

СПб ГУЗ «Городской клинический онкологический диспансер»

Е.О. Комлева

**Молекулярные и генетические маркеры  
опухолевого роста**

Санкт-Петербург  
2010

## Оглавление

В издании отражен ряд ключевых вопросов современной диагностики злокачественных новообразований, что ассоциируется с необходимостью использования биохимических и молекулярных технологий. Адекватное применение последних, как правило, позволяет обнаружить наличие у пациента опухолевого процесса в его предклинической стадии, а значит создает надежные предпосылки эффективности проводимой терапии. Рекомендуемые методические подходы зачастую обеспечивают выявление наследственной предрасположенности к некоторым формам рака. Автор обладает многолетним опытом научно-практической работы по рассматриваемой проблематике.

Издание представляет интерес для специалистов клинической лабораторной диагностики, онкологов, а также может быть использовано при подготовке врачей-интернов и клинических ординаторов.

**Автор Е.О. Комлева**

Заведующая клинико-диагностической лаборатории ГКОД СПб,  
врач высшей квалификационной категории.

© Дизайн ООО «Алкор Био», ..... 2010  
© Верстка ООО «АРТ Мириада Вива» ...2010  
© Типография ООО «Светлица» .....2010

Оглавление	3
Список сокращений (тире)	5
Молекулярные маркеры в онкологии.	6
Онкомаркер рака молочной железы (СА 15-3).	12
Методы количественного определения СА 15-3.	14
Цитологическая диагностика РМЖ.	15
Молекулярно-генетическая диагностика рака молочной железы.	16
Онкомаркер рака яичников (СА 125).	30
Молекулярно-генетическая диагностика рака яичников.	34
Онкомаркер колоректального рака (РЭА).	41
Молекулярно-генетическая диагностика колоректального рака.	45
Онкомаркер рака поджелудочной железы (СА 19-9).	54
Молекулярно-генетическая диагностика рака поджелудочной железы.	57
Онкомаркер рака печени и герминогенных опухолей (АФП).	59
Онкомаркер герминогенных и трофобластических опухолей (ХГЧ)	62
Молекулярно-генетическая диагностика герминогенных опухолей.	68
Справочник терминов.	70
Список литературы	73
Приложение 1. Инструкция по применению набора реагентов для количественного иммуноферментного определения ракового антигена (СА 153) в сыворотке и плазме крови человека (ОнкоИФА-СА 153).	76
Приложение 2. Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного определения антигена са 125 в сыворотке крови (ОнкоИФА-СА 125).	88
Приложение 3 Инструкция по применению набора реагентов для количественного иммуноферментного определения раковоэмбрионального антигена (РЭА) в сыворотке крови человека (ОнкоИФА-РЭА)	99

Приложение 4. Инструкция по применению набора реагентов для количественного иммуноферментного определения ракового антигена (СА 19-9) в сыворотке крови человека (ОнкоИФА-СА 19-9).	110
Приложение 5. Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного определения альфафетопротеина в сыворотке крови человека (ИФА-АФП-1).	121
Приложение 6. Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного определения хорионического гонадотропина в сыворотке крови человека (ГонадотропинИФА-ХГЧ-1).	133
Приложение 7. Инструкция по применению набора контрольных материалов «онкомаркеры» для контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований (ПолиКМ-онко).	145

## Список сокращений (тире)

АФП – альфа-фетопротеин  
 VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста  
 ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения  
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
 ИГХ – иммуногистохимический  
 ИПФР – инсулиноподобный фактор роста  
 ИЦХ – иммуноцитохимический  
 КРР – колоректальный рак  
 МСА – муциноподобный раковый антиген  
 ОЖРС – опухоли женской репродуктивной системы  
 ПАУ – полициклические ароматические углеводороды  
 РР – плацентарный белок  
 ПЦР – полимеразная цепная реакция  
 РМЖ – рак молочной железы  
 РПЖ – рак поджелудочной железы  
 РЭА – раково-эмбриональный антиген  
 РЯ – рак яичников  
 CD – кластер дифференцировки  
 СОВА1 – сывороточный онкооварильный альфа-1-глобулин  
 ТИМП-1 – тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ первого типа  
 ТБГ – трофобластический бета-1-гликопротеин  
 TPS – тканевой полипептидный специфический антиген  
 Tu M2-РК – опухолевая (Tu) пируваткиназа (РК) типа M2  
 FISH – флюоресцентная гибридизация in situ  
 ФСГ – фолликулостимулирующий гормон  
 ХГЧ – хорионический гонадотропин человека  
 ЦНС – центральная нервная система

*Светлой памяти  
профессора Семена Абрамовича Холдина посвящается*

«Ранний диагноз рака спасает жизнь».  
Девиз Всемирной организации здравоохранения.

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В ОНКОЛОГИИ.

Биология XX века расшифровала молекулярные основы жизни. Со всей очевидностью продемонстрировано, что любой живой организм состоит из многообразных отдельных форм. Дискретность была признана фундаментальной характеристикой материального мира. Биологическая дискретность опирается на физическую и генетическую прерывности и включает их в «элементарные» структуры – электроны, атомы, молекулы, а также гены и хромосомы.

Тем самым удалось существенно приблизиться к практическому решению ряда принципиальных вопросов, которые связаны с диагностикой и лечением онкологических заболеваний.\*

Показательно, что ранее присуждения Нобелевской премии Кери Мюллису за открытие в 1983 году полимеразной цепной реакции (ПЦР), ученый был награжден премией Международной федерации клинической химии и лабораторной медицины. Действительно, как убеждают теоретические расчеты, использование метода ПЦР позволяет обнаружить наличие у пациента опухолевого очага размером от 0,01 мм<sup>3</sup>.

Применение молекулярно-биологических технологий диагностики в практической онкологии подчинено решению следующих вопросов:

- диагностика наследственных форм рака;
- определение молекулярных маркеров ранних (доклинических) стадий развития опухоли;
- диагностика молекулярных маркеров неблагоприятной динамики заболевания;
- поиск опухолевых маркеров рецидива опухоли, а также выявление микрометастазов;

\* В течение последних лет активно развивается таргетная терапия злокачественных новообразований. Метод основан на инактивации экспрессии генов-мишеней (англ. target – мишень), играющих значимую роль в прогрессировании опухолевого роста.

- определение полиморфных молекулярных маркеров, ассоциирующихся с повышенным риском развития того или иного типа опухоли.

Фундаментальные исследования молекулярных основ канцерогенеза выявили ключевую роль в нем повреждения ДНК. Определены и наиболее значимые в данном случае эффекты:

- хромосомные перестройки и мутации генов;
- онкогенное влияние ряда вирусов, способных взаимодействовать с геном клеток и встраиваться в молекулу ДНК.

Можно считать доказанным, что делеции определенных участков хромосом обуславливают заболевания различными типами рака (Табл.1).

*Таблица 1. Хромосомные мутации при основных злокачественных новообразованиях.*

Опухоль	Хромосомная локализация
Рак желудка	13 q
Рак легких	3 p, 13q, 17 p
Рак молочной железы	1q, 3p, 13q, 17 p, 17 q, 21
Рак мочевого пузыря	9 q, 11 p, 17 p
Рак печени	11 p
Рак поджелудочной железы	11 q
Рак предстательной железы	8 p, 10 q, 16 q, 18 q
Рак толстого кишечника	5 q, 17 p, 18 q
Рак щитовидной железы	1 p
Ретинобластома	13 q, 14
Феохромоцитомы	1 p
Рак яичников	13 q, 12.3

Не менее ясно, что мутации таких генов, как BRCA1, BRCA2, TP53, CHEK2, ATM, PIK3CA, ING4 вовлечены в процесс канцерогенеза при раке молочной железы; HRAS1, CDKN2A, p14ARF/p15 – при раке мочевого пузыря; RNASEL, ELAC2, MSR1, RTEN, KLF6, FEZ1 – при раке

предстательной железы; VHL, TP53, CDKN2A — при раке почки.

К настоящему времени изучено большое количество онкогенов или доминантных раковых генов, активация которых вызывает злокачественную трансформацию клетки. Таким образом, в организме инициируется процесс формирования ее опухолевого клона.

Пристальное внимание уделяют классу антионкогенов или генам-супрессорам, продукты, которых угнетают митотическую активность клеток.

Наиболее мощным и универсальным в данном случае является ген p53, который в геноме человека размещен на коротком плече хромосомы 17 (локус 17p13.1). Соответствующий ген кодирует биосинтез ядерного фосфопротеида, включающего 393 аминокислотных остатков. Указанное соединение выполняет регуляторную роль в цикле клеточного деления. Продукт гена p53 также отвечает за процесс апоптического самоустранения клеток, которые получили критические повреждения ДНК.

Дезорганизация нормального функционирования гена p53 сопряжена с утратой контроля над клеточным циклом. В результате этого клетки, несмотря на имеющиеся повреждения молекулы ДНК, продолжают активно пролиферировать, что приводит к развитию опухоли.

Установлено наличие тесной взаимосвязи между инактивацией гена p53 и возникновением свыше 50 видов различных злокачественных новообразований (рак легкого, молочной железы, шейки матки, яичников и др.).

Ген RB1, который также входит в класс генов-супрессоров опухолевого роста, оказался первым геном, на примере которого Кнудсон еще в 1971 году сформулировал двухударную теорию канцерогенеза.

Согласно ее основному положению, переход нормальной клетки в малигнизированную предопределяет два последовательных мутационных события («удара»).

Первое из них — мутация, приводящая к образованию клетки, для которой повышен риск злокачественной трансформации. Подробные мутации могут возникать как в соматических, так и в половых (герминальных) клетках. При обнаружении носительства герминальной мутации в гене RB1 у плода, риск развития ретинобластомы составляет 90%.

Структурные изменения, затрагивающие ген RB1, и/или потеря гетерозиготности в области 13q14 были обнаружены в таких опухолях, как мелкоклеточный рак легкого (15%), опухоли яичников, молочной железы (25%), что подчеркивает роль RB1 в регуляции нормального функционирования различных тканей.

Наличие тесной взаимосвязи отдельных генов в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и апоптоза клетки, позволяет считать вероятным их комплексное повреждение при канцерогенезе.

В связи с этим неизменно актуальные поиски причинно-следственной связи инактивации соответствующих генов с процессом опухолевой трансформации.

Изучение механизмов возникновения и прогрессирования опухоли позволило охарактеризовать значение не только структурных изменений генов, но и эпигенетических (функциональных) факторов их регуляции (изменения, не влияющие на нуклеотидную последовательность ДНК, но сопряженные с нарушением экспрессии гена).

В результате дисбаланса метилирования наступает блокировка синтеза белковых продуктов, которые необходимы для физиологической регуляции клеточного цикла, процессов дифференцировки и апоптоза. Все это приводит к опухолевой трансформации клетки.

Аномальное метилирование как механизм, приводящий к инактивации генов-супрессоров опухолевого роста, впервые был описан для гена RB1 (Sakai et al., 1991).

Для ДНК-диагностики сейчас используют разнообразные методы скрининга мутаций. Наиболее доступна идентификация мутаций, изменяющих длину амплифицированных фрагментов, которые затем выявляют при электрофоретическом анализе.

Протяженные делеции могут быть выявлены с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) или с использованием дозового блотгибридизационного анализа.

С целью поиска точковых мутаций, небольших делеций и инсерций в исследуемых генах используют множество различных подходов, основанных на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Продукты амплификации являются объектами дальнейшего поиска мутаций с

помощью ряда методов, позволяющих выявлять различные структурные изменения.

Для определения метилирования уже известных последовательностей ДНК применяют метод метилчувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР).

Метилспецифическая полимеразная цепная реакция (МС-ПЦР) — метод, позволяющий оценивать состояние метилирования индивидуальных CpG-островков независимо от расположения сайтов узнавания метилчувствительных рестриктаз и особенностей метилирования аллелей различного родительского происхождения.

Необходимым условием проведения исследований в области функциональной геномики и протеомики является наличие технологий и специализированного оборудования для высокопроизводительного анализа многокомпонентных биологических микрочипов (биочипов). Разработка биочиповой технологии стала возможной благодаря достижениям в области промышленного производства миниатюрных устройств, несущих многие десятки тысяч функциональных элементов на поверхностях ограниченной площади.

Идея использовать для гибридизационного анализа ДНК плоские стеклянные слайды-пластины (ДНК-биочипы) с иммобилизованными на них синтетическими олигонуклеотидами возникла в конце 1980-х — начале 1990-х годов в связи с необходимостью проведения структурного анализа протяженных фрагментов геномной ДНК.

Биочип, как правило, представляет собой слайд-пластинку площадью от 0,1 до 10 см<sup>2</sup> с фиксированными на поверхности в виде индивидуальных микроточек (диаметр от 10 до 500 мкм) образцами биологически активных веществ.

Современные технологии микропечати позволяют наносить на биочип десятки тысяч индивидуальных образцов нуклеиновых кислот, белков, пептидов, полисахаридов, культур клеток, микроорганизмов и т.д. При этом необходимые количества индивидуальных препаратов составляют подчас лишь триллионные и миллиардные доли грамма (пико- и нанограммы).

Практически любые органические субстанции после несложной предварительной обработки могут быть подвергнуты анализу с помощью

биочипа. Для этого экстрагированные из препаратов и химически модифицированные нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) или белки должны быть перенесены на поверхность микрочипа, с тем, чтобы осуществить регистрацию процессов межмолекулярных взаимодействий на поверхности биочипа за счет использования флуоресцентных, хемилюминесцентных или масс-спектрометрических методов.

С известной условностью можно выделить три основных типа ДНК-биочипов используемых в качестве диагностического инструмента:

- биочипы для сравнительного гибридизационного генетического анализа;
- биочипы для исследования уровней экспрессии генов;
- биочип для выявления мутаций и участков (сайтов) полиморфизма.

В настоящее время накоплен огромный объем информации, характеризующие профили экспрессии генов в клетках нормальных тканей, опухолевых клеточных линиях и трансформированных клетках из опухолевых тканей. Полученные данные включают в специализированные базы данных, которые содержат программные средства, помогающие правильно интерпретировать результаты сравнительных анализов профилей экспрессии в контексте известных биохимических схем.

Если принимать во внимание только максимально перспективные исследования, уже сейчас не трудно выделить шесть научно-прикладных направлений молекулярной диагностики в онкологии:

- идентификация маркеров, которые характерны для пусковых стадий опухолевого роста;
- обнаружение генетических нарушений, сигнализирующих о реальности неблагоприятного прогноза развития заболевания и высокой инвазивности опухоли (выраженность ее метастатического потенциала, невосприимчивость к рационально назначаемой терапии, короткая продолжительность достигаемых периодов ремиссии, значительное ухудшение качества жизни пациента);
- диагностика наличия микрометастазов;
- тестирование наследственных форм опухоли;
- поиск маркеров (полиморфных форм ДНК), определяющих эффек-

тивность химиотерапии и назначения таргетных препаратов (таргетная терапия основана на коррекции молекулярных дефектов, которые возникают в геноме клетки при опухолевой трансформации);

- анализ ДНК-полиморфизмов, повышающих риск развития конкретного типа опухоли в группах риска.

Необходимым итогом молекулярно-генетических исследований онкологии должно стать создание комплексной диагностической системы, которая будет эффективно интегрировать новейшие достижения молекулярной генетики, фундаментальной и прикладной биохимии, а также клинической онкологии.

### ОНКОМАРКЕР РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (СА 15-3).

Раковый антиген СА 15-3 — гликопротеиновый эпитоп муцина (молекулярная масса 300 кДа), представитель класса онкофетальных маркеров.

Плод накапливает СА 15-3 в гепатоцитах, а также в клетках эпителия бронхов. Организм взрослого человека характеризует экспрессия данного антигена эпителием протоков молочной железы.

Впервые соединение удалось выделить Куфэ в 1983 году. Биологический период полужизни маркера составляет 7 дней.

Физиологическая концентрация СА 15-3 в сыворотке крови здоровых женщин  $\leq 37$  Ед/мл. В качестве патологического рассматривают показатель  $> 37$  Ед/мл.

Заболевания, при которых комплекс диагностируемых клинико-биохимических нарушений включает повышение концентрации СА 15-3, представлены в ниже (Табл.2).

**Таблица 2. Основные заболевания, сопровождающиеся повышением уровня СА 15-3.**

Локализация злокачественной опухоли	Неопухолевые заболевания
Желудок Молочная железа Органы женской репродуктивной системы (матка, эндометрий, яичники) Печень Поджелудочная железа	ВИЧ-инфекция Доброкачественные опухоли желудочно-кишечного тракта Мастопатия Пневмония, хроническая обструктивная болезнь легких Ревматические заболевания Саркоидоз Туберкулез Хроническая почечная недостаточность

Применительно к диагностике РМЖ, за антигеном СА 15-3 традиционно сохраняется роль маркера выбора, значение которого предопределяет стадия болезни.

В условиях распространенного опухолевого процесса, повышенный уровень данного антигена регистрируется в 85% случаев, тогда как на фоне I – II стадии РМЖ, подобные изменения отмечены лишь у 15% больных.

Достаточно низкая (15–20%) чувствительность теста делает неэффективным его использование в целях ранней диагностики РМЖ и, соответственно, в программах скрининга при указанной патологии.

Вместе с тем, повышенные, особенно сверхвысокие уровни СА 15-3, выявляемые до проведения оперативного вмешательства, обоснованно расцениваются как прогностически неблагоприятный признак.

Известно, что указанные концентрации антигена, как правило, ассоциируются с наличием отдаленных метастазов первичной опухоли. Кроме того, специальные наблюдения свидетельствуют, что повышение уровня СА 15-3 обнаруживается в среднем за 2,7 месяца до появления клинических признаков рецидива РМЖ.

Коэффициент корреляции между уровнем СА 15-3 и массой опухоли молочной железы составляет 75%. Подробная закономерность аргу-



ментирует правомерность осуществления мониторинга эффективности проводимого лечения РМЖ, путем динамического контроля концентрации данного антигена в сыворотке крови.

#### **Показания к проведению количественного определения СА 15-3:**

- Оценка эффективности проводимого лечения РМЖ.
- Мониторинг послеоперационной активности опухолевого процесса с целью раннего (доклинического) выявления рецидива РМЖ.

### **Методы количественного определения СА 15-3.**

- Иммуноферментный;
- Радиоиммунологический;
- Хемилюминесцентный;
- Электрохемилюминесцентный;
- Молекулярно-генетический.

Перспективным должно явиться применение лабораторной панели, которая интегрирует то или иное сочетание рационально (с максимальным учетом специфики клинической ситуации) подобранных маркеров РМЖ.

*МСА (муциноподобный раковый антиген)* — гликопротеид с молекулярной массой 350–500 кДа, принадлежит к семейству MUC-1. Референсное значение уровня МСА = 11 Ед/мл, стадийноспецифический маркер РМЖ.

Чувствительность теста 60,8% (20). При распространенном РМЖ, уровень МСА повышается в 80% случаев (13).

Показано, что рост концентрации МСА, как и СА 15-3, особенно характерен для РМЖ с наличием метастазов в кости скелета.

Повышение уровня опухолевых маркеров МСА и СА-125, диагностированное у больного РМЖ одновременно, квалифицируется как неблагоприятный прогностический фактор на любой стадии опухолевого роста.

Неспецифический подъем уровня МСА может регистрироваться при беременности, мастопатии, а также (как проявление) неопухолевых

заболеваний печени.

*TPS (тканевой полипептидный специфический антиген)* — фрагмент цитокератина 18 — цитоплазматического белка с молекулярной массой 45 кДа.

Цитокератины (кератины) — белки типичные для эпителиальных клеток. В зависимости от изоэлектрической точки и молекулярного веса, им присвоены порядковые номера от 1 до 27. Экспрессия данных белков находится в тесной связи с морфологическим типом эпителия.

Биологический период полужизни TPS 7 дней. Референсное значение уровня = 80 Ед/л. Специфичность теста — 95%, чувствительность — 18–31%. Данный антиген считается одним из показателей агрессивности РМЖ.

Так при условии выраженности последней, даже сравнительно малого размера опухоль, способна обусловить существенное повышение сывороточного уровня TPS.

В этой связи рекомендуется применение данного теста сочетать с определением одного из муцинов (СА 15-3 или МСА), уровень которых более адекватно отражает распространенность опухолевого процесса.

### **Цитологическая диагностика РМЖ.**

Маммологическое цитологическое исследование (ЦИ) представляет собой объективное изучение структуры клеточных элементов в цитологическом препарате, с целью диагностики наличия и характера опухолевых и/или неопухолевых поражений молочной железы.

Как правило, материалом для проведения ЦИ являются следующие субстраты:

- диагностические пунктаты (опухолевидных образований молочной железы, уплотнений в области рубца после хирургических манипуляций на ней, региональных лимфатических узлов);
- отпечатки и соскобы, полученные с эрозированной поверхности соска молочной железы;
- отпечатки с поверхности разрезов и клеточного материала, полученного при эксфолиативной биопсии.



Общепринятым критерием достоверности ЦИ являются результаты сопоставления его данных и данных планового гистологического исследования. Последнее при этом следует расценивать в качестве основополагающих.

Выраженная пролиферация клеточных элементов представляет собой типичный источник гипердиагностических ошибок в условиях имеющих подозрений на РМЖ.

Характерны в этом плане морфологические изменения протоков и долек молочной железы, которые сопутствуют ее фиброаденоме и пролиферирующему аденозу.

Дополнительные затруднения в постановке на основе ЦИ, адекватного (исключающего наличие опухолевой болезни) диагноза, могут в данном случае быть обусловлены укрупнением клеточных ядер.

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.

Не вызывает сомнения тот факт, что носительство мутаций определенных генов сопряжено с увеличением риска РМЖ. Вместе с тем, прогностическая значимость ряда геномных нарушений, нуждается при данной патологии в уточнении (группа генов-кандидатов). Соответствующие представления обобщены в Табл. 3.

*Таблица 3. Гены и гены-кандидаты, связанные с РМЖ.*

Ген	Биологическая роль	Связь с наследственными РМЖ
BRCA1	Контроль пролиферации при повреждении ДНК	Доказана
BRCA2		
p53		
ATM		

CHEK2	Контроль двунитевых разрывов ДНК	Уточняется (гены-кандидаты)
PTEN	Негативный контроль сигнала пролиферации	
CYP1F1, CYP2D6	Метаболизм эстрогенов	
GSTP1, GSTM1, GSTT1	Метаболизм канцерогенов	

Тесная взаимосвязь множества клеточных генов в процессах регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза объясняет роль их гиперэкспрессии в канцерогенезе при РМЖ. Соответствующий комплекс генов включает: BCL2, D94, Cathepsin D, CCNE, CD63, Claudin-7, CRABP2, CTSD, GATA3, GZMH, hTERT, IGF1R, Ki-67, Lactoferrin, Lipocalin2, MDM2, MUS1, MYBL2, Neurosin, PAI1, PAI2, PON1, PS2, Rantes, SIX1, SMARCD2, STMY3, VEGF (24).

Значительное внимание маммологов привлечено сейчас к ферменту теломеразе. Основная функция теломераз состоит в том, что они препятствуют укорочению теломер (концевых участков хромосом) в процессе деления клеток. Тем самым удается обеспечить неограниченных резерв пролиферации последних.

Теломеразная активность присутствует исключительно в половых клетках, постоянных клеточных линиях и опухолях, в противоположность интактным клеткам (23).

