

## Количественный анализ экспрессии опухолеассоциированных белков в образцах сывороток крови у больных раком яичника и у больных с другой локализацией опухоли. Возможности использования для диагностики и оценки распространенности опухолевого процесса

Т.С. Боброва, Ю.В. Чуев, К.И. Жордания

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Контакты: Татьяна Сергеевна Боброва [Omegov4763@mail.ru](mailto:Omegov4763@mail.ru)

Иммунологическими методами проведено исследование особенностей экспрессии опухолеассоциированных (ОАС) белков в сыворотке крови у больных раком яичника (РЯ) и у больных с другой локализацией опухоли с помощью иммунных сывороток (Ас), моноклональных антител (МКА) для выяснения возможности использования для диагностики и оценки распространенности опухолевого процесса.

С помощью МКА 1 (получены к мембранным белкам клеток Нер-2, рак гортани), Ас 4 (получены к пулу двух цистаденокарцином яичника), МКА 3 (получены к аффинно-очищенным белкам условно нормальной слизистой оболочки желудка человека) были исследованы сыворотки крови больных РЯ и с другой локализацией опухоли и обнаружена позитивная реактивность в 82, ~100 и в 77% случаев соответственно. Показано, что различия в экспрессии ОАС-белков по сравнению со здоровыми донорами статистически достоверны ( $p = 0,0001$ ;  $p = 0,015$ ;  $p = 0,01$  соответственно).

Чувствительность выявления ОАС-белков количественным вариантом ELISA у больных РЯ I–II стадии – 78%, у больных III–IV стадии – 85%, у больных РМЖ (~100%), раком желудочно-кишечного тракта (89%), у больных с лимфопролиферативными заболеваниями (60%), у здоровых доноров – 14%. При сравнении частоты выявления ОАС-белков, в предложенных нами тест-системах с мультиплексными тест-системами в формате биочипа, из 12 опухолевых маркеров обнаружено, что эти тест-системы находятся на уровне мировых стандартов.

**Ключевые слова:** опухоль-ассоциированные белки, ELISA, рак яичника, онкологические больные, сыворотка крови, диагностика

### Quantification analysis of the expression of tumor-associated proteins in serum samples from patients with ovarian cancer and those with other tumor location. Possibilities of their use in the diagnosis and estimation of the extent of a tumorous process

T.S. Bobrova, Yu.V. Chuyev, K.I. Zhordania

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The specific features of the expression of tumor-associated proteins (TAP) were immunologically studied in the sera of patients with ovarian cancer (OC) and other tumor location by means of immune sera (As) or monoclonal antibodies (MAb) to find out whether they could be used to diagnose and estimate the extent of a tumorous process.

MAb 1 (to HEp-2 cell membrane proteins, larynx cancer), Ac4 (to a pool of two ovarian cystadenocarcinomas), and MAb 3 (to affinity-purified proteins of the apparently intact human gastric mucosa) were used to examine the sera of patients with OC and other tumor location and positive responsiveness was detected in 82, ~100, and 77% of cases, respectively. The differences in the expression of TAP in the patients versus healthy donors were shown to be statistically significant ( $p = 0.0001$ ;  $p = 0.015$ ;  $p = 0.01$ , respectively).

The sensitivity of quantifying ELISA in detecting TAP was 78 and 85% in patients with Stages I–II and III–IV OC, respectively; ~100 and 89% in patients with breast cancer and in those with gastrointestinal tract cancer, respectively; and 60 and 14% in patients with lymphoproliferative diseases and healthy donors, respectively. Comparison of TAP detection rates in the authors' test systems with multiplex testing with a biochip array of 12 tumor markers has shown that these test systems are at the world standard level.

**Key words:** tumor-associated proteins, ELISA, ovarian cancer, cancer patients, serum, diagnosis

До настоящего времени не обнаружено максимально надежных методов для диагностики ранних стадий рака яичника (РЯ). По данным статистики, у 64% впервые обратившихся больных был диагностирован РЯ III–IV стадии. Решение проблемы ранней диагностики и выяснения биологической природы

этого заболевания позволит значительно снизить смертность [1–3].

В настоящее время есть только один опухолевый маркер, роль которого хорошо известна в диагностике РЯ – СА-125. Потенциальные возможности многих сывороточных маркеров были исследованы в комби-

нации с СА-125 или без, включая СА-15-3, СА-19-9, OVX1, *lysophosphatidic acid* (LPA) и СЕА. Однако эти маркеры не нашли широкого применения [4–10].

