

АЛГОРИТМ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ПРОСТАТСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА У БОЛЬНЫХ АДЕНОКАРЦИНОМОЙ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Д.Ю. Блохин¹, П.К. Иванов¹, Н.К. Власенкова¹, И.В. Чинарева¹, И.Б. Шоуа²

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²ООО «Медицинский научный центр «МедБиоСпектр»; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Дмитрий Юрьевич Блохин blokhin@yandex.ru

Введение. Концентрация простатспецифического антигена (ПСА) в сыворотке крови значительно повышается при развитии аденокарциномы предстательной железы (ПЖ), в десятки и сотни раз превышая предельные значения диапазона определяемых концентраций для всех существующих диагностических тест-систем, что ограничивает возможности их применения для систематического мониторинга состояния больных и обеспечения эффективности проводимого лечения. Вместе с тем изменение стандартного алгоритма выполнения лабораторного анализа, изложенного в инструкциях к соответствующим тест-системам, позволяет существенно расширить диапазон определяемых концентраций ПСА.

Цель исследования — создание алгоритма количественного определения общего ПСА в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА), пригодного одновременно для первичной лабораторной диагностики, скрининга и систематического мониторинга состояния больных с верифицированным диагнозом аденокарциномы ПЖ.

Материалы и методы. В работе использованы серийно производимые ИФА-наборы реагентов для количественного определения уровня общего ПСА в сыворотке крови, сертифицированные МЗ РФ для клинической лабораторной диагностики. В исследовании применялись образцы сыворотки крови практически здоровых лиц, больных неопухолевыми заболеваниями ПЖ, больных с доброкачественной гиперплазией, а также больных с верифицированным диагнозом аденокарциномы ПЖ, в том числе в стадии диссеминации опухолевого процесса.

Результаты. Показано, что при последовательном 2-кратном разведении исходного образца сыворотки крови «нулевым» стандартом из состава набора линейность определяемой концентрации общего ПСА сохраняется до разведения в 1024 раза, что позволяет корректно выполнить измерение уровня анализа в диапазоне до 30 000 нг/мл.

Выводы. Разработан и апробирован простой алгоритм выполнения количественного определения ПСА методом ИФА у больных аденокарциномой ПЖ.

Ключевые слова: простатспецифический антиген, иммуноферментный анализ, аденокарцинома предстательной железы

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-70-78

THE ALGORITHM OF QUANTITATIVE DETECTION OF PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN AT PATIENTS WITH A PROSTATE ADENOCARCINOMA

D. Yu. Blokhin¹, P. K. Ivanov¹, N. K. Vlasenkova¹, I. V. Chinareva¹, I. B. Showa²

¹N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia;

²“Medical and Research Center MedBioSpectrum”, Ltd; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. Concentration of a prostate specific antigen (PSA) in blood serum considerably increases in case of development of a prostate adenocarcinoma, in tens and hundreds times exceeding extreme values of the range of the determined concentration for all existing diagnostic test systems that limits possibilities of their application for the purpose of systematic monitoring of a condition of patients and efficiency of the treatment. At the same time, change of standard algorithm of accomplishment of the laboratory analysis stated in instructions to the relevant test systems allows to expand the range of the determined concentration of the PSA significantly.

Objective. The present research is executed for the purpose of creation of algorithm of quantitative detection of the total PSA concentration in blood serum specimens by enzyme immunoassay (EIA) suitable at the same time for primary laboratory diagnostics, screening and systematic monitoring of a condition of patients with the verified diagnosis of a prostate adenocarcinoma.

Materials and methods. In present investigation serially made EIA-kits for quantitative determination of level of a total PSA blood serum specimens certified by the Russian Ministry of Health for clinical laboratory diagnostics are used. In research samples of blood serum of almost healthy donors, and also patients with not tumoral diseases of a prostate, and also patients with the verified diagnosis of a prostate adenocarcinoma, including in a stage of a dissemination of tumoral process were applied.

Results. It is shown that linearity of the defined concentration of the total PSA at consecutive two-fold dilutions of blood serum samples by the “zero” standard remains dilution up to 1024 times that allows to execute correctly measurement of total PSA level in the range up to 30 000 ng/ml.

Conclusion. The simple algorithm of performance of quantitative detection of PSA by EIA at patients with a prostate adenocarcinoma is developed and approved.

Key words: prostate specific antigen, enzyme immunoassay, prostate adenocarcinoma

Введение

Простатический специфический антиген (ПСА), являясь опухолевым маркером рака предстательной железы (РПЖ), с 1980 годов широко используется в клинической лабораторной практике для диагностики этого заболевания, мониторинга эффективности проводимого лечения, а в ряде стран также для скрининга мужского населения при формировании группы риска по поводу аденокарциномы предстательной железы (ПЖ).

