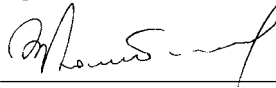


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра



В.В. Колбанов

11 апреля 2003 г.

Регистрационный № 18–0103

**СПОСОБ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ДЕТОКСИКАЦИОННОЙ ТЕРАПИИ,
ПРОВОДИМОЙ
ПРИ МНОГОКОМПОНЕНТНОМ ЛЕЧЕНИИ
ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ,
ПО ЛАБОРАТОРНЫМ ПОКАЗАТЕЛЯМ КРОВИ**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: ГУ «Научно-исследовательский институт онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

Авторы: д-р мед. наук, проф. В.И. Прохорова, д-р мед. наук, проф. А.А. Машевский, д-р мед. наук, проф. Э.А. Жаврид, канд. биол. наук Л.А. Державец, Е.С. Демидович, канд. мед. наук Н.В. Сачивко, канд. биол. наук Р.М. Смолякова, канд. биол. наук Т.П. Цырусъ, канд. биол. наук С.В. Лаппо, Н.В. Юревич, канд. физ.-мат. наук М.С. Абрамович

ВВЕДЕНИЕ

В основе патологических процессов, развивающихся у больных злокачественными новообразованиями под влиянием комбинированного и комплексного лечения, неизбежно лежат изменения в метаболическом статусе организма. Важную роль в развитии побочных реакций на хирургическое, комбинированное, мульти-модальное лечение играет изменение мембранной структуры тканей, обусловленное активацией свободнорадикальных реакций, большая часть которых приходится на перекисное окисление липидов. Не менее важную роль в патогенезе деструктивных состояний играет конформационное состояние альбумина, обеспечивающего транспорт эндотоксинов к органам детоксикации. Снижение концентрации альбумина, связанное с потерей белка или с другими причинами, вызывает повышение концентрации эндотоксинов в крови, что, в свою очередь, активирует систему медиаторов и приводит к снижению функционального состояния физиологических систем дезинтоксикации. Все эти моменты служат патогенетическим механизмом развития многих осложнений при лечении больных.

В современной клинической практике для коррекции гомеостаза при ряде заболеваний и патологических состояний применяют экстра- и интракорпоральные методы: гемосорбцию, плазмаферез, энтеросорбцию, квантовую фотомодификацию крови, электрохимическое окисление крови.

Данные методы получили достаточно широкое распространение и в ЛПУ Беларуси. Обобщение накопленного опыта, в том числе разработанных и используемых в Белорусском центре экстра- и интракорпоральных методов коррекции гомеостаза, показало, что для проведения эффективной детоксикационной терапии необходимо учитывать патогенез заболевания (заболевания, связанные с врожденными или приобретенными нарушениями метаболизма; заболевания, в основе патогенеза которых лежат нарушения в иммунной системе; экзо- и эндогенные интоксикации; заболевания с недостаточно выясненным этиопатогенезом), способ детоксикации, вид сорбционного материала, характер, интенсивность и объем медикаментозной подготовки к сеансам.

Выявление маркеров эндогенной интоксикации в биологических жидкостях при различных злокачественных заболеваниях — одна

из составляющих обоснования выбора метода детоксикации. До настоящего времени не решен вопрос об определении лабораторных критериев, позволяющих оценить полноту ответа на проводимую терапию. Среди многообразия эндотоксинов, накапливающихся в организме, наиболее изученными являются билирубин, мочевины, креатинин, небелковый азот крови или остаточный азот. В патогенезе эндогенных интоксикаций общепризнана большая роль пептидов среднемолекулярной массы. Все они являются продуктами патологической белковой деградации, образующимися при резкой интенсификации процессов протеолиза при различных экстремальных состояниях. В механизме их токсического действия преобладает мембранотропный эффект. При острых и хронических воспалительных процессах различного генеза наблюдается нелIMITированная активация протеаз и истощение антипротеолитического потенциала. В отечественной литературе достаточно широко представлены результаты изучения протеиназно-ингибиторного дисбаланса и коррекции данных нарушений методом экстракорпорального извлечения из крови активных форм сериновых протеиназ с помощью биоспецифических антипротеиназных гемосорбентов.

