

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Проф. О. В. ЩЕРБИНА, канд. мед. наук А. И. МОСКАЛЕЦ

RADIOIMMUNOASSAY OF TUMOR MARKERS IN CLINICAL PRACTICE

O. V. SCHERBINA, A. I. MOSKALETS

*Национальная медицинская академия последиplomного образования им. П. Л. Шупика,
Киевская городская онкологическая больница, Украина*

Описаны теоретические основы радиоиммунологического анализа, проанализированы возможности использования радиоиммунологических исследований в клинической практике. Рассмотрено использование опухолевых маркеров для решения определенных диагностических задач.

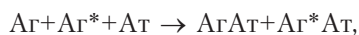
Ключевые слова: радиоиммунологический анализ, иммунорадиометрический анализ, опухолевые маркеры, скрининг.

Theoretical basis of radioimmunoassay is described. The capabilities of radioimmunoassay in clinical practice are analyzed. The use of tumor markers in solving some diagnostic tasks is featured.

Key words: radioimmunoassay, immunoradiometric assay, tumor markers, screening.

Одним из выдающихся достижений прошлого столетия является открытие в 1960 г. американскими учеными R. Yalow и S. Berson радиоиммунологического анализа (РИА). Благодаря своей высокой чувствительности и специфичности этот метод осуществил настоящую революцию в эндокринологии, онкологии, иммунологии и других разделах медицины [1–3].

Радиоиммунологический анализ — метод диагностики *in vitro*, базирующийся на конкурентной реакции между мечеными и немечеными веществами (меченый и немеченый антигены) за связь со специфической воспринимающей системой:



где Ag — немеченый антиген, Ag* — меченый антиген, At — антитело.

Поскольку концентрации меченого антигена и антитела являются одинаковыми для всех анализируемых проб, то единственной переменной величиной в данной реакции является немеченый антиген, от которого и зависит количество образованных комплексов меченого и немеченого антигенов с антителами. Чем выше концентрация немеченого Ag, тем больше займет он связывающих мест антитела, тем меньше будет величина комплекса Ag*At. Следовательно, отношение связанного меченого антигена Ag*At к свободному Ag* обратнопропорционально количеству немеченого Ag, присутствующего в образце. Зная величину этого соотношения или процент связанного меченого антигена Ag*At, можно рассчитать концентрацию анализируемого вещества. С этой целью проводят разделение свободного и связанного антигенов

и измерение радиоактивности одной или обеих его фракций, как правило, Ag*At. Основой количественного определения концентрации вещества является калибровочная кривая, построение которой возможно при наличии стандартных разведений. Результаты радиометрии исследуемых проб представляют в таком же виде, как и данные проб со стандартными разведениями и, откладывая их по оси ординат, по оси абсцисс определяют концентрацию вещества в пробе. В качестве радиоактивной метки используют гамма-излучающий радионуклид ¹²⁵I или бета-излучающий радионуклид тритий.

Преимущества радиоиммунологического анализа:

1. Высокая чувствительность, позволяющая определять малые количества вещества.
2. Высокая специфичность, обусловленная принципом иммунологических реакций.
3. Высокая точность и воспроизводимость метода.
4. Широкий диапазон определяемых концентраций.
5. Простота выполнения анализа и большая пропускная способность.
6. Возможность автоматизации большинства этапов РИА.
7. Отсутствие лучевой нагрузки на организм пациента, минимальная лучевая нагрузка на персонал.
8. Возможность длительного хранения биологического материала.
9. Высокая клиническая информативность.

Компоненты радиоиммунологического анализа:

1. Биологическая проба с веществом, концентрацию которого необходимо определить (немеченый антиген, лиганд).
2. Меченый антиген, идентичный по своим иммунохимическим свойствам немеченому антигену.
3. Антисыворотка, содержащая специфические к меченому и немеченому антигену антитела (связывающий агент).
4. Стандартные растворы, содержащие известные концентрации антигена, идентичного определяемому веществу.
5. Система разделения свободного и связанного с антителом лиганда.

Этапы радиоиммунологического анализа:

1. Внесение и смешивание реагентов, инкубация.
2. Разделение комплекса антиген-антитело и свободного лиганда.
3. Радиометрия.
4. Учет результатов (построение калибровочной кривой, определение концентрации вещества).

