

---

# Лабораторные маркеры злокачественных новообразований

Кафедра клинической лабораторной  
диагностики

СЗГМУ им. И. И. Мечникова

Стюф Ирина Юрьевна

---

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОМ



«Биологические маркеры – это количественно определяемые биологические параметры, которые как индикаторы определяют норму, патологию и результат лекарственного лечения»

(Biomarkers Difinitions Working Group, USA)

**Злокачественное новообразование (ЗН) -**

**длительный многостадийный процесс**

**1 трансформированная клетка - в**

**опухоль**

**1-1,5 см → 5-10 лет (?)**



**большинство опухолей закладывается в**

**25-40 лет и в детстве**



**Ранняя диагностика**

---

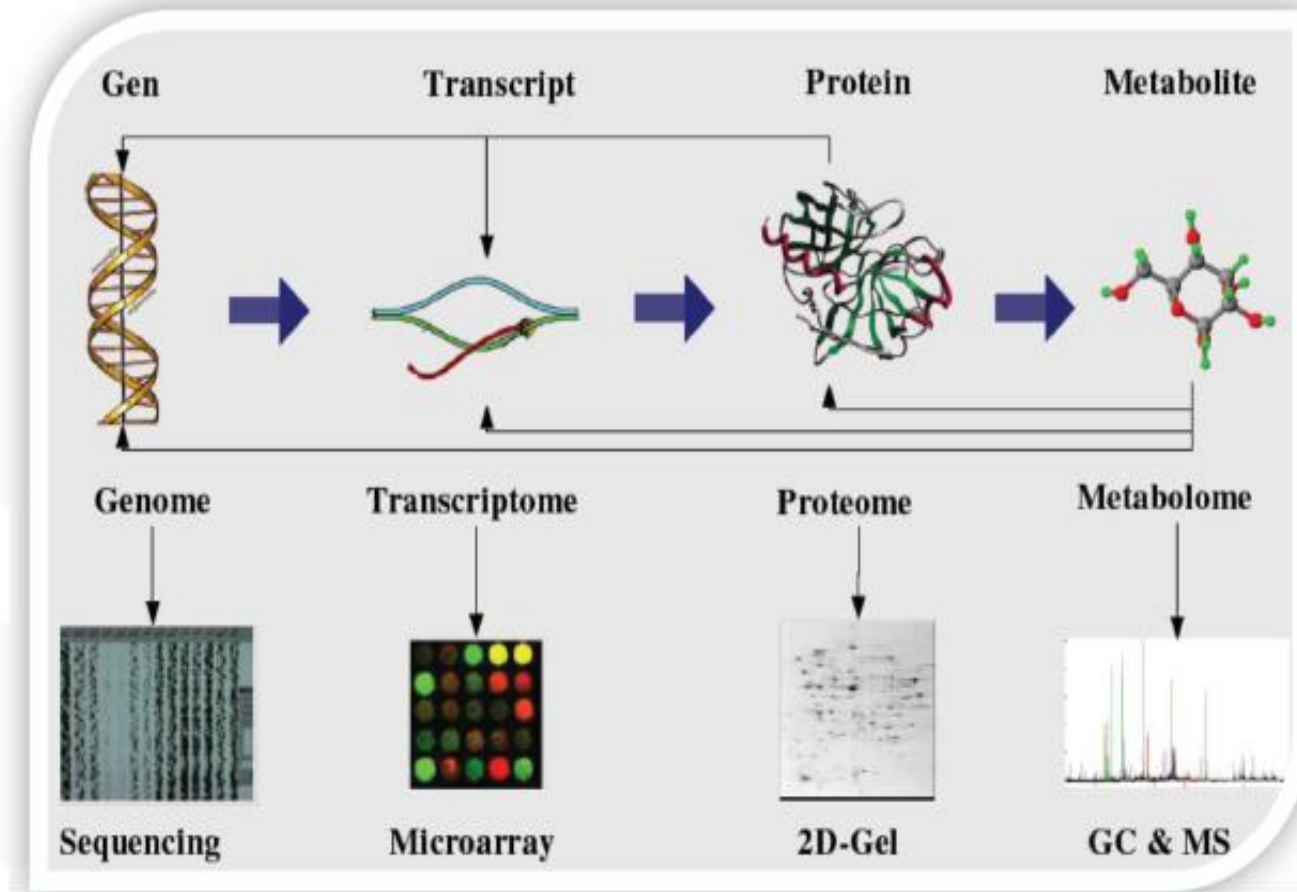
Во время злокачественной трансформации и дальнейшей жизни клетка синтезирует и потребляет БАВ,



которые обусловлены особенностями метаболизма измененной клетки:

- **АВТОНОМНОСТЬ И**
  - **агрессивность роста,**
  - **способность к метастазированию**
-

- Ферментативные
- Иммунохимические
- Рецепторные
- Био- и иммуносенсоры
- ДНК-чипы и иммуночипы
- ПЦР



# Классификация ОМ по методам определения:



А - иммунометрические

Б - молекулярно-биологические

# Прогностические маркеры из б/ж

- Ферменты (ЛДГ, амилаза)
- Гормоны (АКТГ, ХГ)
- Белки плазмы крови (ферритин, церулоплазмин)
- Продукты обмена веществ (гидроксипролин, креатин)
- И прочие...