Однако, несмотря на широкое использование эфферентных и физико-химических методов терапии, до настоящего времени отсутствуют четкие лабораторные критерии для оценки степени тяжести эндотоксикоза и, следовательно, обоснованные показания к дифференцированному проведению наиболее эффективных методов детоксикации у онкологических больных.

Причиной не всегда удачной стабилизации физического статуса пациентов является то, что проводимое лечение не в полной мере является патогенетически обоснованным, т.к. не учитывает изменений гомеостаза в процессе распространения опухоли.

Всё вышесказанное обосновывает необходимость поиска новых информативных физико-химических параметров, отражающих специфику нарушений гомеостаза при злокачественных заболеваниях.

В настоящее время к эндотоксинам относят не только заведомо агрессивные компоненты, но и естественные, типичные для нормального метаболизма продукты и вещества, появляющиеся при патологических процессах в тканях и биологических жидкостях в сверхвысоких концентрациях (серотонин, катехоламины, ки-

ниноген, продукты системы ПОЛ-АОС, β_2 -микроглобулин и др.). Известно, что при многих интоксикациях непосредственным механизмом мембранотоксического действия является перекисное окисление липидов. Процесс перекисидации липидов внутриклеточных мембран приобретает характер цепной реакции, что сопровождается массовой гибелью клеток. В связи с этим исследование структурно-функционального состояния плазматических мембран является перспективным в целях диагностики и оценки степени тяжести состояния больных при развитии синдрома эндотоксемии.

В последние годы во многих клиниках мира все больше внимания уделяют изучению физико-химических и кинетических характеристик центров связывания молекул сывороточного альбумина и его детоксикационных функций. С внедрением в клиническую практику высокочувствительных методов иммуноферментного анализа (ИФА) появилась возможность получения важной и достоверной информации о концентрации в крови онкогенного белка β_2 -микроглобулина, являющегося маркером нарушения функции почек, ферритина — клинически значимого неинвазивного показателя содержания запасов железа в организме больного.

Учитывая, что в ГУ «НИИ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» существенное внимание уделяется разработке новых адекватных подходов к лечению злокачественных опухолей, включающих в комбинированное и комплексное лечение различные модифицирующие факторы, в том числе и гипертермические, чрезвычайно важны своевременная диагностика синдрома эндогенной интоксикации и поиск доступных эффективных методов детоксикации, использование которых в многокомпонентном лечении онкологических больных позволило бы уменьшить тяжесть течения заболевания, сократить сроки пребывания в стационаре, снизить летальность.

В данной инструкции суммирован опыт исследования в крови больных токсинов пептидной природы, активности трипсина, α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ), концентрации α_1 -антитрипсина (α_1 -АТ), β_2 -микроглобулина (β_2 -МГ), ферритина, показателей системы активности перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты организма (ПОЛ-АОС), характеристик электронного пара-

магнитного резонанса (ЭПР) сыворотки крови в ГУ «НИИ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» при различных нозологических формах рака. Методологические основы программы лабораторной оценки эффективности детоксикационной терапии, проводимой у онкологических больных, разработаны исходя из изучения гомеостаза у больных лимфогранулематозом. Больные лимфогранулематозом выбраны в качестве модели интоксикации (20 больных с клиническими признаками интоксикации и 20 больных без симптомов интоксикации). Критерии «биологической» активности процессов эндотоксемии изучены по 14 параметрам биохимического и биофизического тестирования крови.