**Цель настоящей работы:** исследование особенностей экспрессии и распределения опухолеассоциированных (ОАС) белков в сыворотках крови больных РЯ и у больных с другой локализацией опухоли с помощью иммунных сывороток (Ас) и моноклональных антител (МКА), а также возможности использования полученных результатов для диагностики и оценки распространенности опухолевого процесса.

### Материалы и методы

Образцы опухолевых тканей предоставлены отделом патологической анатомии, сыворотки больных и здоровых доноров (ЗД) — лабораторией биохимии и отделением гинекологии НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. Данные по гистологическим диагнозам, по стадиям опухолей, по проведенному лечению у больных РЯ и других онкологических больных получены из архива патолого-анатомического отдела и из архива НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Исследован 61 образец сыворотки крови онкологических пациентов: больных РЯ ( $n = 22$ ), раком молочной железы (РМЖ,  $n = 11$ ), раком желудочно-кишечного тракта (РЖКТ,  $n = 9$ ), больных с лимфопролиферативными заболеваниями (ЛПЗ,  $n = 10$ ), раком легкого (РЛ,  $n = 4$ ), а также сыворотка крови больных с другой локализацией опухоли ( $n = 5$ ), сыворотка крови ЗД и соматических больных (СБ,  $n = 14$ ). Возраст больных составил 33–75 лет. Гистологически опухоли яичника подразделялись на аденокарциномы (серозные) ( $n = 17$ ), муцинозные ( $n = 2$ ), эндометриоидные ( $n = 3$ ).

Были выявлены стадии заболевания опухолями яичников: I ( $n = 7$ ), II ( $n = 2$ ) и III ( $n = 13$ ). У 8 больных РЯ выявлена двусторонняя опухоль (преимущественно у больных III стадии), у 3 больных (I–II стадии) ранее было проведено лечение по поводу РМЖ, двое больных (Ic стадия) были после проведенного химиотерапевтического лечения, 4 (III стадия) — после комбинированного лечения.

**Получение лизатов опухолевых тканей и клеток клеточных линий.** Клетки Нер-2 (рак гортани) выращивали на среде 199 с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиков. Для получения лизатов образцы опухолевых тканей и клетки клеточной линии Нер-2 обрабатывали с использованием буфера, содержащего 100 ммоль/л NaCl, 0,1 % SDS, 10 ммоль/л трис-HCl (pH 7,5), 1 ммоль/л ЭДТА, 0,5 % тритон, 1 ммоль/л PMSF, 0,02 % азида натрия, центрифугировали при 10 000 g в течение 10 мин [11, 12].

**Сыворотки крови больных.** С целью поиска мембранных белков сыворотку крови подвергали ультрацентрифугированию при 125 000 об/мин в течение 1 ч

при 4 °С. Осадок растворяли в буфере для нанесения образцов с 2 % 2-β-меркапэтанолом (2-МЕ) с последующим электрофорезом.

**Кроличья антисыворотка (Ас)** Ас р40-46 получена к полосе с молекулярной массой (М. м.) 40–46 кД [12]. Для этого лизаты клеток Нер-2 подвергали полупрепаративному электрофорезу с последующим переносом на нитроцеллюлозу. Белок, соответствующий М. м. 40–46 кДа вырезали, нитроцеллюлозу с белком растворяли в dimethyl sulphoxide (DMSO) (Sigma, США), полученный раствор вводили кроликам в подколенный лимфатический узел (ЛЛУ) по общепринятой методике.

Ас 4 (мышинная) получена к белкам из 2 образцов РЯ человека. Мышам 4-кратно вводили в область шеи препарат белков, состоящий из пула лизатов 2 образцов РЯ (цистаденокарциномы), по 100 мкг на инъекцию [11, 12].

**Моноклональные антитела.** МКА 1 (1F3-2D4) (мышинные, IgG1) получены против мембранных белков клеток Нер-2; МКА 3 — к аффинно-очищенным белкам из образца условно нормальной слизистой оболочки желудка человека; асциты — с помощью введения гибридомных клеток мышам BALB/c, предварительно обработанных 0,5 мл *pristane* (Sigma, США). Иммуноглобулиновые фракции, выделенные из асцитической жидкости, очищали с помощью ионообменной хроматографии [11, 12]. Меченные пероксидазой антисыворотки к иммуноглобулинам кролика и мыши представлены ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи».