---

**Первоначальные ожидания в отношении  
специфичности и чувствительности  
онкомаркеров (ОМ)  
не оправдались,**

**НО**

**рациональный подход к  
использованию и интерпретации  
результатов**



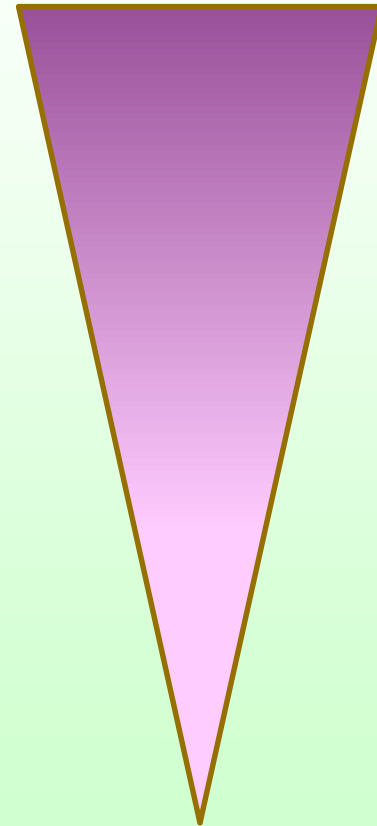
**непрерывный рост их клинической  
значимости**

---



# Классификация ОМ по методам определения: А - иммунометрические

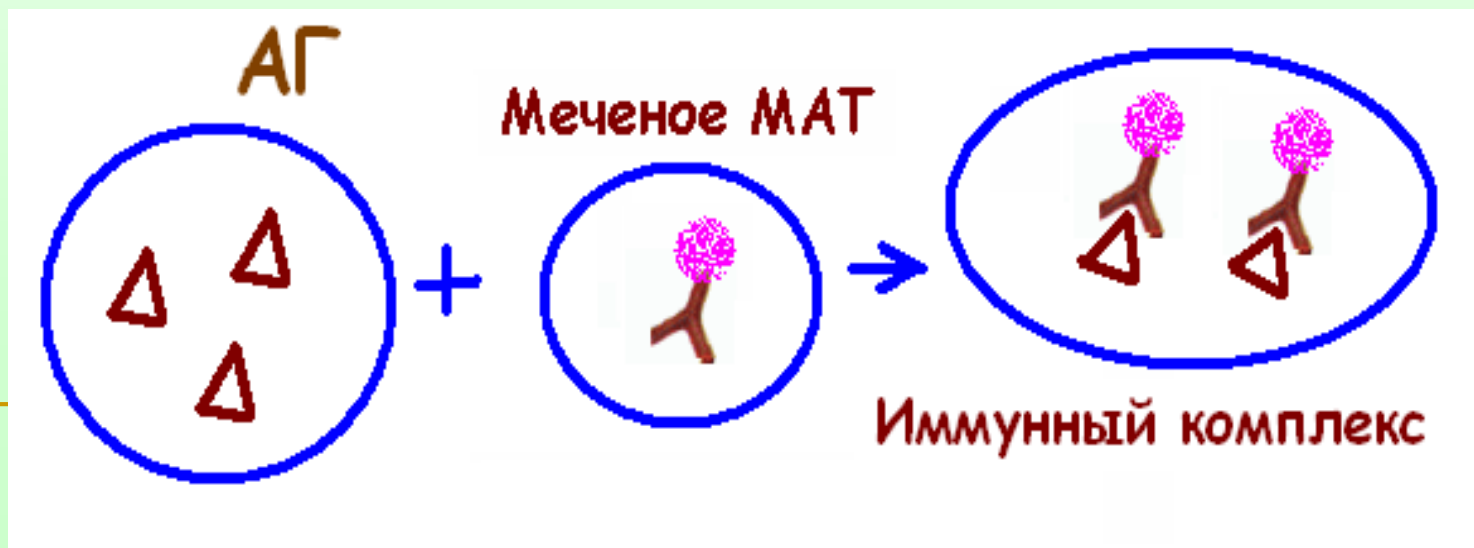
1. Иммунометрические
2. Проточная цитометрия  
(мембранные и внутриклеточные)
3. Вестерн-блот (мембранные и внутриклеточные, секреторные)