Установлено, что для многих типов опухолей в частности, для низкодифференцированных карцином, наличие активной теломеразы коррелирует с неблагоприятным прогнозом (25).

Ген CHEK2 являющийся опухолевым супрессором локализуется на 22-й хромосоме. Мутация 1100 delC гена CHEK2, приводящая к синтезу неполноценного укороченного белка со сниженной экспрессией, встречается в странах Европы с частотой от 0,2% до 1,4% и определяет 2 – 10-кратное увеличение риска РМЖ.

Эта мутация также ассоциируется с повышением риска опухолей других локализаций (яичника, простаты, толстого кишечника, желудка) и может встречаться в «раковых семьях» с отсутствием генетических дефектов BRCA1 и BRCA2.

В Санкт-Петербурге и Ленинградской области рассматриваемая мутация обнаруживается у 2/294 (0,7%) пациентов с раком яичников и у 1/448 (0,2%) здоровых женщин.

Таким образом, в отличие от мутаций в гене BRCA1 и BRCA2, данный аллельный вариант специфически ассоциирован с РМЖ (14/660; 2,1%;  $p < 0.01$ ), но не с раком яичников (2/294; 0,7%;  $p < 0,1$ ).

Факт взаимосвязи особенностей метаболизма эстрогенов и риска возникновения гормонозависимых опухолей, в том числе, РМЖ, считается твердо установленным.

Изучение молекулярных механизмов функционирования эстрогеновых рецепторов привело к пониманию чрезвычайно сложной системы взаимодействия внутри опухолевой клетки различных сигнальных путей.

Последние могут реализоваться не только через эстрогеновые, но и тирозинкиназные рецепторы к эпидермальному фактору роста (EGFR), семейство которых представлено четырьмя рецепторами: EGFR (HER1, ErbB1), HER2 (ErbB2, HER-2/neu), HER3 (ErbB3) и HER4 (ErbB4) (14).

Данные рецепторы участвуют в реализации сигнальных путей, через которые запускаются механизмы клеточного роста и пролиферации.

Ключевыми представителями семейства рецепторов к эпидермальному EGFR при РМЖ являются EGFR (HER1/ErbB1) и HER2 (ErbB2). Гиперэкспрессия рецептора EGFR/HER1 встречается в 27–30% случаев РМЖ, а гиперэкспрессия рецептора HER2 характерна для 20–25% данных больных и ассоциируется с агрессивным фенотипом опухоли.

Взаимодействие эстрогеновых рецепторов с рецепторами EGFR (HER1) и особенно, HER2 (ErbB2) — так называемый crossta LK, считаются причиной развития резистентности клеток опухоли к эндокринной терапии, а также являются важным фактором предикации исхода РМЖ.

Согласно имеющимся предклиническим данным, экспрессия сосудистого эндотелиального фактора роста — VEGF, ассоциирована с гиперэкспрессией HER2 (подчеркнем, что эстроген является потенциальным модулятором неоангиогенеза и повышает экспрессию VEGF в клетках).

Пациентов с опухолями, характеризующимися экспрессией каждого из данных рецепторов, отличает более негативный прогноз, чем на фоне

повышения экспрессии любого из них в отдельности.

Одним из первых тестов, которые удалось внедрить в практику клинической лабораторной онкодиагностики, явилось определение рецепторов стероидных гормонов.

Указанные анализы представляют собой белки, специфически, а также избирательно связывающие соответствующие биологически активные соединения после их проникновения через мембрану клетки.

В настоящее время разработан ряд методов анализа рецепторов стероидных гормонов:

- иммуногистохимический;
- иммуноферментный;
- иммуноцитохимический;
- радиолигандный.

Наиболее важное преимущество ИГХ и ИЦХ анализов определяется возможностью установить с их помощью принадлежность рецепторов именно к опухолевой клетке.

Экспрессия рецепторов эстрогена и прогестерона зависит от типа РМЖ и характеризуется в этой связи следующими уровнями (данные ВОЗ):

- инвазивный дольковый — 60–70% (прогестерон) и 70–95% (эстрогены);
- инвазивный криброзный и муцинозный — 100% (эстрогены);
- инвазивный протоковый — 70–80% (прогестерон и эстрогены).

Проспективные исследования доказывают, что к факторам риска РМЖ у женщин в постменопаузе относят повышение концентрации половых стероидных гормонов (свободного эстрадиола, тестостерона, эстрогена, дегидроэпиандростерона (ДЭА) и ДЭА-сульфата, андростендиона) и снижение сексстероидсвязывающего глобулина, часто ассоциирующимся с избыточной массой тела (абдоминальным ожирением) и гиперинсулинемией.

Влияние эстрогенов на клеточную пролиферацию в тканях молочной железы может реализоваться опосредованно — через факторы роста. Стимулируют пролиферацию и дифференцировку эпителиальных клеток молочной железы и тормозят апоптоз протоонкогены и следующие пептидные

факторы: эпидермальный фактор роста (ЭФР); инсулиноподобные факторы роста типов I и II (ИПФР-I и ИПФР-II); альфа-трансформирующий фактор роста (ТФР-альфа).

Сформулирована также теория генотоксического действия эстрогенов, согласно которой метаболиты эстрадиола проникают в клетку, минуя эстрогеновые рецепторы, связываются с ядерной ДНК и повреждают ее молекулу.

В настоящее время изучено более 100 различных факторов прогноза РМЖ, которые позволяют оценивать биологическое поведение опухоли.

Для оптимального решения таких важных вопросов, как прогноз клинического течения РМЖ, отбор групп пациентов с целью дифференцированного назначения адекватной гормоно- и химиотерапии, большое значение придают ряду маркеров, хорошо выявляемых с помощью иммуногистохимических (ИГХ) методов.

Современная программа комплексного лабораторного ИГХ исследования клеток РМЖ должна интегрировать в себе определение содержания и уровня экспрессии рецепторов стероидных гормонов (эстрогенов, прогестерона, андрогенов), онкобелка HER2 и антигена Ki67.

Среди указанных тестов, определение рецепторов андрогенов, не всегда находит применение на практике. Между тем, они обнаруживаются в 47% случаев РМЖ.

Рецепторы андрогенов выявляются в 69% опухолей, которые имеют рецепторы эстрогенов и прогестерона, а также в 11% опухолей, не содержащих указанные рецепторы.

Почти 1/3 опухолей (32% случаев) лишены при РМЖ всего комплекса рецепторов стероидных гормонов.

Фенотипы РМЖ, характеризующиеся отсутствием рецепторов эстрогенов, обладают более злокачественным течением. Среди соответствующей группы пациентов достоверно чаще диагностируются метастазы первичной опухоли в региональные лимфатические узлы.

Пролиферативная активность клеточных элементов опухоли является одним из основных проявлений биологического поведения опухоли. Считается, что для адекватной оценки данного параметра требуется использовать ИГХ реакцию с антигеном Ki67.

Активная экспрессия антигена Ki67, сочетается с повышенным продуцированием онкобелка HER2 и с одновременно низкой экспрессией клетками РМЖ рецепторов прогестерона.

Последний, в связи с выраженным метастическим потенциалом опухоли, приходится распространить и на ситуацию максимальной экспрессии онкобелка HER2. Соответствующий эффект с одинаковой частотой обнаруживается в различных гормонально-рецепторных фенотипах РМЖ.

Прогностическую роль HER2-позитивного статуса при РМЖ, убедительно подтверждают также данные выживаемости (общей и безрецидивной) группы больных с подобными опухолями. Значения ее характеризующие существенно уступают полученным на фоне HER2 негативного статуса РМЖ (Табл. 4).

**Таблица 4. Выживаемость больных РМЖ, в зависимости от HER2 статуса опухоли.**

HER2 статус опухоли	Выживаемость	
	Общая	Безрецидивная
Позитивный	66,7%	44,4%
Негативный	81,5%	70,4%

Выявление HER2-позитивного РМЖ (гиперэкспрессия онкобелка = 3+) с использованием ИГХ реакции или по амплификации гена HER2 методом FISH, имеет определенные недостатки как методологического, так и технологического плана.

В частности, показано, что первичный HER2 статус РМЖ, не всегда соответствует статусу его метастазов. Подобный эффект объясняют гетерогенностью опухоли.

Кроме того, диагностическую эффективность определения HER2 статуса снижают технологическая вариабельность используемого метода и нередко возникающее разночтение между ИГХ исследованием и FISH анализом. Требуется также учитывать наступающее из-за длительного

архивирования срезов, снижение количества антигена.

В данной связи сейчас предложен новый сывороточный биомаркер РМЖ — внеклеточный фрагмент домена HER2 (HER2 ECD).

Тестирование HER2 ECD ставится серийно, выполняют в режиме реального времени, мониторирует результаты лечения РМЖ, позволяет предсказывать рецидив опухоли, а также способствует оперативной выработке необходимых решений.

Повышение HER2 ECD может быть использовано для идентификации пациенток, отличающихся плохим прогнозом развития РМЖ.

Последние годы разрабатываются подходы к практическому использованию теории опухолевого ангиогенеза в онкоморфологии, а именно определяется степень развития кровеносных сосудов в опухоли, что, в свою очередь часто позволяет предсказать риск развития рецидива и метастазов РМЖ, а также исход заболевания.

Основное внимание уделяется исследованию количества сосудов в РМЖ. Для этого используется ИГХ выявление их с помощью антител против антигенов VII фактора свертывания крови (фактор Виллебранда), CD31, CD34.

На гистологических препаратах, окрашенных с помощью указанных антител, подсчитывают плотность сосудов в опухоли и другие параметры. Кроме того, проводят иммуноморфологические исследования по выявлению ангиогенного сосудистого фактора роста.

Большое значение придают исследованиям, связанным с определением взаимоотношения раковых клеток между собой и с окружающей стромой. Для этого изучают адгезивные свойства клеток с помощью антител против адгезивных молекул, к которым относятся кадгерины, катенины и протеогликан CD44.

Кадгерины — кальцийзависимые белки, осуществляющие связь между клетками. При этом выделяют кадгерины эпителиальные (Е-кадгерины), нервные (N) и плацентарные (P). Внутриклеточно кадгерины взаимодействуют с несколькими белками — катенинами. Среди последних различают альфа-, бета-, гамма-варианты и белок p120.

Взаимодействие кадгеринов и катенинов во многом определяет структуру и функции клеток: полярность, дифференцировку, рост, гибель.

Снижение уровня Е-кадгерина в клетках РМЖ сопровождается снижением дифференцировки, нарастанием инвазивного роста и увеличением метастатического потенциала, что свидетельствует о неблагоприятном прогнозе.

Высокая концентрация Р-кадгеринов в РМЖ резко ухудшает течение заболевания. Считают, что Р-кадгерины являются более информативными маркерами клинического исхода РМЖ, чем изменения в экспрессии Е-кадгерина или катенинов.

Другой аспект этой проблемы — выработка опухолевыми клетками протеолитических ферментов (протеаз), которые приводят к дегенерации клеточного матрикса, что лежит в основе инвазивного роста опухоли и ее метастазирования. Среди таких протеаз наиболее изучены металлопротеиназы и катепсин D. Повышенный уровень этих ферментов отмечен в клетках опухоли, что является одним из критериев ее агрессивности, определяемой стадией заболевания, количеством гормональных рецепторов и гистологическим типом РМЖ.

Анализируя изложенную выше информацию, важно констатировать наличие достаточно большого количества ИГХ маркеров биологического поведения злокачественной опухоли молочной железы.

Вместе с тем, остается актуальной дальнейшая разработка стандартизации всех этапов проведения соответствующих исследований. Разумеется, не могут явиться в этом плане исключением, критерии количественной оценки результатов каждой из применяемых в данном случае реакций.

Правильное формулирование окончательного диагноза является компетенцией гистолога. При этом необходимо руководствоваться действующим вариантом Международной гистологической классификации опухолей и опухолеподобных процессов молочной железы (ВОЗ, 2003).

Протокол гистологического исследования РМЖ должен отразить следующие данные: гистологический тип, степень дифференцировки, размеры опухоли, наличие фокусов рака *in situ* в окружающей ткани, количество исследованных лимфатических узлов, в том числе пораженных метастазами, рецепторный статус опухоли.

### Молекулярно-генетические аспекты наследственного рака молочной железы.

В рамках эпидемиологического подхода к изучению РМЖ, все случаи данной патологии могут быть классифицированы следующим образом:

- спорадический РМЖ, при котором факт заболевания не удается достоверно подтвердить для обеих родителей (около 68% всех случаев РМЖ);
- семейный РМЖ, представляющий собой скопление (исключительно случайное) больных РМЖ внутри одной семьи, как результат воздействия единых для нее и одновременно экзогенных факторов риска канцерогенеза (около 23% всех случаев РМЖ);
- наследственный РМЖ, ассоциирующийся с носительством кровными родственниками (особенно 1-й степени родства) мутаций определенных генов (около 9% всех случаев РМЖ).

Доказана значимость в рассматриваемом аспекте близости родства с пациентом, особенно 1-й его степени (мать, дочь, родная сестра), тогда как 2-я степень родства (двоюродная сестра, бабушка, внучка, тетя, племянница), играет здесь ощутимо меньшую роль.

Классический (аутосомно-доминантный) механизм передачи наследственного РМЖ, предполагает, что образование одиночного мутантного аллеля, достаточно для инициации и/или промоции опухоли.

Этапным достижением в изучении проблемы наследственных форм рака молочной железы и яичников, принято считать открытие генов BRCA (Breast cancer associated gene) — BRCA1 и BRCA2.

В 1994 году был выделен ген BRCA1, который картирован на длинном плече 17-й хромосомы (17q21), затем — в 1996 году удалось клонировать ген BRCA2. Последний размещен на 13-й хромосоме (13q12).

На протяжении дальнейших исследований была получена информация относительно биологической функции, а также структуры рассматриваемых генов.

При этом доказано, что конкретные герминальные мутации генов BRCA1 и BRCA2 способны детерминировать предрасположенность к

РМЖ (также, впрочем, как и раку яичников). В настоящее время идентифицировано более 800 вариантов таких мутаций (главным образом, делеций и инсерций).

С геном BRCA1, согласно оценкам большинства авторов, корректно связывать около 20% случаев наследственного РМЖ.

Носительство женщинами мутаций данного гена сопряжено с наличием следующих рисков:

- вероятность РМЖ = 75%, возраст < 50 лет;
- вероятность РМЖ = 85%–90% к 70 годам;
- вероятность второго новообразования — рака яичников (синдром рака молочной железы и яичников — breast-ovarian cancer syndrome) = 29%, возраст < 50 лет или 44% к 70 годам;
- 4-х кратное увеличение риска рака толстой кишки.

Патогенетическое значение мутаций BRCA1 у мужчин характеризуют следующие результаты наблюдений:

- редкое развитие РМЖ (что, разумеется, не исключает возможность передачи соответствующей мутации по отцовской линии);
- 3-х кратное увеличение риска рака предстательной железы.

В целом РМЖ, обусловленный мутациями BRCA1 характеризуют следующие особенности:

- низкая степень дифференцировки;
- частое отсутствие рецепторов эстрогена и прогестерона;
- гиперэкспрессия гена p53 и циклина E.

С геном BRCA2 связано около 70% случаев наследственного РМЖ. Носительство женщинами мутации данного гена у женщин сопряжено с наличием следующих рисков:

- вероятность РМЖ = 40–70%;
- вероятность рака яичников = 10–35%;
- 4-х кратное увеличение риска карциномы эндометрия;
- 3-х кратное увеличение риска рака поджелудочной железы;
- 2-х кратное увеличение риска рака желудка.

Мужчины-носители мутаций BRCA2 имеют 20% риск заболеть РМЖ, что практически в 200 раз выше, чем в общей их популяции. При этом заболевание диагностируется в более молодом возрасте и отличается



ся высокой летальностью.

В целом РМЖ, обусловленный мутациями BRCA2 характеризуют следующие особенности:

- более высокая (чем в случае BRCA1) степень дифференцировки;
- частое наличие рецепторов эстрогена и прогестерона.

Необходимо подчеркнуть специально, что прогноз у носительниц мутаций BRCA2 более благоприятный, чем в случае нарушения нормального функционирования BRCA1 и при спорадическом РМЖ.

Пик заболеваемости РМЖ у носителей BRCA1 совпадает с возрастом 35–39 лет, а для носителей BRCA2 сдвигается на более поздний период (43–54 года).

Представляется целесообразным проведение медико-генетического консультирования больных РМЖ с косвенными признаками наследственного заболевания:

- возраст обнаружения опухоли < 45 лет;
- наличие РМЖ и/или РЯ у кровных родственников 1–2 степени родства;
- диагностирование первично-множественных опухолей (билатеральный рак молочной железы — БРМЖ и РЯ).

Указанным группам больных показано медико-генетическое обследование и последующий молекулярный анализ с целью выявления носительства повторяющихся «founder»-мутаций в генах BRCA1 (5382 ins C) и BRCA2 (6172 del T).

Благодаря успехам генетики в исследовании проблемы РМЖ, выделен ряд клинических синдромов, включающих как один из компонентов, диагностирование данной опухоли (Табл.5).

**Таблица 5. Синдромы, сопряженные с наследственным раком молочной железы.**

Синдром	Ген	Проявления
Ли-Фраумени	TP53	Саркомы, лейкоз, РМЖ, опухоли головного мозга и аденокарциномы
Коудена	PTEN	РМЖ, рак щитовидной железы, гамартомы/рак кожи, опухоли желудочно-кишечного тракта
Атаксии-телеангиоэктазии	ATM	Лейкоз, лимфомы, РМЖ
ЛинчаII	MSH1/MSH2, PMS1/PMS2	Рак толстой кишки, опухоли яичников, РМЖ
Пейтца-Егерса	LKB11, STK11	Гамартомы желудочно-кишечного тракта, рак яичников и яичка, опухоли поджелудочной железы, РМЖ

Использование молекулярных маркеров при РМЖ позволяет проводить:

- диагностику заболевания;
- оценку степени распространенности неопластического процесса;
- мониторинг эффективности лечения;
- клинический прогноз;
- оценку резистентности к химиотерапии.

Исследована частота различных молекулярных повреждений, характерных для РМЖ. Данные повреждения могут быть систематизированы с учетом разрушаемых при этом клеточных процессов. Ниже (Табл. 6–9) приведена частота, с которой возникают молекулярные повреждения, сгруппированные согласно цитофизиологическому принципу.

**Таблица 6. Молекулярные признаки рака молочной железы. Изменения рецепторов пролиферации дифференцировки.**

Ген	Характер изменения	Частота%
EGFR	Гиперэкспрессия	20–40
HER2/neu	Гиперэкспрессия	20–40
FGF1	Гиперэкспрессия	20–30
ER	Гиперметилование	50
PR	Гиперметилование	40

**Таблица 7. Молекулярные признаки рака молочной железы. Регуляторы клеточного цикла.**

Ген	Характер изменения	Частота%
K-ras	Мутации	5–10
c-src	Гиперэкспрессия	50–70
14-3-3δ	Гиперметилование	90
pRB1	Инактивация	20
Циклин Д	Гиперэкспрессия	35–45
c-myc	Амплификация	5–20

**Таблица 8. Молекулярные признаки рака молочной железы. Регуляторы апоптоза.**

Ген	Характер изменения	Частота%
p53	Мутации	30–40
Bcl-2	Гиперэкспрессия	30–45

**Таблица 9. Молекулярные признаки рака молочной железы. Молекулы адгезии и протеазы.**

Ген	Характер изменения	Частота%
Е-кадгерин	Снижение экспрессии	60–70
Катепсин-D	Гиперэкспрессия	20–24
MMPs	Гиперэкспрессия	20–80

В отличие от классических опухолевых маркеров, определяемых в сыворотке крови, клеточные или тканевые маркеры типичны непосредственно в опухолевой ткани. Большинство из них характеризуют определенные биологические особенности опухоли, специфику ее поведения и регуляции, например гормональную чувствительность или склонность к инвазии и метастазированию. Основное значение таких маркеров заключается в том, что они характеризуют биологические особенности каждой конкретной опухоли и помогают при прогнозировании и индивидуализации лекарственного лечения заболевания.

**Таблица 10. Основные группы тканевых/клеточных прогностических маркеров при раке молочной железы.**

Биологическое значение	Группа маркеров
Показатели эндокринной гормональной чувствительности	Рецепторы стероидных гормонов: РЭ, РП, РА
Показатели активности ауто- и паракринной регуляции пролиферации	Факторы роста и их рецепторы: РЭФР и его лиганды – ЭФР, α-ТФР, HER2/neu и другие рецепторы семейства c-erb. Рецепторы ИФР-1. Рецепторы соматостатина
	Ферменты и белки, участвующие в передаче митогенных сигналов: Рецепторные тирозинкиназы, МАП-киназы, ФИЗК, Akt-1, Crb2 и др.



Показатели метастатической и инвазивной активности	Компоненты системы активации плазминогена: иРА, РАН, рецептор иРА, РА1-2, tРА
	Металлопротеазы и их ингибиторы
	Другие протеолитические ферменты (катепсин D, стрелизин и др.)
	Интегрины
Показатели неоангиогенеза	VEGFA и его рецепторы flt-1 и flk-1
	VEGFC и его рецептор flt-4
	Другие ангиогенные факторы: FGF, тимидинфосфорилаза, TNF, интерлейкины и др.
Регуляторы апоптоза	Супрессорные гены и их продукты: p53, ген ретинобластомы
	Проапоптотические факторы: bcl-2, Fas-рецепторы и Fas-лиганд
Показатели, не имеющие четко выраженной биологической роли при РМЖ	Белок pS2
	Онкогены: c-myc, int-2 и др.

## ОНКОМАРКЕР РАКА ЯИЧНИКОВ (CA125).

Открытый в 1981 г. R. Bast CA125 представляет собой онкофетальный белок, рассматриваемый как высокомолекулярный гликопротеин. Период его биологической полужизни составляет 4–5 суток.

Установлено, что CA125 имеет две формы – свободную и мембраносвязанную. Последняя из них локализована на поверхности эпителия некоторых органов – бронхов, молочных и потовых желез, матки (шейка), маточных труб, яичников, а также – ткани эндометрия.

Свободную форму CA125 содержит ряд биологических жидкостей – бронхо-альвеолярная, внутрибрюшинная, плевральная, слюнная. Кроме того, ее обнаружили в грудном молоке и влагалищном секрете.

Клиническая интерпретация результатов исследования уровня CA125 осуществляется с использованием специальной шкалы (Табл.11)

**Таблица 11. Диагностическая шкала уровней CA125 в сыворотке крови.**

Квалификационный вариант уровня		
референсный	пограничный (серая зона)	патологический
Аналитический вариант уровня (Ед/мл)		
≤35	>35–65	>65

Уровень CA125 ≤ 35 Ед/мл принято считать референсным, поскольку он регистрируется в сыворотке крови 95% здоровых женщин\*.

Максимальное значение диапазона концентраций, определяемых у последних и при доброкачественных новообразованиях яичников составляет 65 Ед/мл. Таким образом, интервал >35–65 Ед/мл должен рассматриваться в качестве серой зоны (cut-off) онкомаркера CA125, которая непосредственно граничит с его патологическим (>65 Ед/мл) уровнем.