**Электрофорез и иммуноблоттинг.** Для проведения иммуноблоттинга (ИБ) 10–20 мкл образца (50–70 мкг белка) в буфере с 2 % 2β-МЕ и 2 % додецил сульфат натрия (ДСН) подвергали электрофорезу в 8 % полиакриламидном геле (ПААГ). Белки переносили на нитроцеллюлозный фильтр «Hybond-C-Extra» (Amersham, Швеция) в электрическом поле напряжением в 2 В/см<sup>2</sup> в течение 20 ч. Фильтры с белками обрабатывали по общепринятой методике. Ас и МКА использовали при разведении 1 : 2000. Выявление позитивной реактивности Ас и МКА с белками было проведено с использованием вторых антител, меченных пероксидазой [11, 12].

**Иммуноферментный анализ.** Определение содержания ОАС-белков в сыворотке крови проводили методом ELISA. В лунки полистероловых планшет вносили образцы ультраосадков (УОС) сыворотки крови онкологических больных, ЗД и СБ по 1 мкл в 100 мкл в 0,1 М карбонатно-бикарбонатного буфера в триплетах с последующим добавлением 0,25 % раствора глутаральдегида по 100 мкл и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Не связавшиеся валентности забивали 5 % раствором фетальной сыворотки. Первые кроличьи антитела (Ас р40-46) исполь-

зовали в разведении 1:2000, инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Вторые антитела против глобулинов кролика, меченные пероксидазой хрена, использовали также в разведении 1:2000. После отмывания в лунки закапывали для проявления позитивной реактивности ортофенилдиамин (ОФД) в фосфатном буфере (5 мг/10 мл) с добавлением 2 мкл  $H_2O_2$ . Для остановки реакции добавляли 10 % раствор серной кислоты ( $H_2SO_4$ ). Результаты оценивали с помощью прибора «Multiscan» (Labsystems, Финляндия) при 490 нм [6]. Для построения калибровочной кривой использовали препараты белков из тканевых образцов РЯ и рака желудка (РЖ) человека, которые преципитировали 50 % раствором сульфата аммония. Затем белки разделяли с помощью 10 % полупрепаративного электрофореза. Полосы, соответствующие белку с М. м. 34–38 кДа из образца тканей РЯ, РЖ и 200–250 кДа из образца тканей РЖ вырезали, белки из полос элюировали с помощью буфера, содержащего 4 % 2-β-меркаптоэтанола (2-β-МЕ). Количество белка в образцах определяли с помощью спектрофотометра.

**Статистическая обработка.** Определение достоверности различий проводили по t-критерию Стьюдента [13]. Различия считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

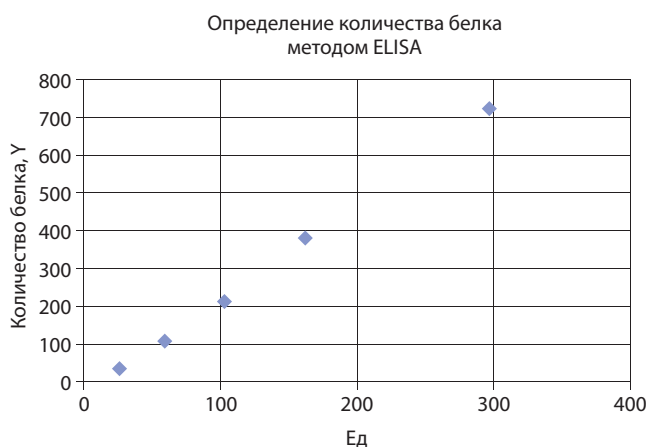
С целью возможного выявления повышения экспрессии ОАС-белков в сыворотке крови онкологических больных был использован метод ИБ с помощью МКА 1, МКА 3 и Ас 4.

С помощью МКА 1 было исследовано 39 сывороток больных РЯ, позитивная реакция по р25-28 и р48-53-55 выявлена в 32 (82 %) образцах, преимущественно у больных III стадией. Интенсивность реакции находилась в прямой зависимости от стадии болезни. Чувствительность выявления ОАС-белков составила 82 %, а специфичность — 72 %.

