

ПРОТЕОМИКА

УДК 616.245

©Коллектив авторов

РАННЯЯ ПРОТЕОМИКА РАКА ЯИЧНИКОВ. МИФ ИЛИ РЕАЛЬНОСТЬ ?

*О.В.Макаров¹, В.М.Говорун², И.Н.Таранец¹, Е.И.Гоуфман²,
А.Н.Грицай¹, А.И.Арчаков²*

¹Кафедра акушерства и гинекологии лечебного факультета РГМУ.

²ГУ НИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН
119121, Москва, ул. Погодинская, д.10, факс: 245-0857

³Российский онкологический научный центр им.Н.Н.Блохина РАМН.

Обобщены литературные данные, отражающие новизну подходов, а также актуальность поиска ранних белковых маркеров рака яичников. В настоящее время альфа-фетопротеин (АФП) и раковый антиген (CA125) рассматриваются в качестве наиболее надежных маркеров тестирования ранних стадий рака яичников. Однако эти маркеры не дают полного представления о стадии заболевания и его злокачественности, а также не обладают достаточной специфичностью. В последнее время появились новые методические подходы, такие как 2-D электрофорез в сочетании с масс-спектрометрией, позволяющие наиболее полно инвентаризировать и идентифицировать белки в различных тканях. Использование этих методов при сканировании белков, полученных из биоптатов тканей рака яичников, позволило выявить ряд новых маркеров, которые, вероятно, можно в недалеком будущем использовать для ранней диагностики данного заболевания.

Ключевые слова: рак яичников, 2-D электрофорез, масс-спектрометрия, маркерные белки.

Опухоли яичников составляют до 25% среди заболеваний женских половых органов [1,2], из которых 17% приходится на рак яичников (РЯ).

Проблема РЯ является одной из самых сложных в онкогинекологии. РЯ остается наиболее распространенной злокачественной опухолью у женщин в развитых странах мира. К настоящему времени накоплен большой экспериментальный и клинический материал, но, несмотря на это, выживаемость больных с этой патологией весьма низкая. Средние международные показатели заболеваемости и смертности РЯ составляют соответственно 8,1 и 6,6 на 100000 женского населения. В отдельных странах эти показатели выше средних (Канада), в других - ниже (Индия, Нигерия, Куба).

В 1992 году в России было зарегистрировано 11635 новых случаев заболевания РЯ и 9186 больных умерло от прогрессирования опухоли [3]. По данным эпидемиологического исследования американских ученых РЯ в тот или иной период жизни может возникнуть у 1,4% (или у одной из 70) новорожденных девочек. В США каждые 45 минут от РЯ умирает одна больная и этот показатель с 1986 по 1996 гг. увеличился на 12,8% [4,5]. В 2001 году у 23400 американских женщин был обнаружен РЯ, 13900 женщин умерло от него [6].

РАННЯЯ ПРОТЕОМИКА РАКА ЯИЧНИКОВ.

Пик заболеваемости приходится на 6-7-ю декаду жизни, при этом средний возраст женщин, страдающих РЯ, 58 лет.

В России РЯ занимает 7-е место по частоте (5,4% на 100000 женского населения) и 4-5-е место среди причин смертности от всех опухолей у женщин [3,7].

РЯ характеризуется быстрым ростом, высокой частотой летальных исходов, склонностью к метастазированию, диссеминацией по брюшине, накоплением асцитической жидкости. Основные причины низкой выживаемости больных РЯ кроются в бессимптомном течении заболевания на ранних стадиях, отсутствии полноценных диагностических методов и частом возникновении рецидивов и метастазов даже после лечения пациенток с ранними стадиями заболевания. Согласно данным мировой статистики, три четверти больных РЯ при обращении к врачу имеют III-IV стадии заболевания; 80% больных обращаются с неспецифическими жалобами, 10-20% больных выявляются при профилактических осмотрах или как "случайная находка".

Пятилетняя выживаемость при выявлении I стадии составляет 80%, при II ст. - 60%, при III ст. - 25%, а при IV ст. - всего 15%. Общая пятилетняя выживаемость составляет 39%. После проведенного, казалось бы, адекватного лечения до 20% больных с I стадией РЯ умирают в дальнейшем от рецидивов заболевания [8,4,9].