# Иммунометрические методы

Выявление маркеров, против которых  
получены МАТ

Обнаружение иммунных комплексов



# Секреторные маркеры - из б/ж - наиболее популярные

## Преимущества:

- доступность и относительная простота определения

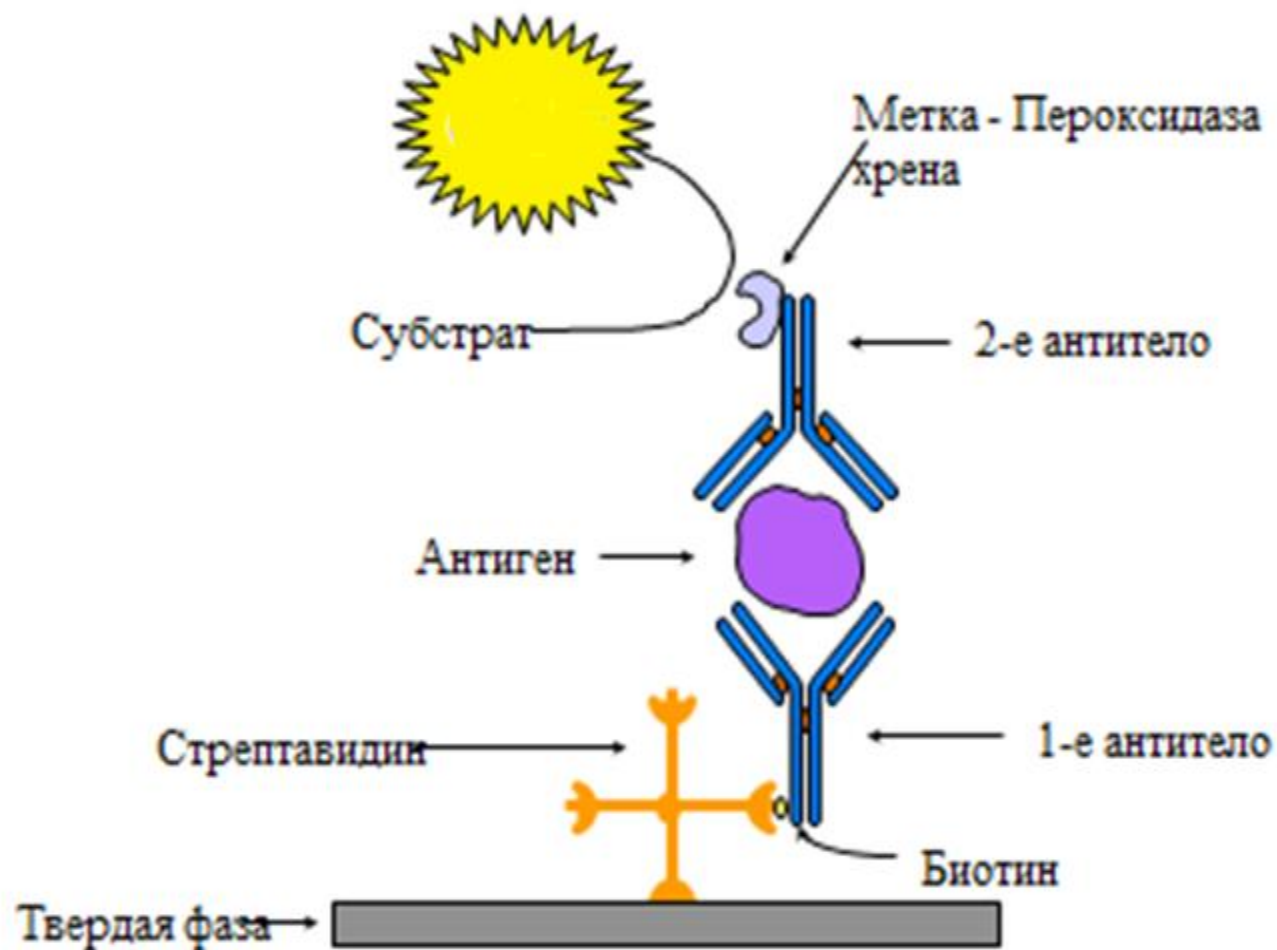
## Недостатки:

- нет опухолеспецифичных ОМ-б/ж
- нет тканеспецифичных ОМ-б/ж (ПСА и тиреоглобулин)
- различия «норма-патология» только в количестве