В УОС 13 сывороток крови больных РЯ с помощью Ас 4 выявлены белки р48-53-55 кД; при этом в сыворотках больных ( $n = 25$ ) с другой локализацией опухоли белки р48-53-55 либо не были выявлены, либо отмечена очень слабая реактивность ( $n = 6$ ; 28 %). С образцами сывороток крови больных I стадией РЯ реактивность Ас 4 была значительно меньше. Чувствительность выявления ОАС-белков с помощью Ас 4 составила ~ 100 %, а специфичность — 72 % при всех стадиях заболевания.

С помощью МКА 3 было исследовано 13 образцов сыворотки крови больных РЯ. Позитивная реактивность выявлена либо по р48-53-55 ( $n = 10$ ; 77 %), либо по р53-55-65 ( $n = 3$ ). Чувствительность выявления ОАС-белков составила 77 %, а специфичность — 69 %. Различия в выявлении экспрессии ОАС-белков с помощью МКА 1, Ас 4 и МКА 3 по сравнению со 3Д ста-

Таблица 1. Построение I калибровочной кривой



тистически достоверны ( $p = 0,0001$ ;  $p = 0,015$ ;  $p = 0,01$  соответственно).

Был разработан количественный вариант твердофазного иммуноферментного метода (квELISA) для измерения содержания ОАС-белков у онкологических больных (и у больных РЯ в частности) и получены 3 калибровочные кривые.

Калибровочные кривые построены по позитивной реактивности Ас р40-46 с р34-38 из образцов лизатов тканей РЯ, РЖ (I и II калибровочные кривые) соответственно, и с лизатом тканей РЖ с М. м.  $p \sim 240-250$  (III калибровочная кривая). Для построения калибровочных кривых по оси абсцисс были отложены цифровые результаты позитивности иммунной сыворотки с образцами сыворотки крови больных в собственных единицах прибора, по оси ординат — цифровые результаты концентрации белка в препаратах образцов тканей РЯ (р34-38) и РЖ (р34-38 или  $p \sim 250$ ), и при восстановлении перпендикуляров из точек на оси абсцисс и оси ординат до их пересечения получены 5 точек, которые при их соединении дали соответствующую калибровочную кривую. В табл. 1 представлен принцип построения калибровочной кривой I. Таким же образом были получены II и III калибровочные кривые.

Цифровые значения для выявления содержания ОАС-белков в УОС сыворотки крови онкологических больных были получены следующим образом: с помощью Ас 40-46 методом квELISA определяли цифровые значения позитивности Ас р40-46 с УОС сывороток крови больных, которые откладывали по оси абсцисс. При пересечении перпендикуляра, опущенного на калибровочную кривую из точки, соответствующей цифровым результатам на оси абсцисс с последующим восстановлением перпендикуляра к оси ординат, получали значения количественного содержания ОАС-белка в сыворотке крови у данного больного (табл. 2).

По I калибровочной кривой (построена по позитивной реактивности Ас р40-46 с р34-38 из тканей РЯ)

**Таблица 2.** Выявление ОАС-белков с помощью Ас р40–46 в УОС сыворотки крови онкологических больных, ЗД, СБ количественным вариантом твердофазного иммуноферментного метода (ELISA)

