

Л. И. Нефёдов¹,
докт. мед. наук

А. А. Глазев¹,
канд. биол. наук

Н. Л. Каравай²

С. Э. Савицкий²,
канд. биол. наук

¹НИЛ биохимии биологически активных веществ Гродненского государственного университета им. Я. Купалы, Гродно, Беларусь

²Гродненская областная клиническая больница, Гродно, Беларусь

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ДОБАВЛЕННЫХ АЛКАЛОИДОВ *CHELIDONIUM MAJUS L.* В КРОВИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ КАК НОВЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ РАКА *IN VITRO*

Аналитическое определение алкалоидов *Chelidonium majus L.* в образцах биологического материала проводили методом обращённо-фазной жидкостной хроматографии с детектированием по поглощению и флюоресценции.

Критерием выявления онкологического заболевания у исследуемой группы пациентов *in vitro* являлось зарегистрированное снижение концентрации добавленных алкалоидов *Chelidonium majus L.* в плазме крови по сравнению с контрольной группой.

Рассчитанные диагностические показатели метода определения изменений уровня добавленных алкалоидов *Chelidonium majus L.* и их производных в крови онкологических больных (чувствительность — 91,7 %, специфичность — 83,3 %, эффективность — 88,9 %) позволяют использовать его параметры для разработки новой тест-системы для выявления злокачественных новообразований *in vitro* и контроля за их лечением с последующим её включением в комплекс современных методов выявления рака у онкологических больных.

Злокачественные новообразования занимают одно из первых мест в структуре заболеваемости населения. Статистические данные последних лет свидетельствуют о неуклонном, интенсивном росте заболеваемости и смертности от рака в разных странах.

Усилия онкологов, направленные на борьбу со злокачественными новообразованиями, еще не дают ожидаемого эффекта.

В связи с тем, что более 60 % больных со злокачественными новообразованиями обращаются в медицинские учреждения при распространенном и прогрессирующем процессе, а общепринятые методы диагностики и лечения рака недостаточно эффективны, в структуре смертности населения Республики Бе-

ларусь онкологические заболевания продолжают занимать второе место после сердечно-сосудистых. Это обуславливает актуальность разработки новых и совершенствование существующих методов диагностики и лечения злокачественных новообразований.

Чрезвычайная сложность канцерогенеза и трудности ранней диагностики рака *in vitro* ставят задачу первостепенной важности — выбор оптимального, селективного и высокочувствительного метода ранней диагностики рака у каждого онкологического больного. Это трудная задача, так как для выявления рака применяют современные методы диагностики — иммунологический, биохимический, гистологический, гормональный и другие [1].

Одним из наиболее перспективных подходов к диагностике злокачественных новообразований сегодня во многих странах мира является их выявление на основе применения различных классов природных соединений, обладающих специфической биологической активностью в отношении широкого спектра опухолей.

В экспериментальных моделях и клинических наблюдениях разных типов злокачественных новообразований доказано, что растительные алкалоиды чистотела большого (*Chelidonium majus L.*), а также их синтетические производные селективно накапливаются в опухолевой ткани, ингибируют рост раковых клеток, подавляя в них процессы синтеза белка, и корректируют метаболический дисбаланс, индуцированный опухолью [2–4].

Очевидна перспективность применения растительных алкалоидов *Chelidonium majus L.* в качестве новых критериев для раннего выявления онкологических заболеваний *in vitro*.

Цель работы — проверка метода определения уровня добавленных алкалоидов *Chelidonium majus L.* в крови онкологических больных и здоровых при разработке новой тест-системы для выявления злокачественных новообразований *in vitro*.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы

В исследование включены 12 больных, имевших в начале лечения в онкогематологическом стационаре основные локализации диагностированного онкологического процесса, и 6 здоровых доноров.