Выраженная гетерогенность концентрирования CA125 в тканях организма объясняет природу повышения его уровня не только при РЯ, но и на фоне достаточно широкого круга других заболеваний, а также патологических состояний:

- воспалительная патология органов брюшной полости (асцит различной этиологии, перитонит, острый панкреатит, почечная недостаточность, рак тела и шейки матки, гепатит и цирроз печени, эндометриоз II и III стадии);
- злокачественные негинекологические опухоли железистого генеза (легких и плевры, молочной железы, мочеточников, желудочно-кишечного тракта).

У женщин репродуктивного возраста основным продуцентом CA125 являются клетки эндометрия, что объясняет наличие зависимых от фазы менструального цикла колебаний онкомаркера. Нормальный диапазон последних может достигать 100–300 Ед/мл. С этих же позиций логично интерпретировать прирост уровня CA125 в сыворотке крови беременных (для I триместра в среднем до 85 Ед/мл).

\* Для радикально оперированных по поводу РЯ больных референсный уровень маркера снижается до 5 Ед/мл (эффект удаления матки).

Что касается патологических состояний, подъем (элевация) СА125 может быть связан с проявлением некоторых его свойств положительно-го белка острой фазы. Применительно к коллагенозам справедливость данного предположения, разумеется, наиболее очевидна.

Для выявления зависимости уровня СА125 от клинического течения РЯ, исследование сыворотки крови можно проводить в следующем режиме:

- до начала курса химиотерапии и/или хирургического лечения;
- после завершения лечения (с учётом продолжительности периода полужизни маркера);
- каждые 3 месяца в течение 2-х лет после химиотерапии и/или оперативного вмешательства;
- каждые 6 месяцев в течение следующего года.

Для больных РЯ факт монотонного роста уровня СА125 является доказательством прогрессирования заболевания (Табл. 12).

**Таблица 12. Уровень СА125, СА19-9 в сыворотке крови больных различными новообразованиями яичников (12).**

Клинический диагноз	Уровень онкомаркеров, Ед/мл	
	СА125 $P < 0,01$	СА 19-9 $P < 0,05$
Здоровые женщины (контроль)	8,9±2,2	5,4±1,2
Злокачественная опухоль I–II стадия III–IV стадия	88,2±22,1 409,2±30,1	85,9±31,4 199,3±55,5
Пограничная опухоль	68,7±19,7	57,5±14,5
Доброкачественная опухоль	20,3±2,8*	16,7±3,8

Уровень изученных онкомаркеров достоверно повышается уже на ранней стадии РЯ (2–6 – кратное увеличение, по сравнению с контролем). В дальнейшем динамика СА125 определяется тяжестью заболевания. Ее характеризует прирост СА125 от 82,6% (I–II стадия РЯ) – до 6,1% (III–IV стадия).

При серозном РЯ, для которого СА125 является наиболее информативным, по сравнению с другими гистологическими типами опухолей маркером, его уровень повышен примерно у 50% или практически у 100% больных (I–II или III–IV стадии РЯ соответственно). Вовлечение в патологический процесс мезотелия брюшины, сопряжено с возможностью диагностировать при асцитных формах РЯ уровни СА125, составляющие до 20000 Ед/мл (4).

РЯ представляет собой патологию с высокой социальной значимостью, тем более важно, что использование рассматриваемого теста закономерно способствует:

- выявлению групп высокого риска в отношении РЯ;
- проведению первичной дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных неоплазий органов малого таза;
- современному диагностированию РЯ (уровень СА125 начинает увеличиваться за 1,5–2,5 года до клинического проявления РЯ (13));
- прогнозированию течения заболевания с момента формулирования окончательного диагноза и длительности периода выживаемости пациентов;
- оценке адекватности проводимой терапии (эффективное лечение РЯ положительно коррелирует с достоверным снижением уровня СА125).

В порядке детализации сформулированного выше положения обратимся к одной из рекомендаций Международного противоракового союза по гинекологическому раку. В ней обозначен критериальный показатель адекватности ответа организма пациента на химиотерапию РЯ.

Уровень СА125 по сравнению с исходным (до начала лечения), должен снижаться в 2 раза и более. Оптимально, чтобы подобный эффект продолжал регистрироваться на протяжении 28 дней.

Рационально построенная программа терапии РЯ неизменно предусматривает мониторинг состояния прошедших лечение больных. Одним из элементов подобного мониторинга является контроль уровня онкомаркеров.

Диагностирование его роста принято трактовать как настораживающий фактор в плане вероятности рецидивирования опухоли (Табл. 13).

**Таблица 13. Уровень CA125; CA19-9 в сыворотке крови при различном течении пограничных опухолей яичников (12).**

Опухолевый маркер, Ед/ мл	Гистотип опухоли			
	серозный		муцинозный	
	ремиссия	рецидив	ремиссия	рецидив
CA125	15,9±2,6	310±25,9	8,4±1,6	45,6±12,7
CA19—9	11,9±2,3	110,5±27,8	5,5±1,5	63,5±22,6

Клинические наблюдения свидетельствуют: возобновление элевации уровня С125 и наличие рецидива РЯ дистанцирует промежуток времени, равный в среднем 3,5±0,5 мес.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА ЯИЧНИКОВ.

Подавляющее большинство эпителиальных опухолей яичника возникает спорадически, тогда как о генетически-ассоциированном увеличении риска РЯ, корректно говорить только в 5—10% случаев. Изучены, по крайней мере, 5 синдромов, которые связаны с наличием предрасположенности к РЯ.

**Органоспецифический (семейный) РЯ.** Риск развития заболевания зависит от числа ближайших родственников, которые были поражены РЯ ранее.

В семьях с единственным его случаем у родственницы 1-й степени родства (мать, дочь или родная сестра), риск заболеть РЯ, двух-трехкратно превышает общепопуляционный, то есть составляет 4—5%.

Для семей, где РЯ диагностирован у единственной кровной родственницы и у одной родственницы 2-й степени родства (бабушка, внучка, двоюродная сестра, тетя или племянница), анализируемый риск увеличивается в 4—5 раз, если сравнивать его с популяционным и соответствует 7%.

В семьях, где две родственницы 1-й степени родства заболевают РЯ, рискует пострадать уже каждая вторая женщина, то есть риск увеличивается до 50%.

**Семейный рак молочной железы РЯ.** В таких семьях ближайшие родственницы заболевают раком молочной железы в молодом возрасте (< 50 лет) и РЯ. Степень риска онкопатологии указанных локализаций предопределяется числом заболевших родственников различной степени родства. Кроме того, среди женщин ранее заболевших раком молочной железы или РЯ, вероятность последующего (метахронного) развития второй опухоли (билатеральный рак) в 2—4 раза выше, чем среднепопуляционный.

**Синдром Линча II.** При данном синдроме в семьях среди ближайших родственников прослеживается заболеваемость аденокарциномами различных локализаций, преимущественно колоректальным раком, раком молочной железы, эндометрия и РЯ. Риск возникновения аденокарциномы среди членов семьи также зависит от числа заболевших родственников, и он в любом случае в 2 раза выше, чем в популяции. Считается, что данный синдром обусловлен носительством мутаций в генах MSH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2.

**Синдром Пейтца — Егерса.** В составе которого РЯ представлен опухолью с гранулезоклеточным гистологическим строением ткани. Обусловлен носительством герминальных мутаций гена LKB11.

**Синдром дисгенезии гонад с ХУ-карнотипом,** на фоне которого часто формируются герминальные и стромальные опухоли.

Закономерный интерес вызывают семьи, аккумулирующие наиболее распространенные опухоли женской репродуктивной системы (ОЖРС). Результаты специальных исследований соответствующих родословных демонстрируют явную генетическую обусловленность семейного накопления РЯ и рака молочной железы.

Речь идет о наличии высокого коэффициента генетической корреляции между РЯ и раком молочной железы (72% общих генов, которые детерминируют одновременную предрасположенность к двум опухолям различной локализации).

Имеется основание утверждать, что в основе подобного эффекта лежат общие генетические факторы подверженности или тесное сцепление

генов, ответственных за развитие этих неоплазм.

Одним из несомненно рубежных достижений в области изучения наследственного рака яичников (рака молочной железы), явилось открытие генов BRCA1 (локализован в хромосоме 17q12–21) и BRCA2 (хромосома 13q12–13).

Носительство мутаций в генах BRCA сопряжено с накоплением риска развития РЯ в течение жизни, оцениваемого как 40–60% (ген BRCA1) или — до 20% (ген BRCA2).

РЯ, обусловленный нарушением нормального функционирования гена BRCA1, относится к серозному типу, диагностируется в более раннем возрасте, по сравнению с BRCA2-ассоциированным и, особенно, возникшим спорадически.

Объективно доказанный факт наличие наследственного РЯ, привлекает к себе внимание онкологов и по причине важности формирования групп риска (оптимальная методика их структурирования вытекает непосредственно из информации приведенной нами выше). Успехи молекулярной генетики позволили разработать технологию прямого обнаружения случаев наследственного РЯ (Табл. 14).

**Таблица 14. Молекулярно-генетические детерминанты наследственного рака яичников.**

Синдромы	Гены	Хромосомная локализация генов	Удельная встречаемость в пределах синдрома, %
Рак молочной железы и яичников	BRCA1 BRCA2	17q21 13q12	75–90 10–25
Наследственный непиллозный рак толстой кишки (HNPCC)	MSH2 MSH1 MSH6 PMS2 PMS1	2p22-p21 3p21 2p16-p15 7p22 2q31-q38	30–35 30–35 5 < 5 < 1

Профилактическая роль именно такого подхода к проблеме наследственного рака яичников (рака молочной железы) четко ассоциируется с эффективностью комплексного использования клинико-генеалогического анализа, медико-генетического консультирования и ДНК-тестирования.

Установлено, что при РЯ, как и в случае других опухолей, накапливаются генетические повреждения, которые лежат в основе прогрессивной трансформации доброкачественных или пограничных опухолей в злокачественные карциномы.

Одним из наиболее изученных при РЯ онкогенов, активацию которого с достаточной частотой обнаруживают в данной опухоли, является ген K-ras (12p). Его продукт относится к классу G-белков и участвует в самых разнообразных реакциях регуляции клеточного цикла.

Мутации в K-ras более характерны для муцинозных, чем для немучинозных РЯ, что аргументирует перспективность применения данного теста при дифференциальной диагностики.

Другой представитель класса онкогенов значение которого подчеркивается для РЯ-с-erbB2/HER2. Он кодирует мембранный гликопротеид семейства рецепторов эпидермального фактора.

Амплификацию и/или гиперэкспрессию данного гена можно наблюдать в 10–50% случаев РЯ. Существует точка зрения, согласно которой активация с-erbB2/HER2 указывает на неблагоприятный прогноз течения РЯ. Однако итоговая практическая ценность с-erbB2/HER2-тестирования еще нуждается в дальнейшем изучении.

Можно считать доказанным участие в патогенезе РЯ и супрессорного гена p53. В геноме человека данный ген размещен на коротком плече хромосомы 17 (локус 17p13.1).

Мутация гена p53 не дает реализоваться апоптозу и способствует опухолевому росту, усилению процесса неоангиогенеза, нарушению внутриклеточных механизмов регуляции клеточного цикла, участвует наряду с другими онкогенами в обеспечении инвазии и метастазирования, в поддержании состояния генетической нестабильности, увеличивающей вероятность иных онкологических мутаций.

Инактивацию p53 отмечают примерно в половине случаев РЯ, тогда

как для пограничных опухолей соответствующий эффект не столь характерен. Вместе с тем, обнаружение мутаций в гене p53 обычно сочетается с клеточной атипией, ростом митотической активности, микроинвазией опухоли, а также с наличием признаков карциномы яичников.

Участие p53 в репарации ДНК и апоптозе предполагает возможную роль его мутаций в развитии резистентности к химиотерапевтическим препаратам.

Причастность генов апоптоза к патогенезу РЯ не ограничивается p53, так как он вступает в сложное взаимодействие с рядом других генов, например, с bcl-2.

Во всяком случае, его гиперэкспрессия и клинический прогноз РЯ коррелируют между собой.

Получены также данные, которые иллюстрируют взаимосвязь мутаций в ряде генов и конкретных гистологических типов РЯ (Табл. 15).

**Таблица 15. Обусловленность гистотипов рака яичников генетическими мутациями.**

Серозный 55 – 60%	Эндометриоидный 15%	Мезонефроидный 5 – 10%	Муцинозный < 5%
Мутируемые гены			
p53, BRCA, K-ras	p53, B-catenin, PTEN	p53	

Полиморфными принято называть гены, представленные в популяции несколькими разновидностями — аллелями, что обуславливает феномен внутривидового разброса наследуемых признаков.

Влияние генетических полиморфизмов на фенотип выражено значительно менее отчетливо, чем соответствующие последствия мутаций, а немалое число полиморфной (нормальной) вариабельности генов даже не сопровождается видимыми функциональными изменениями.

Наиболее принципиальным является тот факт, что нередко аллельный полиморфизм может претендовать исключительно на значение ДНК-маркера тех реальных изменений в генах, которые действительно

предрасполагают к развитию определенного заболевания.

Однако, наличие даже подобной взаимосвязи, необходимо рассматривать как важный элемент создания предрасположенности к развитию ряда гормонозависимых опухолей.

Известно, что эстрогены (как в гонадах, так и внегонадно) образуются из андрогенных предшественников под влиянием фермента ароматазы (эстрогенсинтетазы). Последняя принадлежит к XIX классу суперсемейства цитохромов p450 и кодируется геном CYP19.

Установлено, что его полиморфизм может быть ассоциирован с повышенным риском рака молочной железы. Однако с учетом несомненного наличия взаимосвязи внутри группы гормонозависимых опухолей, указанный вывод с определенной степенью корректности логично экстраполировать на РЯ.

К сожалению, в доступной нам литературе сообщений о результатах молекулярно-генетических исследований, предпринятых в рассматриваемом направлении, обнаружить не удалось.

Самостоятельный интерес представляют гены, ответственные за метаболизм эндогенных и экзогенных канцерогенов.

Одним из наиболее важных классов химических канцерогенов, широко распространенных в окружающей среде, является группа полициклических ароматических углеводородов (ПАУ).

Ключевые реакции биотрансформации ПАУ контролируют ферменты групп цитохрома p450 (CYP2E1, CYP1A1 и CYP2D6), хиноноксиредуктаза (NQ1), глутатион-S-трансфераза (GSTP1, GSTM1, GSTT1) и эпоксид-гидроксилаза (EPH-alpha).

Полиморфизм данных генов формирует риск целого ряда новообразований, хотя применительно именно к РЯ, они пока не изучены.

Вместе с тем соответствующая область онкринологии нуждается в активной разработке. Влияние ферментов метаболизма экзогенных канцерогенов на органы женской репродуктивной системы (ОЖРС), может быть объяснимо не только активацией/детоксикацией указанных вредных веществ, но и влиянием их на процессы биотрансформации стероидных гормонов.

Заслуживает быть упомянутым в данном аспекте катехол-О-ме-



тилтрансфераза (КОМТ), способствующая инактивации (метаксилированию) катехол-эстрогенов. Последние являются эстрогенными дериватами, некоторые метаболиты которых обладают канцерогенным и ДНК-повреждающим действием.

Снижение активности КОМТ сопряжено с дезорганизацией процесса инактивации катехолэстрогенов, что в свою очередь обуславливает их кумуляцию.

Таким образом, закономерен интерес к анализу полиморфизма гена КОМТ как возможного фактора риска развития новообразований гормонозависимых тканей. Необходимо подчеркнуть, что иногда связь с носительством определенного КОМТ-генотипа свойственна больным лишь с определенной формой неоплазмы, например, с муцинозной карциномой при РЯ.

Среди эпигенетических изменений, которые имеют отношение к обсуждаемому вопросу, наибольшего внимания заслуживают сведения о теломеразе (ферменте, препятствующем укорочению концевых участков хромосом и обеспечивающем «долгожительство» стареющих, нормальных и опухолевых клеток).

Теломеразная активность обнаруживается в 92% карцином яичника, в 17% пограничных опухолей и не выявляется в аденомах. При этом показано, что максимальная активность данного фермента отличает низкодифференцированные карциномы.

Практически при всех РЯ обнаруживают наличие делеций участков хромосом, которые отражают инактивацию локализованных на них генов-супрессоров. Указанные делеции могут в данном случае носить как обширный (например, утрата хромосомы 17), так и ограниченный характер (в частности, потеря терминального участка короткого плеча хромосомы 1). Наиболее типичными являются делеции следующих хромосом: 1, 3, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 17, 22 и X. Благодаря применению иммуоферментного и радиоиммунологического методов анализа к настоящему времени при РЯ удалось изучить диагностическую ценность около 30 различных опухолеассоциированных белков РЭА, СА125, трофобластический бета-гликопротеин — ТБГ, ферритин.

Однако подавляющее большинство из них с постоянством демонст-

рирует низкую специфичность в качестве маркеров РЯ.

Среди последних разработок в данной области обнадеживает использование сывороточного онкоовариального альфа-1-глобулина (СОВА1). Референтный уровень маркера  $\leq 0,05$  мг/л (зависимость от пола отсутствует).

Концентрация СОВА1, составляющая 1–10 мг/л, обнаруживается в сыворотке крови 75% больных РЯ и в 25% случаев при доброкачественных опухолях яичников; раке ряда локализаций (желудок, кишечник, матка).

Важно также подчеркнуть, что комбинированное использование при РЯ двух тестов — общий ингибин (гетеродимерный гормон белковой природы, супрессирующий секрецию ФСГ гипофизом) + СА125 позволяет диагностировать до 95% всех гистологических типов данной опухоли.

Таким образом, исследования по разработке технологии скрининга РЯ продолжаются, что предполагает внедрение в практику его лабораторной диагностики более новых, а главное — эффективных инструментов.

Необходимо подчеркнуть очевидное: наиболее существенные из успехов превентивной онкогинекологии лимитирует степень адекватности нашего понимания патогенетических механизмов соответствующей группы заболеваний.

## ОНКОМАРКЕР КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА (РЭА).

Раково-эмбриональный антиген — гликопротеин с молекулярной массой 180 кДа, относящийся к классу онкофетальных белков. Биосинтез РЭА в организме плода осуществляют клетки слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта и в постнатальный период активность данного процесса резко снижается. Биологический период полужизни РЭА составляет 14 дней. Верхняя граница нормального уровня РЭА в сыворотке крови некурящих  $< 5$  нг/мл; для лиц, злоупотребляющих алкоголем и курильщиков — до 10 нг/мл.

Заболевания, при которых комплекс диагностируемых клинико-биохимических нарушений включает рост концентрации РЭА, представлены в Табл. 16.

**Таблица 16. Основные заболевания, сопровождающиеся повышенным уровнем раково-эмбрионального антигена.**

Локализация злокачественной опухоли	Чувствительность, %	Неопухолевые	Чувствительность, %
Толстая кишка	70–80	Эмфизема легких	20–50
Поджелудочная железа	60–90	Язвенный колит	10–25
Трахея, бронхи, легкие	65–75	Алкогольный цирроз печени	25–70
Желудок	30–60	Холецистит	6–20
Молочная железа	50–65	Полип прямой кишки	4–20
Яичники	40	Доброкачественная опухоль молочной железы	4–15
Карциномы других локализаций	20–50		

РЭА, в силу его низкой специфичности, не используют при проведении скрининговых исследований для выявления колоректального рака. Однако, результаты мониторинга уровня антигена в сыворотке крови должны учитываться при оценке адекватности проводимой терапии, а также оказывают влияние на прогноз течения заболевания и раннего выявления метастазов.

Кроме того, если к концу 6-ой недели после радикальной операции, концентрация РЭА не снижается до уровня нормы, следует предполагать наличие метастазов. Подъем значений теста более чем на 100% по сравнению с предыдущим его уровнем, как правило, наблюдается при генерализации процесса и наличии метастазов в печени. Исследование концентрации РЭА позволяет диагностировать рецидив болезни раньше клинических ее проявлений приблизительно на 3–5 месяцев, а по некоторым данным даже на 12 месяцев.

В настоящее время для определения концентрации РЭА в сыворотке крови успешно применяют различные варианты иммуноферментного и иммунофлуоресцентного методов.

Основной принцип указанных технологий сводится к использованию специфических моноклональных антител двух типов к различным эпитопам молекулы РЭА.

Один тип антител, как правило, иммобилизован на твердой фазе (полистироловый шарик, дно полистирольной пробирки или лунки — в случае использования плащечных вариантов метода). Второй тип антител конъюгирован с ферментом или люминофором.

В ходе иммунологической реакции образуется комплекс из трех компонентов (sandwich) — антиген из образца сыворотки крови (онкомаркер) одновременно связывается с антителом, конъюгированным с ферментом или люминофором и антителом, иммобилизованным на твердой фазе.

Избыток неконъюгированных антител, после завершения иммунологической реакции, удаляют (стадия промывания). Затем проводят ферментативную реакцию, катализируемую ферментной частью молекулы конъюгата. Субстратом данной реакции служит хромоген, который в ходе реакции образует окрашенное вещество. Интенсивность окрашивания прямо пропорционально количеству РЭА в образце.

Приведем некоторые рекомендации, следование которым позволит оптимально использовать тестирование уровня РЭА при КРР:

- уровень РЭА целесообразно определять в качестве дополнительного метода диагностики стадии злокачественного процесса;
- динамика результатов исследования создаёт возможность оценить адекватность проводимого лечения, а также оказывает влияние на прогноз течения заболевания;
- мониторинг уровня РЭА в послеоперационный период должен базироваться не только на его значении в качестве классического онкомаркера, но и учитывать современное понимание РЭА как реактанта острой фазы воспаления;
- повышение чувствительности теста может быть достигнуто в результате сочетанного исследования нескольких онкомаркеров РЭА, СА-19-9, СА 72-4. В данном случае технологично использо-



вать паспорт исследования на маркеры КРР.

Публикуемая далее его форма, может быть принята за основу для оптимизации соответствующей работы в случае неоплазм и других локализаций.

#### Форма рекомендуемая

Разработана клинико-диагностической лабораторией Городского клинического онкологического диспансера г. Санкт-Петербурга под руководством заведующей лабораторией Комлевой Е.О.

### ЛАБОРАТОРНЫЙ ПАСПОРТ ИССЛЕДОВАНИЙ НА МАРКЕРЫ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

1. Лечебное учреждение \_\_\_\_\_
2. Фамилия \_\_\_\_\_ Имя \_\_\_\_\_ Отчество \_\_\_\_\_ больного
3. Возраст \_\_\_\_\_ лет
4. Диагноз \_\_\_\_\_ стадия I, II, III, IV (нужное подчеркнуть),  
гистологический тип опухоли \_\_\_\_\_
5. Проведенное лечение \_\_\_\_\_

**Таблица 1. Динамика уровня онкомаркеров**

Дата исследования	Название ОМ, уровни (Ед/мл)					
	РЭА		СА19-9		СА72-4	
	РВ	ЛВ	РВ	ЛВ	РВ	ЛВ

Условные обозначения: ОМ – онкомаркер

РВ – референсная величина

ЛВ – лабораторная величина

**Таблица 2. Лабораторный отчет о проведенных исследованиях.**

Название ОМ	Дата тестирования	Метод определения	Основное оборудование	Тест-система	Подпись врача КДЛ
РЭА					
СА19-9					
СА72-4					

Модифицируемыми факторами риска КРР считают: злоупотребление алкоголем, ряд диетических погрешностей (избыточная доля в рационе жиров животного происхождения, при одновременном дефиците пищевых волокон), низкий уровень физической активности. Немодифицируемыми факторами риска являются: возраст, а также генетическая и семейная предрасположенность к РТК.