На современном этапе ранняя диагностика рака и предрака яичников является важнейшим оружием в противораковой борьбе. Улучшение результатов лечения во многом связано с выявлением новообразований яичников на ранних стадиях, что непосредственно зависит от улучшения диагностических возможностей.

Ранняя диагностика РЯ трудна, так как до настоящего времени не существует специфических диагностических тестов, позволяющих выявить опухоль на начальных этапах ее развития.

Одной из задач, направленных на снижение смертности от РЯ, является разработка эффективных методов диагностики доклинических форм рака или доброкачественных и пограничных форм опухолей яичников. Оценка информативности методов ранней диагностики РЯ направлена на разработку селективного скрининга опухоли яичников с помощью иммунологических, иммуногенетических, биохимических критериев, а также морфологических и цитохимических поисков.

В настоящее время, несмотря на разнообразие применяющихся методов диагностики, нет метода или комплекса методов ранней диагностики РЯ, которые удовлетворили бы клиницистов. Причины тому различные: травматичность методов, инвазивность, невысокая информативность, невозможность применения в амбулаторных условиях и другие.

Одним из наиболее интересных и перспективных направлений в диагностике злокачественных опухолей является нахождение опухолевых маркеров. Их изучение представляет большой интерес не только с практической, но и с теоретической точки зрения. Проводимые в этом направлении исследования позволяют глубже понять этиологию и патогенез злокачественного роста, изучить многие процессы, происходящие в организме.

Опухолевые маркеры, как правило, представляют собой белки (чаще всего это глико- или липопротеины) присутствие и/или изменение концентрации которых в периферической крови или других биологических жидкостях организма коррелирует с наличием и ростом опухоли [10,11].

С точки зрения диагностической ценности идеальный опухолевой маркер должен продуцироваться опухолевой клеткой в достаточных количествах, чтобы его можно было определить с помощью современных методов. Кроме того, он не должен присутствовать (или его должно быть значительно меньше) в крови у здоровых людей или при доброкачественных опухолях. Опухолевый маркер должен выявляться на ранних стадиях опухолевого процесса, что дает возможность использовать его при скрининге конкретного вида опухоли.

Количество опухолевого маркера должно быть прямо пропорционально объему опухоли и этот маркер должен определяться еще до клинических проявлений опухолевого процесса [12,13]. Уровень идеального маркера должен коррелировать с результатами противоопухолевого лечения.

Специфичность маркера чрезвычайно важна в диагностике рака. Она позволяет определять изменение содержания маркера в биологической жидкости, специфичное для данной опухоли, а его присутствие и/или повышение содержания выше границы нормы может считаться критерием наличия злокачественной опухоли [14].

Современные биохимические и иммунологические методы позволяют выявлять новообразования, при которых уровень секретируемого опухолевого маркера не менее 1 фмоля в 1 мл сыворотки крови (10^{-12} М).

В настоящее время применение опухолевых маркеров в онкогинекологии имеет 6 аспектов: формирование групп риска, уточнение диагноза, определение локализации опухоли, контроль за лечением, выявление субклинических рецидивов и, наконец, постановка прогноза. В диагностике РЯ используются следующие маркеры: альфа-фетопроtein (АФП), раково-эмбриональный антиген (РЭА), трофобластический бета-гликопротеин, ферритин, раковый антиген 125 (CA125) и др. Но, несмотря на кажущееся изобилие опухолевых маркеров, единственными и надежными тестами при РЯ являются определение АФП и СА 125 [15,16].

Альфа-фетопроtein (АФП) относится к антигенам, ассоциированным с опухолью, синтез которого в норме идет в эмбриональных тканях. В настоящее время известно, что АФП является гликопротеином с молекулярной массой 61-75 кДа. Уровень его в крови здоровых женщин не превышает 20 мкг/л [14,17].

Сравнительное небольшое повышение АФП может быть обнаружено в крови при различных состояниях, сопровождающихся повреждением печени гепатотоксинами или ранением печени при операциях [1,2].

По-видимому, такую стимуляцию выработки АФП дает и РЯ, сопровождающийся интоксикацией и исключительной способностью к метастазированию.

В онкогинекологии особую ценность АФП представляет при диагностике злокачественных герминогенных опухолей яичников.