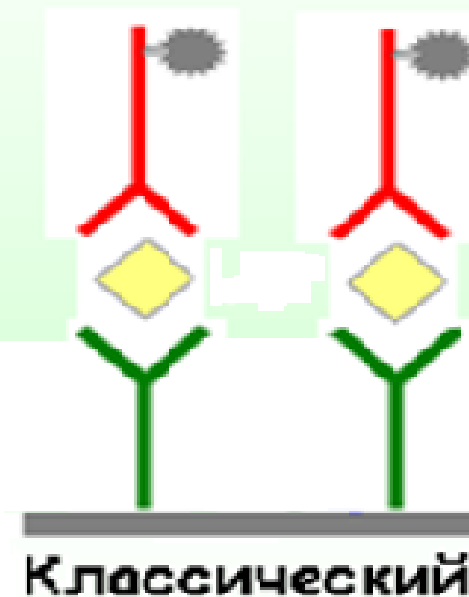


ОМ-б/ж не для диагностики,  
для прогноза

# Иммунометрические тесты



# «Сэндвич»-классический VS «Стрептавидиновые планшеты»



◆ АГ

Y  
MAT1

Y  
MAT2 - пероксидаза

Y  
MAT3 - биотин

## **«Стрептавидиновые планшеты»**

- Улучшить точность и воспроизводимость**
- Расширить динамический интервал тестов**
- Снизить объемы образцов**
- Уменьшить количество разведений и повторных тестов**

# Преимущества технологии «стрептавидиновых планшетов»

- **Экономия реагентов:** меньшее количество сывороток требует разведения и перестановки анализа;
- **Легкость автоматизации методик:** все реагенты жидкие, ГОТОВЫ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ, возможно проведение основной инкубации без шейкирования при комнатной температуре;
- **Идеально подходит загруженным лабораториям:** возможна постановка без использования термостатируемого шейкера

## Преимущества технологии «стрептавидиновых планшетов»

- Самые широкие диапазоны определяемых концентраций;
- Высокая чувствительность и специфичность;

Название	Чувств-ть теста	Диапазон определяемых концентраций			
		Алкор Био	Произв.1	Произв.2	Произв.3
СА 19-9	1 ЕД/мл	0-500	0-240	0-300	0-240
РЭА	1 нг/мл	0-250	0-64	0-80	0-120
СА 15-3	0,2 ЕД/мл	0-400	0-250	0-250	0-200
СА 125	1,6 ЕД/мл	0-1000	0-400	0-400	0-400



# Стрептавидин-биотиновая технология

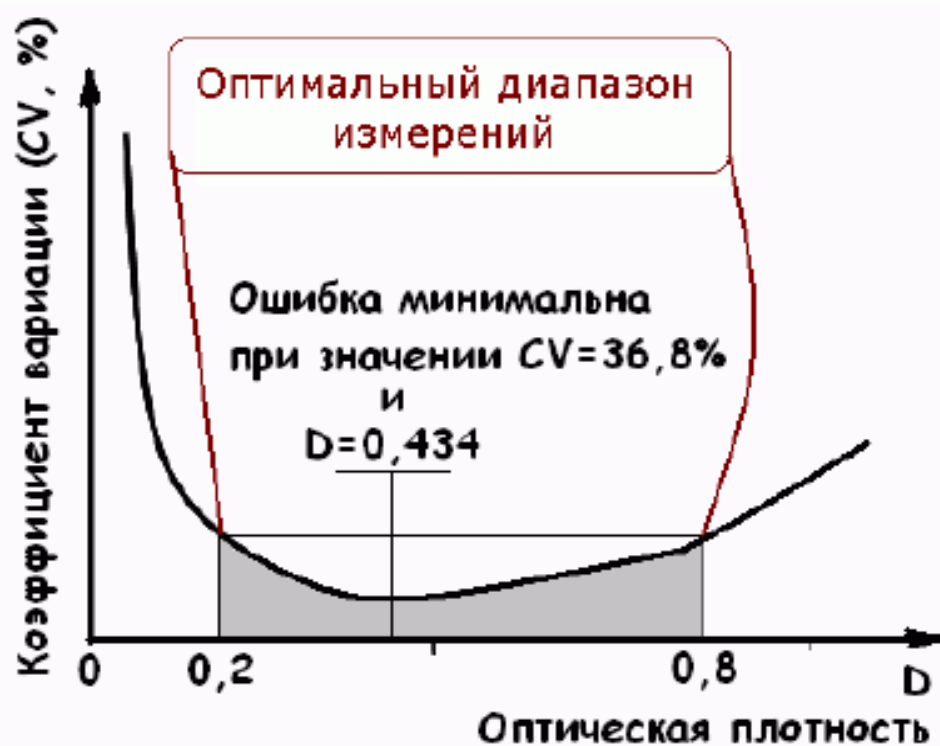
Наборы реагентов\* «Алкор Био»

- ОнкоИФА-СА 125
- ОнкоИФА-РЭА
- ОнкоИФА-СА 19-9
- ОнкоИФА-СА 15-3

# Причины несоблюдения закона Бугера - Ламберта - Бера

Инструментальные ошибки спектрофотометрических измерений:

Ошибка от самой величины оптической плотности  
MIN при  $T=36.8\%$  или  $D(A) = 0.434$ .