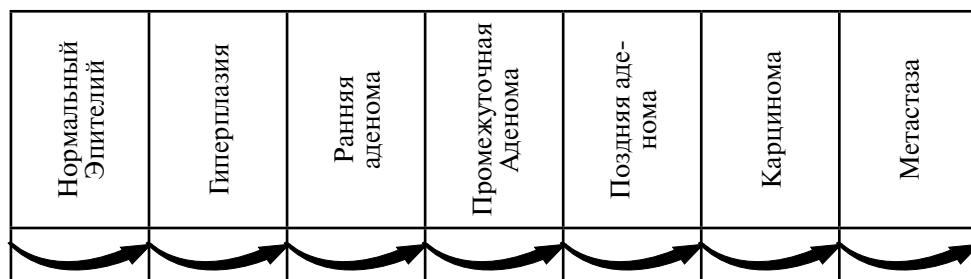
### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА.

Использование молекулярных методов при КРР является перспективным направлением клинической лабораторной диагностики указанной патологии.

КРР представляет собой практически идеальную модель для изучения фундаментальных проблем канцерогенеза. При соответствующей неоплазме с максимальной четкостью удастся отслеживать стадийность морфологической трансформации клеток кишечного эпителия. Подобная трансформация, в свою очередь, детерминирована стадийностью накопления КРР-ассоциированных мутаций в онкогенах и супрессорных генах.

Интересно, что знаком признания концепции автора, предложившего впервые генетическую модель колоректального туморогенеза – Берта Фогельштейна (Bert Vogelstein, 1990), явилось эпонимическое обозначение приводимой далее схемы, как фогельграммы (Рис.1).

**Рисунок 1. Стадийность молекулярного патогенеза рака толстой кишки.**



Вместе с тем, проблема патогенеза КРР, а тем более канцерогенеза в целом, еще далека от своего окончательного решения.

Давно, например, известен факт различия в частоте диагностирования доброкачественных и злокачественных фаз болезни, то есть в реализации на практике классической последовательности событий при КРР — дисплазия/аденома — аденокарцинома. Статистические данные свидетельствуют, что к 9-му десятилетию жизни колоректальные аденомы обнаруживаются более чем в каждом втором, а КРР — лишь в каждом двадцатом случае.

Причины, которые вызывают развитие КРР у членов одной семьи, достаточно вариабельны. Речь может идти о редких аутосомно-доминантных синдромах с активным вовлечением КРР (семейный аденоматозный полипоз или синдром наследственного неполипозного КРР) или о менее ясных в генетическом отношении состояниях. Например таких, как обнаружение аденомы у ближайших кровных родственников.

Известно, что чем в более молодом возрасте развился КРР, тем выше статистический риск диагностирования его у близких родственников. Наследственные синдромы КРР представлены в таблице (Табл.17), согласно фенотипу и мутациям в соответствующих генах.

**Таблица 17. Синдромы, сопряжённые с наследственным колоректальным раком.**

Синдромы	Мутрующий ген
<b>А. Связанные с полипозом</b>	
Семейный аденоматозный полипоз и синдромы с внекишечными проявлениями	APC
Ювенильный полипоз и сопутствующие синдромы	DPC4, PTEN
Синдром Пейтца-Егерса	STK11
<b>Б. Не связанные с полипозом</b>	
Малая форма семейного аденоматозного полипоза	APC hMSH2, hMLH1,
Мутация I1307K евреев Ашкенази Наследственный синдром неполипозного КРР (HNCCS)	hPMS1 hPMS2, hMSH3
Внесиндромные семейные случаи	hMSH6 Неизвестен

Наследственный рак толстой кишки включает две достаточно хорошо описанные форы: наследственный неполипозный колоректальный рак и наследственный рак толстой кишки, развившийся на фоне семейного аденоматозного полипоза.

Наследственный неполипозный колоректальный рак является наиболее выраженной формой рака толстой кишки, на долю которого приходится около 5–10% всех форм колоректального рака. На Международной встрече в Амстердаме в 1991 году были определены первоначальные критерии наследственного неполипозного рака толстой кишки, которые включают:

- наличие в семье 2–3 родственников первой степени родства с морфологически верифицированным диагнозом рака толстой кишки;
- последовательное (вертикальное) поражение двух поколений;

- выявление хотя бы у одного из пораженных членов семьи колоректального рака в возрасте моложе 50 лет.

Синдром наследственного неполипозного рака толстой кишки характеризуется аутосомно-доминантным типом наследования в раннем возрасте, склонностью к поражению правых отделов толстой кишки и развитию первично-множественных злокачественных новообразований.

Средний возраст выявления у больных наследственного неполипозного рака толстой кишки составляет 44 года по сравнению с 64 годами при спорадическом раке. В некоторых семьях может наблюдаться повышенный риск развития других злокачественных новообразований. К ним относятся рак эндометрия, молочной железы, яичников, желудка, тонкой кишки. Кумулятивный (накопленный) риск развития рака у родственников из семьи с наследственным неполипозным колоректальным раком в возрасте до 70 лет составляет 91% для мужчин и 69% — для женщин.

Причиной возникновения наследственного неполипозного рака толстой кишки является мутация одного из генов hMSH2 (2p16); hMLH1 (3p21); hPMS1 и hPMS2 (2q31 и 7q11), участвующих в образовании репарационных комплексов, функция которых заключается в поддержании точности ДНК в процессе ее репликации.

Семейный аденоматоз толстой кишки, на фоне которого развивается колоректальный рак, характеризуется развитием множественных аденом (иногда более 100) в толстой кишке. Его частота составляет 1 на 8 000 новорожденных. Заболевание обнаруживается приблизительно у 40% членов семьи.

Больные с семейным аденоматозом являются носителями герминальной мутации в гене APC (5q21–22). В настоящее время обнаружено более 300 мутаций этого гена, 60% из которых локализованы в экзоне 15. Возникновение соматической мутации в другом нормальном аллеле приводит к инактивации обоих аллелей и развитию злокачественного заболевания. У 95% людей, имеющих мутации в этом гене, рано или поздно развивается рак, причем в 60% случаев возникает именно рак толстой кишки, а в остальных — рак тела матки, рак молочной железы, рак желудка.

В среднем рак у лиц с семейными аденомами развивается в более

раннем возрасте, как правило, до 40 лет, т.е. на 20 лет раньше, чем в популяции. Существует несколько синдромов, характеризующихся аденоматозом желудочно-кишечного тракта и появлением опухолей мягких тканей и костей (синдром Гарднера), медулло- и глиобластом (синдром Турко), которые рассматриваются как варианты семейных аденом.

Синдром Пейтца-Егерса наследуется также по аутосомно-доминантному типу с высокой пенетрантностью. Встречается приблизительно в случае 1 на 8 300–29 000 новорожденных. В отличие от предыдущих синдромов, полипы при данном заболевании представляют собой истинные гамартомы (возможны аденомы) и поражают все отделы ЖКТ. Внекишечные проявления — пигментация слизистой оболочки губ, ротовой полости, а также ладоней, подошв и перианальной области, влагиалища. Наиболее часто малигнизируются полипы желудка, толстой кишки. Описаны редкие случаи развития у больных с данным синдромом рака двенадцатиперстной кишки. При синдроме Пейтца-Егерса нередко отмечается сочетание различных опухолей женского полового тракта, молочных желез и первично-множественных злокачественных новообразований.

Детализация последовательности и специфики молекулярных механизмов, составляющих основу развития редких наследственных синдромов, способствовала правильному пониманию и патогенеза спорадического КРР.

Выявление последнего происходит значительно более часто, притом, что на молекулярном уровне в основе развития заболевания всякий раз лежат достаточно близкие, а иногда и вовсе аналогичные события.

Применительно к возникновению КРР, роль молекулярно-генетических нарушений, особенно нестабильности генома, исследуется около 20 лет. В 1993 году у членов семей больных наследственным неполипозным раком толстой кишки впервые была диагностирована нестабильность микросателлитов (MSI).

Данное открытие позволило выдвинуть гипотезу мутаторного фенотипа возникновения рака, согласно которой для трансформации нормальной клетки, в клетку злокачественную, необходим ряд мутаций.

Однако чтобы подвергнуться указанной трансформации, клетка изначально должна обнаруживать способность мутировать с большей, по

сравнению с нормой, частотой. Подобная же способность, в свою очередь, ассоциируется с инактивацией механизмов, которые в физиологических условиях контролируют сохранение традиционной структуры молекулы ДНК.

Практически во всех случаях КРР уже на самых ранних стадиях развития заболевания, можно наблюдать явление хромосомной нестабильности или нестабильности MSI.

В результате применения методики сравнительной гибридизации генома, позволяющей идентифицировать среднее количество ошибок при копировании, удалось доказать факт их закономерного увеличения. Эффект характеризует следующий ряд: аденома кишечника, выраженная в легкой степени < аденома тяжелой степени < КРР (Табл. 18).

**Таблица 18. Молекулярные события, вовлеченные в развитие колоректального рака.**

Норма	Ранняя аденома	Промежуточная аденома	Поздняя аденома	Карцинома
Ключевой ген	APC (аденоматозный полипоз толстой кишки)	K-ras	DCC (отсутствует в раке толстой кишки)	p53
Хромосома	5q	12p	18q	17p
Нормальная функция	Регуляция метаболизма клеток толстокишечного эпителия	Трансмембранный ГТФ-связывающий белок, передающий митогенные сигналы (p21)	Множественная: роль в апоптозе, ген – супрессор опухоли	Повышается выработка при повреждении клетки для остановки клеточного цикла и обеспечения возможности репарации ДНК или апоптоза
Повреждение	Абортивные мутации	Увеличение функциональных мутаций	Аллельная делеция	Аллельная делеция, мутации с приобретением функции

Эффект	Прогрессирование с развитием ранней аденомы	Пролиферация клеток	Роль в инвазии и метастазах	Клеточная пролиферация, нарушение апоптоза
--------	---	---------------------	-----------------------------	--

Гиперпролиферация клеток кишечного эпителия, которая лежит в основе роста аденоматозных полипов, объясняется мутацией в генах APC и DNA MMR с потерей аллеля известной как потеря гетерозиготности.

Молекулярный механизм развития КРР не постоянно вовлекает ген APC. Однако в подобном случае часто фиксируется повреждение другого участника сигнального Wnt-каскада – гена бета-катенина.

Прогрессированию полипоза способствует мутация онкогена K-ras. В развитии колоректальных карцином ведущая роль принадлежит нарушению функции гена p53. Повреждение гена DCC способствует ослаблению адгезии клеток первичной опухоли, что активизирует процесс ее метастазирования (Табл. 19). Изучается патогенетическая роль при КРР и других генов – SMAD2, SMAD4.

**Таблица 19. Молекулярные признаки колоректального рака.**

Ген	Локус	Функция гена	Нарушения при мутации	Частота, %
APC-gen (adenomatosis poliposis coli)	5q21	Активация апоптоза и контроль за пролиферацией	Угнетение апоптоза и гиперпролиферация эпителия	80 и более
K-ras	12p12.1	Внутриклеточная передача сигналов делению клетки, находящейся в фазе G1	Сигнал к делению клетки не блокируется и происходит ее непрерывное деление	50
p53	17p13	Контролирует процессы репарации клетки. Блокирует деление и индуцирует апоптоз клеток с поврежденной ДНК	Исключает возможность репарации ДНК и апоптоза, «испорченной» клетки	75

DCC (detected in colorectal cancer)	18q21.3	Обеспечивает адгезивные свойства клеток, предотвращает инвазию и метастазирование опухоли	Метастазированию рака первичной опухоли	70
DNA, MMR		Исправляет ошибочное удвоение ДНК	Микросателлитная нестабильность и снижение репаративных способностей клетки	15

Спектр фундаментальных свойств злокачественных опухолей, безусловно включает способность к инвазии, а также к метастазированию. Одним из ведущих механизмов инвазии является разрушение окружающей базальной мембраны и внеклеточного матрикса ассоциированными с опухолью протеазами.

С использованием иммуноферментного метода было изучено содержание *тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ первого типа (ТИМП-1)* в ткани опухоли, гистологически неизменной слизистой оболочке толстой кишки и в плазме крови 100% больных КРР.

В опухолях 92% пациентов с КРР продемонстрировано значительное (до 27,4 раза) увеличение продукции ТИМП-1, по сравнению с окружающей слизистой оболочкой, максимально выраженное при прорастании опухоли в окружающие органы и ткани.

Уровень ТИМП-1 в плазме крови превысил верхнюю границу нормы только у 8% больных (в целом же для данной группы он оставался выше, чем у здоровых доноров).

Одновременно концентрация данного маркера в плазме крови оказалась достоверно большей при наличии отделенных метастазов, по сравнению с местнораспространенным процессом.

Достаточно широкий диапазон концентраций ТИМП-1 в опухолевой ткани и периферической крови, обнадеживает в плане возможности нахождения определенных пороговых уровней маркера для использования в качестве самостоятельного или дополнительного прогностического

критерия при КРР.

Существует целый ряд аргументов в пользу логичности рассмотрения КРР, как гормонозависимой неоплазмы.

Например, если данная опухоль представляет собой первично-множественное новообразование, в качестве его «напарницы» чаще всего диагностируют злокачественную опухоль молочной железы, эндометрия или яичника (кстати, доказано митогенное действие эстрадиола на клетки колоректального эпителия).

Среди достаточного количества подтверждений обсуждаемой гипотезы, назовем, в частности, трактовку нарушения толерантности к углеводам, а также инсулинорезистентность, как факторов предрасположенности к развитию КРР.

Кроме того, гиперинсулинемия и повышение уровня инсулиноподобного фактора роста-1 (ИПФР-1), могут коррелировать соответственно с ранними этапами инвазии КРР с активностью процесса его регионарного метастазирования.

Адекватное понимание изложенной выше информации требует признать роль гормонов и гормоноподобных соединений в качестве возможных модификаторов генетических и эпигенетических событий.

Сейчас уже не приходится сомневаться в том, что развитие КРР (как наследственного, так и спорадического), обусловлено наличием значительного количества последовательно возникающих мутаций в онкогенах, генах-супрессорах и генах репарации ДНК.

*Опухолевая пируваткиназа (TuM2-РК).* Для всех стадий КРР чувствительность данного метаболического (ферментного) маркера составляет 66,4%.

На фоне 1-й стадии заболевания у 57% пациентов, концентрация, по крайней мере, у одного из исследуемых маркеров (РЭА и TuM2-РК), оказывается увеличенной. Превышение референсного их уровня в 4-й стадии РКК диагностируется у 94% больных (для РЭА — в 56 раз и для TuM2-РК — в 6,5 раз).

Высказывается мнение, что сочетанное применение детекции РЭА и TuM2-РК позволит улучшить качество уточняющей клинической лабораторной диагностики у первичных больных с КРР.



Разработан и проходит апробацию эффективности метод количественного определения данного фермента в кале (копрологический тест на TuM2-PK). Позитивная его оценка, предполагает возможность интегрирования теста в скрининговые программы при КРР.

Использование методов молекулярной диагностики имеет большой потенциал как в ранней диагностике и оценке ответа опухоли на терапию, так и в прогнозе заболевания. Для такой диагностики можно использовать различные объекты исследования (Табл. 20).

**Таблица 20. Использование методов молекулярной диагностики при КРР.**

<b>А. Исследование ткани опухоли</b>
Карциномы
Прогноз/течение заболевания
Уточнение стадии опухолевого процесса
Обнаружение микрометастазов
Установление генотипа и фенотипа метастазов
Прогноз ответа на терапию
Аденомы
Развитие метакронных опухолей
Исследование неопухолевых тканей
<b>Б. Исследование проб крови и кала</b>
Диагностика микрометастазов и оценка гематогенной диссеминации
Диагностика, скрининг и динамическое наблюдение
Диагностика наследственных синдромов

## **ОНКОМАРКЕР РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (CA19-9).**

Раковый антиген СА19-9 является первым маркером из класса антигенов, которые ассоциированы с мембранами опухолевых клеток (СА125, СА15-3, МСА, ПСА), полученным и охарактеризованным в результате использования гибридной технологии. СА19-9 представляет собой муцин-сиало-гликолипид с молекулярной массой около 1 000 кДа.

Референсное значение концентрации маркера в сыворотке крови взрослого, здорового человека  $\leq 40$  Ед/мл, биологический период полу-

жизни — 5 дней.

Следует помнить, что антигенную детерминанту СА-19 и антигена группы крови Льюис [Le(a-b-)], кодирует один ген. Последний, как установлено, у 7–10% представителей популяции может отсутствовать.

Соответственно, в эквивалентном количестве случаев биосинтез данного антигена оказывается полностью заблокированным. Данное обстоятельство требуется неизменно учитывать для правильной интерпретации результатов количественного определения СА19-9.

СА19-9 синтезируют клетки эпителия, а как один из представителей группы онкофетальных маркеров, может быть внутриутробно обнаружен в его продуцентах, которые локализованы в печени, поджелудочной железе и желудочно-кишечном тракте.

В постнатальном онтогенезе, на фоне подобной органоспецифичности антигена, его начинает также вырабатывать эпителий бронхов. Минимальные количества СА19-9 присутствуют в сыворотке крови, плевральной и спинномозговой жидкости. Экскретируется из организма с желчью.

Накопленный опыт дифференциально-диагностического применения СА19-9 в условиях наиболее распространенной патологии желудочно-кишечного тракта, позволяет рассматривать его как основной — высокоспецифичный (94%) и высокочувствительный (87%) маркер рака поджелудочной железы.

У 100% больных с распространенным раком головки поджелудочной железы, уровень СА19-9 в сыворотке крови  $> 40$  Ед/мл. На 15-й день послеоперационного периода, снижение концентрации маркера регистрируется в 50% случаев. Для 100% пациентов с исходно не сверхвысокими (64–690 Ед/мл) концентрациями СА19-9, летальный исход регистрировался позднее 17-ти месяцев, вместо 4-х — на фоне показателей (75–24 000 Ед/мл), явным образом превосходящих указанные значения.

Отсутствие абсолютной специфичности теста СА19-9 обусловлено наличием достаточно широкого круга заболеваний и патологических состояний, которые сопровождаются увеличением концентрации данного антигена:

- злокачественные опухоли непанкреатической локализации — гепа-

то- и холангиогенная карцинома, рак внепеченочных желчных путей, желудка, легких, матки, молочной железы, толстого кишечника, яичников (особенно, рак муцинозного типа);

- заболевания печени и желчевыводящих путей;
- панкреатит (острый и хронический);
- воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта.

Показания к исследованию уровня СА19-9 прежде всего возникают при злокачественных опухолях следующих локализаций:

- желудок;
- легкие;
- печень;
- поджелудочная железа;
- толстый кишечник;
- эндометрий;
- яичники (особенно, рак муцинозного типа).

Повышение уровня СА19-9, в сравнении с референсным, становится реальным при раке поджелудочной железы в момент достижения опухолью диаметра  $> 3$  см. Поэтому данный тест не удовлетворяет требованиям, которые предъявляют к методикам, имеющим благоприятные перспективы для использования в качестве скрининговых.

Концентрация антигена  $> 1\,000$  Ед/мл, как правило, свидетельствует о дальнейшей прогрессии неоплазмы — до размера  $> 5$  см. Клинические наблюдения показывают: только 5% соответствующих пациентов остаются операбельными.

Уровень СА-19 демонстрирует четкую корреляцию с характером клинического течения заболевания, поэтому соответствующий тест исследуют, как правило, в процессе динамического наблюдения за пациентом.

Развитие биохимического рецидива заболевания и/или наличие метастазов первичной опухоли, практически стабильно сопровождаются подъемом уровня рассматриваемого антигена.

В малигнизированной ткани поджелудочной железы удалось идентифицировать ряд других антигенов: СА50, СА242, СА494, DU-PAN-2, SPAN-1.

При этом специфичность последних превосходит, а показатель чувствительности уступает, свойственным для СА19-9. У 50% больных может оказаться положительным и тест на СА-125, в принципе более специфичный для рака яичников.

К сожалению, повышение уровня названных маркеров регистрируется лишь в инкурабельной стадии заболевания.

Накапливаются данные в пользу диагностической значимости вычисления при раке поджелудочной железы соотношения концентраций сывороточного тестостерона и дегидротестостерона.

Величины подобного коэффициента  $< 5$  (что, в данном случае ассоциируется с увеличением активности фермента 5-альфа-редуктазы) необходимо квалифицировать какстораживающие в рассматриваемом плане. Сформулированные здесь положения, для 67% данного контингента больных, уже нашли свое объективное подтверждение в лабораторно-диагностической практике.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.

Исследования последнего времени обеспечили существенный прогресс в понимании механизма развития аденокарциномы поджелудочной железы. Сейчас ее можно рассматривать как одну из наиболее изученных с молекулярно-генетических позиций опухоль.

Известны, по крайней мере, 4 гена мутации, которых в той или иной степени причастны к данной проблеме (Табл. 21).

*Таблица 21. Частота мутаций генов при раке поджелудочной железы.*

Ген	Локус	Частота, %
K-ras	12p12	93
p53	17p13	70
p16	9p21	78
DPC4	18q21.1	50



Среди представителей классических генов-супрессоров, при раке данной локализации, наиболее активно вовлеченным в патогенез заболевания оказываются: p16, p53 и DPC4.

Трансформация нормальной клетки в опухолевую и механизм, запускающий программу злокачественной прогрессии, детерминированы при раке поджелудочной железы, как минимум, двумя из наиболее принципиальных изменений в структурных компонентах генома.

С одной стороны, развивается неспособность ряда антионкогенов (p16, p53 и DPC4), явиться посредниками опухоли-супрессивного эффекта. С другой стороны, постоянно сказывается онкогенетическое значение K-ras.

Совокупное влияние указанных факторов приводит к дисрегуляции клеточного цикла, непосредственным результатом чего является малигнизация эпителиальных клеток протоков поджелудочной железы.

Рак поджелудочной железы, как и в случае практически любой локализации опухоли, может быть спорадическим и наследственным. Наследственная форма заболевания включает несколько синдромов (Табл. 22).

**Таблица 22. Риск развития рака поджелудочной железы при различных наследственных синдромах.**

Синдромы	Риск	Частота, %	
		Возраст 50 лет	Возраст 70 лет
Без синдрома	1	0,05	0,5
BRCA2	3,5 – 10	0,5	5
Семейный рак ПЖ	18 – 57	0,9	9
FAMM	20 – 34	1	10 – 17
НП	50 – 80	2,5	25 – 40
Синдром Пейтца-Егерса	132	6,6	30 – 60

*Синдром Пейтца–Егерса* наследуется по аутосомно-доминантному типу с высокой пенетрантностью. Основанием для постановки диагно-

за является обусловленное носительством мутаций в гене STR11/LKB1 наличие полипов, представляющих собой истинные гамартромы (возможны аденомы), которые поражают все отделы желудочно-кишечного тракта, сочетаясь с характерной внекишечной симптоматикой (пигментация – слизистой оболочки губ, ротовой полости, а также кожи ладоней, подошв, перианальной области, влагалища). Наличие синдрома Пейтца–Егерса сопряжено с резким повышением риска рака поджелудочной железы. Согласно некоторым оценкам подобное увеличение может составить 132(!) раза.

