

ОПУХОЛИ ЯИЧНИКОВ – ВЗАИМОСВЯЗИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ АНТИГЕНОВ

Прокопенко П.Г., Борисенко С.А.,
Шелепова В.М., Ивков Н.Н., Терентьев А.А.
*Российский государственный медицинский
университет, Российский онкологический
научный центр РАМН,
Москва*

Диагностика серозных опухолей яичников остается нацеленной на конечный этап заболевания – рак яичников. Между тем, эволюция опухолей яичников – единый и целостный в своей непрерывности процесс, в котором выделяют: **доброкачественные** опухоли яичников (ДОЯ) – *цистадема, пролиферирующая цистаденома* и **злокачественные** – *пограничная опухоль от ранних признаков малигнизации - неинвазивная форма, до формирования 1-го поколения клеток, способных к инвазивному росту) и рак яичников* [Глазунов М.Ф., 1961; Нечаева И.Д., Винокуров В.Л., 1987].

Распространение (метастазирование) процесса при опухолях яичников происходит преимущественно имплантационно и начинается на очень ранних этапах заболевания: при цистаденоме – в 8,4% случаев [Селезнёва Н.Д., Железнов Б.И., 1982], пролиферирующих цистаденомах – в 13-29% [Глазунов М.Ф., 1961], пограничных опухолях (морфологически раковых клеток ещё нет) – в 52% при солидных и в 81% при папиллярных формах опухоли [Нечаева И.Д., Винокуров В.Л., 1987], а при раке яичников (РЯ) распространение достигает 95% случаев [Нечаева И.Д., Винокуров В.Л., 1987; Винокуров В.Л., 2003]. Однако при ДОЯ имплантаты/метастазы нежизнеспособны в автономном режиме - после удаления первичного очага опухоли в яичнике рецидивов практически не бывает и больные не умирают [Глазунов М.Ф., 1961; Селезнёва Н.Д., Железнов Б.И., 1982].

При пограничных опухолях, по разным данным, от рецидивов неинвазивных метастазов умерли: 0%, 4,7%, 6% и 15% больных; от инвазивных метастазов - 23%, 34%, 66,6% и 100% больных [Глазунов М.Ф., 1961; Берек Д., Адаши И., Хилард П., 2002], а в среднем умирают 40-44% больных [Берек Д., Адаши И., Хилард П., 2002; Althek A., Deligdich L., Kase N.G., 2003]. При раке яичников 111-1У стадии (таких больных 75-85%) в течение 5 лет умирают 93-95% больных, а после рецидивов в течение 3 лет – все больные, при этом средняя продолжительность жизни этих больных при диплоидных опухолях составляет 20,8 мес., а при анеуплоидных – 11,8 мес. [Винокуров В.Л., 1982]. Это свидетельство тотального распространения резистентных к лечению клеток на этапе рака яичников. Отсюда очевидно, что заболевание следует выявлять на этапах доброкачественной или пограничной опухоли, когда раковой клетки ещё нет. Но для этого необходимы белки, информативные на ранних этапах развития опухолевого процесса, предшествующих формированию резистентных к лечению раковых клеток, и новая стратегия диагностики с учетом исключительных особенностей раннего метастазирования [Борисенко С.А. и соавт., 2004; Глазунов М.Ф.,

1961; Нечаева И.Д., Винокуров В.Л., 1987; Селезнёва Н.Д., Железнов Б.И., 1982].

В работе представлены результаты изучения 26 онкоовариальных антигенов (ОВА), обнаруженных нами в раковой ткани яичников, включая антиген СА 125, традиционными иммунохимическими методами на основе кроличьих поликлональных антител (ПАТ), проведён иммунодиффузионный анализ (ИДА) распределения их в органах и биологических жидкостях.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Экстрагирование растворимых белков из тканей, получение кроличьих поликлональных антисывороток, моделирование диагностических преципитирующих тест-систем и методы контроля специфичности этих систем, этапы контроля и их последовательность подробно изложены в наших предыдущих работах [Прокопенко П.Г., 1994; Прокопенко П.Г. и соавт., 2001, 2002; Борисенко С.А. и соавт., 2004].

Вариант ИДА с применением тест-системы при изучении белков, представленных в таблице, имел чувствительность 1 мг/л. Для наиболее перспективных, на наш взгляд, белков были разработаны количественные методы - радиоиммунологический и иммуноферментный анализ (РИА и ИФА). Результаты количественного изучения белков, полученные с помощью этих методов, учитывались при анализе результатов.