Из общего числа онкологических больных солидные опухоли были верифицированы у 5 (рак прямой и ободочной кишки, легкого, мочевого пузыря), системные — у 7 (множественная миелома, хронический лимфолейкоз).

Клинический диагноз у всех больных подтвержден данными морфологических исследований операционного или биопсийного материала. Первичные больные с солидными злокачественными опухолями до исследования не подвергались специальным методам лечения, а у больных с системными новообразованиями период после ранее проведенной химиотерапии составлял не менее 3 нед.

Цельную кровь (5,0 мл) из локтевой вены забирали в гепаринизированные пробирки утром натощак при поступлении больных в стационар или в день взятия донорской крови. 1 мл цельной крови переносили в микроцентрифужные пробирки типа Eppendorf, дополнительно внося 100 мкл препарата NSC-631570 в разведениях, при которых конечная концентрация препарата в пробе составляла, соответственно, 20 мкг/мл.

Контролем служили образцы цельной крови с внесением в нее 100 мкл физиологического раствора. Полученные образцы цельной крови инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 150 мин. Фракцию плазмы крови получали путем центрифугирования образцов крови в течение 15 мин при 1 500 об/мин (центрифуга Biofuge Primo R, Германия) с последующим отделением лейкоцитарного слоя и эритроцитов. После этого фракцию плазмы крови депротеинизировали, смешивая с равным объемом 1 моль/л хлорной кислоты ($HClO_4$), и центрифугировали в течение 20 мин при 12 000 г для получения безбелкового экстракта.

Количественную и качественную идентификацию добавленных алкалоидов *Chelidonium majus L.* проводили на ВЭЖХ системе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США). Алкалоиды разделяли методом обращенно-фазной жидкостной хроматографии на аналитической колонке, заполненной сорбентом Zorbax SB C₁₈ (3,5 мкм), с изократическим элюированием подвижной фазой (0,1 моль/л калий-фосфатный буфер (pH 5,7) + 60 % раствор ацетонитрила), при температуре 30°C и скорости потока подвижной фазы 0,4 мл/мин. Проводили детектирование по поглощению (285 нм) и флуоресценции (280/340 нм). Воспроизводимость метода ± 3,5 %, чувствительность — 5·10⁻⁹ моль.

Результаты исследований обрабатывали с помощью программного пакета Statistica 6,0 методами многомерного статистического исследования и математического моделирования.

Результаты и обсуждение

Критерием для выявления онкологического заболевания у исследуемой группы пациентов *in vitro* являлось зарегистрированное снижение концентрации добавленных алкалоидов *Chelidonium majus L.* в плазме крови по сравнению с контрольной группой в результате селективного связывания алкалоидов *Chelidonium majus L.* и их производных с компонентами плазмы и форменными элементами крови онкологических больных *in vitro*.

Для количественной оценки диагностических возможностей и показателей метода определения изменений уровня добавленных алкалоидов *Chelidonium majus L.* и их производных в крови онкологических больных *in vitro* применяли общепринятые критерии, используемые для оценки чувствительности, специфичности, эффективности и прогностического значения метода [5].

Чувствительность — это показатель частоты получения положительных результатов у пациентов, имеющих данное заболевание. Она определялась способностью метода диагностировать заболевание при обследовании больных пациентов. Чувствительность рассчитывается по формуле (1):

$$\text{Чувствительность} = \frac{\text{ИПР}}{\text{ЛОР} + \text{ИПР}} \times 100, \quad (1)$$

где ИПР — истинно положительные результаты, ЛОР — ложноотрицательные результаты.

При обследовании 12 больных с солидными и системными злокачественными новообразованиями в одном случае получен ложноотрицательный результат. Таким образом, чувствительность метода 91,7 %.

Специфичность — это показатель частоты получения отрицательных результатов у лиц, не страдающих данным заболеванием. Она определялась способностью метода выявлять отсутствие заболевания при обследовании здоровых людей. Специфичность рассчитывается по формуле (2):

$$\text{Специфичность} = \frac{\text{ИОР}}{\text{ЛПР} + \text{ИОР}} \times 100, \quad (2)$$

где ИОР — истинно отрицательные результаты, ЛПР — ложноположительные результаты.