ПСА является гликопротеидом с молекулярной массой около 32 кДа, состоящим из 1 полипептидной цепи и имеющим протеиназную ферментативную активность. ПСА органоспецифично продуцируется клетками ПЖ и накапливается в высокой концентрации в составе секрета ПЖ. В норме незначительная часть ПСА попадает в кровоток и присутствует в сыворотке крови в свободной форме (свПСА), а также в форме комплексов с плазматическими белками — α -1-антихимотрипсином и α -2-макроглобулином. В последней форме молекула ПСА полностью экранирована и недоступна для обнаружения обычными иммунометрическими методами, а 1-я и 2-я формы могут быть количественно определены в иммуоферментном (ИФА), иммунофлуоресцентном или радиоиммунном анализе как собственно свПСА и суммарный (общий) ПСА (оПСА), включающий обе формы. В норме ПСА в сыворотке крови женщин обнаруживается лишь в следовых количествах, в то время как у мужчин его концентрация достаточно постоянна и составляет 1–3 нг/мл, несколько повышаясь с возрастом. Воспалительные заболевания ПЖ (простатит, абсцесс), ишемия и инфаркт ПЖ, а также механические микротравмы ее ткани (в том числе в результате массажа ПЖ) могут сопровождаться временным повышением концентрации ПСА в сыворотке, что следует учитывать при назначении данного исследования и в интерпретации результатов. Некоторые факторы, прямо не связанные с патологией ПЖ, также могут оказывать влияние на уровень ПСА в сыворотке крови. При проведении массового скрининга и ранней диагностики опухолей ПЖ верхней границей нормы условно считают концентрацию ПСА до 4 нг/мл, что соответствует низкой встречаемости аденокарциномы ПЖ у мужчин с таким уровнем маркера [1]. Стойкое повышение концентрации ПСА в крови сопровождает гиперпластические заболевания ПЖ, что и определяет диагностическую ценность такого анализа. В то же время концентра-

ция ПСА от 4 до 10 нг/мл трактуется как «серая зона», которая не исключает наличия аденокарциномы, но может быть обусловлена доброкачественной гиперплазией предстательной железы (аденомой) или возрастными изменениями в ней. В такой ситуации полезную информацию для дифференциальной диагностики дает динамическое наблюдение — повышение уровня ПСА более чем на 0,75 нг/мл в год является показанием для биопсии даже при абсолютной концентрации ПСА ниже ее порогового значения [2]. Более высокие концентрации ПСА связаны, как правило, с наличием уже развивающейся аденокарциномы ПЖ, что требует углубленного обследования пациента, в том числе биопсии. Клиническая практика показала, что дальнейшее повышение концентрации ПСА в сыворотке крови более 20 нг/мл связано с высоким риском появления региональных, а более 50 нг/мл — отдаленных метастазов РПЖ; уровень ПСА, превышающий 100 нг/мл, достоверно свидетельствует о диссеминации опухолевого процесса [3]. Таким образом, кроме первичной диагностики РПЖ, уровень ПСА в сыворотке крови является надежным лабораторным критерием наличия региональных и отдаленных метастазов, а также используется для мониторинга эффективности лучевого, гормонального или химиотерапевтического лечения и прогноза заболевания [4].

На российском рынке продукции медицинского назначения в настоящее время представлены наборы реагентов для количественного определения оПСА в сыворотке крови человека методом ИФА, выпускаемые несколькими отечественными производителями и аттестованные Минздравом России в качестве средства клинической лабораторной диагностики. Это ИФА-тест-системы производства «НВО Иммунотех» и «ХЕМА-Медика» (Москва), «Алкор Био» (Санкт-Петербург), «Вектор-Бест» (Новосибирск). Доступны также ИФА-наборы импортного производства (CanAg Diagnostics, Швеция; DRG Diagnostics, Германия, и др.). С одной стороны, наличие выбора средств клинической лабораторной диагностики расширяет ее аналитические возможности, а с другой — эти возможности ограничены различиями в технико-аналитических характеристиках этих тест-систем. Во всех ИФА-наборах рабочей «молекулярной машиной» является пара моноспецифичных антител, как правило, моноклональных, поэтому итоговые характеристики набора прямо связаны с индивидуальными свойствами антител (аффинностью, авидностью),

а также с тем, насколько адекватно эти антитела работают вместе. С уникальными свойствами этой пары связаны не только основные аналитические характеристики конкретного ИФА-набора (чувствительность, специфичность, точность, воспроизводимость результатов анализа), но и значимые технические характеристики: диапазон определяемых концентраций аналита, линейность результатов определения, допустимость разведения анализируемого образца разбавителями для расширения диапазона измерений. Поскольку все производители ИФА-наборов используют для изготовления собственные технические регламенты, разработанные для доступной данному производителю конкретной пары антител, итоговые технико-аналитические характеристики наборов от разных производителей заметно различаются.