Молекулярная масса (ММ) всех белков, представленных в таблице, рассчитана по данным гель-фильтрации. Методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) ММ установлена для наиболее перспективных - около 10 белков, которые нам удалось выделить, включая ферритин, трофобластический бета-гликопротеин (ТБГ) и антиген СА 125. В качестве контроля специфичности и визуализации выделяемого белка широко использовали метод иммунопроявления электрофореграмм, полученных при электрофорезе белка в ПААГ, поликлональными антисыворотками - иммунохимический предшественник иммуноблоттинга, а также визуальный метод выделения индивидуальных окрашенных белков из полиакриламидного геля [Прокопенко П.Г. и соавт., 2002].

Нетрадиционный метод был применен при изучении связывания моноклональных антител (МАТ) к СА 125 различными его олигомерами и комплексами, которые четко разделяются после электрофореза в ПААГ. Пластины/столбики 7,5% ПААГ после электрофореза инкубируют с конъюгатом МАТ к СА 125 с пероксидазой хрена (ММ комплекса около 200 КД) при 37 ° С 2 часа и 12 часов в холодильнике (+4 °С). Отмывают 3 раза водой и инкубируют 1 час при 37 ° С с субстратом – 3,3 - диаминобензидин тетрагидрохлорид (0,005%). Белковые полосы связавшие МАТ окрашиваются в золотисто-красный цвет. Хранят в воде в темном месте. Окраска устойчива в течение минимум 1-3 месяцев.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате 35-летних поисков антигенов строгой раковой специфичности опухолей яичников нам не удалось обнаружить таковых, но позволило создать библиотеку из 26 белков (все ОВА белковой природы) преимущественно узкой органной и опухолевой специфичности.

Все без исключения белки, представленные в таблице, обнаружены нами поликлональными антисыворотками, полученными при иммунизации кроликов экстрактами из опухолевой ткани рака яичников. Анализ распределения ОВА в тканях и биологических жидкостях показал, что все они определяются в эмбриональных органах и биологических жидкостях внутриутробного периода развития плодов: 19 из 24 обнаруженных в раковой ткани яичников белков (исключая ферритин и СА 125) содержатся в амниотической жидкости беременных женщин 10-27 недель беременности, 12 белков обнаружены в тканях органов эмбрионов и плодов различных сроков, включая органоспецифические белки мозга, селезенки и почки (рудименты эмбриональной почки – эпоофорон и пареофорон, всегда сохраняются в яичниках взрослых женщин), 10 – в амниотической жидкости и плаценте и 8 – только в амниотической жидкости. В сыворотке

крови больных с опухолями яичников методом ИДА обнаружены 9 белков, включая ферритин и СА 125 (см. таблицу).

Показано, что чистый стволовой полипептид СА 125 с ММ 55 КД, из которого формируются различные олигомеры и их комплексы [Прокопенко П.Г. и соавт., 2002], не связывает МАТ к СА 125. Связывают МАТ его комплексы в зоне миграции альфа-2-макроглобулинов (2 мм от старта разделяющего 7,5% геля), а также комплексы на границе разделяющего и концентрирующего геля. ММ комплексов связывающих МАТ к СА 125 составляет примерно от 600-800 до 1500 КД. Следовательно, комплекс антител с пероксидазой (ММ около 200 КД) свободно проникает в 7,5% ПААГ и связывается с антигеном. Метод может быть надежной альтернативой непростоному иммуноблоттингу.

Таблица 1. Иммунохимическое тестирование овариальных антигенов (ОВА) с помощью поликлональных антител в тканях органов и биологических жидкостях выше 1 мг/л.

№ ОВА	Мол.М КД	Ткани органов Взрослые плоды	Биологические жидкости АЖ ЛЖ АСЖ	Сыворотка крови (% выяв- ления) ЗД ДОЯ РЯ
1	600	почка почка	---	---
2	110	почка почка	---	---
3	60	почка почка	---	---
4	115	селезенка селезенка	++-	- + (40) + (50)
5	22	селезенка селезенка	++-	- + (24) + (38)
6	130	мозг мозг,ЖКТ	-+++	---
7	24	мозг мозг, почка	+++	---
8	35	плацента	++-	---
9	57	- ЖКТ	+++	- + (55) + (58)
10	55	- ЖКТ	---	---
11	14	- -	+-	---
12	36	- -	+-	- + (25) + (75)
13	68	- ЖКТ	+++	- + (17) + (41)
14	55	- -	+-	- + (22) + (33)
15	32	- ЖКТ	+-	---
16	50	- -	+-	---
17	21	- -	+-	---
18	32	- -	+-	---
19	12	- -	+-+	---
20	100	- -	+-	---
21	105	- ТБГ трофобласт	+-	---
22	200	- РЭА ЖКТ	- x -	---
23	40	- СТР-40 -	+ x -	+ (25) + (98) -
24	477	ФЕРРИТИН	- - +	- + (25) + (38)
25	55	СА 125	+ x +	+ (100) + (100) + (100)
26	87	ЭПА	+ x -	---

