

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение
**«Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук»**

Л.В. Спирина, Г.А. Суханова

**Медицинская биохимия:
биохимия злокачественного роста**

практикум

Под редакцией В.Ю. Сереброва

Томск
Издательство СибГМУ
2018

УДК 577.1:616-098](075.8)

ББК 52.57я73+52.526я73

М422

М 422 Спирина, Л.В. **Медицинская биохимия: биохимия злокачественного роста**: практикум / Л.В. Спирина, Г.А. Суханова; под ред. В.Ю. Сереброва. – Томск: Издательство СибГМУ, 2018. – 81 с.

Практикум подготовлен в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования по специальности 30.05.01 – Медицинская биохимия. «Биохимия злокачественного роста» включает сведения о механизмах канцерогенеза, диагностических и прогностических маркерах злокачественных новообразований. Это составляет основу индивидуального подхода для прогнозирования течения онкологических заболеваний. С целью решения подобных проблем применяются все методы клинической биохимии, молекулярной биологии. В первую очередь, это иммуноферментный анализ, методы полимеразной цепной реакции и другие.

В данном практикуме представлена информация, которая поможет найти правильные решения в условиях работы научной и клинико-диагностической лаборатории, интерпретировать результаты исследований биохимических процессов в норме и патологии, планировать проведение экспериментального исследования, совершенствовать существующие и разрабатывать новые методы диагностики и лечения.

УДК 577.1:616-098](075.8)

ББК 52.57я73+52.526я73

Рецензент:

Медведев М.А. – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой нормальной физиологии СибГМУ.

Учебное пособие утверждено и рекомендовано к печати Методической комиссией МБФ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 2 от 27.12.2016).

© Л.В. Спирина, Г.А. Суханова, 2018.

© Издательство СибГМУ, 2018.

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений.....	5
ТЕМА 1. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА	7
Лабораторная работа. Определение содержания раково-эмбрионального антигена (РЭА).....	8
Семинар. Биохимические механизмы канцерогенеза	12
ТЕМА 2. ОСНОВЫ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ	13
Лабораторная работа № 1. Определение содержания простатического специфического антигена (ПСА)	13
Лабораторная работа № 2. Изучение множественных мутаций гена рака молочной железы (BRCA).....	17
Семинар. Гетерогенность опухоли.....	21
ТЕМА 3. ОНКОБЕЛКИ И ОНКОГЕНЫ. РОСТОВЫЕ ФАКТОРЫ. НЕОАНГИОГЕНЕЗ	23
Лабораторная работа № 1. Определение содержания альфа-фетопротейна (АФП).....	24
Лабораторная работа № 2. Определение мутации V600E в гене BRAF методом ПЦР в режиме реального времени	27
Лабораторная работа № 3. Определение активности кислой фосфатазы и TRACP5B в сыворотке крови.....	31
Семинар. Онкогены и онкобелки. Белки-онкосупрессоры. Ростовые факторы. Ангиогенез.....	35
ТЕМА 4. ОПУХОЛЕВЫЕ МАРКЕРЫ.....	37
Лабораторная работа. Определение содержания хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) в сыворотке крови.....	37
Семинар. Опухолевые маркеры. Онкофетальные антигены. Ферменты. Гормоны. Рецепторы.....	40
ТЕМА 5. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ.....	42
Лабораторная работа № 1. Определение ДНК вируса папилломы человека.....	44
Семинар. Резистентность опухоли, первичная, приобретенная. Гены множественной лекарственной устойчивости. Полиморфизм гена глутатион-S-трансферазы.....	48

Лабораторная работа № 2. Определение содержания СА 19.9	
в сыворотке крови.....	49
Семинар. Маркеры эффективности противоопухолевой терапии	52
Тестовые задания.....	54
Ситуационные задачи.....	69
Вопросы для подготовки к экзамену.....	73
Ответы на тестовые задания.....	77
Ответы к ситуационным задачам.....	78
Рекомендуемая литература.....	80

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФП	– альфафетопротеин
ВПЧ	– вирус папилломы человека
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ЗНО	– злокачественные новообразования
ИГХ	– иммуногистохимия
ИФЗ (IP3)	– инозитол-1'4'5'-трифосфат
кД	– килодальтон
КРР	– колоректальный рак
МЛУ	– множественная лекарственная устойчивость
НМРЛ	– немелкоклеточный рак легких
ПР	– прогестероновые рецепторы
ПСА	– простат-специфический антиген
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РМЖ	– рак молочной железы
РШМ	– рак шейки матки
РЭА	– раковый эмбриональный антиген (СЕА, CD66)
РЯ	– рак яичника
УЗИ	– ультразвуковое исследование
ЭР	– эстрогеновые рецепторы
ТМБ	– тетраметилбензидин
АВС	– АВС-транспортеров (АТР-Binding Cassette)
ALK	– анапластическая лимфомная киназа;
BRCA	– белок системы репарации двухцепочечных разрывов ДНК
c-fos	– ген c-fos относится к группе генов непосредственного раннего ответа и его белок выполняет ряд важных функций, связанных с клеточной дифференцировкой и пролиферацией
c-jun	– фактор транскрипции
c-Myc,	– фактор транскрипции, протоонкогенный белок Мус
ERCC1	– белок, ответственный за 5'-инцизию, необходимую для удаления ДНК-аддуктов, играет ключевую роль в репарации ДНК после повреждения цисплатином.
ERK	–киназа, регулируемая внеклеточными сигналами (extracellular signal regulated kinase); систематическое название – МАП-киназа (МАПК), серин-треониновая протеинкиназа
GST	– глутатион-S-трансфераза
HER2neu	– мембранный белок, тирозинкиназа семейства рецептора эпидермального фактора роста EGFR/ErbB(Neu, ErbB-2, CD340)

Kras	– протоонкоген, представитель семейства белков Ras, представляет собой ГТФазу
MAPK p53	– митоген активированная протеинкиназа – транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл; выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей
Raf	– серин-треониновая протеинкиназа
Ras	– мембранный белок (малый G-белок) – активатор серин-треониновой протеинкиназы Raf
Ret1	– трансмембранная тирозинкиназа
RRM1	– компонент рибонуклеотид-редуктазы, необходимой для продукции дезоксинуклеотидов
TOP1	– топоизомераза 1
TOP2a	– топоизомераза 2 альфа
TUBB3	– белок класса III бета-семейства белка тубулина
TYMS	– тимидилат синтетаза

ТЕМА 1. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Информационный блок

Опухоль (тумор, бластома, неоплазма, онкос) – это патологическое неограниченное разрастание тканей, в основе которого лежит размножение относительно автономных клеток. К основным свойствам злокачественных опухолей относятся: относительную автономность, анаплазию, в том числе биохимической анаплазии. Данное понятие подразумевает под собой сближение биохимических свойств опухолевой и эмбриональной клеток по антигенному составу. Также в опухолевой клетке происходит изменение обменных процессов, которые затрагивают все пути метаболизма.

Активация гликолиза является характерной чертой метаболизма глюкозы. Опухоль получает только половину энергии за счет дыхания, а остальное за счет расточительного гликолиза, который в 19 раз менее эффективен по выходу энергии, по сравнению с дыханием. Даже в аэробных условиях гликолиз в опухолевой ткани достаточно интенсивен. Это объясняется тем, что в опухолевой клетке много гексокиназы с повышенным сродством к глюкозе. Она фосфорилирует глюкозу до глюкозо-6-фосфата и вовлекает её в гликолитический цикл обмена веществ. При этом недоокисленные продукты гликолиза выделяются с мочой, что увеличивает отношение углерода к азоту в моче. Вследствие постоянного гипогликемического давления – гипогликемии или тенденции к ней, стимулируется глюконеогенез, главный поставщик глюкозы. Это превращение в глюкозу углеводов остовов аминокислот и липидов за счёт распада белков мышц, кожи и за счёт распада липидов жировой ткани. Это может иногда привести к истощению, кахексии.

В опухоли ферментные системы синтеза ДНК работают на полную мощность (автономность): клетки постоянно делятся. Наряду с этим непрерывно образуются большие количества РНК. То есть опухолевая клетка постоянно синтезирует большое количество РНК, и в опухоли накапливается белок, что обеспечивает постоянное деление клетки. Это приводит к образованию белков, которые могут быть носителями антигенных свойств, отличных от таковых норм, зрелой ткани, к которым относят эмбриональные специфические антигены и онкобелки.

В целом, обмен белков нарушен не только в самой опухоли, но и во всем организме опухолевого больного, в частности, это выражается в том, что уменьшено количество альбуминов, но увеличен уровень фибриногена в плазме крови.

Изменение липидного обмена сопровождается накоплением холестерина, фосфолипидов в опухоли по сравнению с другими тканями. Кроме того, канцерогенез протекает на фоне увеличения водородных ионов, калия, натрия, осмо-

тического и онкотического давления, воды, что приводит к формированию отрицательного заряда клетки и повышению проницаемости клеточных мембран. В тоже время, содержание двухвалентных ионов кальция и магния уменьшено.

Биохимические особенности опухоли определяют ее системное действие на организм. То есть непосредственным поражением органов и тканей самой опухолью или её метастазами. Какехсия является одним из распространенных синдромов, вызванных влиянием опухоли. Однако нарушения нейроэндокринной регуляции обмена веществ, дисфункция и дистрофия жизненно-важных органов и вторичные инфекции вследствие сниженного иммунитета являются наиболее угрожающими для жизни пациентов. Как указывалось, опухоль функционирует как ловушка глюкозы и азота. Это стимулирует глюконеогенез (главный поставщик глюкозы). Непосредственным следствием гипогликемии является гипертрофия и гиперфункция коры надпочечников, которая усиливает секрецию глюкокортикоидов, прежде всего кортизола. Это приводит к стимуляции глюконеогенеза преимущественно в лимфоидных клетках и, как следствие, к их атрофии и снижению иммунологической реактивности организма. Кроме того, иммунитет пациентов со злокачественной опухолью снижается и в силу действия ряда других факторов, на которых остановимся позднее.

Гипогликемия также сопровождается снижением выработки инсулина, уменьшением транспорта глюкозы и аминокислот в клетки. Кроме того, к системному действию относится снижение окислительно-восстановительных процессов во всем организме, а также довольно часто встречающаяся гиперкальциемия. При этом возникает остеолитическое действие вследствие образования в опухоли паратгормона и простагландина E-2. С увеличением концентрации простагландинов в крови в большой мере связана иммунодепрессия.

К системному действию относятся и изменения содержания белков, липидов в плазме крови, а также нарастающая дизергия и анергия сосудов организма по отношению к адреналину и норадреналину.

Экспериментальный блок

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ РАКОВО-ЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА (РЭА)

Актуальность

Опухолево-эмбриональный антиген, который вырабатывается в тканях пищеварительного тракта, поджелудочной железы эмбриона и плода, представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 175 000–200 000 Да (Дальтон). Особенность его молекулярной структуры – высокое содержание углеводов (до 60 %).

Антиген представляет собой рецептор CD66. Молекулярный механизм действия РЭА связан с активацией онкогенов Ras, c-Myc, Ret1 тирозинкиназы. Это приводит к активации сигнального каскада TGFbeta и Wnt/beta-catenin пу-

ти, результатом чего является усиленная пролиферация клеток, и возрастание подвижности клеток. Кроме того, данный антиген снижает способность клетки к апоптозу, виду апоптоза, который инактивирует его внутренний путь.

Определение уровня РЭА используется для диагностики ряда злокачественных опухолей, в первую очередь рака толстой и прямой кишки. Если в норме содержание РЭА очень низкое, то при онкологическом процессе оно резко возрастает и может достигать очень больших значений. В связи с этим его относят к тканевым маркерам онкологических заболеваний, или онкомаркерам. У взрослых при опухолях раково-эмбриональный антиген может определяться в плевральной жидкости, в выпоте при асците, секретах желудочно-кишечного тракта и моче.

Цель работы:

Определить содержание ракового-эмбрионального антигена в сыворотке крови больных.

Задания для самостоятельной работы:

1. Подготовить реактивы.
2. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
3. Выполнить лабораторную работу с использованием пробы сыворотки крови.
4. Сделать необходимые расчеты.
5. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
6. Сделать выводы по работе.
7. Ответить на дополнительные вопросы.

Принцип работы:

Метод основан на твердофазном иммуноферментном анализе и заключается в специфическом связывании моноклональных антител к РЭА, адсорбированных на лунках иммунологического планшета, с последующим образованием конъюгата.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы:

- конъюгат моноклональных антител к РЭА с пероксидазой хрена, раствор для разведения сывороток;
- фосфатно-солевой буферный раствор с твином;
- раствор тетраметибензидаина;
- стоп-реагент;
- контрольный образец с известным содержанием РЭА;
- калибровочные образцы, содержащие известные количества РЭА.

Оборудование: ИФА-анализатор; автоматические дозаторы переменного объема.

Проведение анализа:

1. *Внесение образцов.* Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов по 100 мкл калибровочных образцов. В остальные лунки внести по 100 мкл контрольного образца и по 100 мкл анализируемых образцов сыворотки.
2. *Внесение конъюгата моноклональных антител.* Конъюгат готов к использованию. В лунки внести по 50 мкл конъюгата.
3. *Инкубация.* Стрипы заклеить пленкой и инкубировать при температуре 37 °С в течение 60 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.
4. *Промывка.* По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть планшет 5 раз промывочным раствором, чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
5. *Внесение тетраметилбензидина (ТМБ).* Раствор ТМБ готов к использованию. Внести во все лунки по 100 мкл ТМБ.
6. *Инкубация.* Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в темноте при температуре 37 °С в течение 15 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.
7. *Внесение стоп-реактента.* Внести во все лунки 100 мкл стоп-реактента с той же скоростью и с той же последовательностью, как и раствор ТМБ. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 сек; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.
8. *Измерение.* Измерить оптическую плотность на спектрофотометре, позволяющем проводить измерения оптической плотности в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине сравнения в диапазоне 620–655 нм.

Референсные значения:

У клинически здоровых людей в возрасте от 20 до 65 лет уровень РЭА в крови колеблется от 0 до 5 нг/мл. Патологические значения более 5 нг/мл.

Для некурящих: 0–2,5 нг/мл; для курящих: 0–5 нг/мл.

Клинико-диагностическое значение:

У всех больных раком ободочной и прямой кишки, желудка и поджелудочной железы при наличии метастазов концентрация РЭА в сыворотке крови превышает норму не менее чем в 2 раза. При этом степень повышения концентрации РЭА зависит от локализации метастазов.

Повышение содержания РЭА в плевральном экссудате и асцитической жидкости обнаружено у 25–40 % больных раком, причем чаще при трансудативных, чем при экссудативных процессах. У 20–25 % больных со злокаче-

ственными новообразованиями увеличение концентрации РЭА в плевральном экссудате бывает единственным признаком наличия опухоли.

Высокий уровень РЭА в сыворотке крови отмечается у 73 % больных раком толстой кишки, 92 % больных раком поджелудочной железы, 57 % больных раком печени, 72 % больных раком легких, 52 % больных раком молочной железы, 53 % больных раком матки и 36 % больных раком яичников.

Кроме опухоли толстого кишечника и прямой кишки, РЭА может повышаться при метастазах рака различного происхождения в печень и кости, хотя при этих состояниях чувствительность метода существенно ниже. Концентрация РЭА в сыворотке крови больных со злокачественными новообразованиями некоторых локализаций (рак органов пищевого канала, молочной железы) коррелирует со степенью опухолевой инвазии и метастазирования. Считается, что количество РЭА, превышающее 80 нг/мл, указывает на наличие в организме метастазирующей опухоли.

Помимо первичной диагностики рака, тест на РЭА используется для контроля за результатами его лечения. Через 2 мес. после операции у больных раком желудка, прямой и толстой кишки происходит снижение уровня концентрации РЭА до нормального, если операция была радикальной и отсутствовали отдаленные метастазы. При дальнейшем наблюдении повышение уровня РЭА у таких больных указывает на развитие отдаленных метастазов или рецидива. Тест на РЭА в этом отношении обладает повышенной чувствительностью: увеличение уровня РЭА происходит за 3–6 мес. до клинического проявления метастазов. Такой контроль за больными очень важен для назначения своевременной повторной операции или применения других видов терапии. Клинически значимым показателем начала развития рецидива у радикально оперированных больных раком толстой и прямой кишки может считаться повышение РЭА в 2 раза.

Уровень РЭА может повышаться при некоторых соматических заболеваниях: хроническая почечная недостаточность; хронические заболевания печени; хронический панкреатит; язвенный колит; болезнь Крона; бронхопневмония; хронический бронхит; туберкулез; муковисцидоз; аутоиммунные болезни, а также у курильщиков.

Следует использовать комбинации определения РЭА с выявлением других опухолевых маркеров согласно предполагаемому виду онкозаболевания. РЭА рекомендуется определять совместно с СА 242, СА 19.9, SCCA, СА 125, NSE.

Ответить на вопросы:

1. Значение РЭА в норме и при патологии.
2. Роль РЭА в диагностике опухолей ЖКТ и легких.
3. Роль РЭА в оценке эффективности лечения опухолей ЖКТ и легких.
4. Содержание РЭА в сыворотке крови при злокачественных новообразованиях, влияние курения на показатели.
5. Содержание РЭА при неопухолевых заболеваниях человека, значение ложно-положительных результатов.
6. Перечислить основные показания для определения РЭА в сыворотке крови.

СЕМИНАР

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Вопросы для самоподготовки:

1. Стадии канцерогенеза: инициация, промоция, опухолевая прогрессия. Канцерогены, действие физических факторов, вирусный канцерогенез.
2. Доброкачественные и злокачественные новообразования, общие черты и отличия.
3. Признаки злокачественности. Атипии – отличия опухолевых клеток от здоровых. Виды атипий: морфологическая, биохимическая, физико-химическая, функциональная.
4. Системное действие опухоли на организм. Биохимические нарушения при опухолевом росте в организме.
5. Метаболический синдром и развитие опухоли в организме.
6. Рак и наследственность. Наследственные формы рака.
7. Первично-множественные опухоли. Раковые синдромы.
8. Эпигеномные нарушения в опухолях. Нарушение уровня экспрессии генов. Метилирование, ацетилирование.
9. Сплайсинг, теломеразная активность.
10. Внеклеточные нуклеиновые кислоты. Циркулирующие ДНК и РНК. МикроРНК. Роль в развитии злокачественных новообразований.
11. Экзосомы. Происхождение. Роль в организме, связь с развитием злокачественных новообразований.

Контрольные вопросы:

1. Биохимические особенности канцерогенеза. Особенности обмена глюкозы, эффект Варбурга.
2. Влияние метаболического синдрома на предрасположенность к развитию злокачественных новообразований. Рак молочной железы и эндометрия.
3. Наследственные раковые синдромы: синдром Линча, Каудена.
4. Влияние абберантного сплайсинга на развитие злокачественных новообразований.
5. Внеклеточные нуклеиновые кислоты, их значение в норме и при патологии.