Так, в сравнительных исследованиях, выполненных одним из российских производителей ИФА-наборов, показано, что абсолютные значения определяемой концентрации ПСА в образцах сыворотки крови могут различаться на 44–120 % при использовании тест-систем разных производителей [5]. Для применения в качестве средства первичной лабораторной диагностики пригоден любой из сравниваемых ИФА-наборов (при условии определения внутреннего лабораторного диапазона нормальных значений аналита для каждого из них). Но при мониторинге концентрации ПСА в систематических исследованиях для получения объективного результата следует использовать наборы одного производителя [6].

Кроме того, серийно выпускаемые ИФА-наборы имеют достаточно узкий диапазон определяемых концентраций ПСА — от 0–25 нг/мл (DRG Diagnostics) до 0–60 нг/мл (CanAg Diagnostics), чего недостаточно для мониторинга состояния пациентов с верифицированным диагнозом аденокарциномы ПЖ. Это особенно важно на стадии диссеминации опухолевого процесса, когда концентрация ПСА в сыворотке крови достигает значений в сотни и даже тысячи нанограммов на миллилитр. Если определяемая концентрация ПСА в образце превышает диапазон калибровочной кривой, производители ИФА-наборов в инструкциях рекомендуют произвести повторное определение, разведя образец исходной сыворотки в 10 раз специальным раствором для разведения образца («Вектор-Бест»), сывороткой крови с ранее определенным низким уровнем ПСА (CanAg Diagnostics) или «нулевым» стандартом, входящим в состав набора (DRG Diagnostics), и вычислить исходную концентрацию ПСА с учетом фактора разведения. Применение рекомендованных производителем разбавителей позволяет избежать искажения полученных результатов анализа при повторном тестировании [5]. Дополнительным препятствием при анализе

образцов с очень высоким содержанием определяемого аналита является возможность возникновения так называемого хук-эффекта (hook effect) — существенного, вплоть до нуля, занижения концентрации определяемого антигена [6]. Этот эффект может возникать при использовании для анализа ИФА-наборов с одностадийной постановкой твердофазной реакции, в которой инкубация образца, содержащего определяемый антиген, и иммуноферментного конъюгата моноклональных антител выполняется в лунке планшета одновременно. Возможность возникновения хук-эффекта и концентрация антигена, при которой он может проявляться, исследуются еще на этапе разработки тест-системы [7], и они должны быть указаны в инструкции к набору. Производители сравниваемых ИФА-наборов информируют, что хук-эффект при использовании выпускаемых ими тест-систем может наблюдаться при концентрации ПСА в образце более 2000 нг/мл (DRG Diagnostics) и более 3000 нг/мл (CanAg Diagnostics). При использовании ИФА-набора производства «Вектор-бест» при любой концентрации ПСА хук-эффект не возникает, поскольку в этом наборе реализована двухстадийная схема постановки реакции [4].

Цель исследования — создание алгоритма количественного определения оПСА в сыворотке крови человека методом ИФА, пригодного одновременно для первичной лабораторной диагностики, скрининга и систематического мониторинга состояния больных с верифицированным диагнозом аденокарциномы ПЖ.

Материалы и методы

В качестве рабочего ИФА-набора для количественного определения оПСА в сыворотке крови человека использован сертифицированный МЗ РФ для клинической лабораторной диагностики набор «ИммуноФА-ПСА», серийно выпускаемый ЗАО «НВО Иммунотех» (Москва). Набор имеет стандартный планшетный формат, реализованный в стрипованном варианте (12 стрипов по 8 лунок), предусматривает одностадийную постановку теста с использованием стандартных образцов 6 уровней концентрации и образца контрольной сыворотки, процедуру разведения в необходимых случаях исследуемого образца сыворотки «нулевым» стандартом, входящим в состав набора, без потери линейности измеряемых значений. При выполнении сравнительных измерений (кросс-валидация, cross-validation) в качестве референтного использован ИФА-набор «CanAg PSA total EIA» (CanAg Diagnostics, Швеция). Постановку иммуноферментных реакций производили в соответствии с инструкциями к соответствующим наборам, учет результатов реакции проводили на фотометре вертикального сканирования планшетного формата

MCC/340 (Flow Lab., США) или BioTrak II (Amersham BioSci., Великобритания) при длине волны 450 нм, результаты измерений обрабатывали с помощью программы ELISAFIT.