Проведение радиоиммунологических исследований возможно при выполнении трех обязательных условий:

1. Количество молекул меченого антигена должно превышать количество антигенсвязывающих участков антитела.
2. Антитело должно одинаково вступать в реакцию как с меченым, так и с немеченым антигеном.
3. Концентрация антител и количество меченого антигена постоянные для заданной тест-системы.

Характеристики радиоиммунологического анализа, определяющие его информативность:

чувствительность — способность выявления наименьших концентраций веществ в исследуемых пробах;

специфичность — способность определения только одной, строго заданной субстанции;

точность — параметр, характеризующий воспроизводимость (совпадение) результатов при проведении многократных определений одной и той же субстанции;

надежность — способность определять истинное количество вещества в пробе.

Разновидностью радиоиммунологического анализа является иммунорадиометрический анализ (ИРМА), в котором в качестве связывающего компонента используются фиксированные на твердофазном носителе антитела, меченые радиолидом. ИРМА обеспечивает лучшую чувствительность в таких случаях:

- низкая стабильность меченого антигена;

– меченое антитело можно получить с высшей удельной активностью по сравнению с меченым антигеном;

– связанное и свободное антитело разделить легче, чем связанный и свободный антиген.

В настоящее время наряду с РИА и ИРМА применяют также иммуноферментный анализ. Относительно иммуноферментного анализа следует сказать следующее. Экономичность использования и качество РИА обычно выше, чем иммуноферментного анализа. Цены на высококачественные импортные наборы для иммуноферментного анализа выше, чем на РИА-наборы, так как технология их изготовления более сложная. В ведущих медицинских центрах Европы все гормональные исследования и определения онкомаркеров в подавляющем большинстве случаев не проводятся с использованием иммуноферментных наборов. Иммуноферментный анализ распространен как дополнительный метод для веществ, которые редко определяются, например, интерлейкинов, или в лабораториях, где нет большого потока исследований.

При иммуноферментном анализе, как правило, меньшая точность и чувствительность анализа, а также более узкий диапазон определяемых концентраций (в частности, из-за более низкой разрешающей способности колориметрического метода детекции). Кроме того, при этом виде анализа более трудоемкая процедура определения концентрации, большая зависимость ферментативной стадии анализа от ряда физико-химических факторов (температура, pH, качество воды, попадание прямого света и т. п.), необходимо строго придерживаться рекомендованного времени при выполнении технологических операций. Это — факторы риска при постановке иммуноферментного анализа. В состав компонентов наборов часто входят вещества с высокой токсичностью и кумулятивным эффектом. Они являются также опасными с экологической точки зрения, так как загрязняют сточные воды. Высокоточные результаты с применением иммуноферментного анализа достигаются при использовании полностью автоматизированных (в большинстве закрытых) анализаторов, что исключает возможные неточности в процедуре анализа. Однако такие анализаторы дорогие и ставят потребителя в зависимость от реагентов соответствующей фирмы. Основная область использования иммуноферментного анализа — диагностика инфекционных заболеваний вирусной и бактериальной природы и иммунология (качественный и полуколичественный анализ).

По своим аналитическим характеристикам с РИА может сравниться только хемилюминесцентный или флуоресцентный анализ. Главным недостатком аналитических систем с использованием флуоресценции является их ориентация на закрытые автоматические анализаторы. Большинство разработок в этой области закрыты патентами, что не позволяет другим фирмам широко

конкурировать на этом рынке. Это, несомненно, отражается на стоимости анализа. Стоимость одного определения с использованием автоматического флуоресцентного анализатора в среднем в 2 раза выше, чем для РИА-анализа. В то же время хемилюминесцентные методы позволяют потребителю использовать любые виды люминометров и выбирать необходимые наборы реактивов от разных фирм. Кроме того, люминометры, используемые для регистрации интенсивности свечения растворов, являются относительно простыми приборами с несложной оптикой и без специального источника света.

В онкологии актуальной задачей является ранняя диагностика злокачественных новообразований. Постоянно проводится поиск опухолевых маркеров, которые бы с высокой достоверностью позволяли диагностировать рак задолго до появления клинических симптомов, особенно у пациентов из групп риска.