Темы докладов, рефератов:

1. Предраковые заболевания, их значение в ранней диагностике опухоли.
2. Мутационно-клоновая теория канцерогенеза, ее значение значение в ранней диагностике опухоли.
3. Теория стволовых опухолевых клеток, ее роль в онкогенезе.
4. Неинвазивные подходы в диагностике и прогнозе течения злокачественных новообразований.
5. МикроРНК и экзосомы, происхождение, связь с развитием злокачественных новообразований.

ТЕМА 2. ОСНОВЫ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Информационный блок

Успехи в изучении процесса роста и распространения опухолей в организме связаны в первую очередь с применением молекулярных и генетических методов исследования, что, несомненно, вносит вклад в развитие подходов ранней диагностики рака. Раннее выявление злокачественных опухолей – скрининг играет важную роль в снижении смертности, а в некоторых случаях, когда речь идет о выявлении предрака, и заболеваемости от злокачественных опухолей. В связи с этим разработка новых методов скрининга, включая выявление молекулярных маркеров ранних стадий канцерогенеза, имеет большое значение.

Скрининговый тест должен быть высокочувствительным и специфичным. Чувствительность теста – это вероятность того, что у больного с предклинической формой рака применяемое для скрининга исследование будет положительным. Чувствительность теста определяется процентом позитивных результатов среди всех случаев рака с подтвержденным диагнозом. Специфичность определяет вероятность того, что у лиц, не имеющих рака, скрининговый тест будет отрицательным. Специфичность теста – процент отрицательных тестов от количества случаев, при которых диагноз рака не был подтвержден.

К методам скрининга, эффективность которых доказана, относят тест на простат-специфический антиген при скрининге на рак предстательной железы. Методы скрининга, эффективность которых находится на стадии изучения, относят скрининг рака шейки матки (РШМ) при тестировании на вирус папилломы человека (ВПЧ) и скрининг рака яичника при исследовании маркер СА 125 совместно с ультразвуковым исследованием (УЗИ).

В настоящее время большое внимание отводится изучению риска развития злокачественных новообразований, в частности рака молочной железы, яичников у женщин и рака предстательной железы у мужчин. Это связано с наличием герминогенных мутаций белка BRCA, которые передаются по наследству и опосредуют развитие наследственных форма рака.

Экспериментальный блок

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПРОСТАТИЧЕСКОГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА (ПСА)

Актуальность

Простатический специфический антиген (ПСА) – это гликопротеин с молекулярной массой 34 кДа, обладающий энзимной (протеазной) активностью,

что приводит к уменьшению вязкости эякулята. Другими названиями маркера являются gamma-seminoprotein или kallikrein-3. ПСА является продуктом связывания андрогенового рецептора с ARE участком (androgen response element) промотора гена PSA.

В норме небольшое количество простат-специфического антигена поступает в эякулят и секрет простаты, и очень незначительное количество попадает в кровь. К экстрапростатическим источникам относят парауретральные железы, молочная железа и амниотическая жидкость.

В сыворотке крови простатический специфический антиген содержится в двух формах: свободной и связанной с разными антипротеазами. Содержание свободной формы составляет около 15 % общего количества ПСА. Большая часть ПСА связана с α 1-антихимотрипсином и доступна для лабораторного определения. Небольшая часть антигена простаты связана с α 2-макроглобулином, и ее определение невозможно. Это связано с тем, что молекула ПСА находится внутри комплекса. Свободная и связанная фракции составляют общий ПСА.

Уровень ПСА в сыворотке крови может быть повышен по следующим причинам: рак предстательной железы (около 80 % больных); доброкачественная гиперплазия предстательной железы (небольшое повышение); воспаление в простате; ишемия или инфаркт простаты; эякуляция накануне исследования; механическое воздействие на простату (массаж простаты, биопсия простаты, цистоскопия, острая задержка мочеиспускания, катетеризация мочевого пузыря, трансуретральная резекция простаты, травма и др.).

Определяют ПСА прежде всего для диагностики при подозрении на рак предстательной железы, а также при скрининговом обследовании мужчин старше 50 лет для выявления субклинических форм рака предстательной железы.

Цель работы:

Определить содержание ПСА в сыворотке крови больных и оценить соответствие его уровня референсному интервалу.

Задания для самостоятельной работы:

1. Подготовить реактивы.
2. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
3. Выполнить лабораторную работу с использованием пробы сыворотки крови.
4. Сделать необходимые расчеты.
5. Заполнить бланк анализа. Оцените полученные результаты.
6. Сделать выводы по работе.
7. Ответить на дополнительные вопросы.

Принцип метода:

Метод основан на твердофазном иммуноферментном анализе и заключается в специфическом связывании моноклональных антител к ПСА, адсорбиро-

ванных на лунках иммунологического планшета, с последующим образованием конъюгата.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы:

- конъюгат моноклональных антител к ПСА с пероксидазой хрена, раствор для разведения сывороток;
- фосфатно-солевой буферный раствор с твином;
- раствор тетраметибензидаина;
- стоп-реагент;
- контрольный образец с известным содержанием ПСА;
- калибровочные образцы, содержащие известные количества ПСА.

Оборудование:

- пипетки-дозаторы переменного объема на 2–20, 10–100, 200–1000 мкл, одноразовые наконечники с фильтрами;
- микроцентрифуга на 13000 об/мин;
- вортекс;
- шейкер;
- ИФА-анализатор.

Проведение анализа:

1. *Внесение образцов.* Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов по 100 мкл калибровочных образцов. В остальные лунки внести по 100 мкл контрольного образца и по 100 мкл анализируемых образцов сыворотки.
2. *Внесение конъюгата моноклональных антител.* Конъюгат готов к использованию. В лунки внести по 50 мкл конъюгата.
3. *Инкубация.* Стрипы заклеить пленкой и инкубировать при температуре 37 °С в течение 60 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.
4. *Промывка.* По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть планшет 5 раз промывочным раствором, чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
5. *Внесение тетраметилбензидаина (ТМБ).* Раствор ТМБ готов к использованию. Внести во все лунки по 100 мкл ТМБ.
6. *Инкубация.* Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в темноте при температуре 37 °С в течение 15 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.

7. *Внесение стоп-реагента.* Внести во все лунки 100 мкл стоп-реагента с той же скоростью и с той же последовательностью, как и раствор ТМБ. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 сек; при этом содержащее лунок окрашивается в желтый цвет.
8. *Измерение.* Измерить оптическую плотность на спектрофотометре, позволяющем проводить измерения оптической плотности в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине сравнения в диапазоне 620–655 нм.

Референсные значения:

Общей для всех возрастов нормой ПСА принято считать показатели от 0 до 4,0 нг/мл. При доброкачественной гиперплазии простаты или при ее хроническом воспалении повышение концентрации ПСА может наблюдаться до 10 нг/мл.

Клинико-диагностическое значение:

При раке предстательной железы ПСА присутствует в сыворотке в основном в связанном виде. Поэтому соотношение свободного и общего ПСА уменьшается и составляет обычно менее 15 %. При доброкачественной гиперплазии простаты соотношение свободной фракции и общего простатспецифического антигена составляет более 15 %. Значение ПСА выше 30 нг/мл, как правило, свидетельствует о наличии злокачественного новообразования предстательной железы.

Для диагностики ПСА используют методы иммуноанализа.

Показания для определения ПСА: наблюдение за течением рака простаты и эффективностью проводимого лечения; диагностика опухолевых заболеваний предстательной железы; скрининговое исследование мужчин на рак простаты.

Анализ крови на ПСА может дать ложноположительные результаты в случае, если недавно больному проводились какие-либо манипуляции на мочевом пузыре, простате или уретре: цистоскопия, биопсия простаты, а также при воспалительных заболеваниях простаты или мочевыводящих путей и после катетеризации мочевого пузыря.

Ответить на вопросы:

1. Значение ПСА в норме и при патологии.
2. Роль ПСА в диагностике опухолей предстательной железы.
3. Роль ПСА в оценке эффективности лечения опухолей предстательной железы.
4. Содержание ПСА в сыворотке крови при доброкачественных и злокачественных новообразованиях предстательной железы.
5. Содержание ПСА при неопухолевых заболеваниях предстательной железы, значение ложноположительных результатов, «серая зона».
6. Перечислить основные показания для определения ПСА в сыворотке крови, возрастные нормы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

ИЗУЧЕНИЕ МНОЖЕСТВЕННЫХ МУТАЦИЙ ГЕНА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (BRCA)

Актуальность

Рак молочной железы – самая частая карцинома, встречающаяся у женщин. Мутации в генах BRCA1 и BRCA2 являются причиной около 30–40 % семейных случаев рака молочной железы (PMЖ) (3–8 % всех случаев заболевания) и около 10 % всех случаев рака яичников (РЯ)). Гены BRCA1 и BRCA2 кодируют аминокислотные последовательности ядерных белков, которые участвуют в регуляции репарации повреждений ДНК и размножения клеток. В интактном (немутантном) состоянии гены BRCA выступают в качестве супрессора опухоли и обеспечивают целостность генома. Кроме того, белковый продукт гена BRCA1 репрессирует транскрипционную функцию гена рецептора эстрогенов, сдерживая, таким образом, избыточную пролиферацию клеток молочной железы и других эстроген-зависимых органов, в частности при половом созревании и беременности.

В настоящее время в гене BRCA1 уже обнаружено более 300 различных мутаций и примерно 150 мутаций найдено в гене BRCA2. Мутация BRCA1, заключающаяся в добавлении (инсерции) одного нуклеотида – цитозина в позиции 5382 обозначается как 5382insC. В результате сдвигается рамка считывания матричной РНК, и возникает преждевременный стоп-кодон в позиции 1829. Таким образом, синтезируется укороченный белок BRCA1, и это сопровождается нарушением его функциональных свойств, что в итоге увеличивает вероятность развития РЯ и PMЖ. Частота встречаемости мутации в популяции составляет 0,25 %. Данная мутация и мутация 4153delA являются причиной почти 86 % семейного рака яичников в России. У больных раком яичников мутация 5382insC встречается в 9,7 % случаев. Мутация 6174delT гена BRCA2, связанная с делецией нуклеотида тимина, является одной из наиболее частых мутаций, выявляемых при раке молочной железы.

Цель работы:

Исследовать наличие мутаций в гене BRCA1 (185delAG, 4153delA, 3819delGТААА, 3875delGTCT, 300 T>G (Cys61Gly), 2080delA), BRCA2 (6174delIT), 5382insC.

Задания для самостоятельной работы:

1. Подготовить реактивы.
2. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
3. Выполнить лабораторную работу с использованием пробы сыворотки крови.
4. Сделать необходимые расчеты.
5. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
6. Сделать выводы по работе.
7. Ответить на дополнительные вопросы.

Принцип метода:

Метод основан на определении мутации BRCA1 (185delAG, 4153delA, 3819delGТААА, 3875delGTCT, 300 T>G (Cys61Gly), 2080delA), BRCA2 (6174delIT), 5382insC методом аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени.

Материал для исследования: периферическая кровь.

Реактивы:

- изопропанол;
- раствор для сорбции (перед использованием прогреть в течение 5–10 мин при температуре 55–56 °С);
- денатурирующий раствор;
- раствор для промывки 1;
- раствор для промывки (перед использованием необходимо добавить 70 мкл 96–100 % этилового спирта);
- вода для ПЦР.

Оборудование:

- пипетки-дозаторы переменного объема на 2–20, 10–100, 200–1000 мкл, одноразовые наконечники с фильтрами;
- микроцентрифуга на 13000 об/мин;
- вортекс;
- шейкер;
- термостат или водяная баня на +55 °С.

Проведение анализа:

Выделение ДНК

1. К 100 мл крови добавить 30 мкл изопропилового спирта, тщательно перемешать.
2. Добавить 200 мкл раствора для сорбции, тщательно перемешать. Добавить 15 мкл денатурирующего раствора, перемешать на вортексе и инкубировать на шейкера 5–10 мин.
3. Внести в колонку с фильтром 100 мкл раствора для промывки 1 и, затем выделяемый образец. Вставить колонку в 2 мл пробирку-приемник. Центрифугировать 1 мин при 13000 об/мин.
4. Нанести на фильтр 500 мкл раствора для промывки 1 и центрифугировать 1 мин при 13000 об/мин. Удалить фильтрат из 2 мл пробирки-приемника.
5. Повторить п. 4.
6. Нанести на фильтр 500 мкл раствора для промывки 2 и центрифугировать 1 мин при 13000 об/мин. Удалить фильтрат из 2 мл пробирки-приемника.
7. Повторить п. 6.
8. Центрифугировать пробирку-приемник с микроколонкой 1 мин при 13000 об/мин для удаления остатков раствора.

9. Извлечь микроколону и поместить ее в новую пробирку объемом 1,5 мл.
10. Нанести на фильтр 50 мкл воды для ПЦР.
11. Инкубировать микроколону 1–3 мин при комнатной температуре, затем центрифугировать 1 мин при 13000 об/мин.
12. Полученный раствор содержит очищенную ДНК. Готовую ДНК хранить при -20 °С.

Определение мутаций гена BRCA

1. Промаркировать для каждого определяемого полиморфизма необходимое количество пробирок для амплификации объемом 0,2 мл (по одной для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца «К–», положительных контрольных образцов «К+1» и «К+2»).
2. Встряхнуть пробирки со смесью для амплификации в течение 3–5 сек и центрифугировать в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.
3. Внести в промаркированные пробирки по 20 мкл соответствующей смеси для амплификации (для каждого полиморфизма отдельно).
4. Встряхнуть пробирки с ПЦР-буфером и Taq-АТ-полимеразой в течение 3–5 сек и центрифугировать в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.
5. Приготовить смесь ПЦР-буфера с Taq-АТ-полимеразой. Смешать в отдельной пробирке:

10 × (N+1) мкл ПЦР-буфера,

0,5 × (N+1) мкл Taq-АТ-полимеразы,

где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К–» и «К+».

6. Встряхнуть пробирку в течение 3–5 сек и центрифугировать в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.
7. Добавить в каждую пробирку со смесью для амплификации по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы.
8. Добавить в каждую пробирку по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закрыть крышки пробирок.
9. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с аэрозольным барьером. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (8 штук для каждого образца) по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК.
10. Внести в пробирки, маркированные «К–», по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК. Внести в пробирки, маркированные «К+1» и «К+2», по 5,0 мкл соответствующих положительных контрольных образцов.
11. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 1–3 сек.
12. Установить все пробирки в блок амплификатора детектирующего прибора.

Расчет:

1. Проверить величину C_t для флуорофоров FAM и ROX последовательно для контроля без матрицы (негативного контроля), положительного ДНК стандарта и клинических образцов ДНК. $dC_{t\text{образец}} = C_t - C_t$ контрольной смеси. $dC_{t\text{м}} = C_t$ положительного ДНК стандарта – C_t контрольной смеси положительного ДНК стандарта
2. Сравнить значения dC_t образец с $dC_{t\text{м}}$. Образец ДНК является положительным (несет мутацию), если dC_t образец $\leq dC_{t\text{м}}$. Образец ДНК является отрицательным (нет мутации или мутировано менее 1 % ДНК-копий гена), если dC_t образец $> dC_{t\text{м}}$.

Клинико-диагностическое значение:

Ассоциация маркера с другими онкологическими заболеваниями: рак яичников, рак простаты, рак поджелудочной железы.

Показания к назначению анализа: рак молочной железы в молодом возрасте (до 50 лет); отягощенный семейный анамнез (два кровных родственника и более с РМЖ и/или РЯ); первично-множественные злокачественные новообразования у пациентки или ее родственников: билатеральный РМЖ; РМЖ и РЯ; другие морфологические особенности рака молочной железы:

- трижды негативный РМЖ (опухоли ER-, PR-, HER2/neu);
- медуллярная карцинома, рак яичников;
- рак молочной железы у мужчин в личном и/или семейном анамнезе.

Ответить на вопросы:

1. Роль белков, кодирующихся генами BRCA1 и BRCA2 в организме. Молекулярный механизм развития злокачественных новообразований.
2. Множественные мутации генов BRCA1 и BRCA2 у больных раком молочной железы. Семейные формы рака.
3. Методы определения мутаций генов BRCA1 и BRCA2 у больных раком молочной железы. Основные показания к определению мутаций генов BRCA1 и BRCA2.
4. Рак простаты и мутации генов BRCA1 и BRCA2.
5. Рак поджелудочной железы и мутации генов BRCA1 и BRCA2.
6. Трипленегативный рак и мутации генов BRCA1 и BRCA2.
7. Мутации гена p53 и генов BRCA1 и BRCA2, роль в развитии злокачественных новообразований.
8. Мутации гена PTEN и генов BRCA1 и BRCA2, роль в развитии злокачественных новообразований.
9. Рак желудка и мутации генов BRCA1 и BRCA2.
10. Рак грудной железы и мутации генов BRCA1 и BRCA2.
11. Меланома, гематологические раки и мутации генов BRCA1 и BRCA2.

СЕМИНАР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ОПУХОЛИ

Вопросы для самоподготовки:

1. Гетерогенность опухоли. Классификация. Опухолевая гетерогенность при различных онкологических заболеваниях.
2. Вклад опухолевого разнообразия в различные варианты прогрессии онкологических заболеваний и эффективность их лечения. Факторы формирования внутриопухолевой гетерогенности. Генетические и негенетические (биохимические).
3. Стволовые опухолевые клетки. Происхождение, связь с развитием злокачественных новообразований.
4. Основные проблемы в диагностике и терапии злокачественных новообразований, связанные с опухолевой гетерогенностью, и возможные пути их решения. Методы, применяемые для изучения опухолевой гетерогенности.
5. Гены, дифференциально экспрессирующиеся в опухолях молочной железы (люминальный А, люминальный Б, трипленегативный и т. д.), связь с манифестацией и прогрессированием заболевания.
6. Гены, дифференциально экспрессирующиеся в опухолях легких (аденокарцинома, плоскоклеточные раки), связь с манифестацией и прогрессированием заболевания.
7. Гены, дифференциально экспрессирующиеся в опухолях ободочной кишки и прямой кишки, связь с манифестацией и прогрессированием заболевания.
8. Гены, дифференциально экспрессирующиеся в опухолях желудка (диффузный и интестинальный подтип), связь с манифестацией и прогрессированием заболевания.
9. Гены, дифференциально экспрессирующиеся в опухолях яичников (серозные, муцинозные, герминогенные опухоли), связь с манифестацией и прогрессированием заболевания.
10. Гены, дифференциально экспрессирующиеся в опухолях щитовидной железы (фолликулярный, папиллярный, медуллярный рак).
11. Гены, дифференциально экспрессирующиеся в опухолях поджелудочной железы, связь с манифестацией и прогрессированием заболевания.