Примечание. АЖ – амниотическая жидкость (10-27 недель беременности); АСЖ – асцитическая жидкость больных раком яичников; ЛФ – лимфатическая жидкость больных раком яичников;

ЗД – здоровые (доноры); ДОЯ – доброкачественные опухоли яичников; РЯ – рак яичников;

+ - выявлен; - - не выявлен; x – данные отсутствуют

Среди ОВА выделены секретируемые и несекретируемые/тканевые белки (ОВА 12 и ОВА 8). По уровню секреции в кровь они различаются примерно также как АФП и РЭА: сывороточный уровень секретируемых белков выше на 2-3 порядка у больных раком по сравнению со здоровыми людьми [Абелев Г.И., 2001]. Напротив, повышение сывороточного уровня тканевых цитоплазматических белков при ра-

ке незначительно и превышает норму в 2-4 раза. Существования строго специфических раковых белков не доказано - все известные «раковые» белки имеют эмбриональное происхождение. Раковая клетка – это путь к деградации и она, видимо, не в состоянии изобретать новые прогрессивные метаболические цепи. Результаты настоящей работы подтверждают это положение и обращают нас к эмбриональным стволо-

вым клеткам (ЭСК), которые вначале называли “плюрипотентными эмбриональными клетками” [Глазунов М.Ф., 1961]. Термин “стволовые” применили для клеток крови в середине XX века, а чуть позже он приобрёл современное звучание для обозначения тотиплюри- и монопотентных ЭСК [Бернет Ф., 1971; Глазунов М.Ф., 1961; Репин В.С., Сухих Г.Т., 1998]. К тотипотентным ЭСК относят зиготу, включая ранние стадии её дробления, к плюрипотентным – ЭСК на более поздних этапах дифференцировки и к монопотентным – региональные специализированные ЭСК [Глазунов М.Ф., 1961; Репин В.С., Сухих Г.Т., 1998]. Следует подчеркнуть, что зигота и первые blastomeres обладают тотальной потентностью и способны дифференцироваться в любую линию специализированных клеток органов, включая трофобласт и плаценту. Потенции генома более поздних ЭСК ниже и они уже не продуцируют *in vitro* клетки трофобласта и плаценты [Репин В.С., Сухих Г.Т., 1998]. Биологическая готовность яйцеклетки половозрелой женщины к дифференцировкам настолько высока, что возможно её партеногенетическое развитие. Гипотезу партеногенетического развития неоплодотворённой яйцеклетки/ооцита предложил W.Waldeyer в 1870 году и она сегодня полностью подтверждена, при таком развитии сформированным оказывается только трофобласт при отсутствии других элементов закладок тела зародыша, но терминальным продуктом дифференцировок ооцита, тем не менее, являются разные формы тератоидных и некоторых других опухолей яичников [Глазунов М.Ф., 1961; Репин В.С., Сухих Г.Т., 1998]. Поэтому 8 ОВА, обнаруженных только в амниотической жидкости, видимо, можно отнести к антигенам ранних дифференцировок тотипотентных ЭСК - зиготы/ооцита. Продуктом плюрипотентных ЭСК могут быть антигены, которые, кроме амниотической жидкости, обнаружены в других эмбриональных органах, а к региональным специализированным (монопотентным) – органоспецифические антигены почки (см. таблицу).

Все органы и ткани взрослого человека бережно хранят остатки зародышевой ткани, как неприкосновенный запас в виде вкраплений эмбриональных стволовых среди дефинитивных клеток. Стволовые клетки – это орган восстановления клеточного гомеостаза в случаях физиологической или массивной гибели/апоптоза клеток. Содержание их не более 0,1-0,01% от всех дифференцированных клеток дефинитивного органа, но они обладают необычайно высокой стартовой готовностью к активной пролиферации и эффективностью репарации клеточного гомеостаза. ЭСК – это биологически запрограммированная система самообновления клеток, которая предохраняет организм от преждевременного старения.