Оптимальный диапазон измерения оптической плотности — от 0.2 до 0.8

# Хук-эффект-эффект сползания / highdose hook effect

“Сэндвич”- ИФА + высокая концентрация  
аналита



Обратно пропорциональная зависимость  
 $A(D)$  от концентрации аналита



**ЛОЖНО-ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ**



Клиницист может обнаружить проблему,  
направляя на исследование пациента, ранее  
проходившего подобное обследование в другой  
лаборатории

## Хук-эффект высоких концентраций:

Обратно пропорциональная зависимость  
 $A(D)$  от концентрации аналита



**ВЫВОД:** пробы следует дополнительно разводить с целью уменьшения концентрации (с последующим пересчетом на разведение)



**ПРИЧИНЫ:**

*??Избыток аналита  $\Rightarrow$  одновременное связывание как иммобилизованных, так и выявляющих АТ,  $\Rightarrow$  нет преципитатов??*

# Хук-эффект высоких концентраций:

## Возможные ПРИЧИНЫ:

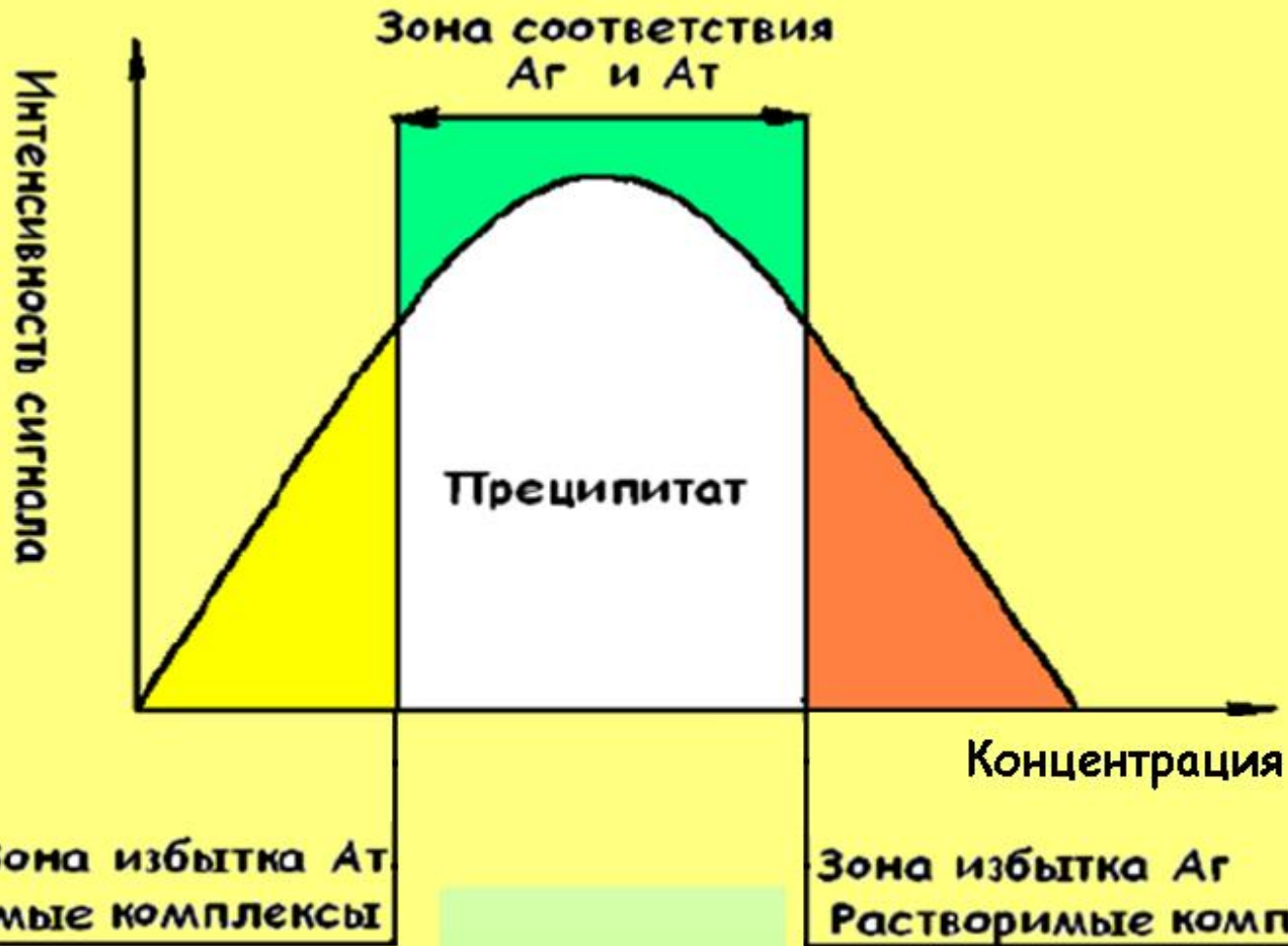
1) Избыток аналита  $\Rightarrow$  одновременное связывание как иммобилизованных, так и выявляющих АТ,  $\Rightarrow$  нет преципитатов

