

С. М. Злепко¹, Т. А. Чернишова², О. Ю. Азархов², Д. Х. Штофель¹

(¹Україна, Вінниця, Вінницький національний технічний університет

²Україна, Маріуполь, Приазовський державний технічний університет)

УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДУ ВИЯВЛЕННЯ ЦИРКУЛЮЮЧИХ ПУХЛИННИХ КЛІТИН

Анотація. Представлено обґрунтування і суть удосконалення методу виявлення циркулюючих пухлинних клітин в крові людини для ранньої діагностики онкологічних захворювань.

Ключові слова: діагностика, циркулюючі пухлинні клітини, онкомаркер.

Abstract. The paper presents the substantiation and essence of the improvement of the method of detection of circulating tumor cells in human blood for early diagnosis of oncological diseases.

Keywords: diagnosis, circulating tumor cells, tumor marker.

Багато зусиль лікарів спрямовується на зменшення якісних та кількісних помилок в підрахунку циркулюючих пухлинних клітин, а також мінімізацію втрати циркулюючих пухлинних клітин (ЦПК) через надмірний забір крові. Більшість доступних підходів для захоплення ЦПК засновано на відмінностях цих клітин від нормальних клітинних компонентів крові за фізичними і молекулярними характеристиками.

Одним із найінформативніших маркерів прогресування пухлинного процесу є циркулюючі в крові пухлинні клітини, збільшення кількості яких може стати приводом до більш ретельного обстеження пацієнтів в «досимптомному періоді». За результатами рандомізованих досліджень, проведених у декількох клінічних та дослідницьких центрах, визначено вплив підвищення рівня циркулюючих пухлинних клітин на розвиток пухлинної прогресії у разі раку молочної залози, передміхурової залози і колоректального раку, коли було виявлено підвищений рівень циркулюючих пухлинних клітин (від 3 до 400 клітин в зразку) в 75 % випадків. За стандартизованими вимогами до дослідження, зразок вважається позитивним за наявності 3 і більше ЦПК.

Аналіз численних досліджень в цій галузі показав, що наявність циркулюючих пухлинних клітин в крові свідчить про набуття пухлиною принципово нових якостей – інвазивності та здатності до метастазування. Безсумнівно, що циркулюючі пухлинні клітини є не тільки ключем до розуміння біології метастазів, але і прогностичним та предиктивним онкомаркером нового покоління, що відображає ефективність ранньої

діагностики протипухлинного лікування. Одним з найголовніших питань удосконалення методів визначення циркулюючих пухлинних клітин є їх виділення цілісними і неушкодженими для подальшого комп'ютерного аналізу отриманих мікроскопічних зображень.

Вперше ЦПК були виявлені і задокументовані австрійським патологоанатомом Т. Р. Ashworth півтора століття тому. Однак циркулюючі пухлинні клітини до цих пір не мають загально визнаного точного визначення. В даний час прийнято вважати, що ЦПК представляють собою популяцію клітин пухлини, які потрапили в кровоносне русло. Слід підкреслити, що ЦПК є гетерогенною популяцією клітин. Тому в залежності від застосовуваних для їх пошуку та аналізу маркерів можуть спостерігатися значні коливання в їх кількості при визначенні на одних і тих же стадіях розвитку пухлини.

Схема удосконаленого методу виявлення і виділення цілісних неушкоджених циркулюючих пухлинних клітин складається з 10-ти етапів.

1 етап – приготування зразка крові пацієнта для дослідження. Отриманий від пацієнта зразок крові 10 мл (периферична, венозна) змішується для приготування гемолізата із 100 мл дистильованої води. Приготовлений зразок аналізується у гематологічному сканері.

2 етап – виконання цитофорезу – розділення за допомогою центрифуги-генератора сканера зразка крові на плазму та формені елементи крові з вибірконим видаленням патологічно змінених клітин.

3 етап – седиментація частинок в розчині (осідання) або спливання в залежності від густини розчину. Ступінь седиментації визначалась за коефіцієнтом седиментації.

На 4 і 5 етапах виконувались процедури дезагрегації клітин та лізис еритроцитів (протягом 20 хвилин).

Для підвищення ефективності методу після фільтру з порами 5 мкм встановлено додаткові полікарбонатні мембрани з порами 3 мкм, які затримують майже 98 % всіх клітин, які пройшли через фільтри з порами 8 мкм і 5 мкм. Таким чином, фільтраційний модуль складається з трьох, послідовно розміщених, одна за одною площин з мембранами з діаметрами пор 8 мкм, 5 мкм і 3 мкм. Час фільтрації на першій становить 5 хвилин, на 2 і 3-й – по 10 хвилин на кожній.

На 7-10 етапах виконується просушування мембран, їх промивка 96 % розчином спирту або фосфатно-основним буфером, після чого на слотах отриманих мембран виконують цитоморфологічний, цитоімунологічний і молекулярний аналіз.

В результаті удосконалення методу виявлення ЦПК та подальшого оброблення їх зображень було досягнуто підвищення інформативності і достовірності результатів оброблення зображень на полікарбонатних мембранах з порами 8, 5, і 3 мкм; та виявлення 99 % ЦПК, характерних для більшості видів раку.