Обнаружение высоких концентраций “раковых” белков в опухолевой ткани/крови больных и в эмбриональных/плодовых тканях и жидкостях, при весьма низком содержании их в тканях и жидкостях взрослых здоровых людей, может указывать на их возможное происхождение из эмбриональных стволовых клеток. Об этом говорят следующие факты: во-первых, синтез этих белков остается стабильно высоким в эмбриональных/плодовых органах и тканях -

альфа-фетопротеин-АФП, ОВА-8, -21; во-вторых, на некотором стартовом уровне синтез и секреция в кровь эмбриональных белков всегда обнаруживаются у здоровых взрослых людей, что является показателем функционирования соответствующих эмбриональных структур, – АФП, ОВА-8, -21; в-третьих, повышение их уровня в крови больных обнаруживают задолго до формирования раковой клетки – АФП, ОВА-12; в-четвертых, при успешном лечении уровень их в крови возвращается к низкому стартовому и вновь повышается при рецидивах – АФП, ОВА-12, -22; в-пятых, при раке уровень секретируемых эмбриональных белков в крови может достигать сывороточного уровня эмбрионального/внутриутробного периода – АФП [Абелев Г.И., 2001]; в-шестых, уровень их в крови плодов и при раке значительно выше (на 2-3 порядка) по сравнению со здоровыми взрослыми людьми – АФП, ОВА-12, -21 [Абелев Г.И., 2001, Прокопенко П.Г. и соавт., 1990, 2002]; в-седьмых, повышение сывороточного уровня “опухолевых” маркеров при неопухолевых заболеваниях [Прокопенко П.Г., 1994]; в-восьмых, при раке яичников может обнаруживаться не только повышенный сывороточный уровень специфического белка трофобласта – ТБГ, но и сформированные морфологические структуры типа трофобласта – “трофобластическое гнездо” [Глазунов М.Ф., 1961] в ткани опухоли с внутриклеточным синтезом ТБГ [Прокопенко П.Г. и соавт., 1990], и последнее, из эмбриональных структур у взрослых людей хранятся только ЭСК; о существовании других подобных структур пока неизвестно.

Эволюция эмбриональной клетки и её взаимоотношения с раковой клеткой обсуждаются с 1870 года и глубоко проанализированы М.Ф.Глазуновым. Он дал наиболее полное представление об этой взаимосвязи, которая “...заключается не в порочном характере источника опухоли, а в способности этого источника – половой/эмбриональной клетки – в патологических условиях расти, дифференцироваться в свойственных ей направлениях, подвергаясь или не подвергаясь малигнизации” [Глазунов М.Ф., 1961]. Это можно наблюдать на примере эволюции эмбриональных клеток рудиментов первичной почки при опухолях яичников. С одной стороны, дифференцировка ЭСК почки идет “в свойственном ей направлении” - по пути создания зрелой клетки почки, и появление белков эмбриональной почки в опухолевой ткани яичников означает степень активации процессов дифференцировки ЭСК почки, а с другой стороны, система репарации не в состоянии противостоять агрессии опухолевой клетки - орган замещается раковой тканью и погибает. Однако при этом в пораженном опухоли яичнике никогда не находили терминально дифференцированных клеток почки, т.е., дифференцировки не завершаются формированием зрелой клетки почки и клетки почки в дефинитивном яичнике всегда остаются эмбриональными, но хорошо известны эпителиальные мезонефроидные светлоклеточные опухоли яичников, происходящие из рудиментов эмбриональных почек, которые проявляют несомненное цитоморфологическое сходство со светлоклеточным гипернефроидным раком почки, что

отразилось в одном из синонимов этой опухоли – гипернефرويد яичника [Глазунов М.Ф., 1961]. Очевидно, что вектор дифференцировок, ориентированный на воспроизведение зрелой клетки дефинитивной почки в ткани яичника, в патологических условиях (в данном случае – чуждое клеточное микроокружение) отклоняется и на каком-то этапе дифференцировок подвергается малигнизации, но продолжает синтезировать органоспецифические белки почки.

Следовательно, эмбриональные белки раковой ткани не стоят в прямой связи с развитием опухоли и потому повышение их уровня в крови не может быть специфичным только для рака, поскольку они количественно отражают любые повреждения органа, требующие восстановления клеточного гомеостаза. Однако следует признать, что повышение сывороточного уровня этих белков при раке более выражено и может означать, прежде всего, степень активности пролиферации ЭСК, что возможно связано с наибольшей опасностью, распознаваемой системой репарации, для жизни не только пораженного органа, но и организма. Можно допустить, что белки эмбрионального происхождения, как продукт ЭСК, обладают высокой биологической активностью и терапевтический эффект при трансплантировании ЭСК обусловлен именно этими соединениями и, возможно, на каких-то этапах лечения могут дополнять и подменять ЭСК, которые подвержены быстрой гибели при трансплантировании. Эти белки могут также найти применение в роли маркеров ЭСК.