В качестве объекта сравнительного исследования использованы образцы сыворотки крови, полученные в ООО «Медицинский научный центр «МедБиоСпектр» в процессе клинического диагностического лабораторного обследования пациентов мужского пола в соответствии с медицинским назначением и их информированным согласием на использование компонентов крови в научных целях. В группу включены 50 пациентов, страдавших доброкачественной аденомой ПЖ, с диагнозом хронического простатита и больных с верифицированным диагнозом аденокарциномы ПЖ, а также пациенты без выявленной патологии ПЖ (панель K50).

Определение диапазона нормальных значений уровня оПСА в сыворотке крови выполнено у 85 практически здоровых мужчин в возрасте 18–69 лет, проходивших профилактическое диспансерное обследование в ООО «Медицинский научный центр МедБиоСпектр» (панель H85).

Мониторинговые исследования уровня оПСА выполнены в группе пациентов, проходивших химиотерапевтическое лечение по поводу диссеминированной аденокарциномы ПЖ в медицинских учреждениях г. Москвы при лабораторном сопровождении (мониторинг показателей ПСА) в клиничко-диагностической лаборатории ООО «Медицинский научный центр «МедБиоСпектр». Постановку реакций выполняли в соответствии с разработанным алгоритмом серийных разведений образцов сыворотки крови, учет результатов реакции проводили на фотометрах MCC/340 (Flow Lab., США) или BioTrak II (Amersham BioSci., Великобритания) при длине волны 450 нм или с использованием автоматического иммуноферментного анализатора «Alisei» Quality System (Radim Group, Италия).

В работе также использованы образцы сыворотки крови больных с диссеминированной аденокарциномой ПЖ (панель ACP48) и контрольный образец сыворотки Lyphochek Level 3 (BioRad, США), Lot #40163 – L3 с концентрацией ПСА в диапазоне 13–36 нг/мл.

Результаты

Результаты измерения уровня оПСА 2 диагностическими наборами в одних и тех же образцах сыворотки крови (панель K50) попарно представлены в табл. 1.

Из приведенных данных видно, что определяемые набором «ИммуноФА-ПСА» концентрации анализата на 15–30 % выше аналогичных, определяемых набором «CanAg PSA total EIA», однако между значениями, определенными с использованием обоих диагности-

ческих ИФА-наборов, имеется прямая корреляция. График аппроксимации и уравнение регрессии приведен на рис. 1. Величина достоверности аппроксимации ($R^2 = 0,9816$) свидетельствует о высокой степени сопоставимости результатов, полученных разными методами.

Тест на воспроизводимость результатов анализа выполнен с использованием набора «ИммуноФА-ПСА» и образцов сыворотки из панели K50 (образцы K-4, K-18 и K-38) с умеренно повышенным, нормальным и высоким уровнями ПСА путем 10-кратной постановки иммуноферментной реакции в каждой из 4 независимых аналитических сессий (табл. 2).

Диапазон нормальных значений уровня оПСА в сыворотке крови ($X_{\text{ср}} \pm 2 \text{ SD}$), определенный с использованием ИФА-набора «ИммуноФА-ПСА», составил $1,50 \pm 2,22$ нг/мл (интервал 0–3,72 нг/мл). Асимметричный характер распределения значений (рис. 2) свидетельствует о негомогенном составе выборки, связанном, возможно, с различными возрастными группами доноров и с наличием у части из них невыявленных гиперпластических заболеваний ПЖ. Таким образом, в диапазон значений $1,50 \pm 2,22$ (0–3,72) нг/мл попадают 95 % результатов из всей выборки ($n = 85$).

В случаях, когда уровень ПСА в образце сыворотки превышает диапазон определяемых концентраций, производитель диагностического ИФА-набора «ИммуноФА-ПСА» рекомендует выполнить 10-кратное разведение исходного образца сыворотки «нулевым» стандартом из набора и повторить постановку иммуноферментной реакции для расчета исходной концентрации анализата с учетом фактора разведения. Для подтверждения сохранения линейности определения уровня ПСА нами использованы серийные 2-кратные разведения контрольного материала с высоким уровнем анализата Lyphochek Level 3 и образцы сыворотки крови пациентов с гистологически подтвержденной аденокарциномой ПЖ (из панели ACP48). Определение концентрации ПСА в образцах, полученных в результате серийных 2-кратных разведений исходного материала (в 2, 4, 8, 16... раз), выполнено в триплетах (n_1 , n_2 и n_3), рассчитаны средние значения, стандартное отклонение и расчетная с учетом фактора разведения концентрация ПСА в исходном образце (табл. 3). Очевидно, что при последовательных 2-кратных разведениях образца исходной сыворотки «нулевым» стандартом из набора линейность определения сохраняется вплоть до кратности разведения в 1024 раза, при котором может быть выполнено адекватное определение концентрации ПСА в исходном образце до 30 000 нг/мл, что бывает необходимо при мониторинге эффективности консервативного лечения больных, страдающих диссеминированной аденокарциномой ПЖ.

