

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра
Д. Л. Пиневич Д. Л. Пиневич
_____ 2013 г.
Регистрационный № 082-0813

**МЕТОД ОЦЕНКИ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ОПУХОЛЕВОГО
ПРОЦЕССА У ПАЦИЕНТОК, СТРАДАЮЩИХ РАКОМ ТЕЛА
МАТКИ**

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской
радиологии им. П.Н. Александрова», Учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет»

Авторы: Т.Ю. Принькова, д.м.н., профессор В.И. Прохорова, к.б.н. Т.П.
Цырусъ, к.м.н. С.А. Мавричев, д.м.н., профессор А.Д. Таганович.

Минск, 2013

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
04.10.2013
Регистрационный № 082-0813

**МЕТОД ОЦЕНКИ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА
У ПАЦИЕНТОК, СТРАДАЮЩИХ РАКОМ ТЕЛА МАТКИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», УО «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: Т.Ю. Принькова, д-р мед. наук, проф. В.И. Прохорова, канд. биол. наук Т.П. Цырус, канд. мед. наук С.А. Мавричев, д-р мед. наук, проф. А.Д. Таганович

Минск 2013

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) разработана для оценки по лабораторным показателям степени распространенности опухоли у пациенток, страдающих раком тела матки, на дооперационном этапе лечения. Такая оценка является дополнительным прогностическим критерием и ни в коей мере не исключает проведения других диагностических мероприятий и морфологической верификации диагноза.

Инструкция предназначена для врачей-онкологов, врачей-акушеров-гинекологов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациенткам, страдающим раком тела матки.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Средства измерений:

- иммуноферментный анализатор (ИФА);
- ЭПР-спектрометр;
- спектрофотометр;
- комплект дозаторов с переменным объемом доз.

Вспомогательные устройства:

- центрифуга лабораторная;
- холодильник бытовой с температурным режимом 2–8°C;
- морозильник с температурным режимом -20°C;
- термостат;
- шкаф сушильный электрический;
- аппарат для дистилляции воды;
- лабораторная посуда (колбы, пробирки, стеклянные палочки);
- комплект наконечников;
- аппарат для дистилляции воды.

Реактивы:

наборы реагентов для ИФА-анализа:

- фактора межклеточной адгезии ICAM-1;
- рецептора эпидермального фактора роста p185.

реагенты для определения карбонильных производных белков:

- KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 для приготовления 1/15 М фосфатного буфера (рН = 7,4);
- NaCl, 0,1%
- 2,4-динитрофенилгидразин, 0,01 М;
- HCl, 2 М;
- трихлоруксусная кислота (ТХУ), 20%;
- этиловый спирт;
- этилацетат;
- мочевины, 8 М.

реагенты для определения структурно-функционального состояния альбумина:

- 16-доксилстеариновая кислота;
- спирт-ректификат, очищенный фенолгидразином и серной кислотой и дважды перегнанный.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

- уточнения стадии опухолевого процесса у пациенток, страдающих раком тела матки, на дооперационном этапе лечения;
- формирования стратегии противоопухолевого лечения в зависимости от стратификации пациенток.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Не выявлены.

Контроль качества лабораторных исследований проводится на всех этапах лабораторного анализа – от периода подготовки пациента до использования полученных результатов в клинике. Осуществляется методом исследования параллельных проб, случайных проб, повторных проб, смешанных проб и специальных контрольных сывороток (согласно приказу Министерства здравоохранения РБ от 24.06.1997 № 154 «О дальнейшем совершенствовании системы контроля качества клинических лабораторных исследований»). Контроль качества работы с данными осуществляется во время их сбора, ввода в базу данных, просмотра, коррекции, проведения математической и статистической обработки.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод оценки распространенности опухолевого процесса у пациенток, страдающих раком тела матки, по лабораторным показателям состоит в определении биохимических параметров сыворотки крови: концентрации растворимого фактора межклеточной адгезии — ICAM-1; растворимого рецептора эпидермального фактора роста — p185; карбонильных производных белков и ЭПР параметра α , характеризующего структурно-функциональное состояние сывороточного альбумина с последующим расчетом значений регрессионного уравнения. Сравнение полученных значений регрессионного уравнения с граничным значением позволяет отнести пациентку к определенной группе по степени распространенности опухоли.

Материалом для исследования служит сыворотка крови. Забор крови у обследуемых пациенток проводят из вены утром натощак. После ретракции сгустка пробы центрифугируют при 1000 об./мин в течение 15 мин. Сыворотку можно хранить до исследования в морозильной камере при температуре от -20 до -70°C. Сыворотка не должна иметь признаков гемолиза. Если исследование не проводят непосредственно после забора материала, необходимо перенести 1–2 мл сыворотки в одноразовую пластиковую пробирку типа Eppendorf, плотно закупорить и хранить при температуре от -16 до -18°C не более 1 мес. После размораживания сыворотку следует тщательно перемешать. Повторное замораживание и оттаивание не допускается.