| Группа обследованных лиц                                                                                                                          | I калибровочная кривая<br>(построена по реактивности Ас р40–46<br>с р34–38 из тканей РЯ)<br>% позитивной реактивности/количество<br>положительно реагирующих образцов/общее<br>количество<br>$X \pm x$ мкг/Л | III калибровочная кривая<br>(построена по реактивности Ас р40–46<br>с р~240–250 из тканей РЖ)<br>% позитивной реактивности/количество<br>положительно реагирующих образцов/общее<br>количество<br>$X \pm x$ мкг/Л |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Больные РМЖ                                                                                                                                    | 82 % (9/11)<br>585 ± 436                                                                                                                                                                                     | ~ 100 (11/11)<br>1318 ± 1020                                                                                                                                                                                      |
| 2. Больные РЛ                                                                                                                                     | ~ 100 % (4/4)<br>1210 ± 256                                                                                                                                                                                  | ~ 100% (4/4)<br>2144 ± 144                                                                                                                                                                                        |
| 3. Больные РЖКТ                                                                                                                                   | 89 % (8/9)<br>600 ± 370                                                                                                                                                                                      | 89 % (8/9)<br>935 ± 393                                                                                                                                                                                           |
| 4. Больные с ЛПЗ, в том числе острым<br>лейкозом, острым миелолейкозом,<br>хроническим миелоидным лейкозом,<br>лимфосаркомой, лимфогрануломатозом | 50 % (5/10)<br>314 ± 223                                                                                                                                                                                     | 60% (6/10)<br>608 ± 449                                                                                                                                                                                           |
| 5. Больные РЯ<br><br>I–II стадии<br>III–IV стадии                                                                                                 | 64 % (14/22)<br>315 ± 96<br>67 % (6/9)<br>55 % (6/11)                                                                                                                                                        | 82 % (18/22)<br>590 ± 61<br>78 % (7/9)<br>85 % (11/13)                                                                                                                                                            |
| 6. Больные опухолями других<br>локализаций                                                                                                        | 60 % (3/5)<br>350 ± 181                                                                                                                                                                                      | 20 % (1/5)<br>336 ± 193                                                                                                                                                                                           |
| 7. Итого                                                                                                                                          | 71 % (43/61)*1                                                                                                                                                                                               | 80 % (48/61)*3                                                                                                                                                                                                    |
| 8. Доноры и больные с соматическими<br>заболеваниями                                                                                              | 7 % (1/14)*2<br>159 ± 96                                                                                                                                                                                     | 14 % (2/14)*4<br>234 ± 164                                                                                                                                                                                        |

\*1 и 2, 3 и 4 – различия между группами статистически достоверны ( $p = 0,05$ )

обнаружена позитивная реактивность с ОАС-белками в сыворотке крови онкологических больных с помощью Ас р40-46 в 70 % (43/61) образцов УОС по сравнению с 7 % (1/14) случаев у ЗД и СБ. При этом позитивная реактивность обнаружена в 82 % (9/11) образцов сывороток крови у больных РМЖ, в ~ 100 % у больных РЛ, в 89 % (8/9) образцов у больных РЖКТ, в 50 % (5/10) случаев у больных с ЛПЗ, в 60 % (3/5) – у больных с другой локализацией опухоли ((рак гортани,  $n = 2$ ), рак тела матки, рак шейки матки (РШМ), нейробластома), в 64 % (14/22) – у больных РЯ (табл. 2).

У больных РЯ I–II стадии позитивная реактивность по I калибровочной кривой была выявлена в 67 % (6/9) наблюдений, а у больных III–IV стадии – в 54 % (7/13). Различия в выявлении позитивной реактивности ОАС-белков у больных РЯ по сравнению с ЗД и СБ статистически достоверны ( $p < 0,05$ ). По цифровым данным этой кривой, в 73 % случаев диагноз РЯ у больных может быть дифференцирован от цифровых значений у больных РМЖ (табл. 3).

По II калибровочной кривой (построена по позитивной реактивности Ас р40-46 с р34-38 из образца тканей РЖ) в ~ 50 % случаев получены цифровые значения

выявления маркеров у больных РЯ, совпадающие с цифровыми значениями выявления этих белков у больных с другой локализацией опухоли. Однако по этой же кривой в ~ 50 % случаев можно дифференцировать I–II стадии РЯ от III–IV стадий этого заболевания.

Наибольший интерес в диагностическом плане представляет III калибровочная кривая (построена по позитивной реактивности Ас р40-46 с  $p > 240-250$  из тканей РЖ), выявляющая экспрессию ОАС-белков в 80 % (43/61) случаев. Чувствительность выявления экспрессии ОАС-белков кВELISA по III калибровочной кривой у больных РЯ I–II стадии – 78 % случаев (7/9), у больных III–IV стадии – 85 % случаев (11/13). У ЗД и СБ позитивная реактивность составляла 14 % (2/14). Все различия в экспрессии ОАС-белков у онкологических больных по сравнению со ЗД и СБ статистически достоверны при  $p = 0,05$ . Представляет интерес возможность дифференциальной диагностики у больных РЯ I–II стадии с РЖ – в 56 % случаев, с ЛПЗ – в 30 % случаев, с опухолями другой локализации – в 60 % случаев. Больные РЯ III–IV стадии могут быть дифференцированы по III калибровочной кривой от больных РМЖ в 64 % случаев, от больных РЖ –