*Синдром FAMM (семейная атипичная множественная меланома).* Основанием для постановки диагноза является наличие обусловленного мутацией гена p16 (картирован в районе 9p), множества пигментных невусов, в том числе и атипичных. Обнаружение синдрома FAMM повышает риск рака поджелудочной железы в 20–34 раза.

Результаты изучения возможности наследования мутаций в гене p16, показали, что наследственные формы рака поджелудочной железы, сочетающиеся с носительством указанных мутаций, регистрируются в 5% случаев соответствующих аденокарцином. При этом для пациентов сохраняется высокий риск меланомы.

Наследственный панкреатит, который вызывают мутации в гене катионического трипсинагена (аутосомно-доминантный тип передачи), ввиду длительности его клинического течения, характеризует 50–80-ти кратное увеличение риска рака поджелудочной железы.

## ОНКОМАРКЕР РАКА ПЕЧЕНИ И ГЕРМИНОГЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ (АФП).

Альфа-фетопроtein (АФП) – представитель класса онкофетальных маркеров, гликопротеин с молекулярной массой около 70 кДа\*.

Первичная структура, физико-химические свойства данного маркера близки к характерным для альбумина сыворотки крови. Очевидно ген, контролирующий синтез этих соединений, происходит из общего гена-

\* В 1963 г. Г.И. Абелев впервые идентифицировал АФП в сыворотке крови эмбрионов мыши, а также в мышечных гепатомах. Затем Ю.С. Татаринов доказал полную идентичность альфа-глобулина (АГ) крови развивающегося эмбриона человека и сывороточного АГ, обнаруживаемого в крови при первичном гепатоцеллюлярном раке. Количественное иммунохимическое определение АФП получило в дальнейшем название «реакция Абелева-Татаринова».

предшественника. В контексте подобных представлений существует мнение, что АФП на протяжении эмбрионального периода функционирует в качестве альбумина.

Начало биосинтеза АФП совпадает с возникновением в желточном мешке эмбриона первых кроветворных клеток-предшественников, в дальнейшем (с 4-й недели беременности), роль его продуцентов переходит к гепатоцитам.

К 20-й неделе внутриутробного развития, уровень АФП (максимальный — 3 г/л регистрируется в сыворотке крови 10-ти недельного эмбриона) постепенно снижается. На момент рождения ребенка он составляет не более 3,5% от исходных значений.

В конце первого года жизни АФП практически полностью элиминируется из крови, остаточные же его количества для взрослых здоровых мужчин и небеременных женщин соответствуют следовым (0–14,4 МЕ/мл). Биологический период полужизни АФП — 4–5 дней.

#### Физиологическая роль АФП:

- ингибирование протеаз;
- связывание эстрогенов;
- связывание ретиноевой кислоты и малых молекул;
- участие в организации сигнала для эмбрионального развития печени.

Данные литературы, характеризующие средний уровень АФП (МЕ/мл) при некоторых заболеваниях представлены ниже:

• гепатоцеллюлярная карцинома	> 800
• дисгерминома яичников	> 1 000
• гепатобластома	> 400
• тератобластома семенников	> 500
• острые отравления	до 100
• гепатит В и С	10–50

Гиперальфафетопроteinемия сопутствует и метастатическим поражениям печени, злокачественным опухолям ряда первичных локализаций (бронхи, желудок, молочная железа, поджелудочная железа, толстый кишечник), а также — хронической почечной недостаточности, циррозу печени.

Основное применение АФП-теста в онкологии сводится к включению в алгоритм диагностики и мониторинга лечения двух видов неоплазм:

- первичный гепатоцеллюлярный рак;
- эмбрионально-клеточные опухоли.

Известно, что АФП с мочой плода, экскретируется в амниотическую жидкость, откуда через плаценту или плодные оболочки проникает в кровь матери. Здесь антиген начинает определяться с 5–6 недели беременности в постепенно возрастающей концентрации (на 20-й неделе беременности она составляет 49 МЕ/мл).

Регистрируемое во второй половине беременности повышение уровня АФП сыворотки крови матери, чревато следующими относительными рисками:

- отслойка плаценты — 4,5;
- задержка внутриутробного развития — 4,0;
- *Spina bifida*, другие пороки развития — 4,0;
- поздний токсикоз — 3,9;
- преждевременные роды — 3,8;
- роды плодом с низкой массой тела — 3,7.

Повышение концентрации АФП может сопровождать и некоторые другие патологические состояния плода.

В противоположность этому, для 30% случаев хромосомных нарушений (болезнь Дауна), уровень АФП на протяжении 15–18 недели гестации, уступает референтному. При диагностировании у матери сахарного диабета I типа, содержание АФП в ее крови, также демонстрирует снижение.

Все сказанное аргументирует правомерность понимания АФП, как достаточно значимого белка-индикатора неблагоприятного развития беременности. Таким образом, в случае обнаружения патологических уровней данного антигена, является целесообразным назначение матери уточняющего обследования.

В последнее время получила необходимое развитие тактика определения концентрации АФП в первом, а не втором триместре беременности. С учетом же низкого для данного периода показателя чувствительности

ти, тест дополняют детекцией уровня специфичного при беременности белка «А». Благодаря использованию соответствующей лабораторной технологии, наличие болезни Дауна, ряд других хромосомных аномалий плода, могут быть распознаны уже на 11–13-й неделях внутриутробного развития.

$$\begin{aligned} \text{NB! АФП, МЕ/мл} &= \text{нг/мл} \times 1,25 \\ \text{АФП, нг/мл} &= \text{МЕ/мл} \times 0,83 \end{aligned}$$

## ОНКОМАРКЕР ГЕРМИНОГЕННЫХ И ТРОФОБЛАСТИЧЕСКИХ ОПУХОЛЕЙ (ХГЧ).

Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) – гормон класса онкофетальных (образуется в клетках синцитио- и трофобласта) маркеров, гликопротеин с молекулярной массой 36–40 кДа.

Молекула ХГЧ состоит из двух субъединиц: альфа и бета. Альфа-субъединица является гликопротеином, содержащим 92 аминокислотных остатка. Молекулы сахаров в положениях 52 и 78 связаны с аспарагином. Пространственная конфигурация альфа-субъединицы обеспечивается наличием 5 дисульфидных (S – S) связей.

Специфичность ХГЧ обусловлена особенностями строения бета-субъединицы, которую образуют 145 аминокислотных остатков. Пространственная конфигурация бета-субъединицы обеспечивается за счет 6 дисульфидных (S – S) связей. Молекулы сахаров соединены с аспарагином в положениях 13 и 20, в положениях 121–145 – с серином, формируя, таким образом, С-концевой пептид.

Обычно молекула трофобластического ХГЧ содержит одну или две молекулы сахаров, связанных с аспарагином, а также одну молекулу, связанную с серином.

В начале беременности, а также в клетках цитотрофобласта злокачественных опухолей образуется ХГЧ с большим количеством связанных сахаров – так называемый гипергликозилированный ХГЧ.

Кроме того, в крови обнаруживаются свободные альфа- и бета-субъединицы, а также деградированная свободная бета-субъединица.

Современные лабораторные технологии позволяют измерять концентрации нативной и гликозилированной молекул ХГЧ, свободной и деградированной бета-субъединиц гормона.

Соответствующие методики находят использование в клинической практике для дифференциальной диагностики опухолей. Кроме того, с их помощью удастся выявлять пороки развития эмбриона и плода (пренатальная профилактика).

ХГЧ присутствует в крови беременных с начала дробления оплодотворенной яйцеклетки (вне зависимости от анатомической локализации эмбриона)\*.

В процессе физиологически развивающейся беременности, уровень ХГЧ сыворотки крови прогрессивно увеличивается. При этом каждые 1,7–2,2 дня на протяжении первых 30 дней (пиковая концентрация – 60–500 мМЕ/мл соответствует 8–10 неделям) регистрируется удвоение его значений. К концу первого триместра (11–12 недели) фиксируют монотонное снижение уровня ХГЧ.

Требуется подчеркнуть, что в случае развития многоплодной беременности концентрация ХГЧ устанавливается кратной не количеству эмбрионов, а развивающихся хорионов. Таким образом, при монохориальной двуплодной беременности, уровень ХГЧ сыворотки крови должен совпадать с нормативным показателем, характерным для беременности одним плодом. На фоне же бихориальной беременности, его 2-х кратное (как максимум) превышение не относится к патологическим.

В течение 10–14 дней после родов отмечается активная элиминация ХГЧ с мочой из организма матери. Верхняя граница нормы уровня гормона в сыворотке крови здоровых небеременных женщин и здоровых мужчин  $\leq 10$  МЕ/л (применительно к тест-системе, стандартизованной по I международному эталонному препарату ХГЧ – Ist+IRP75/537 – ВОЗ).

Период биологической полужизни ХГЧ составляет в среднем 36 часов. В качестве субстрата для определения гормона могут быть использо-

\* С появлением в лабораторной практике высокочувствительных и высокоспецифичных иммуноферментных систем, основанных на выявлении антител к бета-субъединице гормона с помощью моноклональных антител, диагностика беременности стала возможной, начиная с 7–9 (исследуется кровь женщины) или 8 дня (исследуется моча) после оплодотворения яйцеклетки.

ваны:

- амниотическая жидкость;
- ликвор;
- моча;
- сыворотка крови.

Повышенная секреция ХГЧ характерна главным образом для следующих заболеваний:

- хорионкарцинома;
- тератома яичников;
- патология, характеризующаяся эктопической продукцией данного гормона (рак желудка, легких, поджелудочной железы, толстого кишечника).

Как было подчеркнуто ранее, завершение 12 недели беременности должно совпадать с началом уменьшения концентрации ХГЧ в сыворотке крови матери.

Отсутствие подобной динамики у результатах теста позволяет предположить наличие трофобластической болезни (диагностическая чувствительность ХГЧ в ее случае близка к идеальным 100%).

Благодаря исследованиям последнего времени, в качестве маркеров выбора при хорионкарциноме был предложен ряд белковых соединений крови, свойственных ворсинчатым трофобластам — CA125, SP1, PP12, гликопротеин «ранний фактор беременности». Однако, несомненными преимуществами обладают в данном случае бета-хорионический гонадотропин и трофобластический бета-гликопротеин (ТБГ).

Остановившись более подробно на первом из них, сразу подчеркнем надежность теста. Между объемом трофобластической ткани и титром ХГЧ существует четкая корреляция. Принято считать, что опухоль, которая продуцирует 1 мМЕ/мл гормона интегрирует  $10^4$ – $10^5$  трофобластических клеток.

Результаты количественной оценки теста на ХГЧ могут предоставить важную клиническую информацию. Согласно предложенной ВОЗ шкале, сывороточный уровень ХГЧ  $< 1\ 000$  мМЕ/мл говорит в пользу благоприятного для пациента варианта прогноза, тогда как значения маркера  $> 100\ 000$  мМЕ/мл ассоциируются с неблагоприятным исходом

заболевания.

В зависимости от специфики продукции сывороточных маркеров, новообразования яичка могут быть разделены на две группы.

Группа опухолей, не генерирующих ХГЧ и АФП включает семиномы, зрелые тератомы и эмбриональные карциномы в чистом виде. Ткань эмбрионального рака может содержать гигантские клетки синцитиотрофобласта, которые вырабатывают незначительные количества ХГЧ.

Группа маркерпродуцирующих неоплазм включает около 80% герминогенных опухолей: опухоли желточного мешка (вырабатывают АФП), хориокарциномы (секретируют ХГЧ).

Выделяют, наконец, опухоли смешанной природы, которые в рассматриваемом аспекте, должны быть охарактеризованы как вариативнопродуцирующие (АФП и/или ХГЧ).

Наличие принципиальных различий в подходах к лечению семинозных и несеминозных опухолей яичка, предопределяет важность практического значения детекции АФП и ХГЧ. Нередко результаты последней являются более информативными, по сравнению с рутинным гистологическим исследованием ткани опухоли.

Факт обнаружения повышенного уровня АФП у больного семинозой без метастазов в печень, приходится расценивать как симптом наличия в опухоли клеточных элементов желточного мешка.

Увеличение концентрации ХГЧ регистрируется у 15% больных семинозой и, как правило, объясняется присутствием в опухоли несеминозных элементов (реже — гигантских клеток синцитиотрофобласта).

Повышение уровня ХГЧ, наблюдаемой при первичной опухоли достаточно малого объема или при количестве гигантских клеток синцитиотрофобласта, несопоставимом с размером указанного повышения, логично расценить возникшую патологию, как опухоль смешанного типа.

Одномоментное исследование концентрации ХГЧ в сыворотке крови (ХГЧск) и ликворе (ХГЧл), с последующим вычислением коэффициента ХГЧск: ХГЧл, является одной из диагностических технологий, которые способствуют обнаружению метастазов хорионэпителиомы в ЦНС.

Сейчас доказано, что при определенных величинах данного коэффициента ( $< 60:1$ ), должно возникнуть обоснованное подозрение на при-

сутствие уже в структурах ЦНС, активно секретирующих ХГЧ клеток герминогенной опухоли.

Повышение уровня АФП и ХГЧ, в условиях отсутствия диагностированной патологии яичек, создает предположение о наличии у больного локализирующейся внегонадно герминогенной опухоли, которая находится на ранних стадиях развития.

Несеминозные герминогенные опухоли образованы клетками нескольких видов, которые обычно «специализируются» на биосинтезе различных сединений, обладающих маркерной значимостью.

В процессе лечения один или несколько маркеропродуцирующих клонов подвергается редукции. Следствием этого является модификация характерного соотношения синтезируемых неоплазмой маркеров: новообразования, которые ранее продуцировали АФП и ХГЧ, могут утрачивать данную способность. Трудно с уверенностью исключить и вероятность формирования противоположной ситуации.

В этой связи, началу проведения лечения должно предшествовать определение исходного уровня, как АФП, так и ХГЧ в сыворотке крови пациента.

Кроме того, следует помнить, что результаты послеоперационного исследования опухолевых маркеров отражают выраженность достигнутой циторедукции. Тогда как, при эффективной лекарственной терапии подобное тестирование позволяет оценивать степень жизнеспособности маркерпродуцирующих клеточных клонов.

Уровень опухолевых маркеров необходимо мониторировать у всех больных с герминогенными опухолями, осуществляя его как непосредственно в процессе лечения, так и на этапе последующего наблюдения. Организация режима подобного тестирования должна адекватно учитывать степень распространенности опухолевого процесса.

В частности, при I его стадии, соответствующий анализ в течение первого года после орхфуникулэктомии следует назначать не реже, чем 1 раз в месяц; в дальнейшем — через каждые 6 месяцев (2-й, 3-й годы, следующие за хирургическим вмешательством).

Радикальное удаление опухоли должно приводить к снижению повышенного уровня маркеров до его референсных значений (разумеется,

в соответствии с продолжительностью периода их элиминации из организма).

Слабая выраженность, а тем более отсутствие подобного эффекта, даже при невозможности верифицировать диагноз клинико-инструментально, заставляет предположить наличие метастазов первичной опухоли.

Повышение концентрации АФП и ХГЧ может свидетельствовать о рецидиве заболевания, с опережением его клинических проявлений на срок 1–6 месяцев, что позволяет своевременно приступить к лечению. Диагностическая чувствительность АФП и ХГЧ для биохимических рецидивов герминогенных опухолей составляет 86%, при специфичности 100 %.

Вместе с тем, реально создающаяся ситуация подчас исключает однозначность ее трактования. Анализ клинической практики убеждает: отсутствие тенденции к повышению уровня маркеров не всегда гарантированно исключает прогрессирование заболевания.

Рецидивная опухоль способна проявлять трансформированные биологические свойства, например, обнаружить свою маркер-негативность. Ложноотрицательные результаты рассматриваемых тестов могут быть также объяснены небольшим размером новообразования или наличием зрелой тератомы.

Следует помнить и о возможности получения ложноположительных результатов при определении уровня АФП и ХГЧ. Частота их встречаемости, в принципе не столь велика. Обращается, в частности, внимание на феномен лизиса опухолевых клеток, развивающийся в ответ на проведение интенсивной химиотерапии. Кроме того, увеличение концентрации маркеров, регистрируемое автономно от прогрессирования основного заболевания, может быть связано и с печеночной дисфункцией.

Определение концентрации ХГЧ (нативной, гипергликозилированной форм и свободной бета-субъединицы) важно проводить в следующих ситуациях:

- диагностика и мониторинг трофобластических заболеваний (хорионэпителиома, хорионкарцинома);
- дифференциальная диагностика и мониторинг тестикулярных, а



- также овариальных опухолей;
- диагностика наличия физиологически (патологически) развивающейся беременности, мониторингирование указанных состояний;
  - биохимический скрининг врожденных и наследственных аномалий плода;
  - контроль полноты удаления хориона после медицинского аборта.

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕРМИНОГЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ.**

Герминогенные опухоли — гетерогенная группа новообразований, развивающихся из, так называемых, зародышевых клеток (germ cells), т.е. клеток, участвующих в формировании половых желез и в процессах гаметогенеза.

С позиции молекулярной диагностики, универсальная характеристика герминогенных опухолей может быть сведена к увеличению копийности генетического материала, расположенного на коротком плече хромосомы 12.

Подобное событие ассоциируется с возрастанием масштаба представленности продуктов целого ряда генов, которые картированы на данной хромосоме.

Однако до сих пор здесь ведутся поиски конкретного гена, активация которого становится наиболее принципиальным моментом в процессе канцерогенеза. Кроме того, в герминогенных опухолях первого типа (гистологическая классификация ВОЗ) часто наблюдается увеличение копийности 1q и 20q, а также утрата хромосом 1p, 4 и 6q.

Характерными нарушениями для новообразований второго типа является увеличение копийности хромосом 7, 8, 21 и X, в то время как утрата генетического материала затрагивает хромосомы 1p, 11, 13 и 18.

Сперматоцитные семиномы, в отличие от всех других герминогенных опухолей, не содержат повреждений хромосомы 12, характеризуясь при этом появлением экстра-копий хромосомы 9.

Ген-супрессор p53 в герминогенных опухолях мутирован редко (< 10%), что объясняет их чувствительность к апоптозу, и, соответст-

венно, к химиотерапевтическим препаратам.

Отличительное свойство некоторых опухолей яичника состоит в активирующей мутации онкогена RIT, которая затрагивает кодон 816. Указанная мутация в высочайшей степени ассоциирована с развитием билатерального поражения, поскольку наблюдается в 93% парных опухолей и лишь в 1,3% молатеральных новообразований семенников.

Очевидно, данное генетическое повреждение возникает на ранних этапах эмбрионального развития (до миграции зародышевых клеток в герминальный гребень).

## СПРАВОЧНИК ТЕРМИНОВ.

**Антиген** — вещество, индуцирующее состояние чувствительности и/или резистентности к чужеродным соединениям при контакте с иммунной системой после латентного периода. А так же вещество, несущее признаки генетически чужеродной информации и вызывающее в организме развитие специфических иммунных реакций.

**Антитело** — вещество, относящееся к классу Jg (иммуноглобулинов) специфически взаимодействующее со своим антигеном.

**Антионкогены** — гены, продукты которых угнетают митотическую активность клеток.

**Апоптоз** — запрограммированная гибель клеток или «смерть клетки в результате самоуничтожения». Активный генетический контролируемый процесс.

**Биочип** — твердая подложка, на которой нанесены либо определенные фрагменты нуклеиновых кислот, белки, углеводы, иные молекулы-зонды, способные проявлять биологическую активность.

**Генодиагностика или ДНК-диагностика** — совокупность методов по выявлению мутаций, приводящих к наследственной патологии.

**Генетический маркер** — полиморфный участок ДНК, строго определенной локализации, разные аллели которого позволяют различать хромосомы и анализировать их сегрегацию в родословной.

**Ген** — участок молекулы ДНК, на котором синтезируется активная молекула РНК.

**Геном** — совокупность генетической информации, хранящейся в

хромосомах. Геном каждой клетки содержит около 30 000 генов и 3,5 миллиарда нуклеотидов.

**Инициация** — первоначальное воздействие канцерогенного агента на геном клеток «подталкивающее» их к формированию опухоли.

**Интегрины** — семейство мембранных белков-рецепторов для белковых молекул внеклеточного матрикса-фибронектина, ламинина и др.

**Исследование проспективное** — исследование, в котором определенное количество пациентов подвергается наблюдению в течение длительного времени.

**Кадгерин E** — белок, контролируемый межклеточное взаимодействие экспрессируемый на поверхности эпителиальных клеток.

**Маркёр** — аллель (или признак), наследование которого прослеживается в потомстве.

**Метод иммунохимический** — количественный и качественный анализ веществ с использованием реакции антиген-антитело.

**Полимеразная цепная реакция** — катализируемое ДНК-полимеразой многократное образование копий (амплификация) определенного участка ДНК.

**Прогрессия** — этап канцерогенеза опухоли, заключается в возникновении дополнительных изменений в структуре генома и отборе клеточных клонов, наиболее приспособленных меняющимся условиям существования.

**Промоция** — фаза пролиферации и завершения трансформации опухолевых клеток.



**Протооногены** — группа генов-активаторов, контролирующих клеточное деление и дифференцировку.

**Онкогены** — гены, ускоряющие и нарушающие клеточный цикл.

**Опухоль** — патологический процесс, представленный новообразованной тканью, в которой изменения генетического аппарата клеток приводят к нарушению регуляции их роста и дифференцировки.

**Опухолевые супрессоры** — гены, функция которых заключается в ограничении интенсивности молекулярных реакций и подавлении поврежденных клеток.

**Онкомаркеры** — биохимические опухолевые маркеры-вещества, образуемые опухолевыми клетками и секретируемые в биологическую жидкость, где они могут быть количественно определены.

**Хромосомы** — компактно упакованные двойные цепи ДНК, окруженные сложной системой белков.

## Список литературы.

1. Бахидзе Е.В., Малек А.В. Значение методов исследования генома для диагностики терапии рака яичника *Вопр.онкол.*, 2005, №1, с. 50–55.
2. Берштейн Л.М. Гормональный канцерогенез. — СПб: Наука, 2000. — 199 с.
3. Бочков Н.П. Клиническая генетика: Учебник. — 3-е изд., — М.: ГЭОТАР — Медиа, 2006. — 480 с.
4. Винокуров В.Л. Рак яичников: закономерности метастазирования и выбор адекватного лечения больных. — СПб: ООО «Издательство Фолиант», 2004. — 336с.
5. Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Молекулярная онкология: Клинические аспекты. СПб, издательский дом СПбМАПО, 2007. — 211 с.
6. Кишкун А.А. Иммунологические и серологические исследования в клинической практике — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2006 — 536 с.
7. Клиническая биохимия: Учебное пособие под редакцией В.А.Ткачука — 3-е изд., — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 264 с.
8. Комлева Е.О., Лисянская А.С., Манихас Г.М. Диагностическая значимость СА-125 как маркера рака яичников. Клинико-лабораторный консилиум, 2009, №1, с. 75–79.
9. Комлева Е.О., Солдатенков А.В. Диагностическая и прогностическая значимость мониторинга уровня раково-эмбрионального ан-

- тигена в сыворотке крови. Справочник заведующего клинико-диагностической лабораторией, 2010, №3, с. 29–32.
10. Лекции по фундаментальной и клинической онкологии/Под ред. Моисеенко В.М., Урманчевой А.Ф., Хансона К.П. — СПб: ООО «Издательство Н-Л», 2004. — 704 с.
  11. Нейштадт Э.Л., Воробьева О.А. Патология молочной железы. — СПб.: Фолиант. 2003. — 208 с.
  12. Новикова Е.Г., Батталова Г.Ю. Пограничные опухоли яичников. — М.: Медицинское информационное агенство, 2007. — 152 с.
  13. Онкология: Учебник с компакт-диском/Под ред. Чиссова В.И., Дарьяловой С.Л. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. — 560 с.
  14. Поддубная И.В. Местнораспространенный и метастатический рак молочной железы: проблемы терапии и перспективы применения лапаротомии в комбинации с ингибиторами ароматазы в качестве терапии первой линии. Современная онкология, 2010, Т12, №1, с.15–18.
  15. Рак молочной железы. Под ред. чл.-корр. РАМН, проф. Семиглазова. В.Ф. — М.: МЕДпресс-информ, 2009. — 176 с.
  16. Рак толстой кишки: пер. с англ./Под ред. Мейерхардта Дж., Сандерса. М. — М.: ООО «Рид Элсивер», 2009. — 186 с.
  17. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей/Под ред. Петрова С.В., Райхлина Н.Т. — Казань, 2004. — 456 с.
  18. Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний/под ред. Пальцева М.А. и Залетаева Д.В. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2009. — 384 с.