Контрольные вопросы:

1. Что понимают под гетерогенностью опухоли. Принцип классификации.
2. Опухолевая прогрессия и гетерогенность опухоли.
3. Биохимические факторы формирования опухолевой гетерогенности.
4. Значение опухолевой гетерогенности в диагностике и терапии злокачественных новообразований.
5. Современные методические подходы для изучения опухолевой гетерогенности.

Темы докладов, рефератов:

1. Гетерогенность опухолей молочной железы.
2. Гетерогенность в опухолях легких (аденокарцинома, плоскоклеточные раки).
3. Гетерогенность опухолей щитовидной железы.
4. Гетерогенность опухолей поджелудочной железы.

ТЕМА 3. ОНКОБЕЛКИ И ОНКОГЕНЫ. РОСТОВЫЕ ФАКТОРЫ. НЕОАНГИОГЕНЕЗ.

Информационный блок

Онкогены (от греч. *onkos* – опухоль) – гены, которые часто находятся в ДНК- (аденопаповавирусы) и РНК-содержащих (ретровирусы) вирусах, а также в геноме опухолевых клеток. Онкогены обуславливают превращение нормальных клеток эукариот в злокачественные при участии онкобелков, которые они кодируют. Образуются онкогены с видоизмененных нормальных генов (проонкогенов), которые широко представлены в разных видах организмов. Образование проонкогенов происходит вследствие точечных мутаций, амплификации и усиления экспрессии генов, хромосомных перестроек.

Известно около 30 онкогенов, которые кодируют соответствующие белки. В злокачественном перерождении клеток принимают участие, как правило, два онкогена. Значительное количество онкобелков характеризуется протеинкиназной активностью, специфической для аминокислоты тирозина. Фосфорилирование тирозина является одним из пусковых моментов каскада злокачественного перерождения клеток.

Механизмы злокачественной трансформации. Внешние факторы, обладающие совершенно различными признаками, а именно: химические канцерогены, вирусы, ионизирующая радиация, некоторые гормоны и даже инертные пластины могут привести к злокачественной трансформации клетки. Это означает, что канцерогенные факторы, отличающиеся друг от друга по многим свойствам, должны запускать какой-то общий механизм перехода нормальной клетки в трансформированное состояние. Общим местом приложения действия всех канцерогенных факторов является система онкогенов (точнее, онкогенов – онкобелков – онкофакторов).

Онкогены обнаружены в геноме всех нормальных клеток всех видов от дрожифилы до млекопитающих, включая человека, а онкогены *ras* – даже у дрожжей. Клеточные онкогены обозначают часто как протоонкогены вследствие того, что для их стойкой активации в клетках зрелого организма необходимы определенные изменения в генетическом аппарате, а также потому, что вирусные онкогены по своему происхождению – это клеточные онкогены, которые в эволюции были «захвачены» вирусами. Столь высококонсервативная сохранность одних и тех же генов на протяжении периода в 1–2,5 млрд лет свидетельствует о какой-то очень важной их функции, и, по ряду данных, эта функция реализуется в периоде эмбрионального развития и связана с процессами деления клеток и их дифференцировки.

В целом система онкогенов существует в нормальной клетке в заблокированном состоянии, хотя некоторые онкогены, в частности *c-fos* и *c-myc*, функ-

ционируют в течение определенного периода в процессе каждого деления клетки. Для того чтобы произошла злокачественная трансформация, канцерогенный агент должен путем повреждения ДНК или хромосомы дерепрессировать или активировать онкоген или, точнее, не менее двух онкогенов. Активация одного из них обеспечивает возможность неограниченного деления клетки, но еще недостаточна для приобретения всех свойств, присущих трансформированным клеткам. Второй онкоген может быть любого класса; часто в опухолях человека он принадлежит классу *c-gas* и *c-fos*.

Что касается механизмов активации системы онкогенов, то они разнообразны и могут определяться: 1) изменением структуры онкогена за счет, например, точковой мутации (протоонкоген *H-gas*), что приводит к замене глицина на валин в 12-м положении онкобелка *p21*; 2) делецией хромосомы (обычно в области гена *gas*); 3) транслокацией онкогена *тус* из одной хромосомы в другую (например, из 8-й в 14-ю хромосому), где этот онкоген попадает под влияние сильного промотора цепей иммуноглобулина (при лимфоме Беркитта); онкогены из хромосомы 9-й в 22-ю (при хронической миелоидной лейкемии). Вероятно, такие транслокации неслучайны, а отражают «эмбриональные механизмы» регуляции роста и дифференцировки; 4) амплификацией (умножением) протоонкогенов или усилением их активности за счет вирусного промотора. В ряде случаев активация онкогенов, вероятно, происходит при отсутствии некоторых генов, определяемых поэтому как антионкогены – онкосупрессоры (например, в случаях ретинобластомы). В тех вариантах злокачественной трансформации, в которых участвуют факторы роста, должно произойти или повышение их продукции, если соответствующие рецепторы факторов роста уже имеются на плазматической мембране, или появление как рецепторов фактора роста, так и синтез этих факторов, т. е. активация сразу двух или трех онкогенов. Возможно, онкобелок может выполнять функцию внутриклеточных посредников, что означает возможность злокачественной трансформации без участия фактора роста и его рецепторов.

Экспериментальный блок

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА (АФП)

Актуальность

Альфа-фетопротеин (АФП) – это гликопротеин с молекулярным весом 69 000 Да, состоящий из одной полипептидной цепи, включающей ~ 600 аминокислот и содержащей около 4 % углеводов. Образуется при развитии эмбриона и плода. Альфа-фетопротеин принадлежит к семейству альбуминовых генов. Его роль связана с транспортом тяжелых металлов, билирубина, жирных кислот, ретиноидов, стероидов, бивалентных катионов, лекарств, эст-

рогенов. АФП вовлечен в процессы регуляции пролиферации, дифференцировки, защите плода от иммунной системы матери.

В настоящее время данный маркер рассматривается в качестве маркера гепатоцеллюлярного рака. Известно, что усиленная экспрессия маркера происходит при активации эпидермального фактора роста. В свою очередь, маркер способен стимулировать экспрессию онкогенов *c-fos*, *c-jun*, и *N-ras*, а также снижает экспрессию белка p53.

Цель работы:

Определить содержание АФП в сыворотке крови больных.

Задания для самостоятельной работы:

1. Подготовить реактивы.
2. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
3. Выполнить лабораторную работу с использованием пробы сыворотки крови.
4. Сделать необходимые расчеты.
5. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
6. Сделать выводы по работе.
7. Ответить на дополнительные вопросы.

Принцип метода:

Метод основан на твердофазном иммуноферментном анализе и заключается в специфическом связывании моноклональных антител к АФП, адсорбированных на лунках иммунологического планшета, с последующим образованием конъюгата.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы:

- конъюгат моноклональных антител к АФП с пероксидазой хрена, раствор для разведения сывороток;
- фосфатно-солевой буферный раствор с твином;
- раствор тетраметибензидина;
- стоп-реагент;
- контрольный образец с известным содержанием АФП;
- калибровочные образцы, содержащие известные количества АФП.

Оборудование:

- ИФА-анализатор;
- автоматические дозаторы переменного объема.

Проведение анализа:

1. *Внесение образцов.* Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов по 100 мкл калибровочных образцов. В остальные лунки внести по

- 100 мкл контрольного образца и по 100 мкл анализируемых образцов сыворотки.
2. *Внесение конъюгата моноклональных антител.* Конъюгат готов к использованию. В лунки внести по 50 мкл конъюгата.
 3. *Инкубация.* Стрипы заклеить пленкой и инкубировать при температуре 37 °С в течение 60 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.
 4. *Промывка.* По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть планшет 5 раз промывочным раствором, чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
 5. *Внесение тетраметилбензидина (ТМБ).* Раствор ТМБ готов к использованию. Внести во все лунки по 100 мкл ТМБ.
 6. *Инкубация.* Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в темноте при температуре 37 °С в течение 15 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.
 7. *Внесение стоп-реактанта.* Внести во все лунки 100 мкл стоп-реактанта с той же скоростью и с той же последовательностью, как и раствор ТМБ. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 сек; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.
 8. *Измерение.* Измерить оптическую плотность на спектрофотометре, позволяющем проводить измерения оптической плотности в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине сравнения в диапазоне 620–655 нм.

Референсные значения:

у мужчин 0,5–5,5 МЕ/мл, у женщин (небеременных) 0,5–5,5 МЕ/мл.

Клинико-диагностическое значение:

В онкологии АФП используется как маркер первичного рака печени. С целью диагностики используют измерения уровня серологического АФП при гепатоцеллюлярном раке печени. Также у взрослых людей увеличение концентрации АФП бывает связано с развитием хронических гепатитов, опухолей яичек у мужчин, особенно при наличии метастазов. Повышенный уровень АФП определяется приблизительно у 9 % пациентов с метастатическим поражением печени. Возможно незначительное повышение уровня АФП при злокачественных опухолях молочной железы, бронхов и колоректальной карциноме.

Показания для определения: выявление и мониторинг первичной гепатоцеллюлярной карциномы; мониторинг эффективности противоопухолевой терапии.

Следует помнить, что при злокачественных опухолях других органов с метастазами в печень повышается не только уровень АФП, но и значительно повышается уровень РЭА, поэтому сочетанное определение этих двух онкомаркеров помогает дифференцировать первичный рак печени с метастатическим её поражением.

Ответить на вопросы:

1. Значение АФП для диагностики опухолевых заболеваний печени, яичка.
2. Основные показания для определения АФП в сыворотке крови.
3. Референсные значения АФП для мужчин, женщин.
4. Прогностическая роль АФП в комплексе с другими маркерами в оценке течения опухолевых заболеваний.
5. Методы определения АФП в сыворотке крови, стандартизация методов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИИ V600E В ГЕНЕ BRAF МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Актуальность

Ген BRAF кодирует внутриклеточный белок, который является компонентом сигнальных каскадов RAS-МАРК и RAS-МЕК-ERK, регулирующих пролиферацию клетки в ответ на внешние митогенные стимулы. Белок BRAF имеет киназную активность, которая необходима для передачи сигнала при его активации. Соматические активирующие мутации BRAF часто встречаются при меланоме кожи, опухолях щитовидной железы, раке яичников, раке толстой и прямой кишки. Более 80 % активирующих мутаций BRAF составляет точечная мутация в 600 кодоне GTG=>GAG, приводящая к замене валина на глутаминовую кислоту.

Неправильный сигналинг BRAF из-за мутации V600E может приводить к избыточной клеточной пролиферации и к ошибочной устойчивости к апоптозу. Мутации BRAF присутствуют в ~50 % опухолей меланомы, ~40 % папиллярно-тироидно опухолей, ~30 % опухолей яичников, ~10 % колоректальных опухолей, ~10 % опухолей простаты/

Цель работы:

Определить мутацию BRAF-V600E методом ПЦР в реальном времени в опухоли.

Задания для самостоятельной работы:

1. Подготовить реактивы.
2. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
3. Выполнить лабораторную работу с использованием пробы сыворотки крови.
4. Сделать необходимые расчеты.
5. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.

6. Сделать выводы по работе.
7. Ответить на дополнительные вопросы.

Принцип метода:

Метод основан на выявлении мутация гена BRAF-V600E методом аллель специфичной ПЦР в режиме реального времени.

Материал исследования: парафиновые блоки с опухолевым материалом.

Реактивы:

- хлороформ;
- изопропано;
- этиловый спирт;
- раствор А;
- раствор В;
- раствор С;
- ТЕ буфер.

Оборудование:

- микроцентрифуга на 13000 об/мин;
- вортекс;
- шейкер, термостат или водяная баня на +37...95 °С;
- автоматические дозаторы переменного объема.

Проведение анализа:

Выделение ДНК из парафиновых блоков

1. Парафиновые блоки нарезать на 4–8 срезов толщиной 10 мкл.
2. Добавить 400 мкл раствора А в пробирку с парафиновыми срезами ткани. Инкубировать 20–30 мин при 95 °С.
3. Аккуратно достать пробирки из термостата, чтобы крышки не открылись. Остудить 3 мин до комнатной температуры и центрифугировать 30 сек при 10000 об/мин.
4. Добавить 400 мкл хлороформа, перемешать на вортексе 5–10 сек и центрифугировать 1 мин при 10000 об/мин.
5. Добавить к ДНК-экстракту 40 мкл раствора В. Перемешать и центрифугировать 1 мин при 10000 об/мин.
6. Добавить 10 мкл раствора С и 700 мкл изопропанола, перемешать на вортексе и инкубировать 5 мин при комнатной температуре.
7. Центрифугировать раствор ДНК 5 мин при 10000 об/мин. ДНК осядет на дно и внешнюю стенку пробирки. Аккуратно удалить жидкость, используя тонкий наконечник, стараясь не задеть осадок.
8. Добавить 1 мл этилового спирта в пробирку с осадком ДНК и центрифугировать 2 мин при 10000 об/мин. Аккуратно удалить спирт. Высушить осадок 5–10 мин при комнатной температуре до полного испарения этанола.

9. Добавить 100 мкл буфера TE, инкубировать 5 мин при 37 °С, перемешать на вортексе 30 сек до растворения осадка. Центрифугировать 5–10 сек при 10000 об/мин, чтобы собрать жидкость на дне. Готовую ДНК хранить при -20 °С.

Тест на наличие мутации в гене BRAF состоит из двух этапов:

Этап 1. Проверка образцов ДНК в контрольной ПЦР. Контрольная реакция проводится для оценки пригодности образцов ДНК для дальнейшего анализа.

Этап 2. Проведение аллель-специфической реакции на мутацию BRAF-V600E. На этом этапе выбранные разведения ДНК тестируют в аллель-специфичной ПЦР.

Этап 1.

Проведение контрольной ПЦР для проверки образцов ДНК

1. Приготовление разведений образцов ДНК. Приготовить по две 1,5 мл пробирки для каждого образца ДНК. Промаркировать пробирки «1:5» и «1:20», соответственно (таблица 1). В каждую пробирку добавить стерильную воду и исходный раствор ДНК. Перемешать на вортексе в течение 2–3 сек, центрифугировать в течение 5–10 сек.

Таблица 1

Приготовление разведений ДНК

Разведение	ДНК, мкл	Вода для ПЦР, мкл
1:5	30	120
1:20	10	190

2. Приготовление смеси для ПЦР. Рассчитать необходимое количество ПЦР смеси и Taq ДНК полимеразы для тестирования клинических образцов, положительного ДНК стандарта и контроля вода без матрицы с учетом погрешности при пипетировании (таблица 2).

Таблица 2

Количество реагентов на 1 реакцию

Реагент	Количество, мкл
ПЦР смесь (без полимеразы)	19,8
Taq ДНК полимеразы	0,2

3. Быстро разморозить при комнатной температуре или при 37 °С контрольную ПЦР смесь до полного растворения. Перемешать ПЦР смесь на вортексе или переворачивая пробирку 4–5 раз, центрифугировать закрытую пробирку на мини-центрифуге в течение 5 сек.
4. Приготовить общую реакционную смесь в пробирке на 1,5 мл: внести расчетное количество контрольной ПЦР смеси и Taq полимеразу.
5. Приготовить и промаркировать на стенке 8-луночные стрипы для ПЦР.
6. Разморозить и перемешать на вортексе в течение 3–5 сек положительный ДНК стандарт. Центрифугировать в течение 5–10 сек, чтобы собрать капли на дно.
7. Добавить в лунки с готовой реакционной смесью: 5 мкл воды для контроля без матрицы; 5 мкл положительного ДНК стандарта в лунки для положи-

тельного контроля; 4 мкл ДНК клинических образцов (разведения «1:5» и «1:20»).

Проведение ПЦР. Программирование амплификатора. Создание протокола (таблица 3).

Таблица 3

Протокол ПЦР в реальном времени

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	1 Первичная активация	95°C	5 мин	нет
10	1 Денатурация	°C	15 сек	
	2 Отжиг праймеров	°C	1 сек	нет
40	1 Денатурация	°C	15 сек	
	2 Оптическое измерение	°C	1 мин	да

Указать в таблице объем 25 мкл. При программировании планшеты выбрать флуорофоры FAM и ROX.

Анализ результатов:

Проверить величину Ct для флуорофоров FAM и ROX во всех лунках и сравнить величины Ct для флуорофора FAM и для каждого разведения образцов ДНК с положительным ДНК стандартом.

Для BRAF теста выбирают разведения ДНК, имеющее значение Ct наиболее близкое к положительному ДНК стандарту. Для теста оптимально, если Ct неизвестных образцов контрольной реакции отличается от Ct ДНК стандарта не более чем на 2 цикла.

Этап 2.

Проведение аллель-специфической реакции на мутацию BRAF-V600E

1. Приготовление смесей для ПЦР. Быстро разморозить при комнатной температуре или при 37 °C контрольную ПЦР смесь до полного растворения. Перемешать ПЦР смесь на вортексе или переворачивая пробирку 4–5 раз, центрифугировать закрытую пробирку на мини-центрифуге в течение 5 сек.
2. Рассчитать необходимое количество ПЦР смесей и Taq полимеразы для тестирования клинических образцов, положительного ДНК стандарта и контроля вода без матрицы с учетом погрешности при пипетировании. Состав реакционной смеси: 19,8 мкл – ПЦР смесь и 0,2 мкл Taq полимеразы. Промаркировать две чистые пробирки на 1,5 мл для реакционных смесей. Внести в пробирку № 1 контрольную реакционную смесь, в пробирку № 2 – ПЦР смесь BRAF-V600E. Добавить в каждую пробирку Taq полимеразу. Перемешать пипетированием 8–10 раз и центрифугировать в течение 5 сек на 1000 об/мин.
3. Добавить в стрипы по 20 мкл готовой реакционной смеси.

4. Добавить 5 мкл оптимальных разведений ДНК, 5 мкл воды в негативный контроль и 5 мкл положительного ДНК стандарта.
5. Проведение ПЦР. Программирование амплификатора (согласно таблице 3). Создание протокола. Указать в таблице объем 25 мкл. При программировании планшеты выбрать флуорофоры FAM и ROX.

Расчет:

Учет результатов аллель-специфичной ПЦР

1. Проверить величину Ct для флуорофоров FAM и ROX последовательно для контроля без матрицы (негативного контроля), положительного ДНК стандарта и клинических образцов ДНК.

$$dCt_{\text{образец}} = Ct_{V600E} - Ct_{\text{контрольной смеси}}$$

$$dCt_m = Ct_{V600E} \text{ положительного ДНК стандарта} - Ct_{\text{контрольной смеси}} \text{ положительного ДНК стандарта}$$

2. Сравнить значения $dCt_{\text{образец}}$ с dCt_m .

Образец ДНК является положительным (несет мутацию), если

$$dCt_{\text{образец}} \leq dCt_m$$

Образец ДНК является отрицательным (нет мутации или мутировано менее 1 % ДНК-копий гена BRAF), если

$$dCt_{\text{образец}} > dCt_m$$

Клинико-диагностическое значение:

Определение мутации BRAF имеет важное значение для назначения таргетных препаратов в лечении злокачественных новообразований. Так, препарат Зелбораф является ингибитором киназной активности BRAF-V600E. Управление США по надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) разрешило применение этого препарата при неоперабельной или метастатической меланоме с мутацией BRAF-V600E. Другие подобные препараты проходят клинические испытания для таргетной терапии меланом и других опухолей, несущих мутацию BRAF-V600E.