**Таблица 3.** Цифровые значения по перекрестной иммунологической реактивности Ас р40–46 с сывороткой крови больных РЯ с цифровыми значениями у больных РМЖ, с ЛПЗ, другой локализацией опухоли и возможности дифференциальной диагностики

| РЯ I–II и III–IV стадии.<br>Совпадение цифровых значений с результатами выявления экспрессии.<br>ОАС белков при опухолях с другой локализацией.<br>Возможности дифференциальной диагностики | I калибровочная кривая<br>(построена по р34–38,<br>выделенного из тканей РЯ) | III калибровочная кривая<br>(построена по р~240–250,<br>выделенного из тканей РЖ) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>РЯ I–II стадии</b>                                                                                                                                                                       |                                                                              |                                                                                   |
| Совпадение цифровых значений с РМЖ                                                                                                                                                          | 3/11 (27 %)                                                                  | 4/11 (36 %)*                                                                      |
| Возможности дифференциальной диагностики РЯ I–II стадии РМЖ                                                                                                                                 | 73 %                                                                         | 64 %                                                                              |
| РЯ III–IV стадии РМЖ                                                                                                                                                                        | 27 %                                                                         |                                                                                   |
| <b>РЯ I–II стадии</b>                                                                                                                                                                       |                                                                              |                                                                                   |
| Совпадение цифровых значений с РЖ                                                                                                                                                           | 7/9 (77 %)                                                                   | 4/9 (44 %)                                                                        |
| Возможности дифференциальной диагностики с РЖ                                                                                                                                               | 23 %                                                                         | 56 %                                                                              |
| РЯ III–IV стадии с РЖ                                                                                                                                                                       | 30 %                                                                         | 30 %                                                                              |
| <b>РЯ I–II стадии</b>                                                                                                                                                                       |                                                                              |                                                                                   |
| Совпадение цифровых значений с ЛПЗ                                                                                                                                                          | 7/10 (70 %)                                                                  | 7/10 (70 %)                                                                       |
| Возможности дифференциальной диагностики с ЛПЗ                                                                                                                                              | 30 %                                                                         | 30 %                                                                              |
| РЯ III–IV стадии с ЛПЗ                                                                                                                                                                      | 30 %                                                                         | 50 %                                                                              |
| <b>РЯ I–II стадии</b>                                                                                                                                                                       |                                                                              |                                                                                   |
| Совпадение цифровых значений с опухолями другой локализации                                                                                                                                 | 4/5 (80 %)                                                                   | 2/5 (40 %)                                                                        |
| Возможности дифференциальной диагностики                                                                                                                                                    | 20 %                                                                         | 60 %                                                                              |
| <b>РЯ III–IV стадии</b>                                                                                                                                                                     |                                                                              |                                                                                   |
| Опухоли с другой локализацией                                                                                                                                                               | 20 %                                                                         | 80 %                                                                              |
| <b>РЯ I–II стадии</b>                                                                                                                                                                       |                                                                              |                                                                                   |
| Совпадение цифровых значений с опухолями яичника III–IV стадии                                                                                                                              | 7/10 (70 %)                                                                  | 7/10 (70 %)                                                                       |
| Возможности дифференциальной диагностики                                                                                                                                                    | 30 %                                                                         | 30 %                                                                              |

\* Для больных РЯ I–IV стадии.

только в 30 % случаев, от больных с ЛПЗ — в 50 %, от больных с другой локализацией опухоли — в 80 %, от больных РЯ I–II стадии — только в 30 % случаев.

Ранее нами с помощью Ас 4 методом ИБ в тканях ЛУ больных РЯ обнаружены ОАС-белки в 78–100 %; у больных I стадией выявлено меньшее количество белков:  $n = 1-2$  (3) (р14, р25–28); у больных II–IV стадией —  $n = 3-10$  (р14, р25–28, р33–34, р53–55, р75, р150, р ~ 200–250) [12].

Таким образом, выявление ОАС-белков с помощью МКА 1, МКА 3, Ас р40–46 и Ас 4 может служить основой тест-системы для иммунологической диагностики РЯ и для установления стадии распространенности опухолевого процесса. Кроме того, результаты, полученные методом кВЕLISA с помощью Ас р40–46, могут служить тест-системой для дополнительной иммунологической диагностики онкологических заболеваний в целом.

За рубежом были разработаны мультиплексные тест-системы в формате биочипа для одновременного определения сразу 12 опухолевых маркеров: СА-125, СА-15-3, СА-19-9, СА-242, РЭА, АФП, ПСА<sub>общ</sub>, ПСА<sub>св</sub>, β-ХГЧ, гормон роста человека, нейрон-специфическая енолаза (NSE), ферритин [14]. Предложенные нами тест-системы находятся на уровне мировых стандартов при сравнении частоты выявления ОАС-белков с описанными выше мультиплексными тест-системами.

По оценкам Z. Sun et al. (2004), диагностическая чувствительность составила 68,2 %, а специфичность выявления — 97,1 % [14]. В нашем случае диагностическая чувствительность составила 80 %, а специфичность выявления по отношению к ЗД и СБ — 86 %. Частота выявления РЯ у Z. Sun et al. составила 81,3 %, без подразделения выявления частоты экспрессии маркеров по стадиям болезни — 82 %. При этом у больных РЯ I–II стадии частота выявления — 78 %, III–IV стадии — 85 %.

Частота выявления опухолей кишечника и желудка у зарубежных авторов — 38,75 и 57,95 % соответственно, в нашем исследовании частота выявления опухолей желудочно-кишечного тракта ~ 89 %. Таким образом, выявление ОАС-белков с помощью МКА 1, МКА 3, Ас 4, Ас р40-46 может служить основой тест-системы для иммунологической диагностики РЯ и установления

стадии распространенности опухолевого процесса. Результаты, полученные кВЕЛИСА с помощью Ас р40-46, могут служить тест-системой для иммунологической диагностики онкологических заболеваний в целом и для диагностики у больных РМЖ, РЖКТ и ЛПЗ. Однако необходимы дальнейшие исследования на большем количестве клинического материала.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Жордания К.И. Злокачественные эпителиальные опухоли яичника. *Совр Онкол* 2000;2(2):51–5.
2. Кидралиев Р.Р., Адамян Л.В., Жордания К.И. и др. Лизофосфатидиловая кислота как биомаркер рака яичника. *ОЖРС* 2007;1–2:80–4.
3. Сафронникова Н.Р. Профилактика и ранняя диагностика гинекологического рака. Материалы съезда онкологов и радиологов СНГ. Ч. I. Минск: ОДО Тонпик, 2004. С. 249–53.
4. Atack D.B., Niskier J.A., Allen H.H. et al. CA-125 surveillance and second-look laparotomy in ovarian carcinoma *Am J Obstet Gynecol* 1986;154:287–9.
5. Bast R.C., Boyer C.M., Olt G.J. *Ovarian cancer. Biological and therapeutic challenges* London, 1991. Pp. 265–75.
6. Borgono C.A., Grass L., Soosaipillai A. et al. Human kallikrein 14. A new potential biomarker for ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 2003;63(24):9032–41.
7. Luo L., Katsaros D., Scorilas A. et al. The serum concentration of human kallikrein 10 represents a novel biomarker for ovarian cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Res* 2003;63(4):807–11.
8. Skates S.J., Horick N., Yu Y. et al. Preoperative sensitivity and specificity for early-stage ovarian cancer when combining cancer antigen CA-125II, CA15-3, CA72-4, and macrophage colony-stimulating factor using mixtures of multivariate normal distributions. *J Clin Oncol* 2004;22(20):4059–66.
9. Wong N.K., Easton R.L., Panico M. et al. Characterization of the oligosaccharides associated with the human ovarian tumor marker CA125. *J Biol Chem* 2003;278(31):28619–34.
10. Zhang Z., Bast R.C., Yu Y. et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2004;64(16):5882–90.
11. Боброва Т.С., Чуев Ю.В. Исследование опухоли-ассоциированных белков в тканях и сыворотках крови больных карциномами молочной железы. *Мед иммунол* 2006;8(5–6):645–52.
12. Боброва Т.С., Чуев Ю.В., Жордания К.И. Экспрессия опухоли-ассоциированных белков в тканях и сыворотках крови у больных раком яичника. *ОЖРС* 2008;1:65–72.
13. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика, 1976; с. 129–53.
14. Sun Z., Fu X., Zhang L. A protein chip system for parallel analysis of multitumor markers and its application in cancer detection. *Anticancer Res* 2004;24:1159–66.