19. Справочник по онкологии/Под ред. В.М. Моисеенко, СПб.: Издательство «Центр Томм», 2008. — 258 с.
20. Мельников Д.Ю. Использование иммунологического диагностического компонента (МСА и СА-125) в скрининге и мониторинге рака молочной железы. Автореф.дис.кандидатск.-СПб,1994-24с.
21. Хансон К.П., Имянитов Е.Н. Функциональная онкогеномика — новое направление в молекулярной онкологии. Молекулярная медицина. 2004, №1, с. 3–9.
22. Bertucci F, Viens P, Hingamp P, Nasser V, Houlgatte R., Birnbaum D. Breast cancer revisited using DNA array-based gene expression profiling. Int. J.Cancer, 2003, v.103, p. 565–571.
23. Kim N.W., Piatystew M.A., Prowse K. Retal. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science. 1994, Vol. 266, p. 66–71.
24. Lerebours F, Lidereau R. Molecular alteration in sporadic breast cancer. Crit. Rev. Oncol. Hematol., 2002, Vol. 44, p. 121–141.
25. MuraKami J., Nayai N. Ohauta Ketel. Telomerase activity in ovarian carcinoma. Cancer. Res. 1993, Vol. 53, p. 2128–2132.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

### ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕ- ДЕЛЕНИЯ РАКОВОГО АНТИГЕНА (СА 15-3) В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА (ОнкоИФА - СА 15-3).

#### 1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов ОнкоИФА-СА 15-3 предназначен для количественного определения концентрации ракового антигена СА 15-3 в сыворотке и плазме крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. При исследовании на СА 15-3 измеряется концентрация белкового продукта гена *MUC1*. Это большой трансмембранный гликозилированный белок, содержащий три основных домена: большой внеклеточный участок, внутримембранную последовательность и цитоплазматический домен. Хотя физиологическая функция белка *MUC1* до конца не выяснена, показано, что этот гликопротеин вовлечен в процессы межклеточной адгезии, иммунные реакции и образование метастазов. По сравнению со здоровой тканью молочной железы, в ткани карциномы молочной железы белок *MUC1* определяется в более высокой концентрации, но отличается меньшей степенью гликозилирования.

Повышенные концентрации СА 15-3 отмечают при раке легкого, яичников, прямой кишки. Однако известно, что у 2 % здоровых женщин концентрация СА 15-3 может быть повышена. Также есть данные, что у 7 % пациентов с незлокачественными заболеваниями отмечают повышенные концентрации СА 15-3. Поэтому с клинической точки зрения определение только концентрации СА 15-3 не имеет диагностической ценности при тестировании на наличие злокачественных новообразований. Этот результат следует использовать только в сочетании с иными клиническими проявлениями, результатами наблюдений и диагностическими параметрами.

В настоящее время наиболее важным клиническим применением

определения СА 15-3 является мониторинговая терапия пациентов с распространенным раком молочной железы, который невозможно оценить иными клиническими или радиологическими методами. Для прогнозирования течения заболевания у пациентов со впервые диагностированным раком молочной железы необходимо рассматривать данные о концентрации СА 15-3 до операции в сочетании с иными прогностическими факторами.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестных, 6 калибровочных проб и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

**Примечание:** в случае дробного применения набор может быть использован только в течение 1,5 месяцев после вскрытия компонентов набора.

#### 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

##### 2.1. Принцип действия

В наборе ОнкоИФА-СА 15-3 использован двухстадийный «сэндвич» вариант количественного иммуноферментного анализа. На первой стадии анализа в лунки, покрытые стрептавидином, вносятся калибровочные пробы с известным содержанием СА 15-3, разведенные контрольные и анализируемые образцы. Затем добавляется раствор моноклональных антител к СА 15-3, конъюгированных с биотином, и реагенты перемешиваются. В результате реакции между моноклональными антителами и молекулой СА 15-3 образуется комплекс, который связывается со стрептавидином, иммобилизованным на стенках лунок. При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободных и связанных антителами белков сыворотки крови. Затем в лунки добавляется раствор конъюгированного с ферментом антитела, специфичного к другому эпитопу молекулы СА 15-3. Меченное ферментом антитело связывается с молекулами СА 15-3, которые ранее были иммобилизованы во время первой инкубации. Несвязавшийся конъюгат удаляется путем промывки. Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации СА 15-3 в образце.

## 2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованным стрептавидином, маркирован «Стрипы с иммобилизованным стрептавидином» — 1 упаковка;
- 6 калибровочных проб (КП) с известной концентрацией СА 15-3, содержащие соответственно: 0, 10, 40, 100, 200 и 400 Ед/мл. Точные значения концентраций в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (1 мл);
- раствор, содержащий конъюгат моноклональных антител (IgG) к СА 15-3 с биотином, маркирован «Конъюгат Е №1» — 1 флакон (12 мл);
- раствор, содержащий конъюгат моноклональных антител (IgG) к СА 15-3 с пероксидазой хрена, маркирован «Конъюгат Е №2» — 1 флакон (12 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер М» — 1 флакон (20 мл);
- буфер для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д» — 1 флакон (50 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл).

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к СА 15-3 с другими анализатами и интерференция приведены в таблице.

3.3 Коэффициент вариации результатов определения СА 15-3 в одном и том же образце с использованием набора ОнкоИФА-СА 15-3 не превышает 8%.

Вещество	Исследованная концентрация	Перекрестная реакция
СА 15-3	—	100%
СА 125	10 000 Ед/мл	0,1%
СА 19-9	5 000 Ед/мл	0,1%
ПСА	1000 нг/мл	2,6%
АФП	30 000 нг/мл	Не определяется
РЭА	5 000 нг/мл	Не определяется
ХГч	125 000 мМЕ/мл	Не определяется
Ревматоидный фактор	12 500 МЕ/мл	0,1%
Билирубин	200 мкг/мл	Не определяется
Продукты гемолиза	30 мкл/мл	Не определяется
Липиды	50 мкг/мл	0,9%

3.4 Линейность. Зависимость концентрации СА 15-3 в исследуемых образцах при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне 10—400 Ед/мл и составляет 90—110%.

3.5 Чувствительность. Аналитическая чувствительность набора ОнкоИФА — СА 15-3 составляет 0,2 Ед/мл.

3.6 Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях анализата зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора ОнкоИФА-СА 15-3 хук-эффект не наблюдается.

3.7 Клиническая проверка. У большинства здоровых женщин концентрация СА 15-3  $\leq 37$  Ед/мл.

3.8 Определение «интервала нормальных концентраций» зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленный изготовителем интервал нормальных концентраций только до тех пор, пока специалистами

лаборатории не будет определен интервал нормальных концентраций, характерный для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

#### 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. Компоненты на основе крови человека, входящие в состав набора, проверены на ВИЧ и гемоконтактные гепатиты. Однако ни один из существующих методов проверки не дает абсолютной гарантии отсутствия возбудителя, поэтому эти компоненты являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки.

4.5. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

#### 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длинах волн 405 нм и 450 нм.

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными накопечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5—50 мкл; на 40—200 мкл; на 200—1000 мкл; на 1000—5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными накопечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- ванночки для конъюгата Е №1, конъюгата Е №2, ТМБ и стоп-реагента;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

#### 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

В качестве исследуемого материала используется сыворотка или гепаринизированная плазма крови человека. Образцы сыворотки и плазмы крови разрешается хранить при температуре +2...8°C не более 5 суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется алиquotировать образец и хранить в замороженном виде при температуре ~20°C или ниже. Не допускаются повторные циклы замораживания-размораживания образца.

#### 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К АНАЛИЗУ.

7.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдерживать при комнатной температуре (+18...25°C) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.2. Перед проведением анализа все реагенты, контрольные и исследуемые образцы должны быть доведены до комнатной температуры.

7.3. Калибровочные пробы, буфер Д, конъюгат Е №1, конъюгат Е №2, раствор ТМБ и стоп-реагент готовы к использованию.

7.4. Промывочный буфер. Необходимое количество буфера М развести дистиллированной водой в 50 раз.

Например: 5 мл буфера М+245 мл дистиллированной воды.

7.5. Исследуемые образцы. Предварительно развести исследуемые и

контрольные образцы в 21 раз.

Пример подготовки образца к анализу:

25 мкл исследуемого или контрольного образца + 500 мкл буфера Д.

Если концентрация СА 15-3 в предварительно разведенном образце составила более 400 Ед/мл, следует подготовить дополнительное разведение буфером Д в соотношении 1/10 или выше и проанализировать повторно.

## 8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

8.1. В зависимости от количества определяемых образцов подготовить соответствующее количество реагентов, которые перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

На странице 87 приведена схема проведения анализа.

8.2. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 — № 1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;
B1, B2 — № 2 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 0 Ед/мл;
C1, C2 — № 3 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 10 Ед/мл;
D1, D2 — № 4 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 40 Ед/мл;
E1, E2 — № 5 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 100 Ед/мл;
F1, F2 — № 6 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 200 Ед/мл;
G1, G2 — № 7 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 400 Ед/мл;

8.3. С помощью полуавтоматической пипетки внести по 25 мкл калибровочных проб и предварительно разведенных исследуемых образцов в соответствующие лунки.

8.4. Внести во все лунки, кроме A1 и A2, по 100 мкл конъюгата Е №1.

**Примечание:** *Чрезвычайно важно вносить все реагенты как можно ближе ко дну покрытой стрептавидином лунки.*

8.5. Перемешать реагенты в лунках аккуратным постукиванием рамки со стрипами в течение 20–30 секунд.

**Примечание:** *общее время внесения калибровочных проб, контрольных и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

8.6. Инкубировать в течение 60 минут при комнатной температуре (+18...25 °C) без шейкирования.

8.7. По окончании инкубации удалить содержимое лунок путем декантирования или аспирации. После декантирования осторожно постучать планшетом по листу фильтровальной бумаги для удаления капель жидкости. Промыть лунки три раза. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного буфера, предварительно приготовленного к работе (см. п. 7.4).

**Примечание:** *Допускается применять ручное или автоматическое устройство для промывания микропланшетов в соответствии с инструкцией изготовителя.*

8.8. Добавить во все лунки кроме A1 и A2 по 100 мкл конъюгата Е №2. После добавления реагента микропланшет не встряхивать.

8.9. Инкубировать при комнатной температуре 60 минут без шейкирования.

8.10. Промыть лунки как указано в п.8.7.

8.11. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. После добавления реагента микропланшет не встряхивать.

8.12. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре в течение 20–30 минут в зависимости от интенсивности окрашивания.

8.13. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 50 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции и осторожно перемешать в течение 15–20 секунд.

## 9. РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптичес-



кую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

В случае если оптическая плотность калибровочной пробы 400 Ед/мл превышает предел линейного измерения фотометра, необходимо переизмерить оптическую плотность в лунках при длине волны 405 нм.

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину В — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы.

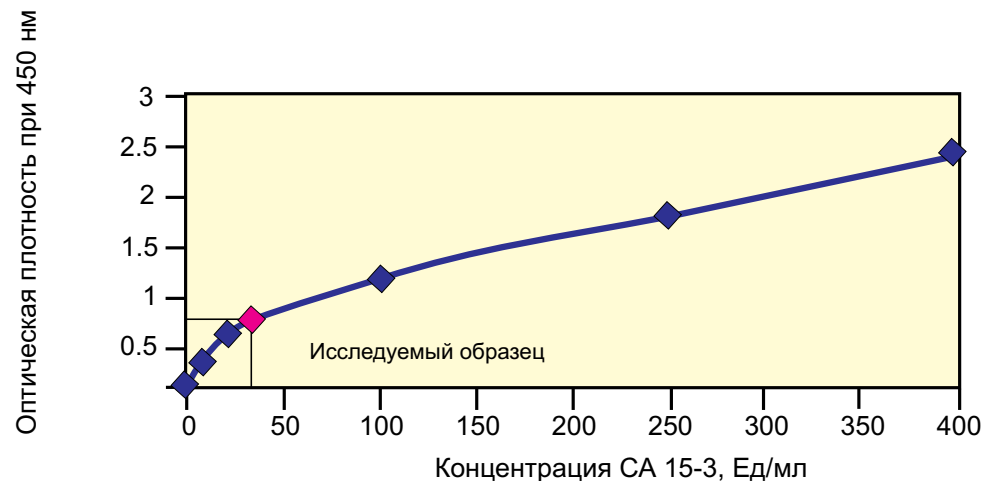
Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой (В-Вт), где Вт — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2.

В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости В (ед.опт.плотн.) от концентрации СА 15-3 калибровочных проб (Ед/мл).

Определить содержание СА 15-3 в пробах по калибровочному графику (см. Рис.1). В случае дополнительного разведения образца необходимо измеренную концентрацию СА 15-3 умножить на фактор разведения.

9.2. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.13, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 30 минут при температуре +2...8°C.

**Рисунок 1. Типичный калибровочный график. (Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!)**



## 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор ОнкоИФА-СА 15-3 должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8 °С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25 °С не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора возможно хранить в течение 1,5 месяцев следующим образом:

- стрипы поместить обратно в пакет из алюминиевой фольги, плотно закрыть и хранить при температуре +2...8 °С.
- калибровочные пробы, конъюгат Е №1, конъюгат Е №2, раствор ТМБ и буфер Д хранить при температуре +2...8 °С.
- буфер М и стоп-реагент хранить при температуре +2...25 °С.
- промывочный буфер, подготовленный к использованию, хранить при комнатной температуре +18...25 °С не более 60 дней.

10.2. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного

графика. Рекомендуется определение концентрации СА 15-3 в контрольных материалах.

10.3. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку/плазму крови.

10.4. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ и стоп-реагента.

10.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

### СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2.							
	1	2	3	4	5	6	7	8-48
КП 0 Ед/мл, мкл	—	25	—	—	—	—	—	—
КП 10 Ед/мл, мкл	—	—	25	—	—	—	—	—
КП 40 Ед/мл, мкл	—	—	—	25	—	—	—	—
КП 100 Ед/мл, мкл	—	—	—	—	25	—	—	—
КП 200 Ед/мл, мкл	—	—	—	—	—	25	—	—
КП 400 Ед/мл, мкл	—	—	—	—	—	—	25	—
СХ*, мкл	—	—	—	—	—	—	—	25
Конъюгат Е-1, мкл	—	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация №1	Перемешать 20-30 секунд, затем без перемешивания, 1 час, КТ							
3-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300
Конъюгат Е-2, мкл	—	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация №2	КТ, темное место, 15–30 минут							
3-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация №3	без перемешивания 20–30 мин, КТ, темное место							
Стоп-реагент, мкл	50	50	50	50	50	50	50	50
Перемешивание	КТ, 15–20 секунд							
Измерение ОП растворов в лунках стрипов	Спектрофотометр, 450 нм							
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа							

Примечания: КП — калибровочная проба;

СХ— анализируемые пробы;

ОП— оптическая плотность;

КТ— комнатная температура (+18...25°C).

\* образцы предварительно разведены буфером Д (п. 7.5.)

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2.

### ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА СА 125 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (ОнкоИФА-СА 125).

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов  
для иммуноферментного (неинфекционные),  
радиоиммунологического и других видов  
иммунохимического анализа  
Комитета по новой медицинской технике МЗ РФ  
(протокол № 8 от 22 сентября 2003 г.)

#### 1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов ОнкоИФА-СА 125 предназначен для количественного определения содержания антигена СА 125 в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. СА 125 относится к онкофетальным белкам. СА 125 является мукогликопротеином с молекулярной массой выше 200 кДа. В норме у взрослых СА 125 присутствует в организме в двух формах — мембраносвязанной и свободной. Связанный антиген выявляется на поверхности эпителиальных клеток фаллопиевых труб, эндометрия, шейки матки, потовых желез, молочных желез, бронхов. В свободной форме он обнаруживается в высоких концентрациях в семенной жидкости, грудном молоке, влагалищных выделениях, слюне, плевральной, бронхоальвеолярной и внутрибрюшинной жидкостях. В кровотоке СА 125 присутствует в низких концентрациях. Увеличение концентрации СА 125 в сыворотке крови свидетельствует о различных патологиях яичников: как злокачественном перерождении ткани яичника, так и при доброкачественных заболеваниях. Повышение содержания СА 125 в сыворотке крови может происходить также при беременности, во время менструаций, при доброкачественных опухолях матки, эндометриозе, раке тела и шейки матки, фаллопиевых труб, при воспалительных процессах в брюшной полости,

а также при ряде злокачественных негинекологических заболеваний — поджелудочной железы, легких, желудочно-кишечного тракта.

Определение СА 125 в сыворотке крови используется при мониторинге больных с установленным раком яичников — для оценки эффективности выбранного лечения, раннего выявления рецидивов и бессимптомно протекающего метастазирования резидуальной опухоли. Диагностическая значимость метода в значительной мере зависит от гистологического типа опухоли, она максимальна в случае серозных карцином яичников, по сравнению с остальными карциномами, и в частности, муцинозными карциномами.

1.3. Набор ОнкоИФА-СА 125 рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

**Примечание:** в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

#### 2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА.

В наборе ОнкоИФА-СА 125 использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к СА 125. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-СА 125-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация СА 125, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-СА 125-пероксидазы, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации СА 125. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству СА 125 в исследуемом образце.

Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству СА 125 в

исследуемом образце. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация СА 125 в исследуемых образцах.

### 3. СОСТАВ НАБОРА:

- Комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к СА 125, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к СА 125» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, содержащие известные количества СА 125: 0; 15; 50; 100; 250; 500 Ед/мл; **концентрации СА 125 в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);**
- буфер для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д» — 1 флакон (3,0 мл);
- конъюгат анти-СА 125-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (18 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (14 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием СА 125, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл);
- пакет закрывающийся полиэтиленовый (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

### 4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

4.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител с раковыми антигенами: РЭА, СА 19-9, СА 15-3, СА 72-4.

4.2. Коэффициент вариации результатов определения СА 125 в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора ОнкоИФА-СА 125 не превышает 8%.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации СА 125 в образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций 15–500 Ед/мл и составляет  $\pm 10\%$ .

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» СА 125 — соответствие измеренной концентрации СА 125 предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 50 Ед/мл. Процент открытия составляет 90–110%.

4.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация СА 125 в сыворотке крови человека не превышает 3 Ед/мл.

4.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора ОнкоИФА-СА 125 хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации СА 125 20 000 Ед/мл.

4.7. Клиническая проверка. Диапазон значений концентраций СА 125 до 35 Ед/мл определяется как нормальный. Концентрация СА 125 повышена у 50% женщин с первичным раком яичников и у 80% женщин с метастатическим раком яичников.

4.8. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций СА 125, соответствующие нормальным.

### 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

5.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидеми-

ческого режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. в состав набора входят образцы и производные крови человека, которые являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

5.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

5.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

## 6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (шейкер), позволяющий производить встряхивание с амплитудой колебаний 3–4 мм и 8–13 Гц (500–800 об/мин) при комнатной температуре (+18...25°C);
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 300 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;

- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

## 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

### 7.1. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка.

- Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.
- Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре (+18...25°C) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

Хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца.

### 7.2. Буфер Д готов к использованию.

7.3. Предварительное разведение исследуемых образцов сывороток крови. Если значения концентрации СА 125 в исследуемых образцах по предварительным данным выше 500 Ед/мл, образцы следует развести буфером Д в 30 раз и в 900 раз:

*Образец №1* (разведение в 30 раз): 290 мкл буфера Д + 10 мкл исследуемого образца.

*Образец №2* (разведение в 900 раз): 290 мкл буфера Д + 10 мкл Образца №1.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

7.4. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) в течение времени не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы поместить в пакет с



этикеткой (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена), который затем вложить в прозрачный пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.5. Конъюгат анти-СА 125-пероксидаза готов к использованию.

7.6. Промывочный буфер. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз. Например: 5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным буфер Р хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.7. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

A1, A2 — №1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;
B1, B2 — №2 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 0 Ед/мл;
C1, C2 — №3 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 15 Ед/мл;
D1, D2 — №4 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 50 Ед/мл;
E1, E2 — №5 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 100 Ед/мл;
1F1, F2 — №6 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 250 Ед/мл;
G1, G2 — №7 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 500 Ед/мл;
H1, H2 — №8 для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

## 8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C). На странице 98 приведена схема проведения анализа.

8.2. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

8.3. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 150 мкл конъюгата анти-СА 125-пероксидаза.

8.4. Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 50 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

**Примечание:** общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.

8.5. Инкубировать стрипы в течение 1 часа при встряхивании на шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800 об/мин.

8.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 7.6, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

8.7. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

8.8. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 минут.

8.9. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм.

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать



величину  $B$  — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой  $B - BT$ , где  $BT$  — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2.

В линейных координатах построить калибровочный график зависимости  $B$  (ед. опт. плотн.) от концентрации СА 125 в калибровочных пробах (Ед/мл).

Определить содержание СА 125 в пробах по калибровочному графику. В случае предварительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию СА 125 умножить на фактор разведения.

8.10. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.8, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение времени не более **20 минут** при комнатной температуре (+18...25°C).

## 9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

9.1. Набор ОнкоИФА-СА 125 должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток. Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить в пакет с этикеткой (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена), который затем вложить в прозрачный пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и конт-

рольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;

- конъюгат Е, буфер Д и раствор ТМБ после вскрытия флакона хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- буферный раствор для промывки лунок, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

9.2. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

9.3. Пробы сыворотки крови можно хранить при температуре +2...8°C не более 2 дней; при необходимости более длительного хранения (до 3 месяцев) — при температуре 20°C и ниже. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания.

9.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4 эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации СА 125 в контрольной сыворотке.

9.5. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

9.6. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и промывочного буфера.