Опухолевыми маркерами называются вещества, продуцирующиеся опухолевыми клетками или организмом в ответ на развитие опухоли. От веществ, продуцирующихся нормальными клетками, они отличаются или качественно (опухолеспецифичные), или количественно (ассоциируемые с опухолью, они присутствуют также и в неопухолевых клетках).

Опухолевые маркеры известны с 1928 года, когда была открыта молекула хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), а затем ее связь с хорионкарциномой. С того времени определение уровней ХГЧ используется для диагностики и контроля за лечением этой опухоли. Позже было установлено, что уровень ХГЧ изменяется и при наличии других тробластических опухолей, что дает возможность контролировать динамику опухолевого процесса.

Значение определения уровней онкомаркеров нельзя переоценивать. Определение концентрации маркеров рассматривают как один из методов диагностики в комплексном обследовании пациента с использованием клинических, эндоскопических, лучевых методов исследования.

Идеальный опухолевый маркер должен удовлетворять следующим критериям:

- продуцироваться только злокачественными клетками;
- быть органоспецифическим;
- появляться в высоких концентрациях в биологических жидкостях организма;
- он должен позволять проводить диагностику всей опухолевой ткани;
- его концентрация должна коррелировать с размером опухоли, со стадией заболевания, с прогнозом и с эффектом лечения [4, 5].

Маркер, отвечающий всем вышеперечисленным требованиям, доныне не выявлен, а маркеры, используемые в диагностике, отвечают лишь некоторым из этих критериев. В настоящее время известно более 200 соединений, принадлежащих

к опухолевым маркерам, и их количество постоянно растет.

Существует несколько принципов классификации опухолевых маркеров. Чаще всего их группируют по химической структуре и по биологической функции, выполняемой в организме.

С химической точки зрения выделяют: гликопротеины, полипептиды, углеводные детерминанты гликопротеинов, гликолипиды, белки, полиамины, иммуноглобулины и др.

Классификация онкомаркеров по биологической функции:

онкофетальные антигены: раково-эмбриональный антиген (РЭА), альфа-фетопротеин (АФП); ХГЧ, специфический бета-1-протеин беременности, сквамозный клеточный антиген (СКА), СА125, СА15-3, СА19-9, СА50, СА72-4;

ферменты: фукозилтрансфераза, кислая простатическая фосфатаза, лактатдегидрогеназа, нейронспецифическая енолаза (НСЕ), тимидинкиназа (ТК), тимидилатсинтетаза, простатический специфический антиген (ПСА);

гормоны: адренокортикотропный гормон, антидиуретический гормон, плацентарный лактоген, кальцитонин, паратгормон, пролактин;

рецепторы: прогестероновые, эстрогенные; другие: ферритин, бета-2-микроглобулин (Б2М), иммуноглобулины, ЦИФРА 21-1, тканевой полипептидный антиген (ТПА), тканевой полипептидный специфический антиген (ТПС) и др.

Большинство опухолевых маркеров принадлежит к онкофетальным антигенам. Эти вещества определяются в относительно высоких концентрациях в тканях эмбриона, где они появляются на поверхности дифференцирующихся клеток и играют важную роль в развитии плода. У взрослых людей их уровень значительно ниже, а биологическая функция не известна. При большинстве опухолевых заболеваний их концентрация заметно повышается. Характерно, что чаще всего онкофетальные маркеры появляются при дифференцированных опухолях, а их уровень коррелирует с размером опухоли. Поэтому их определение играет важную роль для прогнозирования заболевания и контроля за ходом лечения.

Опухолевые маркеры с ферментной активностью являются второй по распространенности группой маркеров, их делят на две подгруппы. Первую из них представляют ферменты, способствующие пролиферации клеток, например, тимидинкиназа и нейронспецифическая енолаза. Уровни этих маркеров значительно повышаются при опухолях, характеризующихся усиленной пролиферацией клеток, поэтому их используют для установления стадии заболевания и его прогноза. Вторая подгруппа — это ферменты, присутствующие в клетках нормальной ткани и имеющие определенную биологическую функцию. Они имеют высокую ткане- и органоспецифичность, что позволяет использовать их в основном для определения локализации опухолей. Маркеры

первой подгруппы повышаются при состояниях, характеризующихся выраженной пролиферативной активностью и низкой дифференциацией клеток, что позволяет использовать их для определения прогноза и стадии заболевания. Вторая подгруппа является высокоспецифической для дифференцированных опухолей, а поэтому используется для определения локализации первичной опухоли, а также для дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных заболеваний.