Таблица 1. Результаты определения уровня общего простатспецифического антигена (ПСА) в одних и тех же образцах сыворотки крови (панель K50) с использованием диагностических наборов реагентов «ИммуноФА-ПСА» («НВО ИммуноТех», Россия) и «CanAg PSA total EIA» (CanAg Diagnostics, Швеция)

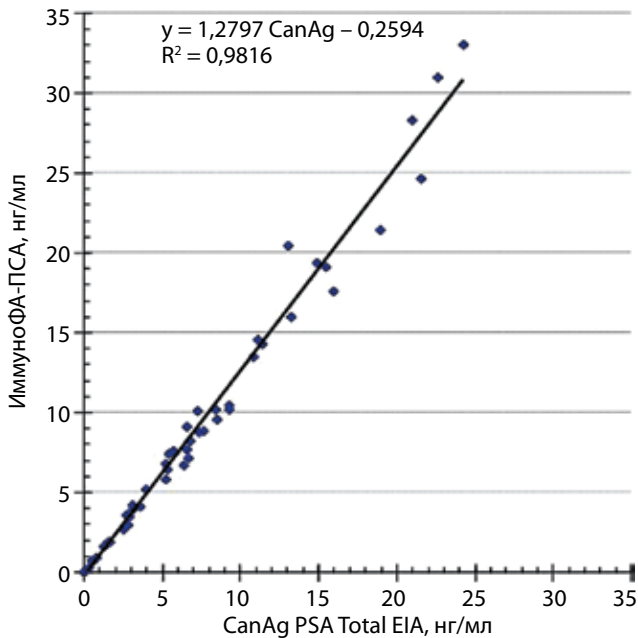
Образец	Определенный уровень ПСА, нг/мл		CanAg / ИммуноФА, %	Образец	Определенный уровень ПСА, нг/мл		CanAg / ИммуноФА, %
	ИммуноФА-ПСА	CanAg PSA total EIA			ИммуноФА-ПСА	CanAg PSA total EIA	
K-1	8,2	6,7	81,7	K-26	16,0	13,2	82,5
K-2	0,1	0,1	100,0	K-27	24,7	21,6	87,4
K-3	14,5	11,1	72,1	K-28	7,7	6,6	85,7
K-4	7,0	5,4	77,0	K-29	10,5	9,3	88,6
K-5	0,3	0,3	100,0	K-30	2,7	2,5	92,6
K-6	0,1	0,1	100,0	K-31	14,3	11,4	79,7
K-7	5,1	4,0	78,4	K-32	33,0	24,3	73,6
K-8	10,2	9,3	91,2	K-33	7,6	5,7	75,0
K-9	8,7	7,4	85,1	K-34	3,5	2,9	82,9
K-10	0,7	0,6	85,7	K-35	9,6	8,5	88,5
K-11	3,0	2,8	93,3	K-36	1,8	1,6	88,9
K-12	0,7	0,5	71,4	K-37	5,8	5,3	91,3
K-13	8,8	7,6	86,4	K-38	30,4	22,6	74,3
K-14	1,9	1,6	84,2	K-39	1,6	1,2	75,0
K-15	19,4	14,9	76,8	K-40	10,2	8,4	82,4
K-16	7,2	6,7	93,1	K-41	7,5	5,8	77,3
K-17	3,5	2,7	77,1	K-42	6,8	5,2	76,5
K-18	2,0	1,6	80,0	K-43	21,4	18,9	88,3
K-19	13,5	10,8	80,0	K-44	6,4	5,3	82,8
K-20	17,6	16,0	90,9	K-45	0,9	0,8	88,9
K-21	3,9	3,1	79,5	K-46	6,7	6,4	95,5
K-22	4,2	3,1	73,8	K-47	19,1	15,4	80,6
K-23	10,1	7,3	72,3	K-48	8,2	6,8	82,9
K-24	20,4	13,1	64,2	K-49	28,3	21,0	74,2
K-25	9,1	6,6	72,5	K-50	4,1	3,6	87,8

Использование серийных разведений образцов позволяет избежать получения ложноотрицательных результатов анализа, возникающих вследствие хук-эффекта, значительно увеличить диапазон определяемых концентраций аналита и, соответственно, расширить область применения диагностического ИФА-набора. Однако реализация такого подхода связана со значительным повышением материалоемкости и себестоимости анализа и требует выполнения ряда стандартизованных манипуляций по пробоподготовке образца на преаналитическом этапе исследования.