Ответить на вопросы:

1. Таргетные препараты в лечении злокачественных новообразований.
2. Методы, используемые для обнаружения мутации BRAF в опухоли.
3. Назначение таргетной терапии зелборафом при детекции мутации BRAF-V600E.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ И TRACP5B В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Актуальность

Кислая фосфатаза (КФ 3.1.3.2) катализирует гидролиз органических эфиров фосфорной кислоты, содержится почти во всех органах и тканях человека,

особенно богаты кислой фосфатазой предстательная железа, клетки крови (эритроциты, лейкоциты и тромбоциты), селезенка, печень, почки, кости, фермент обнаружен в женском молоке. В предстательной железе активность фермента в 100 раз выше, чем в других тканях.

В здоровом организме активность кислой фосфатазы достаточно низкая. У представителей мужского пола ее уровень наполовину состоит из простатической фосфатазы и той, которая находится в печени и разрушенных клетках крови. В женском организме ферменты полностью образуются печенью и разрушенными эритроцитами, тромбоцитами.

Тартрат-резистентная кислая фосфатаза (TRACP 5B) – фермент, секретлируемый исключительно остеокластами и попадающий в повышенном количестве в кровотоки при увеличении количества и возрастании активности остеокластов. TRACP представлена двумя субформами – 5a и 5b, из которых только субформа 5b продуцируется остеокластами.

Цель работы:

Определить активность кислой фосфатазы и TRACP5B в сыворотке крови.

Задания для самостоятельной работы:

1. Подготовить реактивы.
2. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
3. Выполнить лабораторную работу с использованием пробы сыворотки крови.
4. Сделать необходимые расчеты.
5. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
6. Сделать выводы по работе.
7. Ответить на дополнительные вопросы.

Принцип метода:

Кислая фосфатаза расщепляет п-нитрофенилфосфат с образованием нитрофенола, дающего в щелочной среде желтое окрашивание.

Материал исследования: сыворотки крови.

Реактивы:

- Реагент № 1: цитратный буфер, pH 4,8; 90 ммоль/л.
- Реагент № 2: раствор тартрата натрия, 20 ммоль/л.
- Реагент № 3: п-нитрофенилфосфат, 32,7 ммоль/л.
- Реагент № 4: калибратор п-нитрофенол 16,68 мг/100 мл.
- Реагент № 5: натрий едкий, NaOH 1,0 моль/л.

Оборудование:

- шейкер, термостат или водяная баня на +37...95 °C;
- спектрофотометр;
- автоматические дозаторы переменного объема.

Проведение анализа:

1. Предварительно приготовить рабочие реактивы.
2. Рабочий реагент № 1. Смешать необходимые количества реагента № 1 и реагента № 3 в соотношении 4:1. Рабочий реагент № 2. Смешать необходимые количества реагента № 2 и реагента № 3 в соотношении 4:1. Рабочий реагент № 3. Содержимое флакона № 5 (или аликвоту) развести бидистиллированной водой в 10 раз.
3. Рассчитать количество пробирок и внести в пробирки следующие реагенты (таблица 4).

Таблица 4

Ход реакции

№ реагента	Опытная проба А	Опытная проба Б	Холостая проба
Рабочий реагент № 1	0,5 мл		0,5 мл
Рабочий реагент № 2	–	0,5 мл	–
Образец	0,1 мл	0,1 мл	–
Инкубировать точно 30 мин при 37 °С.			
Рабочий реагент № 3	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл
Образец	–	–	0,1 мл

4. Пробы перемешать и фотометрировать против бидистиллированной воды.
5. Расчет активности кислой фосфатазы в сыворотке и плазме крови производят по калибровочному графику (таблица 5).

Таблица 5

Построение калибровочного графика

№ пробы	Калибровочный раствор, мл	Вода, мл	Активность кислой фосфатазы, нмоль/(с·л)
Проба № 1	0,1	1,9	41,7
Проба № 2	0,2	1,8	83,3
Проба № 3	0,5	2,0	166,7
Проба № 4	1,0	1,0	416,7
Проба № 5	1,0	–	833,5

6. Внести в соответствующие пробирки по 0,1 мл проб № 1–5, добавить по 2,5 мл рабочего раствора № 3 и перемешать. Фотометрировать против бидистиллированной воды. Построить калибровочный график зависимости адсорбций от активности фермента.

Расчет:

Активность фермента рассчитывается по формулам:

$$\begin{aligned} \text{Апроба А} - \text{Ахол} &= \text{А1} = \text{Общая активность фермента,} \\ \text{Апроба Б} - \text{Ахол} &= \text{А2} = \text{Тартратстабильная активность,} \\ \text{А1} - \text{А2} &= \text{А3} = \text{Тартратлабильная активность,} \end{aligned}$$

где: Апроба А – адсорбция опытной пробы А, Апроба Б – адсорбция опытной пробы Б, Ахол – адсорбция холостой пробы.

Референсные значения:

Методы определения кислой фосфатазы различаются по использованию буферных систем и значению рН. Чаще всего применяется цитратный буфер, обладающий способностью активировать кислую фосфатазу предстательной железы. Референсные величины активности кислой фосфатазы в сыворотке крови – 67–167 нмоль/с·л. Тартрат-лабильная фракция (простатическая) составляет 0–16,7 нмоль/с·л.

Клинико-диагностическое значение

Определение кислой фосфатазы в сыворотке обычно используют для выявления или мониторинга карциномы простаты у мужчин. Активность этого фермента в сыворотке увеличена у 60 % пациентов с локализацией карциномы в простате, особенно при наличии костных метастазов – фермент продуцируется неопластическими клетками. Уровень активности кислой фосфатазы в последнем случае может возрасти в 40–50 раз от верхней границы референсных значений. Если карцинома остается локализованной в предстательной железе активность кислой фосфатазы может быть лишь слабо увеличенной или находиться в пределах референсных значений, таким образом, нормальный уровень сывороточной активности кислой фосфатазы не исключает рака простаты. Временное увеличение активности кислой фосфатазы в сыворотке крови могут вызывать диагностические или лечебные манипуляции на предстательной железе (пальпация, биопсия и т. п.). Доброкачественная гипертрофия простаты не сопровождается ростом активности фермента в сыворотке.

Активность кислой фосфатазы сыворотки может повышаться также при гиперпаратиреозе, болезни Педжета, некоторых формах рака молочной железы и злокачественных метастазах в костную ткань этих опухолей. В последнем случае источником фермента предположительно являются остеокласты. Увеличенные концентрации кислой фосфатазы наблюдаются у пациентов с болезнью Гоше, болезнью Нимана-Пика, миелоцитарной лейкемией и при некоторых других гематологических заболеваниях.

Определение активности кислой фосфатазы может быть использовано для дифференциальной диагностики метастазов рака предстательной железы в кости и заболеваний костной ткани, в частности остеодистрофий, при которых обычно повышена активность щелочной фосфатазы, в то время как при метастазах рака предстательной железы в кости повышается активность как щелочной, так и кислой фосфатаз.

Следует иметь в виду, что массаж предстательной железы, оперативные вмешательства на ней, катетеризация, цистоскопия, ректальные исследования повышают активность кислой фосфатазы, поэтому кровь на исследования следует забирать не ранее чем через 48 ч после перечисленных процедур.

Определение уровня тартрат-резистентной кислой фосфатазы 5в может быть использовано в качестве маркера метастатического поражения скелета, так как данный процесс сопровождается увеличением интенсивности остеолита и повышением в сыворотке крови активности TRACP5B в результате ее выхода в циркуляторное русло. Тест обладает высокой диагностической чувствительностью и специфичностью: у больных раком молочной железы эти показатели составили 82 и 87 %, у пациентов с раком предстательной железы – 71 и 83,4 %, соответственно.

Определение этого маркера у онкологических больных способствует повышению точности ранней диагностики метастазов в кости, оценки степени метастатического поражения скелета. Исследование этого маркера особенно полезно при мониторинге лечения остеопороза, болезни Педжета, онкологических заболеваний с метастазами в кость различными препаратами, подавляющими резорбцию костной ткани (бисфосфонатами, эстрогенами и другими). Активность TRACP5B в сыворотке крови не зависит от функционального состояния печени и почек и отражает интенсивность костной резорбции за последние 24 ч.

Ответить на вопросы:

1. Каков принцип метода определения активности кислой фосфатазы сыворотки крови.
2. Каков принцип метода определения активности TRACP 5B в сыворотке крови.
3. Каковы показания для определения активности кислой фосфатазы и TRACP 5B в сыворотке крови.
4. Условия правильной подготовки пациента для определения активности кислой фосфатазы и TRACP5B в сыворотке крови в качестве маркера опухолевой патологии предстательной железы.
5. Референсные значения кислой фосфатазы и TRACP 5B в сыворотке крови.

СЕМИНАР

ОНКОГЕНЫ И ОНКОБЕЛКИ, БЕЛКИ-ОНКОСУПРЕССОРЫ, РОСТОВЫЕ ФАКТОРЫ, АНГИОГЕНЕЗ

Вопросы для самоподготовки

1. Онкобелки и белки-онкосупрессоры, механизмы активации. Роль в развитии различных злокачественных новообразований. Классификация белковых продуктов онкогенов - онкобелков. Механизм действия.
2. Онкобелки, структурно сходные с факторами роста. Ген *sis*, *hst*, *ras*, *ihf-2*.

3. Онкобелки-протеинкиназы. Src-белок. RAS-подобные белки. Белки Rap-подсемейства. Dap-киназы.
4. Нуклеотидсвязывающие онкобелки. Ядерные онкобелки. Транскрипционный фактор AP-1. Fos-белки. MYC-белки. Max-белки.
5. Онкосупрессоры Rb, BRCA, p53 механизм действия, связь с развитием злокачественных новообразований.
6. Онкобелки – ингибиторы циклин-зависимых киназ. Онкосупрессор PTEN механизм действия, связь с развитием злокачественных новообразований.
7. APC и beta-катенин. Молекулярный механизм опухолевой прогрессии, связь с развитием злокачественных новообразований.
8. Белки семейства EGFR, Her2. Молекулярный механизм, связь с развитием злокачественных новообразований.
9. Про- и антиапоптотические белки: Bax, bcl-2. Связь с развитием злокачественных новообразований.
10. Формирование кровеносных сосудов в опухолевой ткани. Зависимость метастазирования от ангиогенеза. Маркеры неоангиогенеза. Белок VHL, VEGF.
11. Цистеиновые и сериновые протеиназы. Матриксные металлопротеиназы. Ингибиторы протеиназ. Связь с развитием злокачественных новообразований.

Контрольные вопросы:

1. Роль протоонкогена в регуляции клеточного цикла.
2. Значение онкобелков, структурно сходные с факторами роста.
3. Роль онкобелков – протеинкиназ в развитии опухолевой патологии
4. Значение ядерных онкобелков. Роль Fos-белков, c-Myc, Max в развитии злокачественных опухолей человека.
5. Роль онкосупрессоров Rb, BRCA, p53 в регуляции клеточного цикла и в механизмах репарации ДНК.
6. Значение онкобелков – ингибиторов циклин-зависимых киназ.

Темы докладов, рефератов:

1. Неоангиогенез, маркеры ангиогенеза в диагностике злокачественных новообразований.
2. Ферменты в опухоли, значение в прогрессировании и развитии рецидивов заболеваний.
3. Синдром Линча, диагностика мутаций гена APC.
4. Синдром фон Хиппель Линдау, связь с развитием злокачественных новообразований.
5. Синдром Каудена, значение мутаций гена PTEN в развитии злокачественных новообразований.

ТЕМА 4. ОПУХОЛЕВЫЕ МАРКЕРЫ

Информационный блок

Опухолевыми маркерами называют соединения, которые продуцируются опухолевыми клетками или организмом в ответ на развитие опухоли. Сейчас известно более 200 соединений, относящихся к ним, и их количество постоянно растет.

Существует несколько принципов классификации онкомаркеров. Наиболее часто их группируют по химической структуре или по биологической функции, которую они выполняют в организме. С химической точки зрения их можно разделить на гликопротеины, полипептиды, углеводные детерминанты гликопротеинов, гликолипиды, белки, полиамины, иммуноглобулины и др. По биологической функции их делят на онкофетальные антигены, ферменты, гормоны, рецепторы и соединения, роль которых до конца не выяснена.

Наиболее значимо с клинических позиций разделение маркеров по их роль в диагностике и лечении злокачественных новообразований. Среди них выделяют маркеры диагностики, прогноза развития метастазов и рецидивов заболевания, маркеры исхода заболевания, маркеры эффективности терапии

Экспериментальный блок

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА (ХГЧ) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Актуальность

Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) – это особый белок-гормон, который вырабатывается оболочками развивающегося эмбриона в течение всего периода беременности. ХГЧ поддерживает нормальное развитие беременности. Благодаря этому гормону в организме беременной женщины блокируются процессы, которые вызывают месячные и увеличивается выработка гормонов, необходимых для сохранения беременности.

Повышение концентрации ХГЧ в крови и в моче беременной женщины является одним из наиболее ранних признаков беременности. ХГЧ состоит из двух частей: альфа и бета субъединиц. Альфа субъединица ХГЧ очень похожа на другие гормоны организма человека, а бета субъединица уникальна. Поэтому, анализ на ХГЧ заключается именно в определении концентрации бета субъединицы в крови или в моче.

Небольшие количества ХГЧ вырабатываются гипофизом человека даже при отсутствии беременности. Этим объясняется тот факт, что в некоторых

случаях очень низкие концентрации этого гормона определяются в крови небеременных женщин (в т. ч. у женщин в период менопаузы) и даже в крови мужчин.

Повышение ХГЧ может быть признаком опухолевых заболеваний у небеременных женщин и у мужчин. При действии гонадотропинов происходит стимуляция EGFR и активация онкогена Ras. Также происходит активация of митоген активированных протеинкиназ (МАРК, mitogen-activated protein kinase) и фосфатидил-инозитол-3-киназы.

Цель работы:

Определить содержание ХГЧ в сыворотке крови больных.

Задания для самостоятельной работы:

1. Подготовить реактивы.
2. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
3. Выполнить лабораторную работу с использованием пробы сыворотки крови.
4. Сделать необходимые расчеты.
5. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
6. Сделать выводы по работе.
7. Ответить на дополнительные вопросы.

Принцип метода:

Метод основан на твердофазном иммуноферментном анализе и заключается в специфическом связывании моноклональных антител к ХГЧ, адсорбированных на лунках иммунологического планшета, с последующим образованием конъюгата.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы:

- конъюгат моноклональных антител к ХГЧ с пероксидазой хрена, раствор для разведения сывороток;
- фосфатно-солевой буферный раствор с твином;
- раствор тетраметибензидаина;
- стоп-реагент;
- контрольный образец с известным содержанием ХГЧ;
- калибровочные образцы, содержащие известные количества ХГЧ.

Оборудование:

- пипетки-дозаторы переменного объема на 2-20, 10-100, 200-1000 мкл, одноразовые наконечники с фильтрами
- вортекс;
- шейкер;
- ИФА-анализатор.

Проведение анализа:

1. *Внесение образцов.* Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов по 100 мкл калибровочных образцов. В остальные лунки внести по 100 мкл контрольного образца и по 100 мкл анализируемых образцов сы-воротки.
2. *Внесение конъюгата моноклональных антител.* Конъюгат готов к использованию. В лунки внести по 50 мкл конъюгата.
3. *Инкубация.* Стрипы заклеить пленкой и инкубировать при температуре 37 °С в течение 60 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.
2. *Промывка.* По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть планшет 5 раз промывочным раствором, чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
3. *Внесение тетраметилбензидина (ТМБ).* Раствор ТМБ готов к использованию. Внести во все лунки по 100 мкл ТМБ.
4. *Инкубация.* Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в темноте при температуре 37 °С в течение 15 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.
5. *Внесение стоп-реагента.* Внести во все лунки 100 мкл стоп-реагента с той же скоростью и с той же последовательностью, как и раствор ТМБ. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 сек; при этом содержа-мое лунок окрашивается в желтый цвет.
6. *Измерение.* Измерить оптическую плотность на спектрофотометре, позволяющем проводить измерения оптической плотности в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине сравне-ния в диапазоне 620–655 нм.

Референсные значения:

Допустимое содержание ХГЧ в крови у небеременных женщин и мужчин:

- мужчины и небеременные женщины: меньше 5 мЕд/мл;
- женщины в период менопаузы: меньше 9,5 мЕд/мл.

Клинико-диагностическое значение:

Повышение ХГЧ может быть признаком серьезных заболеваний у небеременных женщин и у мужчин: опухоли яичек, опухолевые заболевания желу-дочно-кишечного тракта, новообразования легких, почек, матки,пузырный за-нос, рецидив пузырного заноса, хорионкарцинома.

Ответить на вопросы:

1. Значение ХГЧ для диагностики опухолевых и неопухолевых заболеваний.

2. Основные показания для определения ХГЧ в сыворотке крови.
3. Референсные значения ХГЧ в сыворотке крови.
2. Методы определения ХГЧ в сыворотке крови, стандартизация методов.
3. Прогностическое значение ХГЧ в оценке эффективности лечения опухолевых заболеваний.

СЕМИНАР

ОПУХОЛЕВЫЕ МАРКЕРЫ. ОНКОФЕТАЛЬНЫЕ АНТИГЕНЫ. ФЕРМЕНТЫ. ГОРМОНЫ. РЕЦЕПТОРЫ

Актуальность

Классификация онкомаркеров по биологической функции подразумевает разделение показателей на следующие классы:

- онкофетальные антигены: раково-эмбриональный антиген, альфа-1-фетопротеин, хорионический гонадотропин человека, специфический бета-1-протеин беременности, СА 125, СА 15.3, СА 19.9, СА 50, СА 72-4;
- ферменты: кислая фосфатаза простаты, лактатдегидрогеназа, нейронспецифическая енолаза, тимидинкиназа, тканевый полипептидный антиген;
- гормоны: адренокортикотропный гормон, антидиуретический гормон, плацентарный лактоген, кальцитонин, паратгормон, пролактин;
- рецепторы: прогестероновые, эстрогенные;
- другие соединения: ферритин, бета-2-микроглобулин, иммуноглобулины.

К важным критериям опухолевых маркеров относят: способность продуцироваться только злокачественными клетками; органоспецифичность; способность появляться в высоких концентрациях в биологических жидкостях. Еще одной важной особенностью опухолевых маркеров является то, что его концентрация должна коррелировать со стадией заболевания, размером опухоли, прогнозом заболевания и эффективностью лечения.