9.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

**СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.**

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9-48
Конъюгат анти-СА-125-пероксидаза, мкл	—	150	150	150	150	150	150	150	150
КП 0 Ед/мл, мкл	—	50	—	—	—	—	—	—	—
КП 15 Ед/мл, мкл	—	—	50	—	—	—	—	—	—
КП 50 Ед/мл, мкл	—	—	—	50	—	—	—	—	—
КП 100 Ед/мл, мкл	—	—	—	—	50	—	—	—	—
КП 250 Ед/мл, мкл	—	—	—	—	—	50	—	—	—
КП 500 Ед/мл, мкл	—	—	—	—	—	—	50	—	—
КС, мкл	—	—	—	—	—	—	—	50	—
СХ, мкл	—	—	—	—	—	—	—	—	50
Инкубация №1	1 час, шейкер, +37°C								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация №2	КТ, темное место, 15–30 минут								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 минуты								
Измерение ОП раство- ров в лунках стрипов	Фотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

Примечания: КП — калибровочная проба;  
 КС — контрольная сыворотка;  
 СХ — анализируемые пробы;  
 ОП — оптическая плотность;  
 КТ — комнатная температура (+18...25°C).

**ПРИЛОЖЕНИЕ 3.**

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА  
 РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО  
 ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
 РАКОВО-ЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА (РЭА)  
 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА  
 (ОнкоИФА - РЭА)**

**1. НАЗНАЧЕНИЕ.**

1.1. Набор реагентов ОнкоИФА — РЭА предназначен для количественного определения концентрации раково-эмбрионального антигена (РЭА) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Раково-эмбриональный антиген — гликопротеин с молекулярной массой 180 кДа, первый из группы так называемых онкофетальных белков. РЭА — наиболее часто используемый маркер при обнаружении рака желудочно - кишечного тракта.

Обнаружение РЭА связано, прежде всего, с раком толстой и прямой кишки, однако, другие злокачественные новообразования (опухоли молочной железы, легких, поджелудочной железы, яичников и других органов) также могут приводить к повышению его концентрации. Существует ряд доброкачественных состояний, при которых концентрация РЭА значительно превышает норму, в частности, воспалительные процессы в легких и желудочно-кишечном тракте и доброкачественные новообразования печени.

С клинической точки зрения значение концентрации РЭА само по себе не имеет диагностической ценности при тестировании на наличие злокачественных новообразований. Этот результат следует использовать только в сочетании с иными клиническими проявлениями, результатами наблюдений и диагностическими параметрами. Имеются случаи, когда у пациентов с колоректальным раком не было обнаружено повышения концентрации РЭА. Кроме того, повышенные концентрации РЭА не всегда изменяются в соответствии с картиной прогрессии или регрессии

заболевания. У курильщиков интервал нормальных концентраций РЭА принимает более широкие значения, чем у некурящих.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестных, 6 калибровочных проб и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

**Примечание:** в случае дробного применения набор может быть использован только в течение 1,5 месяцев после вскрытия компонентов набора.

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

### 2.1. Принцип действия

В наборе ОнкоИФА-РЭА использован одностадийный «сэндвич» - вариант количественного иммуноферментного анализа. В лунки, покрытые стрептавидином, вносятся калибровочные пробы с известным содержанием РЭА, контрольные и анализируемые образцы. Затем добавляется раствор, представляющий собой смесь конъюгатов двух моноклональных антител к РЭА с различной эпитопной специфичностью. Первое антитело конъюгировано с биотином, второе антитело — с ферментом. В результате реакции между моноклональными антителами и молекулой РЭА образуется комплекс, который связывается со стрептавидином, иммобилизованным на стенках лунок. После окончания инкубации антитела, которые не связались с молекулами РЭА, удаляются путем промывки. Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации РЭА в образце.

### 2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованным стрептавидином, маркирован «Стрипы с иммобилизованным стрептавидином»-1 упаковка;
- 6 калибровочных проб (КП) на основе сыворотки крови человека, аттестованные по Первому международному стандарту (The 1st International Reference Preparation (IRP №73/601)), с известной концентрацией РЭА, содержащие соответственно: 0, 5, 10, 25, 100, 250 нг/мл. Точные значения концентраций в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (1 мл).
- раствор, содержащий конъюгат моноклональных мышинных анти-

тел к РЭА с биотином и конъюгат моноклональных антител к РЭА с ферментом, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (13 мл).

- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер М» — 1 флакон (20 мл).
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл).
- стоп-реагент (1Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл).

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность. Данные по интерференции ряда лекарственных препаратов и белковых аналитов приведены в таблице.

Вещество	Концентрация, при которой не наблюдается влияния на результат анализа
Ацетилсалициловая к-та	100 мкг/мл
Аскорбиновая к-та	100 мкг/мл
Кофеин	100 мкг/мл
АФП	10 мкг/мл
ПСА	1,0 мкг/мл
СА-125	10 000 Ед/мл
ХГч	1000 МЕ/мл
ЛГ	10 МЕ/мл
ТТГ	100 мМЕ/мл
Пролактин	100 мкг/мл

3.2. Коэффициент вариации результатов определения РЭА в одном и том же образце с использованием набора ОнкоИФА-РЭА не превышает 8 %.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации РЭА в исследуемых образцах при разведении их сывороткой крови здоровых людей с концентрацией РЭА ниже 5 нг/мл имеет линейный характер в диапазоне 5-250 нг/мл и составляет 90-110%.

3.4. Чувствительность. Аналитическая чувствительность набора ОнкоИФА – РЭА составляет 1 нг/мл.

3.5. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора ОнкоИФА-РЭА хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации РЭА 60 000 нг/мл.

3.6. Клиническая проверка. У большинства здоровых некурящих людей концентрация РЭА составляет  $\leq 5$  нг/мл, у здоровых курящих людей  $\leq 10$  нг/мл.

3.7. Определение «интервала нормальных концентраций» зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленный изготовителем интервал нормальных концентраций только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будет определен интервал нормальных концентраций, характерный для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

#### 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. Компоненты на основе крови человека, входящие в состав набора, проверены на ВИЧ и гемоконтактные гепатиты. Однако ни один из существующих методов проверки не дает абсолютной гарантии отсутствия возбудителя, поэтому эти компоненты являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций. При работе с набором сле-

дует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки.

4.5. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

#### 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длинах волн 405 нм и 450 нм.
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5-50 мкл; на 40-200 мкл; на 200-1000 мкл; 1000-5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- ванночки для конъюгата Е, раствора ТМБ и стоп-реагента;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 1000мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

#### 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 5 суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  или ниже. Не допускаются повторные циклы замораживания-размораживания образца.

## 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К АНАЛИЗУ.

7.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.2. Перед проведением анализа все реагенты, контрольные и исследуемые образцы должны быть доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

7.3. Калибровочные пробы, конъюгат Е, раствор ТМБ и стоп-реагент готовы к использованию.

7.4. Промывочный буфер. Необходимое количество буфера М развести дистиллированной водой в 50 раз.

Например: 5 мл буфера М+245 мл дистиллированной воды.

7.5. Если концентрации РЭА в исследуемом образце по предварительным данным составляет более

250 нг/мл, образец следует развести сывороткой крови здорового человека (с концентрацией РЭА < 5 нг/мл) в соотношении 1/10 или выше.

## 8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

8.1. В зависимости от количества определяемых образцов подготовить соответствующее количество реагентов, которые перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

A1, A2 — № 1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;
--

B1, B2 — № 2 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 0 нг/мл;
---

C1, C2 — № 3 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 5 нг/мл;
---

D1, D2 — № 4 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 10 нг/мл;
--

E1, E2 — № 5 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 25 нг/мл;
--

F1, F2 — № 6 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 100 нг/мл;
---

G1, G2 — № 7 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 250 нг/мл;
---

На странице 109 приведена схема проведения анализа.

8.2. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

8.3. С помощью полуавтоматической пипетки внести по 25 мкл исследуемых образцов, калибровочных и контрольных проб в соответствующие лунки.

8.4. Внести во все лунки кроме A1 и A2 по 100 мкл конъюгата Е.

**Примечание:** *Чрезвычайно важно вносить все реагенты как можно ближе ко дну покрытой стрептавидином лунки.*

8.5. Перемешать реагенты в лунках аккуратным постукиванием рамки со стрипами в течение 20–30 секунд.

**Примечание:** *общее время внесения калибровочных проб, контрольных и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

8.6. Инкубировать в течение 60 минут при комнатной температуре (+18...25 °C) без шейкирования.

8.7. По окончании инкубации удалить содержимое лунок путем декантирования или аспирации. После декантирования осторожно постучать планшетом по листу фильтровальной бумаги для удаления капель жидкости. Промыть лунки три раза. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного буфера, предварительно подготовленного к работе (см.п.7.4.).

**Примечание:** *Допускается применять ручное или автоматическое устройство для промывания микроплашетов в соответствии с инструкцией изготовителя.*

8.8. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. После добавления реагента микроплашет не встряхивать.

8.9. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре в течение 10–30 минут в зависимости от интенсивности окрашивания.

8.10. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последо-



вательности, как и раствор ТМБ, по 50 мкл стоп-реактанта для остановки ферментной реакции и осторожно перемешать в течение 15–20 секунд.

## 9. РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

**В случае, если оптическая плотность калибровочной пробы 250 нг/мл превышает предел линейного измерения фотометра, необходимо переизмерить оптическую плотность в лунках при длине волны 405 нм.**

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину В – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой (В-Вт), где Вт – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2.

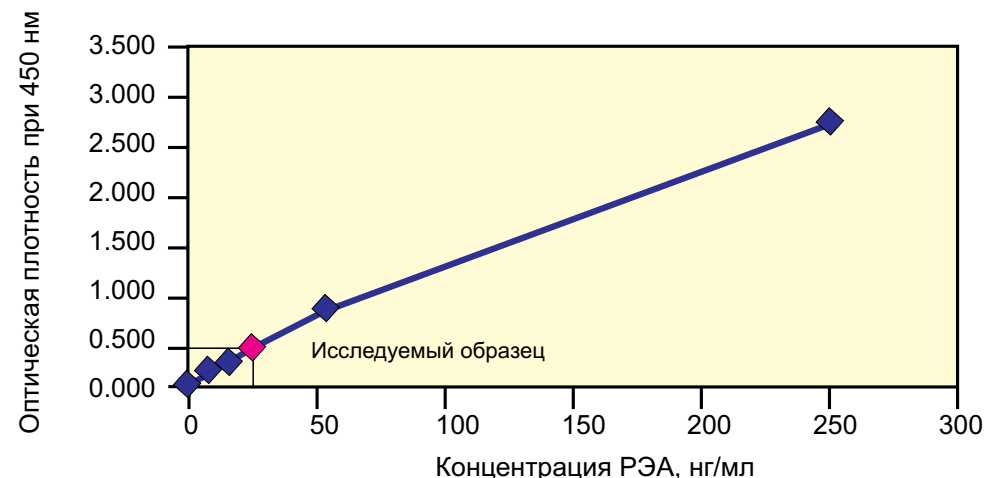
В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости В (ед.опт.плотн.) от концентрации РЭА в калибровочных пробах (нг/мл).

Определить содержание РЭА в пробах по калибровочному графику (см. Рис.1). В случае разведения образца необходимо измеренную концентрацию РЭА умножить на фактор разведения.

9.2. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.10, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не

более 30 минут при температуре +2...8°C.

**Рисунок 1. Типичный калибровочный график (запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!)**



## 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор ОнкоИФА-РЭА должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток.

Срок годности набора – 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора возможно хранить в течение 1,5 месяцев следующим образом:

- стрипы поместить обратно в пакет из алюминиевой фольги, плотно закрыть и хранить при температуре +2...8°C.
- калибровочные пробы, раствор ТМБ и конъюгат Е хранить при температуре +2...8°C.
- буфер М и стоп-реагент хранить при температуре +2...25°C.
- промывочный буфер, подготовленный к использованию, хранить при комнатной температуре +18...25°C не более 60 дней.

10.2. При использовании набора для проведения нескольких неза-



висимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика. Рекомендуется определение концентрации РЭА в контрольных материалах.

10.3. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку крови.

10.4. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ и стоп-реагента.

10.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

### СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2.								
	1	2	3	4	5	6	7	8-48	
КП 0 нг/мл, мкл	—	25	—	—	—	—	—		
КП 5 нг/мл, мкл	—	—	25	—	—	—	—		
КП 10 нг/мл, мкл	—	—	—	25	—	—	—		
КП 25 нг/мл, мкл	—	—	—	—	25	—	—		
КП 100 нг/мл, мкл	—	—	—	—	—	25	—		
КП 250 нг/мл, мкл	—	—	—	—	—	—	25		
СХ, мкл	—	—	—	—	—	—	—	25	
Конъюгат Е, мкл	—	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 1	Перемешать 20-30 секунд, затем без перемешивания 1 час, КТ								
3-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 2	без перемешивания 10-30 мин, КТ, темное место								
Стоп-реагент, мкл	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Перемешивание	КТ, 15-20 секунд								
Измерение ОП растворов в лунках стрипов	Спектрофотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

Примечания: КП — калибровочная проба;  
 СХ — анализируемые пробы;  
 ОП — оптическая плотность;  
 КТ — комнатная температура (+18...25°C).

## ПРИЛОЖЕНИЕ 4.

### ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАКОВОГО АНТИГЕНА (СА 19-9) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА (ОнкоИФА – СА 19-9).

#### 1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов ОнкоИФА-СА 19-9 предназначен для количественного определения концентрации ракового антигена СА 19-9 в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Раковый антиген СА 19-9 относится к группе муциноподобных гликопротеинов, т.н. Sialyl Lewis Antigens (SLA). Повышенная концентрация СА 19-9 в сыворотке крови часто наблюдается у пациентов со злокачественными новообразованиями желудочно-кишечного тракта, в частности, карциномами поджелудочной железы, прямой кишки, желудка и печени. Повышение концентрации СА 19-9, наряду с повышением концентрации РЭА, позволяет предположить патологию желчного пузыря. Обнаружение этого опухолеспецифичного антигена может также быть связано с некоторыми другими новообразованиями.

Определение концентрации СА 19-9 в сыворотке крови может быть использовано при мониторинге пациентов, у которых диагностированы вышеперечисленные опухоли.

С клинической точки зрения значение концентрации СА 19-9 само по себе не имеет диагностической ценности при тестировании на наличие злокачественных новообразований. Этот результат следует использовать только в сочетании с иными клиническими проявлениями, результатами наблюдений и диагностическими параметрами.

Повышенную концентрацию СА 19-9 в сыворотке крови отмечают у 1% нормальных здоровых женщин, у 3% женщин с незлокачественными патологиями яичников и у 6% пациентов с различными незлокачественными состояниями (в том числе во время первого триместра беременности, менструации, при эндометриозе, фиброзе матки, остром салъ-

пингите, заболеваниях печени, воспалительных процессах брюшины и перикарда).

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестных, 6 калибровочных проб и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

**Примечание:** в случае *дробного применения набор может быть использован только в течение 1,5 месяцев после вскрытия компонентов набора.*

#### 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

##### 2.1. Принцип действия

В наборе ОнкоИФА-СА 19-9 использован двухстадийный «сэндвич» – вариант количественного иммуноферментного анализа. На первой стадии анализа в лунки, покрытые стрептавидином, вносятся калибровочные пробы с известным содержанием

СА 19-9, контрольные и анализируемые образцы. Затем добавляется раствор моноклональных антител к

СА 19-9, конъюгированных с биотином, и реагенты перемешиваются. В результате реакции между моноклональными антителами и молекулой СА 19-9 образуется комплекс, который связывается со стрептавидином, иммобилизованным на стенках лунок. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит разделение свободных и связанных антителами белков сыворотки крови. Затем в лунки добавляется раствор конъюгированного с ферментом антитела, специфичного к другому эпитопу молекулы СА 19-9. Меченное ферментом антитело связывается с молекулами СА 19-9, которые были иммобилизованы во время первой инкубации. Несвязавшийся конъюгат удаляется путем промывки. Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации СА 19-9 в образце.

##### 2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилучных стрипов в рамке с иммобилизованным стрептавидином, маркирован «Стрипы с иммобилизованным стрептавидином» – 1 упаковка

- 6 калибровочных проб (КП) с известной концентрацией СА 19-9, содержащие соответственно: 0, 10, 50, 100, 250 и 500 Ед/мл. Точные значения концентраций в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов – 6 флаконов (1 мл).
- раствор, содержащий конъюгат моноклональных антител к СА 19-9 с биотином, маркирован «Конъюгат Е №1» – 1 флакон (13 мл).
- раствор, содержащий конъюгат моноклональных антител к СА 19-9 с пероксидазой хрена, маркирован «Конъюгат Е №2» – 1 флакон (13 мл).
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер М» – 1 флакон (20 мл).
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» – 1 флакон (14 мл).
- стоп-реагент (1Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» – 1 флакон (14 мл).

### 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к СА 19-9 с другими анализатами и интерференция приведены в таблице.

3.2. Коэффициент вариации результатов определения СА 19-9 в одном и том же образце с использованием набора ОнкоИФА-СА 19-9 не превышает 8 %.

Вещество	Исследованная концентрация	Перекрестная реакция
СА 19-9	—	100%
СА 125	10 000 Ед/мл	0,1%
СА 15-3	15 000 Ед/мл	Не определяется
ПСА	5000 нг/мл	Не определяется
АФП	10 000 нг/мл	Не определяется
РЭА	10 000 нг/мл	Не определяется
ХГч	10 000 мМЕ/мл	Не определяется
Ревматоидный фактор	1000 кМЕ/мл	Не определяется

3.3. Чувствительность. Аналитическая чувствительность набора ОнкоИФА-СА 19-9 составляет 1,0 Ед/мл.

3.4. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора ОнкоИФА-СА 19-9 хук-эффект не наблюдается.

3.5. Клиническая проверка. У большинства здоровых людей концентрация СА 19-9  $\leq 40$  Ед/мл.

3.6. Определение «интервала нормальных концентраций» зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленный изготовителем интервал нормальных концентраций только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будет определен интервал нормальных концентраций, характерный для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

### 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. Компоненты на основе крови человека, входящие в состав набора, проверены на ВИЧ и гемоконтактные гепатиты. Однако ни один из существующих методов проверки не дает абсолютной гарантии отсутствия возбудителя, поэтому эти компоненты являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных

инфекций. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки.

4.5. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

## 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длинах волн 405 нм и 450 нм.
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными накопечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5-50 мкл; на 40-200 мкл; на 200-1000 мкл; 1000-5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными накопечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- ванночки для конъюгата Е №1, конъюгата Е №2, раствора ТМБ и стоп-реагента;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 1000мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

## 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре +2...8°C не более 5 суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре -20°C или ниже. Не допускаются повторные циклы замораживания-размораживания образца.

## 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К АНАЛИЗУ.

7.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.2. Перед проведением анализа все реагенты, контрольные и исследуемые образцы должны быть доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

7.3. Калибровочные пробы, конъюгат Е №1, конъюгат Е №2, раствор ТМБ и стоп-реагент готовы к использованию.

7.4. Промывочный буфер. Необходимое количество буфера М развести дистиллированной водой в 50 раз. Например: 5 мл буфера М+245 мл дистиллированной воды.

7.5. Если концентрация СА 19-9 в образце по предварительным данным составляет более 500 Ед/мл, образец допускается развести в соотношении 1/10 (или выше) калибровочной пробой №1.

## 8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

8.1. В зависимости от количества определяемых образцов подготовить соответствующее количество реагентов, которые перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

На странице 120 приведена схема проведения анализа.

8.2. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 – № 1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;
B1, B2 – № 2 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 0 Ед/мл;
C1, C2 – № 3 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 10 Ед/мл;
D1, D2 – № 4 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 50 Ед/мл;
E1, E2 – № 5 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 100 Ед/мл;

F1, F2 — № 6 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 250 Ед/мл;
---

G1, G2 — № 7 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 500 Ед/мл;
---

8.3. С помощью полуавтоматической пипетки внести по 25 мкл калибровочных проб, контрольных проб и исследуемых образцов в соответствующие лунки.

8.4. Внести во все лунки, кроме A1 и A2, по 100 мкл конъюгата Е №1.

**Примечание:** *Чрезвычайно важно вносить все реагенты как можно ближе ко дну покрытой стрептавидином лунки.*

8.5. Перемешать реагенты в лунках аккуратным постукиванием рамки со стрипами в течение 20–30 секунд.

**Примечание:** *общее время внесения калибровочных проб, контрольных и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

8.6. Инкубировать в течение 60 минут при комнатной температуре (+18...25 °С) без шейкирования.

8.7. По окончании инкубации удалить содержимое лунок путем декантирования или аспирации. После декантирования осторожно постучать планшетом по листу фильтровальной бумаги для удаления капель жидкости. Промыть лунки три раза. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного буфера, предварительно приготовленного к работе (см. п. 7.4.).

**Примечание:** *Допускается применять ручное или автоматическое устройство для промывания микропланшетов в соответствии с инструкцией изготовителя.*

8.8. Добавить во все лунки кроме A1 и A2 по 100 мкл конъюгата Е №2. После добавления реагента микропланшет не встряхивать.

8.9. Инкубировать при комнатной температуре 60 минут без шейкирования.

8.10. Промыть лунки, как указано в п. 8.7.

8.11. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. После добавления реагента микропланшет не встряхивать.

8.12. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°С) в течение 15–30 минут в зависимости от интенсивности окрашивания.

8.13. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 50 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции и осторожно перемешать в течение 15–20 секунд.

## 9. РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

**В случае если оптическая плотность калибровочной пробы 500 Ед/мл превышает предел линейного измерения фотометра, необходимо переизмерить оптическую плотность в лунках при длине волны 405 нм.**

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину В — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы.

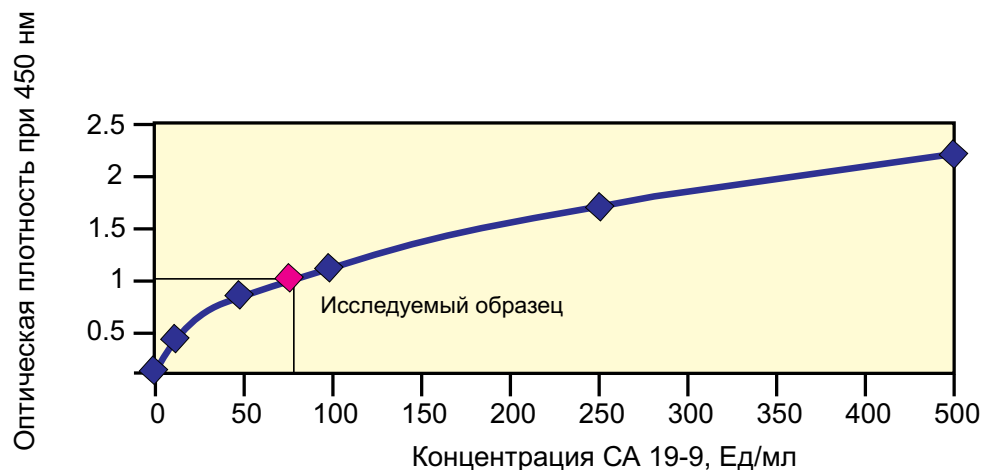
Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой (В-Вт), где Вт — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2.

В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости В (ед.опт.плотн.) от концентрации СА 19-9 в калибровочных пробах (Ед/мл).

Определить содержание СА 19-9 в пробах по калибровочному графику (см. Рис.1). В случае разведения образцов необходимо измеренную концентрацию СА 19-9 умножить на фактор разведения.