Нами разработан и апробирован общий алгоритм, позволяющий оптимизировать процедуры такого

рода исследований. Ниже кратко изложены его основные принципы.

Для выполнения серийных 2-кратных разведений исходного образца сыворотки необходимо предварительно приобрести у производителя ИФА-набора дополнительно «нулевой» стандарт, поскольку входящего в состав коммерческого набора его количества (3 мл) недостаточно для выполнения систематических исследований. Серийные разведения образца удобно выполнять в дополнительно приобретаемом круглодонном 96-луночном планшете, последовательно перенося разводимый образец из лунки в лунку в вертикальных рядах (рис. 3). Предварительно



R^2 – величина достоверности аппроксимации

Рис. 1. Использование набора реагентов «ИммуноФА-ПСА». Значения концентрации общего простатспецифического антигена в образцах сыворотки крови во всем диапазоне калибровочной кривой превышают аналогичные значения, определенные с использованием набора «CanAg PSA total EIA» в среднем на 28 %, однако достоверно аппроксимируются с ними прямой линией, что свидетельствует о высоком коэффициенте корреляции между 2 методами

в лунки планшета, используемые для разведения образца, следует поместить по 50 мкл «нулевого» стандарта, применяя только калиброванную одинаковую пипетку. Далее в лунку А соответствующего вертикального ряда следует внести 50 мкл исходной сыворотки, подлежащей разведению и дальнейшему исследованию. Не меняя наконечник пипетки, следует перемешать содержимое лунки пипетированием, после чего перенести 50 мкл ее содержимого в лунку В того же ряда, и так далее до лунки G, в которой в результате окажется разведенный в 128 раз образец.

Если в мониторинг включают пациента, ожидаемый уровень ПСА у которого на «скрининговом» визите неизвестен, для ИФА используют разведения, полученные в лунках А, С, Е и G (на рис. 3 выделены

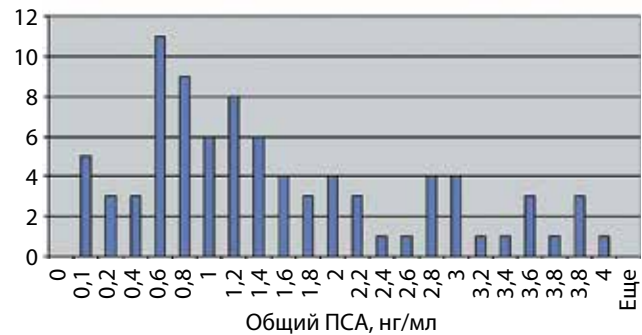


Рис. 2. Использование ИФА-набора «ИммуноФА-ПСА». Распределение вероятностей определения уровня общего ПСА в сыворотке крови практически здоровых лиц мужского пола в возрасте 18–69 лет

жирным шрифтом), соответствующие разведениям в 2, 8, 32 и 128 раз; иммуноферментная реакция выполняется в дублях; для анализа образца 1 пациента используют 1 полный стрип (8 лунок) планшета ИФА-набора. Если в результате реакции для разведений в 128 раз концентрация ПСА превышает диапазон определяемых значений, следует повторить разведения исходного образца для получения разведений в 256, 512 и 1024 раза, после чего тестировать полученные разведения в ИФА. Если в результате ИФА в области определяемых концентраций аналита окажутся сразу несколько последовательных разведений сыворотки данного пациента, для дальнейших расчетов исходной концентрации ПСА следует использовать наименьшее из них.

Если пациент уже находится в повизитном мониторинге и базальный уровень его ПСА известен (документирован и внесен в базу данных), при последующих визитах в качестве ожидаемого следует использовать то же разведение исходной сыворотки, которое при предыдущем визите использовалось для расчета исходной концентрации ПСА. Однако динамика развития опухолевого процесса может приводить к заметным колебаниям концентрации аналита в сыворотке крови, в связи с чем следует также анализировать одно разведение до ожидаемого и 2 последовательных разведения после него. Для этого следует произвести серийные разведения исходной сыворотки аналогично тому, как это описано выше,

Таблица 2. Воспроизводимость результатов определения простатспецифического антигена в 4 аналитических сессиях

Образец	Исх. знач., нг/мл	1-я сессия (n = 10)			2-я сессия (n = 10)			3-я сессия (n = 10)			4-я сессия (n = 10)		
		X_{cp}	SD	CV %	X_{cp}	SD	CV, %	X_{cp}	SD	CV, %	X_{cp}	SD	CV, %
K-18	2,0	1,97	0,18	9,14	1,99	0,25	12,56	2,13	0,19	8,92	1,92	0,21	10,94
K-4	7,0	7,03	0,21	2,99	7,02	0,20	2,85	7,03	0,18	2,56	7,05	0,22	3,12
K-38	30,4	30,72	0,78	2,54	30,06	0,77	2,56	29,33	0,94	3,20	30,06	0,93	3,09

Примечание. X_{cp} – среднее арифметическое, нг/мл; SD – стандартное отклонение среднего арифметического, нг/мл; CV – коэффициент вариации.