Таким образом, эмбриональные белки, обнаруженные в ткани рака яичников, позволяют создавать диагностические комбинации антигенов для выявления различных гистотипов опухолей яичников на ранних этапах развития и реально сдвинуть проблему иммунодиагностики этого заболевания с мертвой точки.

ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АМПЛИТУДНО-ЧАСТОТНОГО СПЕКТРА ДОПЛЕРОГРАММ У БОЛЬНЫХ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

Прокофьева Т.В., Полунина О.С.,
Уклистая Т.А., Ерина И.А., Перова Н.Ю.
ГОУ ВПО АГМА,
Астрахань

Амплитудно-частотный анализ гармонических составляющих флуктуаций тканевого кровотока (АЧА) является важным этапом диагностической стратегии в оценке микроциркуляторных нарушений при исследовании кровотока методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ). Он позволяет более полно и точно оценивать соотношение механизмов регуляции тканевого кровотока и выявлять нарушения в микроциркуляторном русле, чем это можно сделать при визуальной оценке зарегистрированной доплерограммы. Зачастую только АЧА ЛДФ-граммы позволяет выявлять значимые изменения в регуляции кровотока.

Целью исследования явилось выявление индивидуальных особенностей амплитудно-частотного спек-

тра доплерограмм у больных инфарктом миокарда (ИМ).

Было обследовано 82 пациента с ИМ в возрасте $50,11 \pm 5,49$ лет.

Оценивались следующие составляющие амплитудно-частотного спектра: амплитуда вазомоций, амплитуды дыхательных колебаний и кардиоколебаний.

При исследовании микроциркуляции у больных ИМ методом ЛДФ нами были выявлены существенные изменения в амплитудно-частотном спектре ЛДФ-граммы. Значительное снижение амплитуды вазомоций свидетельствовало о подавлении механизма активной модуляции тканевого кровотока. Угнетение активных регуляторных систем, при условии сохранения компенсаторных способностей, чаще всего сопровождалось возрастанием роли пассивной модуляции, что способствовало разгрузке веноулярного звена микроциркуляторной системы. Именно в этой связи следует рассматривать общую тенденцию к возрастанию вклада респираторных и кардиочастотных ритмических составляющих в общий уровень флаксмоций.

Степень активации пассивных механизмов характеризовалась значительной индивидуальностью. Это позволило нам выделить 4 типа патологических гистограмм:

1 вариант характеризовался изолированным подавлением активного механизма модуляций тканевого кровотока и проявлялся снижением амплитуды медленных колебаний при отсутствии увеличения амплитуд респираторных и пульсовых колебаний. На наш взгляд, подобный характер гистограммы свидетельствовал об отсутствии компенсаторных резервов и тяжелом состоянии больного. Этот вариант гистограммы встретился у 10 больных ИМ (11,8%).

2 вариант характеризовался регистрацией высокоамплитудных респираторных волн наряду со снижением амплитуды вазомоций, что свидетельствовало о преобладании дыхательного компонента в механизмах компенсации нарушенного кровообращения. Подобные гистограммы были зарегистрированы у 9 больных ИМ (10,6%).

3 вариант характеризовался наличием высоких кардиоволн при одновременном снижении амплитуды вазомоций, что было расценено нами как активация преимущественно кардиального компонента пассивной модуляции тканевого кровотока. Подобные гистограммы были наиболее характерны для больных ИМ, выявляясь у 35 человек этой группы (41,2%).

4 вариант характеризовался увеличением одновременно амплитуды дыхательных и кардиоволн на фоне снижения амплитуды медленных колебаний. Подобный тип гистограммы свидетельствовал, на наш взгляд, о хорошей компенсаторной способности регуляторных систем. Данный тип АЧС регистрировался у 20 больных ИМ (23,5%).

Таким образом, для оценки выраженности микроциркуляторных нарушений и при назначении патогенетической медикаментозной терапии необходимо учитывать не статистические средние значения составляющих амплитудно-частотного спектра, а индивидуальное соотношение амплитуд вазомоций, кардиоколебаний и респираторных колебаний.