Следующим видом опухолевых маркеров являются гормоны, которые продуцируются специализированными эндокринными клетками или синтезируются эктопически. Эти маркеры чаще всего используют для контроля за ходом медикаментозного лечения и в послеоперационном периоде.

У гормонозависимых опухолей одновременно с их ростом увеличивается и количество рецепторов. В отличие от предыдущих групп маркеров, оказывающихся в сыворотке крови, в данном случае определение уровней проводят в биопсийном материале. Эти маркеры используют для определения прогноза, а также для выбора оптимальной терапии (например, при опухолях молочной железы).

Последняя группа онкомаркеров, которые не имеют ферментной или гормональной активности, — это вещества, продуцируемые нормальными тканями организма. Однако их концентрация резко возрастает при неспецифической реакции организма на развитие опухоли (ферритин, Б2М и др.).

Различают главные, второстепенные и дополнительные опухолевые маркеры. Главный маркер характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью к определенному виду опухоли. Второстепенный маркер, имея более низкую чувствительность и специфичность для данной опухоли, в комбинации с главным маркером повышает вероятность ее выявления. Определение второстепенного маркера проводится как правило параллельно с определением главного маркера. Дополнительный маркер имеет чаще всего еще более низкую чувствительность и специфичность при диагностике онкологического заболевания, но может иметь высокую специфичность для конкретного органа (то есть быть органоспецифическим). Кроме того, возрастание его уровня обычно связано с рецидивом опухоли. В таблице приведена комбинация опухолевых маркеров для соответствующих онкологических заболеваний [4].

Комбинация опухолевых маркеров

Злокачественные новообразования	Опухолевый маркер		
	главный	второстепенный	дополнительный
Рак желудка	СА 72-4, РЭА	ТК или ТПА	
Рак толстой кишки	РЭА, СА 19-9	ТПА	ТК
Рак поджелудочной железы	СА 19-9, СА 50	РЭА	АФП
Рак желчного пузыря	СА 19-9	АФП	ТК или ТПА
Метастазы в печени	СА 19-9, РЭА, АФП	ТК	
Мелкоклеточный рак легкого	НСЕ	ТК или ТПА	
Рак легких	ЦИФРА 21-1, СКА, РЭА	ТК или ТПА	
Рак молочной железы	СА 15-3, ТПА, ТК	РЭА	
Хорионэпителиома	Бета-ХГЧ	ТК	
Пузырный занос	Бета-ХГЧ		
Тератома	АФП, бета-ХГЧ		
Рак яичника	СА 125, СА 72-4		
Рак тела матки	СА 125, ЦИФРА 21-1		
Рак шейки матки	СКА, ЦИФРА 21-1		
Рак простаты	ПСА, свободный ПСА	ТК	
Рак яичка	АФП, бета-ХГЧ		
Рак мочевого пузыря	ТПА, РЭА, ЦИФРА 21-1	ТК	
Нейробластома	НСЕ		
Злокачественная меланома	НСЕ, ТК		
Феохромоцитома	НСЕ		
Карциноид	НСЕ		
Лейкоз	Б2М, ТК		
Злокачественная лимфома	Б2М, ТК		

Показания для применения опухолевых маркеров: скрининг онкологических заболеваний; дифференциальная диагностика рака и доброкачественных процессов; оценка распространенности процесса (в сочетании с методами лучевой диагностики); прогноз; оценка эффективности терапии; мониторинг больных с целью раннего выявления рецидивов и генерализации заболевания.