Вопросы для самоподготовки:

1. Биохимические маркеры: Онкофетальные антигены. Ферменты. Гормоны. Рецепторы.
2. ПСА – маркер раннего выявления рака предстательной железы, его значение. Порог. Серая зона. Тестостерон – маркер диагностики и лечения рака предстательной железы.
3. СА-125 – маркер раннего выявления рака яичников, его значение.
4. Маркеры раннего выявления опухолевых заболеваний ЖКТ.
5. Маркеры раннего выявления опухолевых заболеваний легких.
6. Ферменты: кислая фосфатаза простаты, лактатдегидрогеназа, нейронспецифическая енолаза, тимидинкиназа, тканевый полипептидный антиген. Показания для диагностики, контроля лечения злокачественных новообразований.

7. Альфа-фетопротеина, клиническое значение. Показания для диагностики и контроля лечения злокачественных новообразований. Гепатоцеллюлярная карцинома.
8. Ферритин, бета-2-микроглобулин, иммуноглобулины. Показания для диагностики, контроля лечения злокачественных новообразований.
9. Рецепторы гормонов, клиническое значение. Показания для диагностики и контроля лечения гормонзависимых опухолей (РМЖ, рак простаты).
10. Дополнительные маркеры для оценки риска развития РМЖ на основе определения статуса BRCA (РЭА, МСА, СА 72.4, СА 19.9, СА 15.3). Их значение и роль в диагностике РМЖ.

Контрольные вопросы:

1. Классификация опухолевых маркеров, ее значение
2. Значение ПСА как маркера для выявления рака предстательной железы
3. Маркер СА 125, его значение для выявления патологии репродуктивных органов.
4. Альфа-фетопротеин, маркер для выявления гепатоцеллюлярного рака.
5. Рецепторы ER, PR, Ki-67, Her2neu, значение в выявлении опухолевой патологии молочной железы

Темы докладов и рефератов:

1. Значение скрининга с целью выявления ранних форм рака в современном обществе.
2. Роль биохимических маркеров в скрининговых программах.

ТЕМА 5. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ

Информационный блок

Молекулярные механизмы опухолевой прогрессии в настоящее время рассматривают как комплекс факторов, которые вносят вклад в развитие опухолевой гетерогенности и резистентности. Такое широкое представление с учетом всех значимых маркеров является основой для развития современной противоопухолевой терапии.

Опухолевая гетерогенность, свойственная большинству злокачественных новообразований человека, является основной преградой на пути к высокоэффективной диагностике онкологических заболеваний, успешному прогнозу и лечению. Представляя собой результат клонального разнообразия в пределах одной опухоли, внутриопухолевая гетерогенность может проявляться в неоднородности генетического и эпигенетического статусов, генной и белковой экспрессии, морфологического строения и других характеристик опухоли. Появление такого разнообразия, вероятно, является источником для адаптации опухоли к меняющимся условиям микроокружения и/или инструментом для изменения ее злокачественного потенциала, что в любом случае приводит к возникновению клеточных клонов, различающихся недетерминированным набором признаков.

Пролиферирующие клетки, как правило, более чувствительны к различным токсичным агентам, чем клетки покоящиеся. В значительной степени это объясняется тем, что только в пролиферирующих клетках происходит синтез ДНК, на подавлении которого собственно и основано действие многих цитотоксических агентов. С этой точки зрения, казалось бы, уничтожение опухолевых клеток в организме – цель вполне достижимая.

В то же время неоднократно упоминавшееся кардинальное свойство опухоли – нестабильность генома и обусловленная ею клональная гетерогенность – способствуют непрерывной генерации в ней новых клеточных вариантов, из которых некоторые резистентны к цитотоксическим воздействиям. Основными методами консервативного лечения злокачественных опухолей являются гормоно- и химиотерапия, в процессе которых обнаруживают феномен возникновения в опухолевых клетках соответствующего вида резистентности, в основе которой лежат специфические механизмы.

Основной причиной неэффективности химиотерапии опухоли считают формирование фенотипа множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), который характеризуется способностью опухолевых клеток выживать в условиях высоких доз широкого спектра химиопрепаратов. Выделяют два типа

МЛУ: предрсуществующую (первичную) МЛУ, или исходную, ее определяют индивидуальные особенности опухоли и организма больного, кроме того, она зависит от гистогенеза опухоли, в частности высокая предрсуществующая МЛУ у опухолей, происходящих из метаболческих активных тканей (почки, печень, поджелудочная железа и др.). При предрсуществующей МЛУ все клетки опухоли оказываются устойчивыми к химиотерапии еще до начала лечения. Второй тип лекарственной устойчивости – это приобретенная или адаптивная МЛУ, которая возникает в опухолевых клетках в процессе химиотерапии под воздействием лекарственных средств.

Фенотип множественной лекарственной устойчивости связывают с функционированием продуктов генов семейства АВС-транспортеров (АТР-Binding Cassette), их работу считают мажорным механизмом лекарственной устойчивости. Энергозависимые АВС-транспортеры могут экспрессироваться всеми клетками организма и в норме выполняют физиологическую функцию экспорта против градиента концентрации из клеток различных метаболитов, ксенобиотиков, холестерина, нейтральных и катионных органических соединений, глутатиона, органических анионов, лейкотриенов, нуклеотидных аналогов циклических нуклеотидов и др. В опухолевых клетках АВС-транспортеры осуществляют выброс цитостатических препаратов, таргетных (лапатиниб, иресса, софатиниб, герцептин, акситиниб и др.) и гормональных средств из опухолевых клеток против градиента концентрации с затратой энергии АТФ.

GST (глутатион-S-трансферазы) (К.Ф. 2.5.1.18) – ферменты, ответственные за конъюгацию сульфгидрильной SH₂ группы с электрофильными атомами С, N, S, O молекул ксенобиотиков. GST катализирует реакцию глутатиона с различными алифатическими, ароматическими, эпоксидными и гетероциклическими радикалами экзогенных повреждающих веществ. GST найдены у всех млекопитающих, а также у растений. У человека выделяют четыре основных класса GST альфа GSTA, мю GSTM, тета GSTT и пи GSTP.

GST – это семейство ферментов, катализирующих конъюгацию различных ксенобиотиков, с отщеплением глутатиона (GSH). Каталитическая активность GST обеспечивает клетку механизмом защиты от вредного воздействия этих веществ. Все GST представляют собой гомо или гетеродимеры с молекулярной массой около 57 кДа. В каждой субъединице имеется по одному независимому активному центру, в гетеродимере субъединицы сохраняют свои основные физические и каталитические свойства, характерные для каждой из них.

Полиморфизм генов GSTM1 и GSTT1 обусловлен наличием двух аллелей: функционально активной и неактивной – нулевой. Нулевой аллель соответствует частичной или полной делеции, приводящей к снижению или отсутствию ферментативной активности, в результате чего способность организма избавляться от некоторых вредных соединений значительно снижается. Делеция гена GSTM1 встречается у 30–60 % людей в европеоидных популяциях, а гена GSTT1 – в 16–25 %.

Выявление патогенетически значимых опухолевых маркеров, ассоциированных с эффективностью противораковой терапии, на первом этапе создало

предпосылки для разработки таргетных противоопухолевых препаратов. В дальнейшем показана высокая эффективность их применения у больных с наличием патогенетических значимых изменений проонкогенов, белков рецепторного аппарата клетки и их сигнальных путей.

В настоящее время происходит накопление знаний о факторах, предсказывающих эффективность терапии для других злокачественных новообразований человека, к их числу относят плоскоклеточные карциномы головы и шеи, светлоклеточный рак почки, опухоли предстательной железы и многие другие. Такой подход в лечении онкологических больных позволяет добиться высоких результатов лечения за счет снижения побочных эффектов терапии, увеличения безрецидивного периода жизни пациентов и, в конечном итоге, будет способствовать улучшению показателей их общей выживаемости.

В настоящее время разработано и широко применится в практике молекулярно-генетическое определение статуса рецептора Her2neu для назначения таргетного препарата герцептин. Для других солидных опухолей подобные показания находятся в стадии разработки. Это касается немелкоклеточного рака легкого, а именно аденокарцином, а также для колоректального рака. К таким маркерам относят мутации EGFR, Kras, ALK.

Применение стандартных и разработка новых схем химиотерапии в значительной мере исчерпали свои возможности в плане повышения эффективности лечения. Основным препятствием на этом пути является недостаточно эффективный выбор химиопрепаратов и тактики лечения конкретного больного, при использовании стандартных клинических, прогностических и предсказательных критериев. При этом определение индивидуальной чувствительности опухоли к отдельным химиопрепаратам дает возможность планировать лечение конкретного больного. В настоящее время таким маркерам относят *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*.

Экспериментальный блок

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Актуальность

Вирус папилломы человека (ВПЧ) – вирус, поражающий исключительно эпителиальные клетки эктодермального происхождения: кожу, слизистые оболочки половых органов и ротовой полости. Несмотря на один из самых маленьких размеров среди вирусов и простоту строения, возбудитель крайне живуч. Характерной и главной особенностью ВПЧ является способность стимулировать эпителиальные клетки кожи и слизистых оболочек к неконтрольному размножению. Однако, самыми страшными заболеваниями, причиной которых является ВПЧ – это рак шейки матки и влагалища у женской части населения, и рак полового члена и простаты у мужчин.

На данный момент выявлено более 100 типов папилломовирусов, но лишь немногие из них способны вызывать у человека какие-либо заболевания. Наиболее часто в биоматериале опухоли шейки матки обнаруживаются ВПЧ 16 и 18 типов, так как именно с их деятельностью связано развитие раковых изменений кожи и слизистых оболочек.

Цель работы:

Определение вируса папилломы человека методом полимеразной цепной реакции.

Задания для самостоятельной работы:

1. Подготовить реактивы.
2. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
3. Выполнить лабораторную работу с использованием пробы сыворотки крови.
4. Сделать необходимые расчеты.
5. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
6. Сделать выводы по работе.
7. Ответить на дополнительные вопросы.

Принцип метода:

Определение ДНК вируса папилломы человека 16 и 18 типов методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Материал исследования: плазма или сыворотка крови человека.

Реактивы:

Комплект для выделения нуклеиновых кислот:

- концентрирующий раствор;
- лизирующий раствор № 1;
- лизирующий раствор № 2;
- осадитель нуклеиновых кислот;
- раствор для отмывки №1; раствор для отмывки № 2;
- элюирующий раствор.

Комплект контрольных образцов:

- отрицательный контрольный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека (ОКО);
- внутренний контрольный образец (ВКО);
- положительный контрольный образец, универсальный (ПКО) для детекции 16 и 18 подтипов вируса папилломы человека.

Готовая реакционная смесь (ГРС).

Оборудование:

- амплификатор в режиме реального времени;

- вортекс;
- шейкер;
- магнитный штатив-рабочее место;
- термостат для эпендорфов.

Проведение анализа:

Выделение ДНК из проб (с помощью набора для выделения нуклеиновых кислот из сыворотки и крови).

1. Лизирующий раствор (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть, перемешивая при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок 1,5 мл (включая отрицательный контроль выделения).
3. В каждую пробирку внести по 30 мкл раствора ВКО. В пробирки, согласно маркировке, внести по 1 мл пробы, используя для каждой пробы отдельный наконечник с аэрозольным барьером.
4. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести 1 мл ОКО, используя наконечник с аэрозольным барьером. В каждую пробирку, не задевая стенок, внести 1 мл концентрирующего раствора. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и инкубировать 5 мин при комнатной температуре.
5. Затем центрифугировать при 3000 об/мин при комнатной температуре 5 мин. Из каждой пробирки пипеткой с отдельным наконечником удалить надосадочную жидкость.
6. В каждую пробирку к полученному осадку добавить по 200 мкл лизирующего раствора № 1. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 сек, чтобы осадок отслоился от дна пробирки. Выдержать при комнатной температуре 5 мин.
7. В каждую пробирку к лизирующим раствором добавить по 500 мкл лизирующего раствора № 2 с сорбентом. (Предварительно в лизирующий раствор № 2 добавить 80 мкл суспензии сорбента, прогретого до 56 °С).
8. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 сек. Выдержать в термошейкере при 56 °С с частотой вращения 1300 об/мин в течение 10 мин.
9. В каждую пробирку с анализируемыми образцами внести 750 мкл осадителя нуклеиновых кислот.
10. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 сек. Оставить при комнатной температуре на 3–5 мин. Центрифугировать в течение 5 мин при 13000 об/мин.
11. Из каждой пробирки пипеткой с отдельным наконечником удалить надосадочную жидкость.
12. В каждую пробирку к осадку добавить 500 мкл раствора для отмывки № 1. Перемешать содержимое на вортексе в течение 10–15 сек. Центрифугировать в течение 5 мин при 13000 об/мин.

13. Из каждой пробирки пипеткой с отдельным наконечником удалить надосадочную жидкость.
14. В каждую пробирку к осадку добавить 500 мкл раствора № 2 для отмывки. Перемешать содержимое на вортексе в течение 10–15 сек. Центрифугировать в течение 5 мин при 13000 об/мин.
15. Из каждой пробирки пипеткой с отдельным наконечником удалить надосадочную жидкость.
16. Высушить осадки в открытых пробирках при комнатной температуре в течение 2–3 мин.
17. В каждую пробирку к осадку добавить по 200 мкл элюирующего раствора. Тщательно ресуспендировать осадок на вортексе. Инкубировать в термоблокере при 56 °С с частотой вращения 1300 об/мин в течение 10 мин. Центрифугировать на микроцентрифуге 1 мин при 13000 об/мин.

Проведение ПЦР-амплификации и детекции продуктов амплификации

1. Подготовка пробирок для проведения ПЦР. Пробирки с готовой реакционной смесью объемом 50 мкл пронумеровать и расположить на штативе.
2. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести 50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК, не захватывая осадок. Плотнo заклеить оптической пленкой.
3. Поместить пробирки в амплификатор.
4. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК и ВКО и детекции флуоресцентных сигналов.
5. *Протокол проведения реакции амплификации*
1 стадия: 50 °С – 2 мин;
2 стадия: 95 °С – 2 мин;
3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 сек, 60 °С – 20 сек).
6. Выбрать каналы детекции амплификации ВКО и возбудителей инфекции.
«FAM» – для регистрации сигнала ДНК ВКО.
«HEX» – для регистрации сигнала ДНК ВПЧ 16 типа.
«ROX» – для регистрации сигнала ДНК ВПЧ 18 типа.
7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательными контролями согласно инструкции к используемому прибору.
8. Запустить программу и провести реакцию амплификации флуоресцентных сигналов в режиме реального времени.

Референсные значения:

В нормальных условиях ДНК вируса папилломы человека 16 и 18 подтипов не определяется. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителя), если для этого образца значение Ct по каналу «HEX» и по каналу «ROX» 40 или не определяется.

Клинико-диагностическое значение:

Определение вируса папилломы человека методом полимеразной цепной реакцией (ПЦР) отличается высокой чувствительностью и специфичностью (98 %). Женщины, у которых длительно присутствует ВПЧ в шейке матки, имеют риск развития рака в 65 раз больше, чем те, у кого вирус не обнаруживается. Риск значительно возрастает (в 130 раз), если пациентка старше 30 лет и инфицирована 16 или 18 типом ВПЧ.

Ответить на вопросы:

1. Папилломовирусная инфекция, типы папилломовирусов, связь с развитием предраковых заболеваний у мужчин и женщин.
2. Папилломовирусная инфекция и развитие рака шейки матки у женщин.
3. Основные показания для определения папилломовирусов.
2. Методы выявления инфицированности папилломовирусной инфекцией. Особенности правильной постановки диагноза.
3. Особенности формирования скрининговых программ для диагностика предраковых заболеваний шейки матки.

СЕМИНАР

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ОПУХОЛИ, ПЕРВИЧНАЯ И ПРИОБРЕТЕННАЯ. ГЕНЫ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ

Вопросы для самоподготовки:

1. Резистентность опухоли к терапевтическому воздействию, виды, механизмы развития.
2. Молекулярные механизмы адаптации клеток опухолевой природы к действию неблагоприятных факторов.
3. Первичная резистентность. Чувствительность различных опухолей к противоопухолевой терапии.
4. Приобретенная резистентность. Множественная лекарственная устойчивость. Роль ABC транспортеров.
5. Ферменты биотрансформации. Цитохром P450. Связь с развитием злокачественных новообразований.
6. Роль глутатион-S-трансфераз в организме. Основные мутации гена глутатион-S-трансферазы, ассоциированные с развитием злокачественных новообразований. Злокачественные новообразования, при которых встречаются мутационные изменения гена глутатион-S-трансферазы.
7. Первичная резистентность светлоклеточной опухоли почки, молекулярные механизмы развития.
8. Развитие кастрационно-резистентного рака предстательной железы, механизмы, молекулярные механизмы развития.

9. Трипл-негативный рак молочной железы, молекулярные механизмы развития.
10. Радиорезистентность. Развитие радиорезистентного рака щитовидной железы, молекулярные механизмы развития.
11. Резистентный рак яичников, молекулярные механизмы развития.

Контрольные вопросы:

1. Виды резистентности, механизмы развития. Молекулярные механизмы адаптации клеток опухолевой природы к действию неблагоприятных факторов.
2. Различия в чувствительности различных опухолей к противоопухолевой терапии.
3. Приобретенная резистентность, Роль ABC транспортеров, гликопротеин Р.
4. Ферменты биотрансформации. Цитохром Р450. Роль глутатион-S-трансфераз в организме. Злокачественные новообразования, при которых встречаются мутационные изменения ферментов биотрансформации.

Темы докладов, рефератов:

1. Резистентные опухоли почки, молекулярные механизмы развития.
2. Каstrationно-резистентного рака предстательной железы.
3. Гормонорезистентность при раке молочной железы.
4. Радиорезистентный рак щитовидной железы, молекулярные механизмы развития.
5. Резистентность к таргетной терапии.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СА 19.9 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Актуальность

Карбогидратный антиген СА 19.9 в сыворотке крови (СА 19.9) – гликопротеин, обнаруживается в фетальном эпителии поджелудочной железы, желудка, печени, тонкой и толстой кишки, лёгких. У взрослых данный антиген является маркёром железистого эпителия большинства внутренних органов и продуктом их секреции. СА 19.9 встречается в высокой концентрации в моче, слюне, семенной жидкости, моче, соке желудка, соке поджелудочной железы.

Следует учитывать, что антигенная детерминанта СА 19.9 и антиген группы крови Льюис (Le(a-b-)) кодируются одним геном. Этот ген отсутствует у 7–10 % людей в популяции. Соответственно у такого количества людей генетически отсутствует возможность синтеза СА 19.9, поэтому даже при наличии злокачественной опухоли из железистого эпителия уровень маркёра в сыворотке крови не определяется или его концентрация находится на очень низких значениях. СА 19.9 выводится исключительно с жёлчью, поэтому даже незначительный холестаза может быть причиной значительного повышения его уровня в крови. Повышение концентрации СА 19.9 (до 100 МЕ/мл и даже до 500 МЕ/мл)

может наблюдаться также при доброкачественных и воспалительных заболеваниях ЖКТ (в 50 % случаев панкреатита) и печени (гепатит, цирроз), при муковисцидозе и воспалительных заболеваниях органов малого таза у женщин (в 25 % случаев эндометриоза и миомы матки). У этих групп больных СА 19.9 может быть использован в качестве маркера мониторинга лечения этих заболеваний.