При обследовании 6 здоровых пациентов в одном случае получены ложноположительные результаты. Таким образом, специфичность метода 83,3 %.

Эффективность метода определяется как отношение числа правильных результатов к общему числу выполненных анализов. Эффективность рассчитывается по формуле (3):

$$\text{Эффективность} = \frac{\text{ИПР} + \text{ИОР}}{\text{общее число анализов}} \times 100. \quad (3)$$

Полученные результаты показывают, что эффективность данного метода 88,9 %.

Прогностическое значение положительного результата определяется как количество всех истинно положительных результатов в процентах. Прогностическое значение положительного результата рассчитывается по формуле (4):

$$\text{ПЗ (+)} = \frac{\text{ИПР}}{\text{ИПР} + \text{ЛПР}} \times 100. \quad (4)$$

Прогностическое значение положительного результата для данного метода составляет 91,7 %.

Прогностическое значение отрицательного результата определяется как количество всех истинно отрицательных результатов в процентах. Прогностическое значение отрицательного результата рассчитывается по формуле (5):

$$\text{ПЗ (-)} = \frac{\text{ИОР}}{\text{ИОР} + \text{ЛОР}} \times 100. \quad (5)$$

Прогностическое значение отрицательного результата для данного метода составляет 83,3 %.

Представленные данные указывают на то, что предлагаемый метод характеризуется высокими чувствительностью, специфичностью, эффективностью и прогностическим значением.

Достоинствами разработанного метода являются:

- невысокая себестоимость, включающая затраты на колонку и реагенты для анализа, что позволяет удешевить стоимость анализа;
- простота процедуры выполнения измерений (требует только навыков подготовки образцов биоматериала и работы на жидкостном хроматографе), что позволяет уменьшить систематическую ошибку и погрешность измерений, тем самым повысив правильность и достоверность полученных результатов;
- непродолжительное время анализа, позволяющее сократить длительность процедуры обследования пациента.

Рассчитанные диагностические показатели метода определения изменений уровня добавленных алкалоидов *Chelidonium majus L.* и их производных в крови онкологических больных позволяют использовать его параметры для разработки процедуры раннего выявления злокачественных новообразований *in vitro* с последующим ее включением в комплекс современных методов диагностики рака у онкологических больных.

Заключение

Характеристики метода определения изменений уровня добавленных алкалоидов *Chelidonium majus L.* и их производных в крови онкологических больных (чувствительность — 91,7 %, специфичность — 83,3 %, эффективность — 88,9 %) позволяют использовать полученные результаты для разработки новой тест-системы для выявления злокачественных новообразований *in vitro* и мониторинга эффективности проводимой терапии.

Литература

1. Виторган Ю. Е. Клиническое применение иммунологических тестов при ранних формах рака молочной железы. М., 1988.
2. Nefyodov L. I., Uglanica K. N., Smirnov V. Y. et al. Amino acids and their derivatives in tumour tissue from patients with breast cancer treated with Ukrain. Part VI // Drugs Exp. Clin. Res. 1996. Vol. 22. P. 87–90.
3. Глазев А. А., Нефёдов Л. И. Изменения в аминокислотном пуле плазмы крови у онкологических больных под воздей-

ствием противоопухолевого препарата NSC-631570: возможные подходы к диагностике рака // Биомед. химия. 2008. Т. 54. № 3. С. 289–300.

4. Walterova D. Inhibition of liver alanine aminotransferase activity by some benzophenanthridine alkaloids // J. med. Chem. 1981. Vol. 24. № 9. P. 1100–1103.

5. Маршалл В. Дж. Клиническая биохимия. М.—СПб.: Бином-Невский диалект, 2002.