9.2. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.13, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение не более 30 минут при температуре +2...8°С.

**Рисунок 1. Типичный калибровочный график. (Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!)**



## 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор ОнкоИФА-СА 19-9 должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора возможно хранить в течение 1,5 месяцев следующим образом:

- стрипы поместить обратно в пакет из алюминиевой фольги, плотно закрыть и хранить при температуре +2...8°C.
- калибровочные пробы, конъюгат Е №1, раствор ТМБ и конъюгат Е №2 хранить при температуре +2...8°C
- буфер М и стоп-реагент хранить при температуре +2...25°C
- промывочный буфер, подготовленный к использованию, хранить при комнатной температуре +18...25°C не более 60 дней.

10.2. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного

графика. Рекомендуется определение концентрации СА 19-9 в контрольных материалах.

10.3. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку крови.

10.4. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ и стоп-реагента.

10.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.



## СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2.								
	1	2	3	4	5	6	7	8-48	
КП 0 Ед/мл, мкл	—	25	—	—	—	—	—		
КП 10 Ед/мл, мкл	—	—	25	—	—	—	—		
КП 50 Ед/мл, мкл	—	—	—	25	—	—	—		
КП 100 Ед/мл, мкл	—	—	—	—	25	—	—		
КП 250 Ед/мл, мкл	—	—	—	—	—	25	—		
КП 500 Ед/мл, мкл	—	—	—	—	—	—	25		
СХ, мкл	—	—	—	—	—	—	—	25	
Конъюгат Е-№1, мкл	—	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 1	Перемешать 20-30 секунд, затем без перемешивания 1 час, КТ								
3-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300
Конъюгат Е-2, мкл	—	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 2	без перемешивания 1 час, КТ								
3-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300	3х 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 3	без перемешивания 15-30 мин, КТ, темное место								
Стоп-реагент	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Перемешивание	КТ, 15-20 секунд								
Измерение ОП растворов в лунках стрипов	Спектрофотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

Примечания: КП — калибровочная проба;  
 СХ — анализируемые пробы;  
 ОП — оптическая плотность;  
 КТ — комнатная температура (+18...25°C).

## ПРИЛОЖЕНИЕ 5.

### ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ альфа-ФЕТОПРОТЕИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА (ИФА-АФП-1).

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов для иммуноферментного (неинфекционные), радиоиммунологического и других видов иммунохимического анализа Комитета по новой медицинской технике МЗ РФ (протокол № 10 от 20 ноября 2000 г.)

### ВЗАМЕН ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ, УТВЕРЖДЕННОЙ 16 июля 1997 г.

#### 1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов ИФА-АФП-1 предназначен для количественного определения концентрации альфа-фетопротеина в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Альфа-фетопротеин (АФП) является гликопротеином с молекулярной массой около 70 000 Да. В процессе развития человека АФП образуется главным образом в желточном мешке и эмбриональной печени и в меньшей степени в желудочно-кишечном тракте. Своей максимальной концентрации (до 240 000 МЕ/мл) в сыворотке крови плода АФП достигает в период 12–15 недель внутриутробного развития, после чего его уровень снижается и достигает нормы (0–16 МЕ/мл) к концу второго года жизни. В таких пределах в норме этот показатель сохраняется на протяжении всей жизни.

АФП, являясь главным белком сыворотки крови раннего плода, выделяется почками плода в амниотическую жидкость и оттуда через плаценту и пупочный канатик проникает в систему кровообращения матери. Уровень

АФП в крови беременных женщин постоянно возрастает и достигает максимума (до 400 МЕ/мл) к середине третьего триместра беременности.

Изменение концентрации АФП в сыворотке крови беременных женщин является важным показателем пренатальной диагностики некоторых врожденных заболеваний (открытые пороки медуллярной трубы, синдром Дауна). Кроме того, этот метод широко применяется в акушерстве при диагностике множественной беременности, внутриутробной смерти плода и угрозе выкидыша. Определение уровня АФП также может быть использовано при диагностике и мониторинге различных видов рака. Так, например, высокий и удерживающийся уровень АФП (800–80 000 МЕ/мл и выше) очень часто сопутствует первичной гепатоме, тератомам семенников и опухолям эндодермального синуса яичников.

1.3. Набор ИФА-АФП-1 рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно.

**Примечание:** в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

## 2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА.

В наборе ИФА-АФП-1 использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к АФП. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-АФП-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация АФП, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-АФП-пероксидазы, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации АФП. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству АФП в исследуемом образце.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание

раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата анти-АФП-пероксидазы. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация АФП в определяемых образцах.

## 3. СОСТАВ НАБОРА:

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к АФП, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к АФП» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, аттестованные по Первому международному стандарту WHO на АФП 72/225, содержащие известные количества АФП: 0; 10; 50; 100; 200 и 300 МЕ/мл; **концентрации АФП в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов** — 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- конъюгат анти-АФП-пероксидазы, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- буфер для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д» — 1 флакон (10 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (14 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием АФП, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл);
- пакет полиэтиленовый закрывающийся (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

#### 4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

4.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител к АФП с сывороточным альбумином, хорионическим гонадотропином, плацентарным лактогеном и иммуноглобулинами человека.

4.2. Коэффициент вариации результатов определения АФП в одном и том же образце с использованием набора ИФА-АФП-1 не превышает 8%.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации альфа-фетопротейна в образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций 10–300 МЕ/мл и составляет 90–110%.

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» АФП — соответствие измеренной концентрации АФП предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 50 МЕ/мл. Процент открытия составляет 90–110%.

4.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация АФП в сыворотке крови человека не превышает 0,9 МЕ/мл.

4.6. В наборе ИФА-АФП-1 значения концентраций калибровочных проб выражены в МЕ/мл. Для пересчета концентраций АФП в нг/мл необходимо пользоваться соотношением: 1 нг/мл = 1,25 МЕ/мл.

4.7. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора ИФА-АФП-1 хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации АФП 12 500 МЕ/мл.

4.8. Клиническая проверка. Концентрация АФП в сыворотке крови у 200 здоровых доноров обоих полов составила 0–14,4 МЕ/мл.

4.9. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций АФП, соответствующие нормальным.

#### 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

5.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. в состав набора входят образцы и производные крови человека, которые являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

5.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

5.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

#### 6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в стрипах при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание с амплитудой колебаний 3–4 мм и частотой 8–13 Гц (500–800 об/мин) при температуре +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с изменяемым объ-

емом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл с наконечниками;

- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 300 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

## 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

### 7.1. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка.

- Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.
- Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре (+18...25°C) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая. Хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца.

### 7.2. Буфер Д готов к использованию.

**7.3. Предварительное разведение исследуемых образцов сывороток крови.** Если концентрация АФП в исследуемых образцах по предварительным данным выше 300 МЕ/мл, образцы следует развести буфером Д в 100 и 5000 раз. Пример подготовки образца к анализу:

*Образец № 1* (разведение в 100 раз): 990 мкл буфера Д + 10 мкл исследуемого образца.

*Образец № 2* (разведение в 5000 раз): 490 мкл буфера Д + 10 мкл образца № 1.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

**7.4. Стрипы.** Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) в течение времени не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы поместить в пакет с этикеткой (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена), который затем вложить в прозрачный пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.5. Промывочный буфер.** Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например: 5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным буфер Р хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.6.** Конъюгат анти-АФП-пероксидаза готов к использованию.

**7.7.** Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию.

**7.8.** Стоп-реагент готов к использованию.

**8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.** 8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

На странице 132 приведена схема проведения анализа.

**8.2.** Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 — № 1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 — № 2 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 0 МЕ/мл;

C1, C2 — № 3 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 10 МЕ/мл;

D1, D2 — № 4 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 50 МЕ/мл;

E1, E2 — № 5 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 100 МЕ/мл;

F1, F2 — № 6 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 200 МЕ/мл;

G1, G2 — № 7 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 300 МЕ/мл;

H1, H2 — № 8 для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

8.3. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 100 мкл раствора конъюгата анти-АФП-пероксидаза.

8.4. Внести в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 20 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

Примечание: общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.

8.5. Инкубировать стрипы в течение 1 часа при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800 об/мин.

8.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 7.5, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

8.7. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 15–30 минут в зависимости от степени разви-

тия окраски.

8.8. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 минут.

8.9. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм.

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину В — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой  $B - BT$ , где  $BT$  — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2.

В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости В (ед.опт.плотн.) от концентрации АФП в калибровочных пробах (МЕ/мл).

Определить содержание АФП в пробах по калибровочному графику. В случае предварительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию АФП умножить на фактор разведения.

8.10. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.8, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение времени не более 20 минут при комнатной температуре (+18...25°C).

## 9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

9.1. Набор ИФА-АФП-1 должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить в пакет с этикеткой (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена), который затем вложить в прозрачный пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- конъюгат Е, буфер Д и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- буферный раствор для промывки лунок, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ( $+18...25^{\circ}\text{C}$ ) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности.

9.2. Пробы сыворотки крови можно хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 2 дней; при необходимости более длительного хранения (до 3 месяцев) — при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  и ниже. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания.

9.3. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную и мутную сыворотку, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

9.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации альфа-фетопroteина в контрольной сыворотке.

9.5. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

9.6. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и промывочного буфера.

9.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.



## СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9-48
Конъюгат анти-АФП-пероксидаза, мкл	—	100	100	100	100	100	100	100	100
КП 0 МЕ/мл, мкл	—	20	—	—	—	—	—	—	—
КП 10 МЕ/мл, мкл	—	—	20	—	—	—	—	—	—
КП 50 МЕ/мл, мкл	—	—	—	20	—	—	—	—	—
КП 100 МЕ/мл, мкл	—	—	—	—	20	—	—	—	—
КП 200 МЕ/мл, мкл	—	—	—	—	—	20	—	—	—
КП 300 МЕ/мл, мкл	—	—	—	—	—	—	20	—	—
КС, мкл	—	—	—	—	—	—	—	20	—
СХ, мкл	—	—	—	—	—	—	—	—	20
Инкубация №1	1 час, термостатируемый шейкер, +37°C								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация №2	КТ, темное место, 15–30 минут								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 минуты								
Измерение ОП растворов в лунках стрипов	Фотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

Примечания: КП — калибровочная проба;  
 КС — контрольная сыворотка;  
 СХ — анализируемые пробы;  
 ОП — оптическая плотность;  
 КТ — комнатная температура (+18...25°C).

## ПРИЛОЖЕНИЕ 6.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ  
 ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
 ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА  
 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА  
 (Гонадотропин ИФА-ХГч-1).

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов  
 для иммуноферментного (неинфекционные),  
 радиоиммунологического и других видов  
 иммунохимического анализа Комитета по  
 новой медицинской технике МЗ РФ  
 (протокол № 8 от 18 сентября 2000 г.)

ВЗАМЕН ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ,  
 УТВЕРЖДЕННОЙ 02 октября 1998 г.

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов Гонадотропин ИФА-ХГч-1 предназначен для количественного определения концентрации хорионического гонадотропина в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Хорионический гонадотропин (ХГ) является гликопротеином с молекулярной массой около 37 000 Да, состоящим из двух субъединиц — альфа и бета.

Количественное определение уровня ХГ считается наиболее надежным индикатором при ранней диагностике беременности.

Изменение концентрации ХГ в сыворотке крови беременных женщин является важным показателем пренатальной диагностики некоторых врожденных заболеваний (открытые пороки медуллярной трубы, синдром Дауна). Кроме того, определение концентрации ХГ в сыворотке крови широко применяется в акушерстве при диагностике множественной беременности, угрозе выкидыша и внематочной беременности.

Хотя присутствие ХГ в сыворотке крови обычно связано с нормальной беременностью, повышенные уровни ХГ также обнаруживаются у больных с тератогенными карциномами и трофобластическими новообразованиями и (иногда в случаях эктопического синтеза ХГ) при раке яичка, молочной железы, тонкого кишечника, легких и предстательной железы. Уровень ХГ при некоторых видах рака может достигать величин, превышающих 100 000 МЕ/л. Измерение уровня ХГ является важным методом диагностики и мониторинга таких заболеваний.

1.3. Набор Гонадотропин ИФА-ХГч-1 рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

**Примечание:** в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

## 2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА.

В наборе Гонадотропин ИФА-ХГч-1 использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к  $\beta$ -субъединице ХГ. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-ХГ-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация ХГ, содержащегося в исследуемом образце, и связывание с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-ХГ-пероксидазы, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации ХГ. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству ХГ в исследуемом образце.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации ХГ в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности

раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ХГ в определяемых образцах.

## 3. СОСТАВ НАБОРА:

- Комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ХГ, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к ХГ» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, аттестованные по Третьему международному стандарту ХГ человека WHO 75/537, содержащие известные количества ХГ — 0; 15; 50; 125; 250 и 500 МЕ/л; **концентрации ХГ в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов** — 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- конъюгат анти-ХГ-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (18 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (14 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл).
- буфер для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д» — 1 флакон (20 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием ХГ маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл);
- пакет полиэтиленовый закрывающийся закрывающийся (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

## 4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

4.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител к  $\beta$  —субъединице ХГ с тиреотропным, лютеинизирующим и фолликулостимулирующим гормонами человека.

4.2. Коэффициент вариации результатов определения ХГ в одном и том же образце с использованием набора Гонадотропин ИФА-ХГч-1 не превышает 8%.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации ХГ в образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций 15–500 МЕ/л и составляет 90–110%.

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ХГ — соответствие измеренной концентрации ХГ предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 50 МЕ/л. Процент открытия составляет 90–110%.

4.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ХГ в сыворотке крови человека не превышает 5 МЕ/л.

4.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора Гонадотропин ИФА-ХГч-1 хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации ХГ 400 000 МЕ/л.

4.7. Клиническая проверка. Концентрация ХГ у 200 здоровых доноров обоих полов в возрасте 18–40 лет не превышала 10 МЕ/л. В таблице приведены значения ожидаемых показателей ХГ у женщин на различных сроках нормально протекающей беременности и соответствующие им рекомендуемые разведения анализируемой сыворотки крови перед проведением анализа.

4.8. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ХГ, соответствующие нормальным.

## 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

5.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Срок беременности по ПДПМ, количество недель	Медиана, МЕ/л	Толерантные пределы, МЕ/л	Рекомендуемое разведение сыворотки крови
2	150	50–300	без разведения
3-4	2 000	1 500–5 000	1:20
4-5	20 000	10 000–30 000	1:1 400
5-6	50 000	20 000–100 000	1:1 400
6-7	100 000	50 000–200 000	1:1400 и 1:2000
7-8	80 000	40 000–200 000	1:1400 и 1:2000
8-9	70 000	35 000–140 000	1:1400
9-10	65 000	32 500–130 000	1:1400
10-11	60 000	30 000–120 000	1:1400
11-12	55 000	27 500–110 000	1:1400
13-14	50 000	25 000–100 000	1:1400
15-16	40 000	20 000–80 000	1:1400
17-21	30 000	15 000–60 000	1:1400

5.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. в состав набора входят образцы и производные крови человека, которые являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

5.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

5.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

## 6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в стрипах при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание с амплитудой колебаний 3–4 мм и частотой 8–13 Гц (500–800 об/мин) при температуре +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл с наконечниками;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 300 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

## 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

### 7.1. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка.

- Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.
- Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми

на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре (+18...25°C) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

Хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца.

### 7.2. Буфер Д готов к использованию.

7.3. Предварительное разведение исследуемых образцов сывороток крови. Если значения ХГ в исследуемых образцах по предварительным данным выше 500 МЕ/л, образцы следует развести буфером Д в 20, 400 и 2000 раз. Пример подготовки образца к анализу:

*Образец №1* (разведение в 20 раз): 190 мкл буфера Д + 10 мкл исследуемого образца.

*Образец №2* (разведение в 400 раз): 190 мкл буфера Д + 10 мкл образца №1.

*Образец №3* (разведение в 2000 раз): 160 мкл буфера Д + 40 мкл образца №2.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

7.4. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре в течение времени не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы поместить в пакет с этикеткой (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена), который затем вложить в прозрачный пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.5. Промывочный буфер. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз. Например: 5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным буфер Р хранить закрытым при

температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.6. Конъюгат анти-ХГ-пероксидаза готов к использованию.

7.7. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

## 8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры. На странице 144 приведена схема проведения анализа.

8.2. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 — №1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;
B1, B2 — №2 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 0 МЕ/л;
C1, C2 — №3 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 15 МЕ/л;
D1, D2 — №4 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 50 МЕ/л;
E1, E2 — №5 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 125 МЕ/л;
F1, F2 — №6 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 250 МЕ/л;
G1, G2 — №7 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 500 МЕ/л;
H1, H2 — №8 для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

8.3. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 150 мкл раствора конъюгата анти-ХГ-пероксидаза.

8.4. Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 50 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

**Примечание:** общее время внесения калибровочных проб, контрольной

сыворотки и образцов сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.

8.5. Инкубировать стрипы в течение 1 часа при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800 об/мин.

8.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 7.5, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

8.7. Во все лунки немедленно внести по 100 мкл раствора тетраметилбензидина. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

8.8. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 минут.

8.9. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм.

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину В — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой В — ВТ, где ВТ — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2.



В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости  $B$  (ед.опт.плотн.) от концентрации ХГ в калибровочных пробах (МЕ/л).

Определить содержание ХГ в пробах по калибровочному графику. В случае предварительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию ХГ умножить на фактор разведения.

8.10. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.8, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение времени не более **20 минут** при комнатной температуре (+18...25°C).

## 9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

9.1. Набор ГонадотропинИФА-ХГч-1 должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить в пакет с этикеткой (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена), который затем вложить в прозрачный пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- конъюгат Е, буфер Д и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- буферный раствор для промывки лунок, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C)

не более 5 суток;

- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

9.2. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

9.3. Пробы сыворотки крови можно хранить при температуре +2...8°C не более 2 дней; при необходимости более длительного хранения (до 3 месяцев) — при температуре –20°C и ниже. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания.

9.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4 эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации ХГ в контрольной сыворотке.

9.5. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

9.6. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и промывочного буфера.

9.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.



## СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9-48
Конъюгат анти-ХГ-пероксидаза, мкл	—	150	150	150	150	150	150	150	150
КП 0 МЕ/л, мкл	—	50	—	—	—	—	—	—	—
КП 15 МЕ/л, мкл	—	—	50	—	—	—	—	—	—
КП 50 МЕ/л, мкл	—	—	—	50	—	—	—	—	—
КП 125 МЕ/л, мкл	—	—	—	—	50	—	—	—	—
КП 250 МЕ/л, мкл	—	—	—	—	—	50	—	—	—
КП 500 МЕ/л, мкл	—	—	—	—	—	—	50	—	—
КС, мкл	—	—	—	—	—	—	—	50	—
СХ, мкл	—	—	—	—	—	—	—	—	50
Инкубация №1	1 час, термостатируемый шейкер, +37°C								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация №2	КТ, темное место, 15–30 минут								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 минуты								
Измерение ОП растворов в лунках стрипов	Фотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

Примечания: КП — калибровочная проба;

КС — контрольная сыворотка;

СХ — анализируемые пробы;

ОП — оптическая плотность;

КТ — комнатная температура (+18...25°C).

## ПРИЛОЖЕНИЕ 7.

# ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА КОНТРОЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ «ОНКОМАРКЕРЫ» ДЛЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ МЕТОДОВ КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ (ПолиКМ-онко).

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор аттестованных контрольных материалов ПолиКМ-онко предназначен для использования в качестве контрольных сывороток для контроля правильности и воспроизводимости результатов лабораторных исследований количественного определения опухолевых маркеров и других веществ, определяемых с помощью иммуноаналитических методов. Набор неаттестованных контрольных материалов ПолиКМ-онко предназначен только для контроля воспроизводимости результатов лабораторных исследований количественного определения опухолевых маркеров.

1.2. Набор предназначен для определения аналитов: Альфа-фето-протеин (АФП), Карциноэмбриональный антиген (РЭА), Пролактин, Простат-специфический антиген (Общий ПСА (оПСА) и Свободный ПСА (сПСА)), Раковые антигены (СА 125, СА 15-3, СА 19-9), Тиреоглобулин (ТГ), Ферритин, Хорионический гонадотропин (ХГЧ).

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

## 2.1. Принцип действия.

Набор контрольных образцов на основе сыворотки крови человека позволяет определять концентрации входящих в его состав очищенных препаратов гормонов, опухолевых маркеров и других веществ с помощью метода иммуноанализа для контроля правильности и воспроизводимости результатов лабораторных исследований количественного определения этих аналитов.

## 2.2. Состав набора.

В состав набора входят флаконы из темного стекла с лиофилизированными препаратами контрольных образцов, укупоренные резиновым

стоппером и завальцованные цветным алюминиевым колпачком:

*уровень 1 (норма)* — алюминиевый колпачок красного цвета;

*уровень 2 (повышенное содержание маркеров)* — алюминиевый колпачок зеленого цвета;

*уровень 3 (патологически высокое содержание маркеров)* — алюминиевый колпачок синего цвета.

2.3. Варианты комплектации:

- комплект из трех уровней по 1 флакону каждого;
- комплект из трех флаконов одного уровня;
- каждый уровень поштучно.

### 3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

3.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

3.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

3.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарноэпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

3.4. Компоненты на основе крови человека, входящие в состав набора, проверены на ВИЧ и гемоконтактные гепатиты. Однако ни один из существующих методов проверки не дает абсолютной гарантии отсутствия возбудителя, поэтому эти компоненты являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки.

3.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

3.6. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

### 4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.

- Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными накопечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

### 5. ПОДГОТОВКА КОНТРОЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

5.1. Для восстановления лиофилизированных контрольных материалов перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность.

5.2. В каждый флакон по стенке внести точно по 2,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками (точность дозирования добавляемой воды прямо влияет на точность получаемых результатов!). Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре (+18...25°C) без перемешивания.

5.3. Аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 20 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

5.4. Убедиться, что на стенках и крышках не осталось нерастворенных частиц.

### 6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

Провести определения аналитов в соответствии с инструкцией производителя тест-системы.

### 7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

7.1. Набор контрольных материалов ПолиКМ-онко должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

Срок годности набора — 2 года.

7.2. Восстановленные (растворенные) контрольные материалы хра-

нить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$ . Исследование *СА 15-3*, *СА 19-9*, *сПСА*, *Ферритина*, *АФП* и *Пролактина* должно быть проведено в течение одного дня; *оПСА* – в течение двух дней. Допускается исследование *РЭА*, *СА 125*, *ТГ* и *ХГЧ* в течение пяти последующих дней.

7.3. Для экономного использования контрольного материала и для исследований, которые не могут быть выполнены в указанные сроки, допускается после растворения разделить содержимое флаконов на аликвоты. Объемы аликвот поместить в пробирки или флаконы соответствующего объема и хранить герметично закрытыми при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  и ниже не более 1 месяца. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания, так как повторение этой процедуры может привести к недопустимо большим изменениям в концентрации онкомаркеров.

*СА 15-3* и *СА 19-9* не выдерживают замораживания, поэтому эти аналиты необходимо определять в день растворения.

7.4. При помутнении содержимого флаконов не следует использовать контрольные материалы для проведения анализа.

7.5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.