Показано, что при наличии мутаций Kras, онкогена, которолирующего клеточный цикл клетки способствует одновременному повышению уровнем РЭА и СА 19.9. Молекулярный механизм действия маркера СА 19.9 связан с активацией рецептора EGFR и MAPK зависимых сигнальных каскадов, что сочетается с изменением локомоторных свойств раковых клеток за счет влияния на молекулу адгезии EpcAM (GA733-2).

Цель работы:

Определить содержание СА 19.9 в сыворотке крови больных.

Задания для самостоятельной работы:

1. Подготовить реактивы.
2. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
3. Выполнить лабораторную работу с использованием пробы сыворотки крови.
4. Сделать необходимые расчеты.
5. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
6. Сделать выводы по работе.
7. Ответить на дополнительные вопросы.

Принцип метода:

Метод основан на твердофазном иммуноферментном анализе и заключается в специфическом связывании моноклональных антител к СА 19.9, адсорбированных на лунках иммунологического планшета, с последующим образованием конъюгата.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы:

- конъюгат моноклональных антител к СА 19.9 с пероксидазой хрена; раствор для разведения сывороток;
- фосфатно-солевой буферный раствор с твином;
- раствор тетраметибензидаина;
- стоп-реагент;
- контрольный образец с известным содержанием СА 19.9;
- калибровочные образцы, содержащие известные количества СА 19.9.

Оборудование:

- пипетки-дозаторы переменного объема на 2–20, 10–100, 200–1000 мкл, одноразовые наконечники с фильтрами;
- вортекс;
- шейкер;
- ИФА-анализатор.

Проведение анализа:

1. *Внесение образцов.* Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов по 100 мкл калибровочных образцов. В остальные лунки внести по 100 мкл контрольного образца и по 100 мкл анализируемых образцов сыворотки.
2. *Внесение конъюгата моноклональных антител.* Конъюгат готов к использованию. В лунки внести по 50 мкл конъюгата.
3. *Инкубация.* Стрипы заклеить пленкой и инкубировать при температуре 37 °С в течение 60 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.
4. *Промывка.* По окончании инкубации снять липкую планку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть планшет 5 раз промывочным раствором, чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
2. *Внесение тетраметилбензидина (ТМБ).* Раствор ТМБ готов к использованию. Внести во все лунки по 100 мкл ТМБ.
3. *Инкубация.* Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в темноте при температуре 37 °С в течение 15 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.
4. *Внесение стоп-реактанта.* Внести во все лунки 100 мкл стоп-реактанта с той же скоростью и с той же последовательностью, как и раствор ТМБ. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 сек; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.
5. *Измерение.* Измерить оптическую плотность на спектрофотометре, позволяющем проводить измерения оптической плотности в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине сравнения в диапазоне 620–655 нм.

Референсные значения:

Показатели нормы содержания опухолевого маркера СА 19.9 составляют в сыворотке крови менее 24 Ед/мл, в плазме крови – до 37 Ед/мл (37 U/ml).

Клинико-диагностическое значение:

Увеличение содержания онкомаркера СА 19.9 в крови происходит при злокачественных опухолях поджелудочной железы, злокачественных опухолях

желудка, злокачественных опухолях толстой кишки (колоректальный рак), карциноме желчного пузыря и желчных протоков, других гастроинтестинальных онкологических заболеваниях, раке легкого.

Диагностическая специфичность теста низкая из-за локализации антигена СА 19.9 во многих органах. В то же время нормальные значения маркера не встречаются при злокачественных заболеваниях. Определение содержания СА 19.9 используют как дополнительный маркер широко используемого теста определения РЭА.

Определение содержания СА 19.9 в сыворотке крови применяют: для диагностики и мониторинга лечения рака поджелудочной железы; для раннего обнаружения метастазирования опухоли поджелудочной железы; для мониторинга рака толстой кишки (совместно с РЭА), желудка (совместно с РЭА), жёлчного пузыря и жёлчных протоков (совместно с АФП); для диагностики и мониторинга лечения рака яичников (в сочетании с СА125 и СА 72.4).

Ответить на вопросы:

1. Значение СА 19.9 для диагностики опухолевых заболеваний ЖКТ.
2. Основные показания для определения СА 19.9 в сыворотке крови.
3. Референсные значения АФП в сыворотке и плазме крови.
4. Связь маркера СА 19.9 с антигеном группы крови Льюис.
5. Методы определения СА 19.9, их стандартизация.

СЕМИНАР

МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

Вопросы для самоподготовки:

1. Противоопухолевая терапия: классическая химиотерапия, таргетная терапия.
2. Гормон-чувствительные и гормон-нечувствительные опухоли. Маркеры эффективности противоопухолевой терапии. Рак предстательной железы.
3. Маркеры эффективности противораковой терапии. Рак молочной железы. Рецепторы гормонов. HER2neu.
4. Определение полиморфизма гена *EGFR*, связь с выбором тактики лечения больных раком легкого.
5. Определение транслокаций *ALK* при немелкоклеточном раке легкого, методы исследования, выбор тактики лечения.
6. Определение полиморфизма гена *KRAS*, связь с выбором тактики лечения больных колоректальным раком.
7. Определение полиморфизма гена *NRAS*, связь с выбором тактики лечения больных колоректальным раком.
8. Маркеры эффективности химиотерапии. Эффективность применения платин-содержащих препаратов. *BRCA*-зависимые раки.

9. Маркеры эффективности химиотерапии. Гены *RRM1*, *ERCC1*, связь с фармакокинетикой препарата.
10. Маркеры эффективности химиотерапии. Гены *TOP1*, *TOP2a*, связь с фармакокинетикой препарата.
11. Маркеры эффективности химиотерапии. Гены *TUBB3*, *TYMS*.

Контрольные вопросы:

1. Гормон-чувствительные и гормон-нечувствительные опухоли. Рецепторы ER, PR, AR.
2. Значение рецептора HER2neu для диагностики и лечения больных со злокачественными новообразованиями.
3. Определение полиморфизма гена *EGFR* у больных раком легкого.
4. Определение транслокаций *ALK* у пациентов с немелкоклеточным раком легкого, методы исследования, выбор тактики лечения.
5. Определение полиморфизма гена *KRAS*, *NRAS* у больных колоректальным раком.
6. Маркеры эффективности химиотерапии. Гены *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*.

Темы докладов, рефератов:

1. Место классической конвенциональной и таргетной терапии в лечении злокачественных новообразований.
2. Лечение немелкоклеточного рака легкого с применением молекулярных маркеров.
3. Лечение колоректального рака с применением молекулярных маркеров.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ.

1. ОСНОВНЫЕ ТЕОРИИ КАНЦЕРОГЕНЕЗА –

- 1) теория большого взрыва и теория зарождения ченых дыр
- 2) эволюционная теория и теория Дарвина
- 3) теория относительности и теория Фишера
- 4) теория стволовых опухолевых клеток, теория клональной эволюции, мутационно-клоновая теория

2. ОСНОВНОЕ ПОЛОЖЕНИЕ МУТАЦИОННО-КЛОНОВОЙ ТЕОРИИ –

- 1) злокачественные новообразования развиваются из одной опухолевой клетки, то есть имеют моноклональное происхождение
- 2) опухоль развивается из нескольких опухолевых клеток (поликлональное происхождение)
- 3) раковые опухоли развиваются из эмбриональных клеток, оказавшихся ненужными в процессе эмбрионального развития
- 4) опухолевая клетка развивается из соматической клетки в процессе ее деления

3. ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК –

- 1) высокодифференцированные клетки, сохраняющие морфологические структуры и способные выполнять специфические функции
- 2) непролиферирующие клетки, стабильность генома, сохранение способности к контактному торможению
- 3) клетки активно пролиферируют и охраняют способность к дифференцировке
- 4) неограниченный рост клеток, нестабильность генома, утрата клетками свойства контактного торможения

4. УСКОЛЬЗАНИЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ОТ ИММУННОГО НАДЗОРА ПОДРАЗУМЕВАЕТ

- 1) нарушение механизмов противоопухолевой иммунной защиты и утрату способности к распознаванию и отторжению опухолевых клеток
- 2) проявление вторичного иммунодефицита
- 3) потерю клетками свойства контактного торможения
- 4) изменение экспрессии интегрина E

5. ЭПИГЕНОМНЫЕ НАРУШЕНИЯ – ЭТО

- 1) качественные, количественные изменения генов ответственных за клеточное деление
- 2) нарушения систем, регулирующих клеточное деление: системы репарации ДНК, супрессорной антимитотической системы, системы самоэлиминации (апоптоза)
- 3) нарушение процесса репликации ДНК в опухолевых клетках
- 4) наследственные нарушения в структуре ДНК

6. ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ, ВСТРЕЧАЮЩИЕСЯ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ –

- 1) мутации в генах-онкосупрессорах и онкогенах
- 2) мутации в гене PTEN и Rb
- 3) абберантный сплайсинг и фоллинг
- 4) метилирование промоторных областей генов, ацетилирование гистонов, реанжировка хроматина

7. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ РАКОВЫЕ СИНДРОМЫ –

- 1) фенилкетонурия и тирозинемия
- 2) несемейный полипоз толстого кишечника и финдром фон Хиппель–Линдау
- 3) спорадический рак яичников и толстого кишечника
- 4) семейная ретинобластома, семейный аденоматозный полипоз толстого кишечника, синдромы множественных эндокринных опухолей

8. РОЛЬ ТЕЛОМЕРАЗ В РАЗВИТИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ОБОСНОВАНА

- 1) существованием взаимосвязей между короткими теломерами в клетке и развитием опухолевого процесса
- 2) наличием высокой активности теломеразы в опухолевых клетках
- 3) наличием небольшой теломеразной активности, которая снижает риск развития злокачественных новообразований
- 4) связью между мутацией теломеразы и риском развития злокачественных новообразований

9. ОСНОВНОЙ ТИП БИОХИМИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ – ЭТО

- 1) снижение синтеза ДНК и РНК
- 2) снижение активности фетальных форм ферментов
- 3) увеличение скорости окислительного фосфорилирования
- 4) повышение скорости гликолиза

10. ИЗМЕНЕНИЕ ОБМЕНА ГЛЮКОЗЫ В ПРОЦЕССЕ ОНКОГЕНЕЗА СОПРОВОЖДАЕТСЯ

- 1) повышением активности фосфофруктокиназы, не ингибирующейся АТФ и цитратом, и повышением активности лактатдегидрогеназы
- 2) снижением активности гексокиназы
- 3) повышением активности глицеральдегидфосфатдегидрогеназы
- 4) снижением активности лактатдегидрогеназы

11. БИОХИМИЧЕСКИЙ АТИПИЗМ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРОЯВЛЯЕТСЯ

- 1) преобладанием окислительных процессов на гликолитическими
- 2) в высокой активности теломеразы
- 3) отсутствием фетальных форм белков и ферментов
- 4) преобладанием гликолитических процессов над окислительными

12. МИШЕНЯМИ ДЛЯ ДЕЙСТВИЯ ВСЕХ КАНЦЕРОГЕННЫХ АГЕНТОВ ИЛИ ОНКОГЕННЫХ ФАКТОРОВ ЯВЛЯЮТСЯ СЛЕДУЮЩИЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ –

- 1) протоонкогены и онкосупрессоры
- 2) эпигенетические участки ДНК
- 3) промоторная часть гена
- 4) интроны и экзоны

13. ОСНОВНЫМИ БИОХИМИЧЕСКИМИ МЕХАНИЗМАМИ АВТОНОМНОСТИ ОПУХОЛИ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) продукция опухолью для себя факторов роста и их рецепторов и способность опухоли организовать свое собственное микроокружение
- 2) выраженная антигенность опухоли и сохранение способности к уклонению от иммунного надзора
- 3) наличие контроля за пролиферацией и дифференцировкой клеток
- 4) антибластомная резистентность организма и иммунные факторы резистентности

14. КЛИНИЧЕСКИЕ СТАДИИ ФОРМИРОВАНИЯ ОПУХОЛИ

- 1) гиперплазия ткани, доброкачественная опухоль, дисплазия, carcinoma in situ, инвазивный рак
- 2) доброкачественная опухоль, дисплазия, carcinoma in situ, инвазивный рак
- 3) гиперплазия ткани, инвазивный рак.
- 4) carcinoma in situ, доброкачественная опухоль

15. КАХЕКТИН – ЭТО

- 1) важнейший цитокин, вызывающий раковую кахексию, являющийся фактором некроза опухолей альфа
- 2) интерлейкин-1

- 3) интерферон гамма
- 4) фактор некроза опухолей бета

16. КАНЦЕРОГЕНЕЗ – ЭТО КОМПЛЕКС МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЙСЯ

- 1) нарушениями в репарации ДНК, аномальным сплайсингом белков
- 2) мутациями в генах фолдинга белков и генов шаперонов
- 3) аномальной активностью протеасом
- 4) мутациями в онкогенах и онкосупрессорах, наличием генетической нестабильности

17. ОСНОВНЫМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ НАРУШЕНИЙ НОРМАЛЬНОГО КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА В ОНКОГЕНЕЗЕ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) потеря контроля над размножением и усиление механизмов защиты клеток от действия сигналов апоптоза
- 2) сохранение контроля над делением клеток, активация апоптоза
- 3) нарушение нормального соотношения тканевых структур
- 4) увеличение количества регулирующих процесс деления белков

18. РОЛЬ микроРНК В ОНКОГЕНЕЗЕ –

- 1) микроРНК могут выступать в качестве онкогенов или генов-супрессоров и играть важную роль в опухолевой прогрессии
- 2) участие в метилировании ДНК
- 3) участие в репликации ДНК
- 4) отсутствие влияния на иммунную систему

19. СИСТЕМНОЕ ДЕЙСТВИЕ ОПУХОЛИ НА ОРГАНИЗМ ВЫРАЖАЕТСЯ В

- 1) подавлении пролиферации прилежащих тканей и нарушении функции органов.
- 2) участии в формировании иммунного ответа
- 3) развитии хронической почечной недостаточности
- 4) сдавлении прилежащих тканей и нарушении функции органов, развитии эндотоксикоза, развитии паранеопластических синдромов

20. СЛОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ КОНТРОЛЯ ТЕМПОВ КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ, РОСТА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ФОРМИРУЕТ

- 1) система протоонкогенов и генов-супрессоров
- 2) система онкобелков
- 3) микроокружение
- 4) структура ткани

21. ОСНОВНОЙ ПРИНЦИП КЛАССИФИКАЦИИ ОНКОБЕЛКОВ –

- 1) функциональный
- 2) структурный

- 3) молекулярно-генетический
- 4) биологический

22. ОНКОБЕЛКИ – ЭТО

- 1) белки с измененной функцией, а также нормальные белки, но синтезируемые клеткой в больших количествах
- 2) белки – продукты инактивации генов-онкосупрессоров
- 3) интерлейкины
- 4) факторы некроза опухолей

23. СОГЛАСНО КЛАССИФИКАЦИИ ОНКОБЕЛКИ РАЗДЕЛЯЮТСЯ НА

- 1) онкобелки, структурно сходные с факторами роста; онкобелки-протеинкиназы; нуклеотидсвязывающие онкобелки; ядерные онкобелки
- 2) транскрипционные факторы, факторы роста
- 3) ростовые факторы и интерлейкины
- 4) факторы некроза опухолей и интерлейкины

24. ОСНОВНАЯ МАССА ОНКОБЕЛКОВ ПРЕДСТАВЛЕНА

- 1) белками, структурно сходными с факторами роста
- 2) протеинкиназами
- 3) ядерными белками
- 4) ростовыми факторами

25. ФУНКЦИИ БЕЛКА P53 –

- 1) контроль входа в S-фазу, регулируя активность фактора транскрипции E2F
- 2) регуляция клеточного цикла и апоптоза, контроль целостности генома
- 3) фосфатаза; стимулирует апоптоз, подавляя активность PI3K-РКВ/Akt сигнального пути
- 4) повышение активности p53 и других факторов транскрипции, связываясь с RAD51, участвует в узнавании и/или репарации повреждений ДНК

26. ФУНКЦИИ БЕЛКА RB –

- 1) контроль входа в S-фазу, регулируя активность фактора транскрипции E2F
- 2) регуляция клеточного цикла и апоптоза, контроль целостности генома
- 3) фосфатаза; стимулирует апоптоз, подавляя активность PI3K-РКВ/Akt сигнального пути
- 4) повышение активности p53 и других факторов транскрипции, связываясь с RAD51 участвует в узнавании и/или репарации повреждений ДНК

27. ФУНКЦИИ БЕЛКА BRCA1 –

- 1) контроль входа в S-фазу, регулируя активность фактора транскрипции E2F
- 2) регуляция клеточного цикла и апоптоза, контроль целостности генома
- 3) фосфатаза; стимулирует апоптоз, подавляя активность PI3K-РКВ/Akt сигнального пути
- 4) повышение активности p53 и других факторов транскрипции, связываясь с RAD51 участвует в узнавании и/или репарации повреждений ДНК

28. ИНГИБИТОРЫ ЦИКЛИНЗАВИСИМЫХ КИНАЗ – ЭТО

- 1) CDKN1A и CDKN1B
- 2) ген *sis*
- 3) Rb
- 4) белок онкосупрессор p53

29. HER2neu – ЭТО

- 1) представитель семейства рецепторов эпидермального фактора роста человека, ErbB2
- 2) представитель семейства рецепторов эпидермального фактора роста человека, ErbB3
- 3) тирозинкиназный рецептор VEGFR2
- 4) рецептор c-MET

30. РОЛЬ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА Bcl-2 В РАЗВИТИИ ОПУХОЛЕЙ –

- 1) являются основными регуляторами митохондриального пути апоптоза
- 2) являются белками-онкосупрессорами
- 3) регулируют процессы неоангиогенеза
- 4) регулируют процессы репарации ДНК

31. ЗНАЧЕНИЕ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА APC В ОНКОГЕНЕЗЕ –

- 1) связывают и разрушают цитоплазматический b-катенин, препятствуют образованию транскрипционных комплексов b-катенин/Tcf
- 2) подавляют экспрессию гена VEGF (фактора роста эндотелия сосудов) и других генов, активируемых при гипоксии
- 3) репарация неспаренных участков ДНК (mismatch repair)
- 4) регуляция клеточного цикла и апоптоза, контроль целостности генома

32. ФУНКЦИЯ БЕЛКА PTEN

- 1) контроль входа в S-фазу, регулируя активность фактора транскрипции E2F
- 2) регуляция клеточного цикла и апоптоза, контроль целостности генома