У обследованных пациенток определяется уровень в крови:

- *растворимого фактора межклеточной адгезии — ICAM-1* — трансмембранного гликопротеина, регулирующего адгезию клеток к стенке сосуда. Высокие уровни молекул межклеточной адгезии являются ранними и очень чувствительными маркерами опухолеассоциированного ангиогенеза. У онкологических пациентов увеличение титров растворимого ICAM-1 в сыворотке крови связано с опухолевым ростом, наличием отдаленных метастазов и плохим

прогнозом. Для определения концентрации растворимого ICAM-1 в сыворотке крови используют иммуноферментный анализатор и стандартный диагностический набор;

- *растворимого рецептора эпидермального фактора роста — p185*, участвующего в клеточной пролиферации и дифференцировке. Повышенный уровень этого рецептора в сыворотке крови может напрямую зависеть от его экспрессии в опухолевой ткани и ассоциироваться с ранними рецидивами и снижением выживаемости. Для определения концентрации растворимого рецептора p185 в сыворотке крови используют иммуноферментный анализатор и стандартный диагностический набор;

- *карбонильных производных белков (КПБ)*, представляющих собой продукты окислительной модификации белков. Данный показатель является маркером окислительного стресса в организме и прогностически неблагоприятным признаком, свидетельствующим о нарастании функционально-метаболических нарушений. Уровень карбонильных производных белков определяют спектрофотометрически при длине волны 363 нм по методу Е.Е. Дубининой. Для анализа используют сыворотку крови, разведенную 0,1% раствором NaCl в соотношении 1:10. Одновременно готовят контрольные и опытные пробы, содержащие 0,05 мл разведенной сыворотки и 0,95 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH = 7,4). В опытные пробы приливают по 1 мл 0,01 М 2,4-динитрофенилгидразина, растворенного в 2 М HCl. В контрольные пробы вместо 2,4-динитрофенилгидразина добавляют равный объем (1 мл) 2 М HCl. Для осаждения белков в каждую пробу вносят 1 мл 20% ТХУ-кислоты. Пробы инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч, затем центрифугируют при 3000 об./мин в течение 15 мин. Далее осадок 2 раза промывают смесью этилового спирта и этилацетата (1:1). Полученный осадок подсушивают на воздухе, а затем растворяют в 8 М растворе мочевины. Мочевину приливают к осадку в объеме 3 мл. Для лучшего растворения осадка добавляют 1 каплю 2 М HCl. Полученные в результате окислительной модификации белков карбонильные производные взаимодействуют с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, оптическую плотность которых регистрируют на спектрофотометре при длине волны 363 нм. Уровень карбонильных производных окисленных белков выражают в единицах оптической плотности, отнесенных на 1 мл сыворотки. Концентрацию карбонильных производных выражают в наномолях, используя коэффициент молярной экстинкции $22 \times 10^3 \text{ моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$.

- *ЭПР параметр α* , интегральный параметр, отражающий структурно-функциональное состояние основного транспортного белка сыворотки крови — альбумина, или степень «загруженности» альбумина опухолевыми токсинами и метаболитами. Его определяют с помощью метода ЭПР-спектроскопии сыворотки крови. В ячейку планшета для иммунологических исследований вносят 50 мкл исследуемой сыворотки, добавляют 10 мкл рабочего раствора спиновой зонды 16-доксилстеариновой кислоты (концентрация – 10^{-2} , т. е. 3,85 мг метки на 1 мл спирта) и тщательно перемешивают. Содержимое набирают в капилляр для ЭПР-исследований и помещают в спектрометр. Запись спектров ЭПР и их обработка производятся в автоматическом режиме. Метод основан на снижении связывания спиновой метки при заполнении связывающих центров сывороточного альбумина другими гидрофобными лигандами. Регистрацию спектров осуществляли на ЭПР-спектрометре. По ЭПР-

спектру отношение несорбированной метки к метке, связанной с альбумином, обозначается параметром α .

Полученные данные изученных показателей подставляют в регрессионное уравнение и рассчитывают его значение:

$$P = \frac{\exp(-5,96 + 2,29 \times \text{ЭПР}\alpha + 0,008 \times \text{sICAM1} + 0,091 \times \text{p185} - 4,13 \times \text{КПБ})}{1 + \exp(-5,96 + 2,29 \times \text{ЭПР}\alpha + 0,008 \times \text{sICAM1} + 0,09 \times \text{p185} - 4,13 \times \text{КПБ})}$$

где P — регрессионная функция, пограничное значение которой составляет 0,41. Если значение $P > 0,41$, прогнозируется наличие у пациентки распространенного рака тела матки, соответствующего III–IV стадиям, при $P < 0,41$ прогнозируется наличие нераспространенного опухолевого процесса, соответствующего I–II стадиям.

Точность (диагностическая эффективность) предложенного метода оценки распространенности опухоли у пациенток, страдающих раком тела матки, по лабораторным показателям составляет 94,4%; чувствительность — 96,5%, специфичность — 85,0%; прогностическая ценность положительного результата — 85,0%, отрицательного — 96,5%.

Внедрение в клиническую онкологическую практику предиктивных факторов распространенности опухоли у пациенток, страдающих раком тела матки, способствует снижению затрат на лечение пациентов этой категории. Экономический эффект обусловлен тем, что адекватная терапия проводится по индивидуальным показаниям пациенток в зависимости от степени распространенности опухолевого процесса; своевременная неоадьювантная терапия снижает продолжительность противоопухолевого лечения.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Причинами ошибочных результатов при исследовании лабораторных показателей могут быть: неправильный забор и хранение сыворотки крови, неточное взятие образца исследуемого материала, использование реагентов с истекшим сроком годности, неточное пипетирование реагентов, нарушение техники лабораторного тестирования. На результаты лабораторных исследований могут оказывать влияние виды проводившейся терапии и отдельные лекарственные вещества, что может затруднять интерпретацию картины лабораторного тестирования крови. Для надежности получаемого результата необходимо наличие контрольных сывороток, включенных в число тестируемых образцов при каждой процедуре анализа.