Установлено, что изменения внутренней среды организма под влиянием синдрома эндогенной интоксикации (СЭИ) проявляются существенным усилением процессов свободнорадикального окисления липидов, снижением антиоксидантной активности крови, транспортной функции альбумина и повышением уровня молекул средней массы (МСМ), величины сорбционной способности эритроцитов (ССЭ), концентрации опухолеассоциированных антигенов. Эти изменения менее выражены у больных при отсутствии СЭИ.

Принимая во внимание низкую диагностическую чувствительность указанных выше биохимических параметров крови, по данным теста нельзя проводить оценки эффективности многокомпонентного лечения у онкологических больных с различными нозологическими формами рака. Тем не менее низкая корреляционная взаимосвязь между отдельными из этих параметров показывает, что тесты не являются альтернативными и могут дополнять друг друга, обеспечивая суммарный эффект. Совместное использование комплекса наиболее информативных показателей дает возможность повысить диагностические возможности лабораторного тестирования крови и в контексте с клинической интерпретацией использовать их при оценке эффективности проводимой лечебно-детоксикационной терапии, используемой в многокомпонентном лечении у больных различными нозологическими формами рака.

Повышение точности оценки эффективности проводимой ферментной терапии обеспечивается путем создания комплексов информативных показателей и на их основе — решающих правил:

- 1) ЭПР-параметр α , малоновый диальдегид (МДА), МСМ:
 $Z_1 = 0,532 \times X_{\text{ЭПР-}\alpha} + 0,236 \times X_{\text{МДА}} + 15,146 \times X_{\text{МСМ}} > 8,812$;
2) β_2 -МГ, МСМ, ССЭ:
 $Z_2 = 0,003 \times X_{\beta_2\text{-МГ}} + 18,079 \times X_{\text{МСМ}} + 0,24 \times X_{\text{ССЭ}} > 29,801$.
Диагностическая эффективность составляет 78,1–80%.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Разработанные комплексы лабораторных тестов и решающие правила пригодны для выявления СЭИ и контроля за эффективностью проводимой лечебно-детоксикационной терапии, используемой при многокомпонентном лечении больных с различными нозологическими формами рака. Решающие правила построены с помощью линейной дискриминантной функции многомерного анализа биохимических показателей крови, отражающих состояние оксидантного статуса организма, естественных систем детоксикации, транспортной функции альбумина.

Решающие правила позволяют диагностировать возникающий у онкологических больных СЭИ с эффективностью 78,1–80,0%. Использование созданных комплексов лабораторных тестов и решающих правил при многокомпонентном лечении больных способствует объективизации индивидуальных показаний к проведению метаболической коррекции в процессе проводимой терапии.

Целесообразность оценки эффективности проводимого детоксикационного пособия по разработанному комплексу информативных лабораторных признаков и решающему правилу обусловлена тем, что при проведении патогенетически обоснованной метаболической коррекции в прогностически неблагоприятной группе больных сокращается пребывание данных пациентов в стационаре после лечения и уменьшается необходимость в дорогостоящем лечении осложнений. Экономическая эффективность при этом значительно превышает затраты на выполнение лабораторного анализа.

Предложенные комплексы тестов и решающие правила несложны в выполнении и доступны для использования в клинико-лабораторной практике, позволяют дать объективную оценку проводимых мероприятий и могут быть использованы для уточнения степени патологии.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАГЕНТОВ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ УСТРОЙСТВ

Средства измерений:

- спектрофотометр;
- спектрофлуориметр;
- иммуноферментный анализатор;
- ЭПР-анализатор сыворотки крови;
- весы аналитические;
- пипетки;
- микрошприц.

Вспомогательные устройства:

- центрифуга лабораторная;
- встряхиватель для пробирок;
- мешалка магнитная;
- баня водяная с контактным термометром с диапазоном измерения 0–100°C;
- холодильник бытовой с температурным режимом;
- шкаф сушильный электрический;
- лабораторная посуда (колбы, пробирки, стеклянные палочки, воронки).

Реактивы:

- тест-системы для ИФА β_2 -МГ;
- трихлоруксусная кислота (ТХУ);
- тиобарбитуровая кислота (ТБК);
- уксусная кислота;
- бутанол;
- спирт этиловый;
- гепарин (можно цитрат натрия);
- метиленовый синий;
- физиологический раствор;
- вода дистиллированная.

Контроль качества проводимых лабораторных исследований осуществляется методами исследования параллельных, случайных, повторных и смешанных проб (Приказ МЗ РБ № 154 от 24 июня 1997 г. «О дальнейшем совершенствовании системы контроля качества клинических лабораторных исследований»). Контроль качества компьютерной базы осуществляется во время ее формирования на

уровне ввода данных, их просмотра и корреляции, контроля правильности математической и статистической обработки данных.

Техника безопасности

При выполнении исследований необходимо соблюдать меры безопасности, описанные в «Основных правилах безопасной работы в лаборатории» (Приказы МЗ РБ № 66 от 12.06.1989 г., № 201 от 19.01.1998 г., № 351 от 16.12.1998 г.), Инструкции по охране труда для КДЛ № 92 (1999), инструкциях по эксплуатации медицинских измерительных приборов.

ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕДЛАГАЕМОГО СПОСОБА

Разработанные комплексы включают исследование в крови онкологических больных:

– уровня МСМ¹ — вторичных эндогенных токсинов пептидной природы; появление их связано с активацией протеолитических ферментов в крови и нарушением экскреторной функции почек;

– МДА² — конечного токсического продукта переокисления липидов, образующего с ТБК флуоресцирующий комплекс, интенсивность света которого прямо пропорциональна концентрации МДА;

– величины ССЭ³ — универсальных адсорбентов; под действием эндогенных токсинов существенно увеличивается способность эритроцитов сорбировать витальные красители;

– β_2 -микроглобулина — маркера нарушения функции почек (проводится методом ИФА на специализированных анализаторах с использованием тест-систем фирм-производителей анализаторов);

– величины ЭПР-параметра α^4 , отражающего структурно-функциональное состояние сывороточного альбумина (проводится с помощью созданного в ГУ «НИИ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» ЭПР-анализатора крови).

¹См. метод Н.И. Габриэлян.

²См. метод Т.Н. Федоровой, Т.С. Коршуновой, Э.Г. Ларского.

³См. метод А.А. Тогайбаева, А.В. Кургузкина, И.В. Рикун, Р.М. Кирибжановой.

⁴См. методические рекомендации «Метод ЭПР-спектрометрии спин-меченой сыворотки крови в диагностике злокачественных новообразований» / А.А. Машевский, В.И. Прохорова, Т.П. Цырус и др. — Минск, 1994.

В основе метода ЭПР-спектрометрии спин-меченой сыворотки крови лежит регистрация спектров ЭПР сыворотки крови, в которую добавляется свободнорадикальное соединение — спиновая метка (СМ). В результате специфического связывания СМ белками сыворотки крови происходит их фиксация и СМ приобретает ограниченную подвижность, изменяется ее ЭПР-спектр. Специфика изменений белковых компонентов сыворотки крови под влиянием метаболических сдвигов в организме обуславливает изменение способности СМ фиксироваться крупными молекулами.

Определение у больных злокачественными новообразованиями содержания МСМ, МДА, β_2 -МГ, ЭПР-параметра α проводят в сыворотке или плазме крови, уровня ССЭ — в эритроцитарной массе. Используют плазму крови, стабилизированную либо гепарином (5–10 ЕД на 1 мл крови), либо 3,8% раствором цитрата натрия (9:1). Применение пластиковых пробирок при взятии крови позволяет избежать контактной активации протеолитических систем. По той же причине желательно проводить исследование свежих образцов. Исследуемые образцы сыворотки или плазмы крови могут храниться при температуре 2–8° С в течение 24 ч. В случае длительного хранения они должны быть разделены на аликвоты и храниться в замороженном виде при температуре –20° С до использования. Исследование ССЭ, ЭПР-параметра α необходимо проводить в день взятия крови во избежание образования олигомеров белка.

Разработанные «наборы» биохимических параметров и решающие правила (Z_1, Z_2) пригодны для оценки эффективности лечебно-детоксикационной терапии, проводимой при многокомпонентном лечении больных.

Состав комплексов:

1-й — ДЭ = 78,1%

ЭПР- α , МДА, МСМ

2-й — ДЭ = 80%

β_2 -МГ, МСМ, ССЭ

Решающие правила:

$$Z_1 = 0,532 \times X_{\text{ЭПР-}\alpha} + 0,236 \times X_{\text{МДА}} + 15,146 \times X_{\text{МСМ}} > 8,812;$$

$$Z_2 = 0,003 \times X_{\beta_2\text{-МГ}} + 18,079 \times X_{\text{МСМ}} + 0,24 \times X_{\text{ССЭ}} > 29,801.$$

Первым этапом многокомпонентного лечения у больных злокачественными заболеваниями должно быть объективное определение степени эндогенной интоксикации и «биохимическая санация» организма.

Для обеспечения эффективного многокомпонентного (локальная или общая гипертермия, полихимиотерапия) лечения у онкологических больных перед началом лечебных мероприятий необходимо определить в крови вышеуказанные лабораторные показатели, входящие в один из «наборов» и на основании определения комплекса тестов рассчитать дискриминантную функцию Z_1 или Z_2 . При значении дискриминантной функции $Z_1 > 8,3$ и $Z_2 > 29,8$ следует до проведения специальных методов противоопухолевого лечения предпринять меры, направленные на восстановление нарушенных параметров гомеостаза, используя медикаментозные (препараты, способствующие устранению метаболических нарушений) или немедикаментозные методы терапии (гемосорбция, энтеросорбция, УФОК и т.д.).

После сеанса многокомпонентного лечения (локальная или общая гипертермия, полихимиотерапия) также необходимо определение дискриминантной величины Z_1 или Z_2 . Превышение дискриминантной величины разработанных правил в постпроцедурном периоде ($Z_1 > 10,3$ или $Z_2 > 32,2$) служит дополнительным, в сочетании с клинической симптоматикой, аргументом для углубленного обследования больного и проведения ему целенаправленных профилактических мероприятий.

По нашему мнению, определение дискриминантных величин следует проводить до и после каждого сеанса многокомпонентной терапии, что позволит снизить степень специфической интоксикации, предотвратить развитие побочных действий цитостатиков, уменьшить в итоге длительность пребывания больных в стационаре.

Основываясь на изменениях показателей изученных параметров крови, дальнейшая неспецифическая профилактика возможных осложнений в постпроцедурном периоде должна включать медикаментозную коррекцию, направленную на ликвидацию расстройства гомеостаза (блокирование процессов свободнорадикального окисления липидов и т.д.) и оптимизацию выведения эндотоксинов из организма. Это в конечном итоге должно обеспечить избирательную защиту биомембран, снижение вероятности развития патологии хирургического и терапевтического профиля в постпроцедурном периоде и повышение эффективности лечения онкологических больных в целом.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

Ошибочные результаты при исследовании физико-химических показателей крови могут быть получены в следующих случаях:

- использование реагентов с истекшим сроком годности;
- неточное пипетирование реагентов;
- неправильный забор и хранение образцов крови;
- неточное взятие образца исследуемого материала;
- нарушение технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим т.д.).

Следует учитывать, что исследования предлагаемых комплексов тестов необходимо проводить одним и тем же методом в одной лаборатории. На изучаемые показатели могут оказывать влияние клинические факторы. Для правильной клинической оценки необходимо тесное сотрудничество лабораторного и клинического персонала.

Наличие в каждой лаборатории пула контрольных сывороток, которые включаются в число тестируемых образцов при каждой процедуре анализа, дает уверенность в надежности получаемого результата.

Противопоказания к применению: не выявлены.