- 3) фосфатаза; стимулирует апоптоз, подавляя активность PI3K-РКВ/Akt сигнального пути
- 4) повышение активности p53 и других факторов транскрипции, связываясь с RAD51 участвует в узнавании и/или репарации повреждений ДНК

33. АНГИОГЕНЕЗ – ЭТО

- 1) процесс образования новых кровеносных сосудов в органе или ткани
- 2) процесс перехода раковых клеток из кровеносных сосудов в прилегающие ткани и образование метастазов в определённых органах
- 3) процесс иммунофенотипического распознавания клеток
- 4) процесс роста опухоли за счет увеличения массы тканей

34. К АНГИОГЕННЫМ ФАКТОРАМ ОТНОСЯТ

- 1) фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF)
- 2) фактор свертывания IV
- 3) ингибиторы матриксных металлопротеиназ
- 4) ангиостатин и эндостатин

35. ПРОТЕАЗЫ, ВСТРЕЧАЮЩИЕСЯ В ОПУХОЛИ –

- 1) треониновые и аспартамовые протеазы
- 2) глютаминовые и треониновые протеазы
- 3) аспартамовые и глютаминовые протеазы
- 4) цистеиновые, сериновые протеазы, матриксные металлопротеиназы

36. МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ – ЭТО

- 1) семейство тканевых ингибиторов металлопротеиназ
- 2) ферменты, способные разрезать белки рассечением пептидных связей и отличающиеся от других протеаз наличием в своём активном центре аминокислоты серина
- 3) семейство внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса
- 4) ферменты класса гидролаз, катализирующий расщепление фибрина, в результате чего происходит разрушение тромбов

37. ПРОИЗВОДНЫЕ ФИБРИНОГЕНА, ОБЛАДАЮЩИЕ АНТИ-АНГИОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ, –

- 1) ангиостатин и эндостатин
- 2) матриксные металлопротеиназы
- 3) ангиопоэтин-1
- 4) VEGF

38. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АНГИОСТАТИНА СВЯЗАН СО

- 1) снижением экспрессии VEGF в опухоли и ингибированием экспрессии FGF
- 2) стимуляцией ангиогенеза (формирование кровеносных сосудов из существовавших ранее)
- 3) повышением проницаемости сосудов
- 4) модификацией иммунного ответа

39. СТИМУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССА АНГИОГЕНЕЗА ПРОИСХОДИТ ПРИ ДЕЙСТВИИ

- 1) VEGF-A
- 2) VEGF-B
- 3) VEGF-C
- 4) VEGF-D

40. К ИНГИБИТОРАМ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ (ММП) ОТНОСЯТ

- 1) тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП)
- 2) ферменты, способные разрезать белки расщеплением пептидных связей и отличающиеся от других протеаз наличием в своём активном центре аминокислоты серина
- 3) семейство внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса
- 4) ферменты класса гидролаз, катализирующий расщепление фибрина, в результате чего происходит разрушение тромбов

41. ОПУХОЛЕВЫЙ МАРКЕР – ЭТО

- 1) маркер, встречающийся во всех клетках организма в 100 % случаев
- 2) соединение, которое продуцируется опухолевыми клетками или организмом в ответ на развитие опухоли
- 3) соединение, которое продуцируется клетками APUD системы
- 4) маркер активации свертывающей системы крови

42. КРИТЕРИИ ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ

- 1) способность продуцироваться всеми клетками организма, тканеспецифичность
- 2) специфичны только для гепатоцитов, способны появляться в высоких концентрациях в желчи
- 3) способность появляться в высоких концентрациях в моче, способны продуцироваться юкставаскулярными клетками почек
- 4) способность продуцироваться только злокачественными клетками, органоспецифичность, способность появляться в высоких концентрациях в биологических жидкостях

43. ВИДЫ ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ –

- 1) вспомогательные, главные
- 2) сосудистые, тканевые, органые
- 3) первичные, вторичные, дополнительные
- 4) главные, второстепенные, дополнительные

44. БОЛЬШИНСТВО ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ ПРЕДСТАВЛЕНО

- 1) гормонами и их рецепторами
- 2) раковыми эмбриональными антигенами
- 3) ферментами
- 4) белками-онкосупрессорами

45. ГЛАВНЫЙ МАРКЕР – ЭТО

- 1) маркер с высокой чувствительностью и специфичностью к определенному виду опухоли
- 2) маркер с низкой чувствительностью и специфичностью в отношении определенной опухоли, применяется в комбинации, что повышает эффективность выявления опухоли
- 3) маркер с низкой чувствительностью и специфичностью при детекции заболевания, но специфичен в отношении конкретного органа
- 4) маркер с низкой чувствительностью и специфичностью к определенному типу опухоли

46. ВТОРОСТЕПЕННЫЙ МАРКЕР – ЭТО

- 1) маркер с высокой чувствительностью и специфичностью к определенному виду опухоли
- 2) маркер с низкой чувствительностью и специфичностью в отношении определенной опухоли, применяется в комбинации, что повышает эффективность выявления опухоли
- 3) маркер с низкой чувствительностью и специфичностью при детекции заболевания, но специфичен в отношении конкретного органа
- 4) маркер с низкой чувствительностью и специфичностью к определенному типу опухоли

47. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАРКЕР – ЭТО

- 1) маркер с высокой чувствительностью и специфичностью к определенному виду опухоли
- 2) маркер с низкой чувствительностью и специфичностью в отношении определенной опухоли, применяется в комбинации, что повышает эффективность выявления опухоли
- 3) маркер с низкой чувствительностью и специфичностью при детекции заболевания, но специфичен в отношении конкретного органа
- 4) маркер с низкой чувствительностью и специфичностью к определенному типу опухоли

48. КОМБИНАЦИЯ МАРКЕРОВ СА19.9, РЭА, АФП ИСПОЛЬЗУЕТСЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ

- 1) рака желудка
- 2) рака поджелудочной железы
- 3) рака ободочной кишки
- 4) рака почки

49. КОМБИНАЦИЯ МАРКЕРОВ СА19.9, АФП ИСПОЛЬЗУЕТСЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ

- 1) рака желудка
- 2) рака поджелудочной железы
- 3) рак желчного пузыря и желчных путей
- 4) рака почки

50. СА125 ЯВЛЯЕТСЯ _____ МАРКЕРОМ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЯИЧНИКОВ

- 1) главным
- 2) второстепенным
- 3) дополнительным
- 4) обязательным

51. ПОД ГЕТЕРОГЕННОСТЬЮ ОПУХОЛИ ПОНИМАЮТ

- 1) популяции клеток, отличающиеся по генотипам и фенотипам и, соответственно, имеющие разные биологические характеристики
- 2) понятие, связанное с особенностями лечения заболевания и определяющее ее эффективность
- 3) свойство опухоли уклоняться от иммунного надзора
- 4) свойство организма как целого отвечать изменениями жизнедеятельности на воздействия окружающей среды

52. ВЫДЕЛЯЮТ СЛЕДУЮЩИЕ ВИДЫ ГЕТЕРОГЕННОСТИ –

- 1) опухолевая и внутривидовая
- 2) межопухолевая и внутриопухолевая
- 3) стохастическая и детерминированная
- 4) первичная и вторичная

53. МЕЖОПУХОЛЕВАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ –

- 1) выделение молекулярных подтипов рака молочной железы с диагнозом инвазивный протоковый рак молочной железы
- 2) фенотипические различия между аденокарциномами легких и молочной железы
- 3) различия в экспрессии маркера HER2neu у больных раком молочной железы и раком желудка

- 4) морфологические различия между аденокарциномами легких и молочной железы

54. ВНУТРИОПУХОЛЕВАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ –

- 1) фенотипические различия между аденокарциномами легких и молочной железы
- 2) различная выраженность экспрессии HER2neu в биопсийном и послеоперационном материале больных раком молочной железы
- 3) морфологические различия между аденокарциномами легких и молочной железы
- 4) различная выраженность экспрессии HER2neu в биопсийном материале из разных участков опухоли у больных раком молочной железы

55. ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ОПУХОЛИ –

- 1) генетические
- 2) биохимические
- 3) факторы опухолевого микроокружения
- 4) химические

56. ГИПОТЕЗА ФОРМИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕВОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ –

- 1) гипотеза стволовых раковых клеток и гипотеза клональной эволюции
- 2) мультиклоновая и стохастическая гипотезы
- 3) мутационная и эпигенетическая гипотезы
- 4) гипотеза Фишера и Кошланда

57. ВИДЫ СТВОЛОВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК –

- 1) раковые и эмбриональные
- 2) наследственные и приобретенные
- 3) первичные и вторичные
- 4) монопотентные и полипотентные

58. МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕВОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ –

- 1) хроматография
- 2) кинетически катализ
- 3) аллель-специфичная ПЦР
- 4) гибридизация in situ FISH

59. ЗНАЧЕНИЕ ОПУХОЛЕВОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ В ОНКОГЕНЕЗЕ

- 1) определяет особенности течения заболевания и эффективность лечения
- 2) имеет только фундаментальное значение
- 3) влияет на диагностику заболевания
- 4) влияет на иммунную систему организма

60. БИОХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ ОПУХОЛЕВОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ –

- 1) витамины и эссенциальные элементы
- 2) тропонин и миоглобин
- 3) p53, PTEN, BRCA
- 4) гормоны, ростовые факторы, ферменты биотрансформации

61. ОПУХОЛЕВАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ БЫВАЕТ

- 1) первичной и вторичной
- 2) наследственной и мутационной
- 3) приобретенной и вспомогательной
- 4) адаптационной и реактивной

62. ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ НЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫ К ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ И С САМОГО НАЧАЛА ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) вторично-резистентными
- 2) первично-резистентными
- 3) радиорезистентными
- 4) резистентные к таргетной терапии

63. РЕЗИСТЕНТНОСТЬ, ВОЗНИКАЮЩАЯ В ХОДЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ ИЗНАЧАЛЬНО ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К НЕЙ ОПУХОЛЕЙ, – ЭТО

- 1) вторичная резистентность
- 2) первичная резистентность
- 3) радиорезистентность
- 4) химиорезистентность

64. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ПРОТИВООПУХОЛЕВОМУ ЛЕЧЕНИЮ –

- 1) поступление в клетку чужеродных веществ, способствующих повреждению внутриклеточных структур
- 2) повреждение системы репарации ДНК
- 3) снижение активности системы монооксигеназ и уменьшение уровня конъюгации токсических соединений с глутатионом, глюкуроновой кислотой
- 4) повышение репарации ДНК

65. ВАЖНЕЙШЕЕ СВОЙСТВО ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК –

- 1) нестабильность генома
- 2) высокая активность систем обнаружения поврежденной ДНК
- 3) активация апоптоза
- 4) пребывание клетки вне фазы клеточного цикла, наиболее уязвимой для повреждения

66. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ АДАПТАЦИИ КЛЕТОК ОПУХОЛЕВОЙ ПРИРОДЫ К ДЕЙСТВИЮ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ СВЯЗАН СО

- 1) способностью запустить в клетке действие защитных механизмов
- 2) способностью увеличить активность клеток иммунной системы
- 3) способностью регулировать клеточное деление
- 4) активностью процессов метастазирования

67. АВС ТРАНСПОРТЕРЫ – ЭТО

- 1) белки, защищающие клетки от гидрофобных ядов
- 2) белки – рецепторы, связанные с G белками
- 3) тирозинкиназные рецепторы, связанные с основными сигнальными системами
- 4) ростовые факторы

68. ПОТЕРЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ ЯВЛЯЕТСЯ ПРИЗНАКОМ

- 1) опухолевой прогрессии
- 2) благоприятного исхода заболевания
- 3) хорошей эффективности лечения
- 4) ремиссии заболевания

69. МНОЖЕСТВЕННАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ – ЭТО

- 1) феномен, связанный с действием факторов, способных запустить в клетке действие защитных механизмов
- 2) невосприимчивость клеток или организма одновременно к целому ряду лекарственных препаратов разного химического строения и с разным механизмом действия
- 3) преобладание клеток первично-резистентных над вторично-резистентными в опухоли
- 4) невосприимчивость ко всем видам противоопухолевого лечения

70. ВЕРОЯТНАЯ ПРИЧИНА КЛИНИЧЕСКОЙ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ – ЭТО

- 1) гиперэкспрессия гена MDR1 и гиперэкспрессия Р-гликопротеина (Pgp) при неизменной копияности гена
- 2) изменение активности иммунной системы
- 3) активация АКТ/m-TOR сигнального пути
- 4) повышенная экспрессия фактора, активируемого гипоксией (HIF)

71. К КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМ КРИТЕРИЯМ ВЫБОРА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЛЕЧЕНИЯ ОТНОСЯТ

- 1) активность АЛТ и АСТ
- 2) содержание тропонина и миоглобина

- 3) наличие стволовых опухолевых клеток в строме и в крови
- 4) наличие регионарных и отдаленных метастазов, прорастание опухоли в крупные сосуды и инвазивный рост

72. НАЛИЧИЕ РЕЦЕПТОРОВ ЭСТРОГЕНОВ В ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) показателем потенциальной чувствительности опухоли к антигормональной терапии.
- 2) свидетельством о функциональной активности рецепторов эстрогенов
- 3) показателем эффективности полихимиотерапии
- 4) показателем активности иммунной системы организма

73. НАЛИЧИЕ РЕЦЕПТОРОВ ПРОГЕСТЕРОНОВ В ОПУХОЛИ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) показателем эффективности полихимиотерапии
- 2) свидетельством высокой экспрессии HER2neu рецептора
- 3) свидетельством функциональной активности рецепторов эстрогенов
- 4) показателем эффективности лучевой терапии

74. HER2 ПОЗИТИВНЫЙ РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧАСТО

- 1) выявляется в протоковых раках молочной железы
- 2) сопровождается исчезновением прогестероновых рецепторов
- 3) сопровождается исчезновением эстрогеновых рецепторов
- 4) сопровождается исчезновением рецепторов HER2neu

75. РЕЦЕПТОР EGF (EGFR) ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) онкогеном семейства erb-c-erbB1, часто называемым по аналогии с названием кодируемого белка – геном EGFR
- 2) рецепторной тирозинкиназой из семейства инсулинзависимых рецепторов
- 3) рецептором фактора роста гепатоцитов
- 4) рецептором сосудистого эндотелиального фактора роста

76. ALK ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) онкогеном семейства erb-c-erbB1, часто называемым по аналогии с названием кодируемого белка
- 2) рецепторной тирозинкиназой из семейства инсулинзависимых рецепторов
- 3) рецептором фактора роста гепатоцитов
- 4) рецептором сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF)

77. KRAS ЯВЛЯЕТСЯ ГЕНОМ, КОДИРУЮЩИМ ОДИН ИЗ БЕЛКОВ

- 1) рецептора эпидермального фактора роста (EGFR)
- 2) рецепторной тирозинкиназы из семейства инсулинзависимых рецепторов

- 3) рецептора фактора роста гепатоцитов
- 4) рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF)

78. РОЛЬ БЕЛКА ERCC1 (EXCISION REPAIR CROSS-COMPLEMENTING-1) СВЯЗАНА С

- 1) активностью рибонуклеотид-редуктазы, необходимой для продукции дезоксинуклеотидов
- 2) процессом репарации ДНК после повреждения цисплатином
- 3) компонентом рибонуклеотид-редуктазы, необходимой для продукции дезоксинуклеотидов
- 4) активностью ДНК-полимеразы

79. БЕЛОК RRM1 ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ

- 1) молекулярную мишень гемцитабина и является компонентом рибонуклеотид-редуктазы
- 2) рибонуклеотид-редуктазу, необходимую для продукции дезоксинуклеотидов
- 3) фермент репарации ДНК после повреждения цисплатином
- 4) фермент, регулирующий активность ДНК-полимеразы

80. РОЛЬ ТИМИДИЛАТ СИНТЕТАЗЫ (TYMS) СВЯЗАНА С

- 1) катализированием метилирования дезоксиуридилат в дезоксипимидилат
- 2) процессом репарации ДНК после повреждения цисплатином
- 3) активностью рибонуклеотид-редуктазы, необходимой для продукции дезоксинуклеотидов
- 4) активностью ДНК-полимеразы

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача № 1

Женщина, 28 лет, обращается к врачу по поводу маточных кровотечений, жалобы на токсикоз, отёки, тошноту и рвоту. Кровь при кровотечении имеет тёмный цвет и жидкую консистенцию. При гинекологическом осмотре отмечается увеличенный размер матки. Матка при этом имеет тугоэластичную консистенцию. Достоверных признаков беременности, как сердечные тоны плода, его движения не наблюдаются. Подозревают пузырный занос или хорионкарциному.

1. *Предположить диагноз.*
2. *Охарактеризовать изменения лабораторных показателей.*
3. *Предложить схему дополнительной диагностики с включением опухолевых маркеров.*

Задача № 2

Мужчина, 36 лет. Жалобы: наличие крови в моче (гематурия), боль в области поясницы и пальпаторно определяемое образование на стороне поражения. Также отмечает слабость, потерю аппетита и веса, потливость, повышение температуры, артериальную гипертензию. Объективно: врачом обнаружен синдром сдавления нижней полой вены (симптоматическое варикоцеле, отеки ног, расширение подкожных вен брюшной стенки, тромбоз глубоких вен нижних конечностей), синдром Штауффера (дисфункцию печени). При обследовании выявлено изменения лабораторных показателей крови и мочи, биохимических показателей. А также отмечается повышение уровня ренина, паратгормона, инсулина, ХГЧ.

1. *Предположить диагноз.*
2. *Охарактеризовать изменения лабораторных показателей.*
3. *Предложить схему дополнительной диагностики с включением опухолевых маркеров.*

Задача № 3

Больной, 56 лет поступил с жалобами на постоянную слабость, похудание, резкое снижение аппетита и извращением вкусовых ощущений, болями в области печени. Объективно отмечается увеличение печени, при пальпации орган плотный с неровной, поверхностью. Дополнительно имеет признаки лихорадки и асцит. При обследовании выявлено изменения лабораторных показателей крови и мочи, биохимических показателей. А также отмечается повышение уровня АФП, ХГЧ, СА 19.9 – отрицательный.

1. *Предположить диагноз.*
2. *Охарактеризовать изменения лабораторных показателей.*

3. *Предложить схему дополнительной диагностики с включением опухолевых маркеров.*

Задача № 4

Больной, 45 лет, курит 2 пачки сигарет в день. Жалуется на тягостный, надсадный, наступающий приступами своеобразный кашель – лающий, свистящий, влажный с примесью крови в мокроте, изменения голоса. Объективно при обследовании врачом отмечаются признаки лихорадки, сдавления верхней полой вены и ее основных коллекторов, одностороннее западение под ключицей, плохое прилегание лопатки и отставание ее при дыхании из-за атрофии мышц. Перкуторный звук коробочный на стороне правого легкого. Рентгенологически обнаруживают устье затемнения у корня легких с неправильными очертаниями и с расходящимися тенями. Врачом поставлен предварительный диагноз – рак легкого. При обследовании выявлены изменения лабораторных показателей крови и мочи, биохимических показателей. А также отмечается повышение уровня ХГЧ, СА 19.9 и РЭА.