Скрининг онкологических заболеваний. Критериями для скринингового теста является эффективность раннего выявления заболевания и правильность теста. Но, учитывая тот факт, что уровень опухолевых маркеров коррелирует с массой опухолевой ткани, в большинстве случаев нельзя рекомендовать скрининг по онкомаркерам для выявления ранних стадий заболевания. Негативный результат анализа не означает, что онкологическое заболевание отсутствует. Лишь отдельные маркеры пригодны для диагностики злокачественных опухолей в начальных стадиях, например, простатический специфический антиген для ранней диагностики рака предстательной железы.

Дифференциальная диагностика рака и доброкачественных процессов. Определение уровней опухолевых маркеров может оказать помощь в дифференциальной диагностике злокачественных и доброкачественных процессов. Так, высокий уровень альфа-фетопротеина в сыворотке крови в комбинации с «холодным очагом» в печени (по данным скинтиграфии с радиоколлоидом) свидетельствует о первичной опухоли или наличии метастаза. Простатический специфический антиген при сомнительных данных пальцевого ректального исследования и трансректального ультразвукового обследования помогает в дифференциальной диагностике рака и доброкачественных процессов в предстательной железе (доброкачественная гиперплазия простаты, хронический простатит и др.). Это позволяет уменьшить количество негативных биопсий у пациентов с доброкачественными процессами. Однако для каждого опухолевого маркера существуют пограничные значения концентрации или, как их еще называют некоторые авторы, «серые зоны», что характерно как для рака, так и для доброкачественного процесса. Этот фактор уменьшает ценность опухолевых маркеров в дифференциально-диагностическом процессе.

Оценка распространенности процесса (в сочетании с методами лучевой диагностики). Как указывалось выше, уровень опухолевых маркеров коррелирует с массой опухолевой ткани. При наличии метастазов (регионарных и особенно отдаленных) резко повышается уровень маркеров. Поэтому у первичных больных с высокими уровнями онкомаркеров необходимо исключить метастазы. Для этого с успехом используют методы лучевой диагностики в соответствии с требованиями эффективного выбора диагностических изображений при опухолях соответствующих локализации. Так, при высоких уровнях РЭА и АФП в сыворотке крови у больных с колоректальным раком необ-

ходимо в первую очередь обследовать печень на наличие метастазов, используя для этого ультразвуковое исследование, компьютерную томографию. У больных раком предстательной железы концентрация простатического специфического антигена, превышающая 100 нг/мл, с высокой достоверностью указывает на наличие метастазов в скелет.

Прогноз. Чем выше предоперационные уровни опухолевого маркера, тем выше стадия заболевания и худший прогноз. В настоящее время интенсивно изучается связь целого ряда онкомаркеров с возможностью прогнозирования опухолевых заболеваний.

Оценка эффективности терапии. Для ряда онкологических заболеваний существуют маркеры, пригодные для оценки эффективности лечения. При этом нужно принимать во внимание количество позитивных и негативных случаев динамики уровня каждого маркера. Например, у больных раком молочной железы используют маркер СА 15-3. Но необходимо учесть, что в 34% случаев уровень СА 15-3 не снижается при достаточно успешном лечении, что может привести к ошибочному выводу относительно выбранного метода лечения. Однако высокая чувствительность в случае рецидива болезни позволяет успешно использовать этот маркер в комплексе с анализом клинической картины заболевания. При опухолевых процессах в толстом кишечнике показательной является концентрация раково-эмбрионального антигена, которая повышается у 85% пациентов. Регулярные определения уровней этого маркера можно использовать для контроля эффективности лечения. Повторное нарастание уровня (минимум в 2 раза) свидетельствует о неэффективности лечения.

Мониторинг больных. При регулярном наблюдении за уровнями онкомаркеров можно выявить метастазы за несколько месяцев до их клинического проявления. Следует отметить, что проведение спорадических исследований уровней опухолевых маркеров не имеет смысла. Необходимо отметить, что наиболее важным показателем является динамика изменений, а не абсолютные показатели концентрации. Так, при мониторинге больных раком щитовидной железы определяют в сыворотке крови уровни тиреоглобулина. Тиреоглобулин — гликопротеид, который продуцируется не только нормальными, но и неопластическими клетками щитовидной железы. Он не определяется в сыворотке крови пациентов, у которых проведена тиреоидэктомия и отсутствуют метастазы рака щитовидной железы. Его появление в сыворотке крови у таких пациентов свидетельствует о наличии рецидива или метастазов.