2) Связан с изменением оптической плотности раствора, на основании которой проводится определение концентрации фотометрическим методом

---

3)  $АГ+АТ \rightleftharpoons \underline{АГ-АТ} \downarrow$

# Кривая Хейдельберга-Кендалла / Heidelberger-Kendall curve



1927, кривая зависимости количества преципитата  
от количества  $A_{\Gamma}$  и  $A_T$

## **ВЫВОД:**

**пробы следует дополнительно  
разводить с целью уменьшения  
концентрации**

**(с последующим пересчетом на разведение)**

## **Внимание!**

**Точность приготовления разведений  
определяет качество постановки теста!**

# Наборы реагентов\* «Алкор Био»

- ОнкоИФА-общий ПСА
- ОнкоИФА-свободный ПСА
- ТироидИФА-ТГ
- ГонадотропинИФА-ХГч
- ИФА-АФТ
- ИФА-ферритин

\* РУ РФ



# Конкурентные преимущества ОМ «Алкор Био»

- Самые востребованные «Онкомаркеры»
- Чувствительная детекция «стрептавидин-биотин»
- Диапазон линейной зависимости  $A(D)$  от концентрации в 2 раза шире, чем у аналогов
  - Расширение границ хук-эффекта
- Простые методики (РЭА, СА 125, СА 19-9, СА 15-3), не требующие дополнительного оборудования (инкубация при КТ без шейкирования)
  - Все реагенты готовы к использованию

Рак желудка	СА 72-4	РЭА	
Рак прямой и сигмовидной кишки	РЭА	СА 19-9	
Рак легкого	СА 19-9	РЭА	АФТ
Рак яичников, РШМ	СА 72-4	СА-125	Ь-ХГЧ
РШМ	АФТ	Ь-ХГЧ	
РМЖ	РЭА	СА 15-3	
Рак поджелудочной железы	СА 125	СА 19-9	
Рак печени	АФТ	СА 19-9	
Рак предстательная железа: хронический простатит, аденома	ТСА	ТСА свободный	

# Обнаружение секреторных ОМ

- Не является средством первичной диагностики
- Неприменимо для локализации опухоли (кроме PSA и TG)
- Не рекомендуется в качестве скринингового метода при отсутствии симптоматики

# Требования к ОМ из б/ж

- Иммунохимическая специфичность
- Доступность анализируемого материала
- Синтез на начальных стадиях опухолевого процесса
- Пропорциональность количества опухолевой массе
- Прогностическая значимость

# Лабораторный алгоритм определения секреторных ОМ:

Согласно ВОЗ рекомендуемые интервалы взятия проб для анализа

- 1 раз в месяц в течение 1-го года после лечения,
- 1 раз в 2 месяца в течение 2-го года после лечения,
- 1 раз в 3 месяца в течение 3-го года наблюдения.

## Эффективные скрининговые программы:

- маммографический скрининг РМЖ у женщин 50-69 лет;
- цитологический скрининг предрака и РШМ;
- скрининг рака и предрака толстой кишки с помощью теста на скрытую кровь;
- скрининг рака предстательной железы: тест на простат-специфический антиген (ПСА)

## Скрининговые программы на стадии изучения:

- маммографический скрининг РМЖ у женщин моложе 50 лет;
- скрининг РШМ: тестирование на ВПЧ;
- скрининг рака толстой кишки: сигмоидоскопия;
- скрининг рака легкого: низкодозовая спиральная компьютерная томография (СКТ);
- скрининг рака желудка: тестирование на *Helicobacter pylori* + гастроскопия;
- скрининг рака яичника: маркер СА 125 + УЗИ;
- скрининг рака кожи (меланома): визуальное обследование;
- скрининг рака полости рта: визуальное обследование.