Таблица 3. Определенные и расчетные значения концентрации общего простатспецифического антигена (ПСА) при серийных последовательных разведениях контрольного материала LyrphoChek Level 3 и образцов сыворотки крови (3 пациента с верифицированным диагнозом аденокарциномы предстательной железы)

Образец	Фактор разведения, раз	Определенная концентрация ПСА, нг/мл				Стандартное отклонение	Расчетная концентрация ПСА в исходном образце, нг/мл
		n1	n2	n3	Среднее		
LyrphoChek Level 3	—	31,9	32,5	32,2	32,2	0,30	32,2
	2	16,9	16,8	16,4	16,7	0,26	33,4
	4	8,3	8,6	8,5	8,47	0,15	33,9
	8	4,4	4,2	4,7	4,43	0,25	35,4
	16	2,5	2,2	2,3	2,33	0,15	37,3
	32	1,2	1,1	1,4	1,23	0,15	39,4
	64	0,6	0,5	0,6	0,57	0,06	36,5
	Среднее стандартное отклонение						35,44
							2,49
ACP-24	—	>>	>>	>>	—	—	—
	2	32,2	33,6	33,1	32,97	0,71	66,0
	4	16,6	16,9	16,4	16,63	0,25	66,5
	8	8,4	8,2	8,8	8,47	0,31	67,8
	16	4,5	4,2	4,6	4,43	0,21	70,9
	32	2,1	2,2	2,4	2,23	0,15	71,4
	64	1,1	0,9	1,2	1,07	0,15	68,5
	128	0,6	0,4	0,6	0,53	0,12	67,8
	Среднее стандартное отклонение						68,4
							2,06
ACP-31	—	>>	>>	>>	—	—	—
	2	>>	>>	>>	—	—	—
	4	>>	>>	>>	—	—	—
	8	28,8	26,7	28,4	27,97	1,12	223,8
	16	15,1	13,7	14,1	14,3	0,75	228,8
	32	7,8	6,9	6,7	7,13	0,59	228,2
	64	4,0	3,8	3,6	3,80	0,20	243,2
	128	1,8	1,8	1,9	1,83	0,06	234,2
	256	0,8	0,9	0,9	0,87	0,06	222,7
	Среднее стандартное отклонение						230,15
							7,59
ACP-46	—	>>	>>	>>	—	—	—
	2	>>	>>	>>	—	—	—
	4	>>	>>	>>	—	—	—
	8	>>	>>	>>	—	—	—
	16	>>	>>	>>	—	—	—
	32	25,5	26,8	26,1	26,13	0,65	836,2
	64	13,2	13,0	13,2	13,13	0,12	840,3
	128	6,8	6,1	6,4	6,43	0,35	823,0
	256	3,2	3,3	3,3	3,27	0,06	826,9
	512	1,5	1,5	1,7	1,57	0,12	803,8
	1024	0,8	0,7	0,9	0,80	0,10	819,2
	Среднее стандартное отклонение						824,9
							13,04

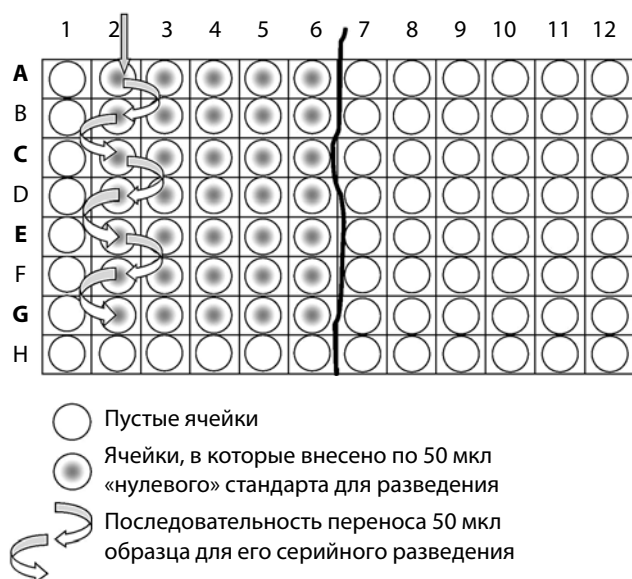


Рис. 3. Серийные двукратные разведения образца сыворотки крови для последующего ИФА концентрации ПСА у больных, страдающих диссеминированной аденокарциномой ПЖ. Дизайн выполнения

но анализировать разведения, полученные в 4 последовательных лунках (например, лунки В, С, D и Е, если при предыдущем визите расчет сделан из разведения в лунке С). Использование 4 последовательных разведений также потребует использования 1 целого стрипа (8 лунок) планшета ИФА-набора. Таким образом, для целей мониторинга уровня ПСА у пациентов, страдающих диссеминированной аденокарциномой ПЖ, максимально на 1 планшете может быть выполнен ИФА 11 образцов сыворотки при постановке реакции в дублях и построении калибровочной кривой для каждого планшета, чего требуют автоматические ИФА-анализаторы.

Используя разработанный алгоритм преаналитической пробоподготовки образцов сыворотки крови, мы провели исследования по повизитному мониторингу больных диссеминированной аденокарциномой ПЖ, проходивших лечение и находившихся под клиническим наблюдением в различных медицинских учреждениях г. Москвы. Повторные визиты соответствовали интервалу времени примерно в 1 мес (табл. 4). Поскольку задачей являлось исключительно лабораторное сопровождение медицинских лечебных мероприятий, никакой оценки соответствия уровня ПСА клинической картине заболевания и эффективности проводимого лечения в настоящей работе не может быть проведено. Вместе с тем приведенные данные иллюстрируют общую динамику процесса и диапазоны концентраций, в которых могут

Таблица 4. Уровень общего простатспецифического антигена в сыворотке крови при повизитном мониторинге больных диссеминированной аденокарциномой предстательной железы, определенный в стандартном иммуноферментном анализе после выполнения серийных разведений образцов по разработанному алгоритму (рассчитан с учетом фактора разведения)

Визит	Уровень простатспецифического антигена, нг/мл					
	МАСР-3	МАСР-7	МАСР-8	МАСР-11	МАСР-16	МАСР-23
Скрининг	339	1554	2513	9603	3019	1165
Визит 1	244	225	2057	3642	6013	1254
Визит 2	567	151	2001	683	5214	256
Визит 3	243	16	803	93	10535	16
Визит 4	487	98	256	22	—	7,2
Визит 5	247	252	215	11	—	9,3
Визит 6	248	549	170	6,5	—	5,4
Визит 7	385	970	107	6,2	—	7,7
Визит 8	353	—	111	5,6	—	5,0
Визит 9	519	—	108	3,8	—	3,9
Визит 10	558	—	47	2,8	—	2,1
Визит 11	—	—	57	2,7	—	0,2
Визит 12	—	—	117	1,5	—	0,7
Визит 13	—	—	640	2,1	—	0,5
Визит 14	—	—	—	7,3	—	0,3
Визит 15	—	—	—	93	—	0,7

Примечание. МАСР-3, МАСР-7, МАСР-8, МАСР-11, МАСР-16, МАСР-23 — коды пациентов.

колебаться уровни ПСА при повизитном мониторинге больных, а также показывают потенциальную пригодность серийных производимых диагностических наборов реагентов для количественного определения оПСА человека методом ИФА для подобных исследований.

Таким образом, применение общих принципов разработанного алгоритма количественного определения оПСА в сыворотке крови человека методом ИФА предоставляет возможность использования стандартных диагностических ИФА-наборов одновременно для первичной лабораторной диагностики, скрининга и систематического мониторинга состояния больных с верифицированным диагнозом аденокарциномы ПЖ.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Пушкарь Д. Ю. Радикальная простатэктомия. М., 2004.
2. Пушкарь Д. Ю., Раснер П. И. Диагностика и лечение локализованного рака предстательной железы. М., 2008.
3. Урология. Национальное руководство. Под ред. Н. А. Лопаткина. М., 2011.
4. Клиническая андрология. Под ред. В.-Б. Шилла, Ф. Комхаира, Т. Харгрива. М., 2011.
5. Попова Н. А., Калаева Л. А., Одинцов С. В. и др. Сравнительный анализ общего простатспецифического антигена с помощью четырех различных наборов реагентов. Инф. бюллетень «Новости «Вектор-Бест» 2008;1(47):3–4. <http://www.vector-best.ru/publ/nvb/n47.pdf>.
6. Шаркова В. Е., Власов Г. С., Свежова Н. В. Ошибки при проведении иммуноферментного анализа. Клиническая лабораторная диагностика 2007;3:42–5.
7. Осипова Т. В., Ленева Н. В., Виха Г. В. и др. Набор для количественного определения общего простатспецифического антигена в сыворотке крови человека методом одностадийного твердофазного иммуноферментного анализа. Патент РФ № 2242006 от 10.12.2004.