При быстро развивающихся опухолях с неблагоприятным прогнозом (например, рак пищевода) или в тех случаях, когда онкомаркеры не имеют должной чувствительности, длительное наблюдение с использованием маркеров является нецелесообразным.

Выбор опухолевых маркеров. Клиническая оценка. Прежде всего необходимо правильно выбрать опухолевый маркер при данном онкологическом заболевании. Неправильный выбор опухолевых маркеров для определенного заболевания означает, что при данной патологии не происходит повышения уровня исследуемых маркеров (например, СА 15-3 при злокачественных новообразованиях простаты). Гистологический тип опухоли указывает, какую группу маркеров стоит использовать в данном случае для контроля за эффективностью лечения при мониторинге больных. При высокодифференцированных опухолях не следует определять онкомаркеры, характерные для менее дифференцированных опухолей той же локализации. В ранних стадиях заболевания при небольшой массе опухоли нельзя ожидать значительной концентрации продуктов ее жизнедеятельности в крови и других биологических жидкостях организма, поэтому возможны ложноотрицательные результаты исследований. Лечение (операция, химиотерапия, радиотерапия), которое приводит к полному удалению опухоли и девитализации опухолевых клеток, обязательно должно сопровождаться снижением уровней онкомаркеров к норме. Но если не учитывать биологический период полужизни опухолевых маркеров, то проведение исследований через относительно короткий промежуток времени после операции и по завершении лучевой или химио-, гормонотерапии может дать результат, который не коррелирует с клиническими данными и результатами лучевых методов исследований. Необходимо принимать к сведению факторы, способ-

ные повлиять на уровень исследуемого маркера (например, повышение уровня простатического специфического антигена при урологических манипуляциях на предстательной железе). Уровень РЭА повышен у курильщиков. Некоторые неонкологические заболевания могут сопровождаться значительным повышением уровней опухолевых маркеров, например, 10-кратным ростом уровня ТК при ряде вирусных заболеваний. Заболевания печени и почек влияют на метаболизм онкомаркеров и могут изменять результаты анализа. Концентрация многих опухолевых маркеров повышается при хроническом гепатите, циррозе печени, хронической почечной недостаточности. Опухолевые маркеры в своем большинстве не имеют абсолютной органоспецифичности, можно лишь говорить о специфике в отношении определенного типа тканей. Так, повышенные уровни СА 19-9 могут свидетельствовать о раке поджелудочной железы, однако этот же маркер могут продуцировать злокачественные опухоли кишечника, желудка и других органов. При длительном наблюдении за пациентами решающим является не абсолютный показатель уровня маркера, а динамика изменения его концентрации.

В заключение нужно констатировать, что опухолевые маркеры в комплексе с клиническими, лучевыми, эндоскопическими и другими современными методами диагностики помогают в решении задач клинической онкологии. Необходимо проводить поиск новых высокоспецифических маркеров и эффективно комбинировать существующие для повышения эффективности диагностики злокачественных опухолей и мониторинга больных.

Литература

1. Застосування пухлинних маркерів у комплексній діагностиці онкологічних захворювань та оцінці ефективності протипухлинної терапії / М. А. Ішханова, Н. А. Мітрянєва, В. І. Старіков, Г. В. Трунов // Укр. радіолог. журнал.— 1998.— Т. 6, № 4.— С. 465–467.
2. Славнов В. Н. Состояние и перспективы развития радиоиммунологии // Мед. радиология и радиационная безопасность.— 1999.— Т. 44, № 3.— С. 5–13.
3. Щербина О. В. Роль радіонуклідних in vitro методів дослідження в онкології // Зб. наук. праць співробітників КМАПО ім. П. Л. Шупика.— Вип. 11, кн. 2.— К., 2002.— С. 376–383.
4. Опухолевые маркеры и их обследование.— Прага; IMMUNOTECH.— 1999.— 28 с.
5. Опухолевые маркеры в клинической практике: Посobie для врачей / В. Ф. Сухой, В. С. Первый, Н. В. Сухая и др.— Днепропетровск: АРТ-ПРЕСС.— 2003.— 44 с.

Поступила 12.02.2007