# 1 - Диагностические+эфффективность терапии таргетными препаратами (НК-нуклеиновые кислоты)

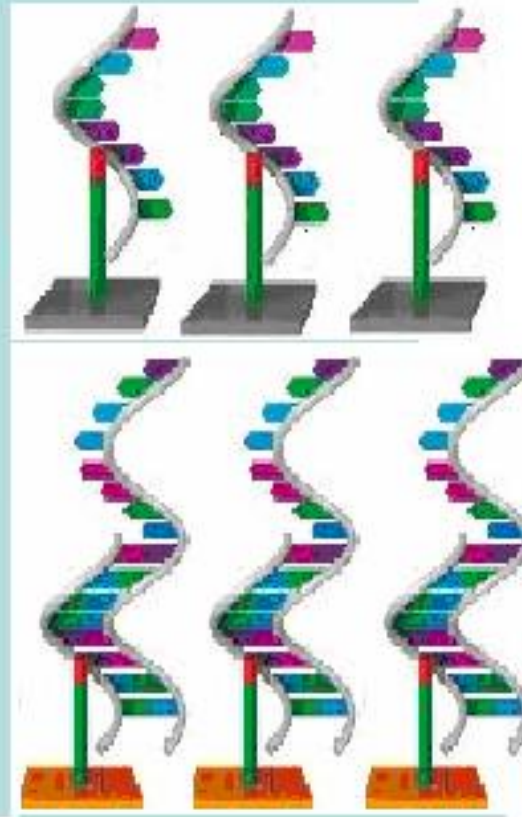
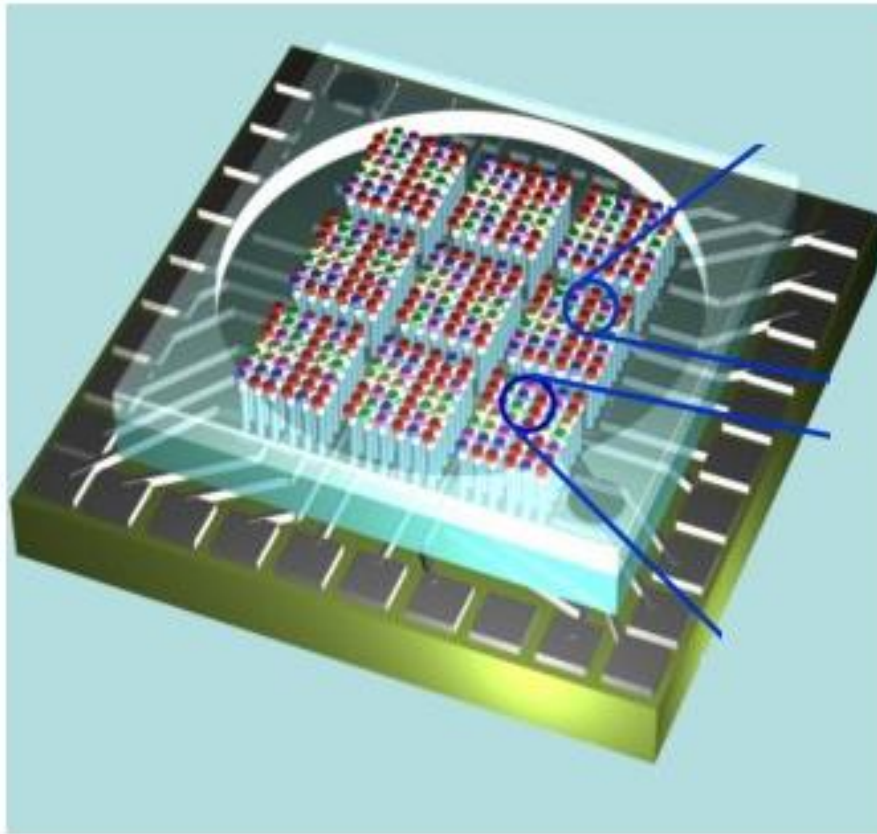
ХМЛ, ОЛЛ, ОМЛ, Ph-хромосома

Препарат	Показания	Необходимый генетический анализ
Гливек	Лейкоз	транслокация t (9;22)

- Мониторинг количества bcr-abl – содержащих клеток
- Анализ мутаций во фрагменте гена, кодирующем киназный домен – устойчивость к Гливеку



# Модификации ПЦР -



3- праймеры с  
люминесцентной  
меткой



Есть гибридизация – цвет чипа и интенсивность окраски меняется и измеряется

Разработан чип «Муковисцид», 25 мутаций



## Мутационный анализ значимых генов:

- рецептор эпидермального ФР у больных колоректальным раком
- рецептор эпидермального ФР у больных немелкоклеточным раком легкого
- рецептор эпидермального ФР у больных РМЖ

# Классификация ОМ по методам определения:

## А - иммунометрические

### 2. Проточная цитометрия (мембранные и внутриклеточные)

#### Фенотипирование клеток - опухолевых и Н



---

➤ Исследование рецепторного газона  
опухолевых клеток -

➤ Факторы роста и их рецепторы -  
показатель способности опухоли к  
саморегулируемой пролиферации

---

# Препараты, блокирующие рецепторы семейства c-erbB

Препарат	Рецептор-мишень
Герцептин (трастузумаб)	HER2
Иресса (гефитиниб)	HER1 – РЭФР
Эрбитукс (цетуксимаб)	HER1 – РЭФР
Тарцева (эрлотиниб)	HER1 – РЭФР
Омнитарг (пертузумаб)	<i>HER2</i>
Тайверб (лапатиниб)	HER1 – HER2
Вектибикс (панитумумаб)	HER1 – РЭФР