1. *Предположить диагноз.*
2. *Охарактеризовать изменения лабораторных показателей.*
3. *Предложить схему дополнительной диагностики с включением опухолевых маркеров.*

Задача № 5

Мужчина, 30 лет, жалуется на увеличение яичка, чувство тяжести в мошонке. Образование безболезненное, однако, в последнее время отмечает появление крови в эякуляте (гемоспермия), а также на резкое нарушение мочеиспускания.

1. *Предположить диагноз.*
2. *Охарактеризовать изменения лабораторных показателей.*
3. *Предложить схему дополнительной диагностики с включением опухолевых маркеров.*

Задача № 6

Больной, 50 лет, курит с 16 лет, жалуется на снижение аппетита, похудание, боли в эпигастральной области и диспептические расстройства. Желудочная диспепсия проявляется такими симптомами, как ощущение тяжести и чувства переполнения после еды, тошнота, отрыжка и срыгивание.

При обследовании выявлено изменения лабораторных показателей крови и мочи, биохимических показателей, а также отмечается повышение уровня СА 19.9, РЭА, ХГЧ.

1. *Предположить диагноз.*
2. *Охарактеризовать изменения лабораторных показателей.*
3. *Предложить схему дополнительной диагностики с включением опухолевых маркеров.*

Задача № 7

Больная, 45 лет. Обратилась к терапевту с жалобами на усталость, общее недомогание, периодическими приступами лихорадки до 37,5 °С. Гинекологический статус в норме. При обследовании выявлены изменения лабораторных показателей крови и мочи, биохимических показателей. В ОАК признаки хронической анемии, а также повышение уровня СА 19.9, РЭА, ХГЧ. Положителен тест на скрытую кровь в кале.

1. *Предположить диагноз.*
2. *Охарактеризовать изменения лабораторных показателей.*
3. *Предложить схему дополнительной диагностики с включением опухолевых маркеров.*

Задача № 8

Пациент, 50 лет, попал в отделение общей хирургии по скорой помощи. Жалуется на рвоту и тошноту, озноб, повышенную температуру, сильные схваткообразные боли. При обследовании выявлены изменения лабораторных показателей крови и мочи, биохимических показателей, а также повышение уровня СА 19.9, РЭА, ХГЧ.

1. *Предположить диагноз.*
2. *Охарактеризовать изменения лабораторных показателей.*
3. *Предложить схему дополнительной диагностики с включением опухолевых маркеров.*

Задача № 9

Пациент, 60 лет, отмечает появление в моче крови, при самом мочеиспускании чувствуется боль. Имеются жалобы на распирание в животе, отвращение к мясу, снижение аппетита, длительное расстройство стула (на протяжении нескольких недель). При обследовании выявлены изменения лабораторных показателей крови и мочи, биохимических показателей, а также повышение уровня СА 19.9, РЭА, ХГЧ.

1. *Предположить диагноз.*
2. *Охарактеризовать изменения лабораторных показателей.*
3. *Предложить схему дополнительной диагностики с включением опухолевых маркеров.*

Задача № 10

Больная, 50 лет. Постоянное несварение желудка, вздутие живота, боли, провоцируемые концентрацией газов, диспепсия, преждевременное насыщение, поясничные боли. Обратилась с этими жалобами к терапевту. Дополнительно отмечает повышение частоты мочеиспусканий, срочный позыв к мочеиспусканию, тошнота, кровянистые выделения, запор и увеличение диаметра талии, нарушение менструального цикла. Для уточнения диагноза была направлена к гинекологу. При обследовании выявлены изменения лабораторных показателей

крови и мочи, биохимических показателей, а также повышение уровня СА 125, ХГЧ.

1. *Предположить диагноз.*
2. *Охарактеризовать изменения лабораторных показателей.*
3. *Предложить схему дополнительной диагностики с включением опухолевых маркеров.*

Задача № 11

Женщина, 28 лет, обратилась к онкологу с жалобами на уплотнение и втяжение соска, а также кровянистые выделения из него. Стоит на учете у гинеколога по поводу беременности 20 недель. При обследовании выявлены изменения лабораторных показателей крови и мочи, биохимических показателей, а также повышение уровня АФП, ХГЧ в 3 раза.

1. *Предположить диагноз.*
2. *Охарактеризовать изменения лабораторных показателей.*
3. *Предложить схему дополнительной диагностики с включением опухолевых маркеров.*

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЭКЗАМЕНУ

1. Стадии канцерогенеза: инициация, промоция, опухолевая прогрессия. Канцерогены, действие физических факторов, вирусный канцерогенез.
2. Доброкачественные и злокачественные новообразования, общие черты и отличия.
3. Признаки злокачественности. Атипии – отличия опухолевых клеток от здоровых. Виды атипий: морфологическая, биохимическая, физико-химическая, функциональная.
4. Системное действие опухоли на организм. Биохимические нарушения при опухолевом росте в организме.
5. Метаболический синдром и развитие опухоли в организме.
6. Рак и наследственность. Наследственные формы рака.
7. Первично-множественные опухоли. Раковые синдромы.
8. Эпигеномные нарушения в опухолях. Нарушение уровня экспрессии генов. Метилирование, ацетилирование.
9. Сплайсинг, теломеразная активность.
10. Внеклеточные нуклеиновые кислоты. Циркулирующие ДНК и РНК. МикроРНК. Роль в развитии злокачественных новообразований
11. Экзосомы. Происхождение. Роль в организме, связь с развитием злокачественных новообразований.
12. Онкобелки и онкосупрессоры, механизмы активации. Роль в развитии различных злокачественных новообразований. Классификация белковых продуктов онкогенов – онкобелков. Механизм действия.
13. Онкобелки, структурно сходные с факторами роста. Ген *sis*, *hst*, *ras*, *ihf-2*.
14. Онкобелки – протеинкиназы. Src-белок. RAS-подобные белки. Белки Rar-подсемейства. Dar-киназы.
15. Нуклеотидсвязывающие онкобелки. Ядерные онкобелки. Транскрипционный фактор AP-1. Fos-белки. MYC-белки. Max-белки.
16. Онкосупрессоры Rb, BRCA, p53. Механизм действия, связь с развитием злокачественных новообразований.
17. Онкобелки – ингибиторы циклин-зависимых киназ. Онкосупрессор PTEN механизм действия, связь с развитием злокачественных новообразований.
18. APC и beta-катенин. Молекулярный механизм опухолевой прогрессии, связь с развитием злокачественных новообразований.
19. Белки семейства EGFR, Her2. Молекулярный механизм, связь с развитием злокачественных новообразований.
20. Про- и антиапоптотические белки: Bax, bcl-2. Связь с развитием злокачественных новообразований.

21. Формирование кровеносных сосудов в опухолевой ткани. Зависимость метастазирования от ангиогенеза. Маркеры неоангиогенеза. Белок VHL, VEGF.
22. Цистеиновые и сериновые протеиназы. Матриксные металлопротеиназы. Ингибиторы протеиназ. Связь с развитием злокачественных новообразований.
23. Значение скрининга с целью выявления ранних форм рака в современном обществе. Роль биохимических маркеров в скрининговых программах.
24. Виды биохимических маркеров: онкофетальные антигены. Ферменты. Гормоны. Рецепторы.
25. ПСА-маркер раннего выявления рака предстательной железы, его значение. Порог. Серая зона. Тестостерон – маркер диагностики и лечения рака предстательной железы
26. СА-125 – маркер раннего выявления рака яичников, его значение
27. Маркеры раннего выявления опухолевых заболеваний ЖКТ.
28. Маркеры раннего выявления опухолевых заболеваний легких.
29. Ферменты: кислая фосфатаза простаты, лактатдегидрогеназа, нейронспецифическая енолаза, тимидинкиназа, тканевый полипептидный антиген. Показания для диагностики, контроля лечения злокачественных новообразований.
30. Альфа-фетопротеин, клиническое значение. Показания для диагностики и контроля лечения злокачественных новообразований. Гепатоцеллюлярная карцинома.
31. Ферритин, бета-2-микроглобулин, иммуноглобулины. Показания для диагностики и контроля лечения злокачественных новообразований.
32. Рецепторы гормонов, клиническое значение. Показания для диагностики и контроля лечения гормонзависимых опухолей (РМЖ, рак простаты).
33. Дополнительные маркеры для оценки риска развития РМЖ на основе определения статуса BRCA (РЭА, МСА, СА 72.4, СА 19.9, СА 15.3). Их значение и роль в диагностике РМЖ.
34. Гетерогенность опухоли. Классификация. Опухолевая гетерогенность при различных онкологических заболеваниях.
35. Вклад опухолевого разнообразия в различные варианты прогрессии онкологических заболеваний и эффективность их лечения. Факторы формирования внутриопухолевой гетерогенности. Генетические и негенетические (биохимические).
36. Стволовые опухолевые клетки. Происхождение, связь с развитием злокачественных новообразований.
37. Основные проблемы в диагностике и терапии злокачественных новообразований, связанные с опухолевой гетерогенностью, и возможные пути их решения. Методы, применяемые для изучения опухолевой гетерогенности.
38. Гены, дифференциально экспрессирующиеся в опухолях молочной железы (люминальный А, люминальный Б, трипленегативный и т. д.), связь с манифестацией и прогрессированием заболевания.

39. Гены, дифференциально экспрессирующиеся в опухолях легких (аденокарцинома, плоскоклеточные раки), связь с манифестацией и прогрессированием заболевания.
40. Гены, дифференциально экспрессирующиеся в опухолях ободочной кишки и прямой кишки, связь с манифестацией и прогрессированием заболевания.
41. Гены, дифференциально экспрессирующиеся в опухолях желудка (диффузный и интестинальный подтип), связь с манифестацией и прогрессированием заболевания.
42. Гены, дифференциально экспрессирующиеся в опухолях яичников (серозные, муцинозные, герминогенные опухоли), связь с манифестацией и прогрессированием заболевания.
43. Гены, дифференциально экспрессирующиеся в опухолях щитовидной железы (фолликулярный, папиллярный, медуллярный рак).
44. Гены, дифференциально экспрессирующиеся в опухолях поджелудочной железы, связь с манифестацией и прогрессированием заболевания.
45. Резистентность опухоли к терапевтическому воздействию, виды, механизмы развития.
46. Молекулярные механизмы адаптации клеток опухолевой природы к действию неблагоприятных факторов.
47. Первичная резистентность. Чувствительность различных опухолей к противоопухолевой терапии.
48. Приобретенная резистентность. Множественная лекарственная устойчивость. Роль ABC транспортеров.
49. Ферменты биотрансформации. Цитохром P450. Связь с развитием злокачественных новообразований.
50. Роль глутатион-S- трансфераз в организме. Основные мутации гена глутатион-S-трансферазы, ассоциированные с развитием злокачественных новообразований. Злокачественные новообразования, при которых встречаются мутационные изменения гена глутатион-S-трансферазы.
51. Первичная резистентность светлоклеточной опухоли почки, молекулярные механизмы развития.
52. Развитие кастрационно-резистентного рака предстательной железы, механизмы, молекулярные механизмы развития.
53. Трипл-негативный рак молочной железы, молекулярные механизмы развития.
54. Радиорезистентность. Развитие радиорезистентного рака щитовидной железы, молекулярные механизмы развития.
55. Резистентный рак яичников, молекулярные механизмы развития.
56. Противоопухолевая терапия: классическая химиотерапия, таргетная терапия.
57. Гормон-чувствительные и гормон-нечувствительные опухоли. Маркеры эффективности противоопухолевой терапии. Рак предстательной железы.

58. Маркеры эффективности противораковой терапии. Рак молочной железы. Рецепторы гормонов. HER2neu.
59. Определение полиморфизма гена EGFR, связь с выбором тактики лечения больных раком легкого.
60. Определение транслокаций ALK при немелкоклеточном раке легкого, методы исследования, выбор тактики лечения.
61. Определение полиморфизма гена KRAS, связь с выбором тактики лечения больных колоректальным раком.
62. Определение полиморфизма гена NRAS, связь с выбором тактики лечения больных колоректальным раком.
63. Маркеры эффективности химиотерапии. Эффективность применения платин-содержащих препаратов. BRCA- зависимые раки.
64. Маркеры эффективности химиотерапии. Гены RRM1, ERCC1, связь с фармакокинетикой препарата.
65. Маркеры эффективности химиотерапии. Гены TOP1, TOP2a, связь с фармакокинетикой препарата.
66. Маркеры эффективности химиотерапии. Гены TUBB3, TYMS.

ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Номер вопроса	Номер ответа	Номер вопроса	Номер ответа
1	4	41	2
2	1	42	4
3	4	43	4
4	1	44	2
5	2	45	1
6	4	46	2
7	4	47	3
8	2	48	2
9	4	49	3
10	1	50	3
11	4	51	1
12	1	52	2
13	1	53	1
14	1	54	4
15	1	55	3
16	4	56	1
17	1	57	3
18	1	58	4
19	4	59	1
20	1	60	4
21	1	61	1
22	1	62	2
23	1	63	1
24	2	64	4
25	2	65	1
26	1	66	1
27	4	67	1
28	1	68	1
29	1	69	2
30	1	70	1
31	1	71	4
32	3	72	1
33	1	73	3
34	1	74	3
35	4	75	1
36	3	76	2
37	1	77	1
38	1	78	2
39	1	79	1
40	1	80	1

ОТВЕТЫ К СИТУАЦИОННЫМ ЗАДАЧАМ

Задача № 1

1. Пузырный занос.
2. В сыворотке крови обнаружен повышенный уровень ХГЧ, а также выявлены признаки воспалительной реакции при анализе результатов ОАК и ОАМ.
3. В качестве дополнительных маркеров рекомендовано исследование уровня эстрогенов, прогестерона, СА 125, АФП.

Задача № 2

1. Рак почки.
2. Признаки воспалительной реакции при анализе результатов ОАК, в том числе повышение СОЭ, белков острой фазы.
3. Схема дополнительной диагностики будет включать в себя исследование уровня СА 125, АФП, СА19.9, РЭА.

Задача № 3

1. Рак печени.
2. Признаки воспалительной реакции при анализе результатов ОАК, в том числе повышение СОЭ, белков острой фазы.
3. Схема дополнительной диагностики будет включать в себя исследование уровня СА 125, АФП, СА19.9, РЭА.

Задача № 4

1. Рак легких.
2. Признаки воспалительной реакции при анализе результатов ОАК, в том числе повышение СОЭ, белков острой фазы.
3. Схема дополнительной диагностики будет включать в себя исследование уровня СА 125, АФП, СА19.9, РЭА.

Задача № 5

1. Рак яичка.
2. Признаки воспалительной реакции при анализе результатов ОАК, в том числе повышение СОЭ, белков острой фазы.
3. Схема дополнительной диагностики будет включать в себя исследование уровня АФП, СА19.9, РЭА, ХГЧ.

Задача № 6

1. Рак желудка.

2. Признаки воспалительной реакции при анализе результатов ОАК, в том числе повышение СОЭ, белков острой фазы.

3. Схема дополнительной диагностики будет включать в себя исследование уровня АФП, ХГЧ.

Задача № 7

1. Рак ободочной кишки. Признаки воспалительной реакции при анализе результатов ОАК и ОАМ.

2. Признаки воспалительной реакции при анализе результатов ОАК, в том числе повышение СОЭ, белков острой фазы.

3. Схема дополнительной диагностики будет включать в себя исследование уровня АФП, СА 125.

Задача № 8

1. Рак поджелудочной железы.

2. Признаки воспалительной реакции при анализе результатов ОАК, в том числе повышение СОЭ, белков острой фазы.

3. Схема дополнительной диагностики будет включать в себя исследование уровня АФП, ХГЧ, ПСА.

Задача № 9

1. Рак мочевого пузыря.

2. Признаки воспалительной реакции при анализе результатов ОАК, в том числе повышение СОЭ, белков острой фазы.

3. Схема дополнительной диагностики будет включать в себя исследование уровня АФП, ХГЧ, ПСА, РЭА

Задача № 10

1. Рак яичника.

2. Признаки воспалительной реакции при анализе результатов ОАК, в том числе повышение СОЭ, белков острой фазы.

3. Схема дополнительной диагностики будет включать в себя исследование уровня АФП, РЭА.

Задача № 11

1. Рак молочной железы.

2. Признаки воспалительной реакции при анализе результатов ОАК, в том числе повышение СОЭ, белков острой фазы. Повышенный уровень СА 15.3, СА 242.

3. Схема дополнительной диагностики будет включать в себя исследование уровня эстрогенов, прогестерона.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная литература

1. Клиническая лабораторная диагностика. [Электронный ресурс]: национальное руководство: в 2-х томах / под ред. В.В. Долгова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – Режим доступа: [http://www.studentlibrary.ru / book / ISBN9785970421314.html](http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970421314.html)
2. Кишкун, А.А. Клиническая лабораторная диагностика [Электронный ресурс] / А.А. Кишкун. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – Режим доступа: [http://www.studentlibrary.ru / book / ISBN9785970415504.html](http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970415504.html)

Дополнительная литература

1. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / под ред. Н.У. Тица – М.: Лабинформ, 1997. – 942 с.
2. Назаренко, Г.И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г.И. Назаренко, А.А. Кишкун. – М.: Медицина, 2000. – С. 165–166.
3. Фактор роста эндотелия сосудов и его рецептор 2-го типа в опухолях и сыворотке крови больных раком почки [текст] / Н.Е. Кушлинский, М.Ф. Трапезникова, Е.С. Герштейн и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – № 6. – С. 691–694.
4. McGinley PJ, Kilpatrick ES. Tumour markers: their use and misuse by clinicians // *Ann Clin Biochem.* – 2003. – Vol. 40. – P. 643–647.
5. Meshko D. Differential diagnosis by laboratory medicine. – Ed. Springer, 2002. – P. 224–225.
6. Sharma S. Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology* : Official Journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology. 2009. – Vol. 30(1). – P. 1–8. doi:10.4103/0971-5851.56328.
7. Wilson D. McGraw-Hill Manual of Laboratory and Diagnostic Tests 1st Ed Normal, Illinois, 2007. – P. 347–348.

учебное издание

**Людмила Викторовна Спирина
Галина Алексеевна Суханова**

**Медицинская биохимия:
биохимия злокачественного роста**

практикум

Под редакцией В.Ю. Сереброва

Редактор Коломийцев А.Ю.
Технический редактор Коломийцева О.В.
Обложка Забоенкова И.Г.

Издательство СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
тел. 8 (3822) 51-41-53
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

Подписано в печать
Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Гарнитура «Times». Печ. лист. 3,6. Авт. лист. 5,1.
Тираж 100 экз. Заказ №

Отпечатано в Издательстве СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru