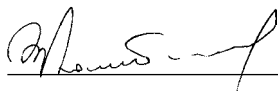


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра здравоохранения



В.В. Колбанов

13 мая 2005 г.

Регистрационный № 8–0105

**ДИАГНОСТИКА
ИНВАЗИВНОГО РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ
ПО ЛАБОРАТОРНЫМ ПОКАЗАТЕЛЯМ**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: 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, канд. биол. наук Л.А. Державец, д-р мед. наук О.Г. Суконко, канд. биол. наук Т.П. Цырусь, канд. биол. наук С.В. Лаппо, Н.В. Юревич, канд физ.-мат. наук М.С. Абрамович

ВВЕДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря (РМП) занимает одно из ведущих мест в структуре онкоурологических заболеваний. По данным Белорусского канцер-регистра, заболеваемость злокачественными новообразованиями мочевого пузыря в Республике Беларусь в 2002 г. составила 10,5 на 100 тыс. жителей. В 2003 г. было выявлено 1 042 новых случая указанной патологии.

В связи с особенностями течения этой нозологической формы рака его лечение относится к одной из наиболее актуальных проблем в онкологии. Учитывая существенные различия тактики лечения поверхностного и инвазивного РМП, необходимым условием проведения адекватных терапевтических мероприятий является возможность определения инвазивности опухоли на дооперационном этапе, когда еще нет морфологической верификации всего операционного материала. Это имеет принципиальное значение, т. к. при поверхностном РМП (не врастающем в мышечный слой; Tis, Ta, T1) метастазы в лимфоузлах, как правило, не встречаются. В этой связи такие опухоли можно удалять трансуретрально. При инвазивном РМП, прорастающем в детрузор и глубже, реальность лимфогенного метастазирования резко возрастает. При первичном обращении у 20–30% больных выявляется инвазивный РМП, причем у 30–70% из них имеются метастазы, в том числе у 10–15% — отдаленные. Лечение этой формы РМП более агрессивное, и при выборе тактики лечения предпочтение отдается радикальной цистэктомии.

Определение местного распространения опухоли на дооперационном этапе преследует клинически значимую цель: выделение групп больных, которым показана трансуретральная резекция, и тех, которым необходимы более сложные схемы лечения, включающие радикальное удаление мочевого пузыря.

Запросы клиники направлены на выявление критериев, способствующих определению больных с инвазивным и неинвазивным РМП, на том этапе, когда сама опухоль еще не удалена вместе с мочевым пузырем и не может быть морфологически исследована вся стенка мочевого пузыря. При этом цитологические и гистологические исследования мазков, пунктатов и биоптатов опухоли имеют свои ограничения, в связи с чем их диагностическая чувствительность

не превышает 60%. Особое значение приобретает изучение возможности использования для этих целей диагностики *in vitro*, основанной на исследованиях специфических особенностей биологических жидкостей организма, обусловленных опухолевым ростом.

Наиболее эффективным из всех известных опухолевых маркеров для диагностики и мониторинга течения карциномы мочевого пузыря является Cyfra 21–1 (19-й фрагмент цитокератина). Специфическими опухолевыми маркерами, помогающими выявить злокачественный рост в мочевом пузыре, являются также тканевый полипептидный антиген (ТПА) и тканевый полипептидный специфический антиген (ТПСА). Отмечается четкая корреляция между степенью распространенности заболевания, наличием или отсутствием метастазов, а также эффективностью лечения и изменением содержания этих опухолевых маркеров в крови.

В настоящее время активно изучается эффективность использования целого ряда неспецифических и специфических маркеров (онкогенов, факторов опухолевого ангиогенеза и ингибиторов ангиогенеза, белков-регуляторов клеточного цикла, антигенов клеточной пролиферации, рецепторов эпидермального фактора роста, пептидных факторов роста, молекул клеточной адгезии и опухолеассоциированных антигенов, выявляемых в крови) для диагностики рецидивов РМП.

Анализ литературных данных за последнее время свидетельствует, что в мире параллельно с развитием классического лабораторного исследования маркеров рака большое внимание уделяется изучению показателей гомеостаза организма больного.

Известно, что состояние биохимического гомеостаза определяет как саму возможность развития опухоли, так и характер течения злокачественного процесса. В свою очередь длительное воздействие новообразования на организм оказывает неизбежное влияние на его функциональные возможности. Вмешательство опухоли в обмен веществ онкологического больного, с одной стороны, и реакция на нее, с другой, приводят к сложным метаболическим сдвигам в системе «опухоль–организм». Выявление нарушений в этой системе имеет непосредственное отношение к диагностике рака, так как каждый новый тест, имеющий значительное откло-

нение от нормальных величин, может рассматриваться в качестве опухолевого маркера. Совокупность тех или иных опухолевых маркеров, особенно слабо коррелирующих между собой, очевидно, может иметь большее диагностическое значение, чем каждая отдельная «раковая реакция».

Опыт исследований, проведенных в НИИ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова по изучению информативности широкого спектра опухолевых маркеров для диагностики и мониторинга инвазии опухоли мочевого пузыря, свидетельствует о том, что наряду с определением специфических опухолеассоциированных антигенов перспективным является выявление нарушений в общих цепях метаболизма на молекулярном и субклеточном уровнях.

В основу инструкции по применению положены данные исследования по 29 параметрам биохимического и биофизического тестирования крови у 178 больных РМП и 50 клинически здоровых лиц. Наряду с изучением общепринятых опухолевых маркеров мочевого пузыря (19-го фрагмента цитокератина — Cyfra 21–1, ТПА, ТПСА) у больных проводилось исследование в крови концентрации раково-эмбрионального антигена (РЭА), β_2 -микроглобулина (β_2 -МГ), тимидинкиназы (ТК) — фермента, относящегося к группе онкофетальных ферментов. Определялись показатели, характеризующие структурно-функциональное состояние молекул сывороточного альбумина (ЭПР-параметр α , емкость первого и второго центров связывания, ширина спектральных линий: высокополевых, центральных, низкополевых). Исследовались основные параметры перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид (МДА), основания Шиффа), определялось количество двойных связей (ДС) в липидной фракции сыворотки крови, содержание нитрит-ионов в крови и моче. Антиоксидантный статус организма больных оценивали по активности эритроцитарной супероксиддисмутазы (СОД), концентрации витаминов А (ретинола, ретинола ацетата) и Е (α -токоферола, γ -токоферола, σ -токоферола, токоферола ацетата).

Диагноз заболевания устанавливался при клинико-инструментальном обследовании пациентов и подтверждался результатами

гистологического исследования опухоли. В зависимости от распространенности опухолевого процесса больные были разделены на две группы: 1) с поверхностным РМП (T₁-T₁N₀M₀) — 87 человек, 2) с инвазивным РМП (T₂-T₄N₀-N₂M₀) — 91 человек. Методологические основы диагностики инвазии РМП разработаны исходя из анализа всех изученных вышеуказанных параметров у больных инвазивным и поверхностным РМП.

Установлено, что у больных РМП наблюдаются изменения в системе «перекисное окисление липидов — антиоксидантная система» (ПОЛ—АОС). Усиливаются процессы свободно-радикального окисления липидов, увеличивается концентрация нитрит-ионов в биологических жидкостях. Наряду с активацией системы ПОЛ, у больных РМП по сравнению с клинически здоровыми лицами отмечена низкая суммарная ненасыщенность липидов, снижается антиоксидантная активность крови и транспортная функция альбумина. Повышается концентрация опухолеассоциированных антигенов. У больных инвазивным РМП эти изменения более выражены.

Принимая во внимание невысокую диагностическую чувствительность указанных выше биохимических параметров крови, по данным отдельного теста нельзя проводить диагностику степени распространенности РМП. 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 распространения опухоли в мышечный слой, что позволит повысить эффективность лечения больных РМП.

Повышение диагностической точности лабораторного тестирования обеспечивается путем создания комплексов информативных показателей и решающих правил для их клинического использования.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Разработанные комплексы лабораторных тестов и решающие правила пригодны для диагностики инвазии РМП. Решающие пра-

вила построены с помощью линейной дискриминантной функции многомерного анализа биохимических показателей крови, отражающих состояние системы ПОЛ—АОС, показателей опухолеассоциированных антигенов и транспортной функции альбумина.

Решающие правила позволяют диагностировать инвазию РМП с эффективностью 87,5–89,0%. Определение совокупности лабораторно-диагностических показателей у больных РМП и создание на их основе решающего правила дает возможность осуществлять оценку степени распространения опухоли в дотерапевтическом периоде с целью выработки адекватных методов лечения.

Выделение группы больных с поверхностной формой РМП в дохирургическом периоде позволяет использовать щадящую тактику их лечения на основе трансуретральной резекции и избежать калечащей операции (цистэктомии), приводящей к глубокой инвалидизации пациентов.

В свою очередь ранняя диагностика инвазивного РМП позволяет своевременно провести комплексное или комбинированное лечение, включающее радикальное удаление мочевого пузыря.

При своевременном проведении патогенетически обоснованных методов лечения сокращается пребывание пациентов в стационаре. Экономическая эффективность при этом значительно превышает затраты на выполнение лабораторного анализа.

Предложенные комплексы тестов и решающие правила несложны в выполнении и при наличии соответствующего оборудования доступны для использования в клиничко-лабораторной практике.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАГЕНТОВ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ УСТРОЙСТВ

Средства измерений:

- спектрофлуориметр;
- иммуноферментный анализатор;
- ЭПР-анализатор сыворотки крови;
- анализатор двойных связей;
- весы аналитические;
- дозатор с переменным объемом доз;
- микрошприц.

Вспомогательные устройства:

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

Реактивы:

- тест-системы для ИФА β_2 -микроглобулина, Суфра 21–1, ТК;
- спиновая метка (16-доксилстеариновая кислота);
- тиобарбитуровая кислота (ТБК);
- уксусная кислота;
- спирт этиловый;
- физиологический раствор;
- вода дистиллированная.

Контроль качества проводимых лабораторных исследований осуществляется методами исследования параллельных, случайных, повторных и смешанных проб, а также специальных контрольных сывороток (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 (Приказ МЗ РБ № 66 от 12.06.1989 г., № 201 от 19.01.1998 г., № 351 от 16.12.1998 г., инструкция по охране труда для КДЛ № 270 (2002 г.), инструкции по эксплуатации медицинских измерительных приборов).

ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕДЛАГАЕМОГО СПОСОБА

Разработанные комплексы включают исследование в крови онкологических больных:

– *Syfra 21-1* (19-го фрагмента цитокератина) — опухолевого маркера для диагностики и мониторинга течения мышечно-инвазивной карциномы мочевого пузыря (проводится методом иммуноферментного анализа (ИФА) на специализированных иммуноферментных анализаторах с использованием тест-систем фирм-производителей);

– β_2 -микроглобулина (β_2 -МГ) — маркера нарушения функции почек (проводится на иммуноферментных анализаторах использованием тест-систем фирм-производителей или на биохимических анализаторах);

– *ТК* — фермента, относящегося к группе онкофетальных ферментов (проводится методом ИФА на иммуноферментных анализаторах с использованием тест-систем фирм-производителей);

– *МДА*¹ — конечного токсического продукта переоисления липидов, образующего с ТБК флуоресцирующий комплекс, интенсивность света которого прямо пропорциональна концентрации МДА;

– определение количества *ДС*² в липидной фракции сыворотки крови (проводится с помощью анализатора ДС, разработанного в институте химической физики АН России. Анализатор изготовлен совместно российско-голландским предприятием «АММО»);

– *витамина Е*³ — естественного антиоксиданта (проводится спектрофлуориметрическим методом, может быть определен методом высокоэффективной жидкостной хроматографии);

¹см. метод: Т.Н. Федорова, Т.С. Коршунова, Э.Г. Ларский // Лаб. дело. — 1983. — № 3. — С. 25–27.

²см. метод: В.Н. Титов, Д.М. Лисицын, М.Г. Творогова, В.А. Амелюшкина // Клин. лаб. диагностика. — 2001. — № 7. — С. 3–9.

³см. метод: Р.Ч. Черняускене, Э.З. Варшкявичене, П.С. Грибаускас // Лаб. дело. — 1984. — № 6. — С. 362–365.

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

В основе метода ЭПР-спектрометрии спин-меченой сыворотки крови лежит регистрация спектров электронного парамагнитного резонанса сыворотки крови, в которую добавляется свободно-радикальное соединение — спиновая метка (СМ). В результате специфического связывания метки 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 (Машевский А.А., Прохорова В.И., Цырусъ Т.П. и соавт., 1994).

Определение у больных злокачественными новообразованиями содержания Суфра 21–1, ТК, МДА, β_2 -МГ, ЭПР-параметра α , ДС, витамина Е проводят в сыворотке или плазме крови. 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 позволит избежать контактной активации протеолитических систем. 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 ЭПР-параметра α необходимо проводить в день взятия крови во избежание образования олигомеров белка.

Разработанные комплексы биохимических параметров и решающие правила (Z_1 , Z_2) пригодны для диагностической оценки степени инвазии РМП.

⁴см. Метод ЭПР-спектрометрии спин-меченой сыворотки крови в диагностике злокачественных новообразований: метод. рекомендации / А.А. Машевский, В.И. Прохорова, Т.П. Цырусъ и др. — Минск, 1994.

Состав комплексов:

– 1-й: ТК, ЭПР- α , ДС, Cyfra 21–1, МДА;

– 2-й: ТК, ДС, β_2 -МГ, витамин Е.

Решающие правила:

$$- Z_1 = 0,2 \times X_{\text{ТК}} + 0,9 \times X_{\text{ЭПР}\alpha} - 0,1 \times X_{\text{ДС}} - 0,04 \times X_{\text{Cyfra 21-1}} - 0,03 \times X_{\text{МДА}} - 4,2 \geq 0;$$

$$- Z_2 = 0,2 \times X_{\text{ТК}} - 0,1 \times X_{\text{ДС}} + 0,0002 \times X_{\beta_2\text{-МГ}} - 2 \times X_{\text{Е}} + 9,0 \geq 0.$$

Диагностическая эффективность: $Z_1 = 89\%$, $Z_2 = 87,5\%$.

Для обеспечения эффективного лечения у больных РМП перед началом лечебных мероприятий необходимо определить в крови вышеуказанные лабораторные показатели, входящие в один из комплексов. На основании определения комплекса тестов рассчитать дискриминантную функцию Z_1 или Z_2 . При значении дискриминантной функции Z_1 или $Z_2 \geq 0$ обследованный больной может быть отнесен к прогностически неблагоприятному классу (инвазивный рак).

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

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

- использования реагентов с истекшим сроком годности;
- неточного пипетирования реагентов;
- неправильного забора и хранения образцов крови;
- неточного взятия образца исследуемого материала;
- нарушения 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.