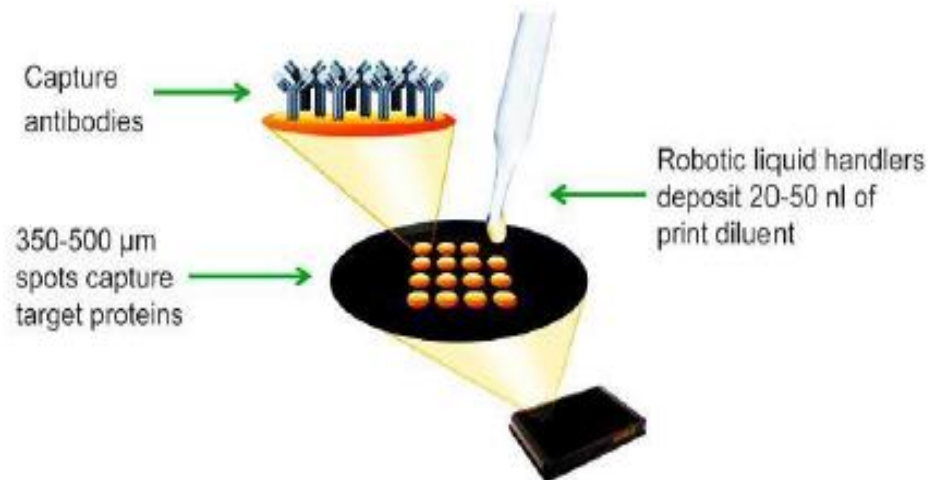
Семейство трансмембранных тирозинкиназных

рецепторов **c-erbB** или **HER**

(Human Epidermal growth factor Receptor)

# Мультиплексный микроочечный ИФА в планшете

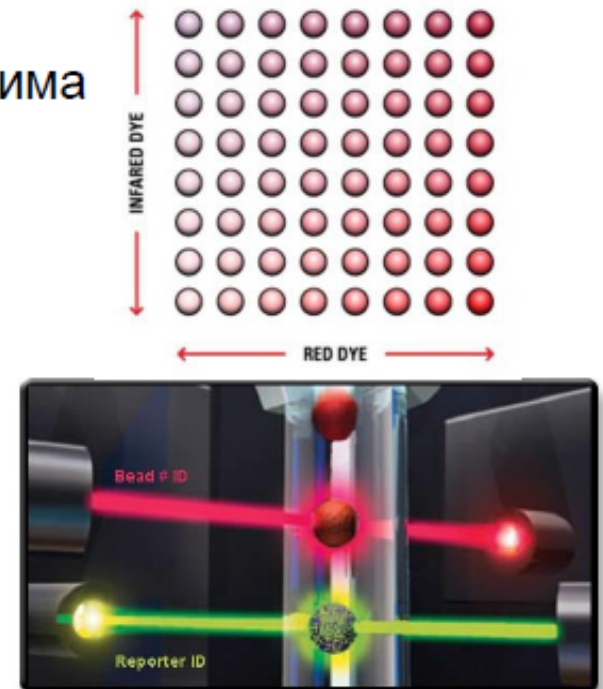
- **Определение до 25 соединений в одной лунке**
- **Время анализа – 2,5 часа**
- **До 80 проб на одном микропланшете**
- **Коммерческие наборы для контроля уровня цитокинов, гормонов и др.**
- **Снижение на порядок стоимости одного анализа**





# xMAP (Luminex) технологии – возможности

- Развитие классической цитофлуориметрии
- Быстрый анализ из-за псевдогомогенного режима
- Носители
  - Магнитное ядро + полистирол
  - Диаметр 5,6–6,5 мкм
  - Единообразие по форме
  - 2 красных красителя, 10 вариантов нагрузки
- Проточный оптический детектор
  - Поток в узкой струе
  - Оптические детекторы
  - Цифровая обработка данных
- Мультиплексный анализ до 100 соединений
- **Время** анализа – 1 час
- **Микропланшетный** формат – до 96 проб
- **Открытая** платформа – может варьироваться число проб, число параметров и комплектация



Красный лазер –  
идентификация аналита

Зеленый лазер –  
измерение содержания  
аналита

# Требования к тест-системам

- Простота
- Надежность
- Экономичность
- Широкий диапазон определяемых концентраций
- Высокая специфичность (более 95%)
- Достаточная чувствительность (более 50%)

Технология	Исследуемые молекулы
ДНК- и РНК-чипы	ДНК, РНК, mRNA, miRNA, siRNA, snRNA, метилированная ДНК
Белковые чипы	Протеины, пептиды
LOAC	ДНК, РНК, miRNA, протеины, пептиды
RT-PCR	ДНК, РНК
Секвенированные ДНК	ДНК, РНК, miRNA, метилированная ДНК
Конвенциональные мультиплексные методы (FISH и аналогичные)	Протеины, ДНК
Методы СТС	Протеины





**Спасибо за внимание!**