Уровень АФП при РЯ незначительно превышает уровень 30 мкг/л, который наблюдается при раке желудочно-кишечного тракта, гепатитах, циррозе печени и других заболеваниях. Появление в крови большого количества АФП (10000-100000 мкг/л) характерно для первичного гепатоцеллюлярного рака и тератокарциномы яичника.

Высокий уровень АФП наблюдается и при опухолях других локализаций, но гораздо чаще: при раке поджелудочной железы (24%), желудка (15%), желчных путей (25%), пищевода (3%), толстой кишки и почки (3%), колоректальном раке и раке легких (5 - 7%). Поражение печени метастазами опухолей желудочно-кишечного тракта также сопровождается повышением уровня АФП у 9% больных. При этом концентрация АФП колеблется у этих больных в пределах 100-500 нг/мл [17,14].

СА 125 - углеводный опухолево-ассоциированный поверхностный дифференцированный антиген (АГ), который синтезируется в фетальной ткани эпителиальными клетками вторичной полости. Этот антиген относится к высокомолекулярным гликопротеинам с молекулярной массой 50000 кДа. СА125 обнаруживается в клеточных линиях серозных карцином яичников и в некоторых участках серозных аденокарцином, но не в муцинозных карциномах яичников. Антиген получен из клеточной линии РЯ человека [18].

Показатели СА 125 у 97,2% здоровых людей не превышают 35 Ед/л. У 83% больных РЯ уровень СА 125 выше 35 Ед/л и составляет 145 ± 19 Ед/л [19,13]. Повышение и снижение уровня СА 125 коррелирует с прогрессией или регрессией заболевания. Анализ данных показал, что у всех пациенток с уровнем СА 125 менее 1/2 ДК (ДК - дискриминационная концентрация маркера, равная 35 Ед/мл)

РАННЯЯ ПРОТЕОМИКА РАКА ЯИЧНИКОВ.

и ежемесячным приростом менее 20% от предыдущей величины, рецидива в ближайшие 6 мес, не наблюдалось. Если прирост превышал 20%, рецидив был диагностирован через 4-6 мес. Чувствительность СА 125 при рецидиве заболевания составила 97%. При полной ремиссии в отсутствие опухоли уровень СА 125 должен быть близок к нулю [13]. Использование СА 125 позволяет не только диагностировать наличие рецидива с достаточно высокой точностью, но и прогнозировать дальнейшее развитие заболевания.

Учитывая, что точность диагноза "рака яичников" в группе больных с опухолями яичников составляет - 77,3% при чувствительности на "рак" - 85,7% и специфичности на "не рак" - 62,5%, определение СА 125 используется для обследования групп высокого риска, а также с целью дифференциальной диагностики с другими заболеваниями [19].

До сих пор строгой специфичности для опухолевого поражения яичников, к сожалению, подтвердить не удалось, так как в единичных случаях высокая концентрация СА 125 была выявлена при остром воспалении придатков, при раке поджелудочной железы, прямой кишки и молочной железы. Обнаружено, что концентрация маркера повышается при заболеваниях, связанных с поражением серозных оболочек: экссудативном плеврите, асците, перикардите, перитоните, хроническом панкреатите, гепатите, циррозе печени с асцитом, в третьем триместре беременности, при патологии слизистой матки, эндометриозе, кисте яичника, при аутоиммунных заболеваниях. Но, несмотря на это, СА 125 можно считать относительно избирательным маркером опухолевого поражения яичников.

При исследовании сывороток крови больных с I ст. заболевания содержание маркера колеблется в пределах нормы, что ставит под сомнение целесообразность определения СА 125 у больных с целью ранней диагностики, тогда как в случае развившегося рака на более поздней стадии СА 125 обнаруживается в 80% случаев.

Чрезвычайная сложность проблемы РЯ требует более точных и принципиально новых критериев, характеризующих особенности развития данной патологии.

В 1995-2000 годах в биологии возник новый раздел - протеомика. Методы, используемые в протеомике позволяют практически тотально инвентаризировать все белки, синтезируемые клеткой, а также выявлять их посттрансляционные модификации. Сравнение протеомных карт различных клеток в норме и при патологии позволяет расшифровать механизмы, участвующие в развитии патологических реакций, в основе которых лежит подавление или стимуляция синтеза отдельных белковых компонентов клетки, а также изменения их посттрансляционных модификаций. Специфичность протеомного анализа позволяет регистрировать развитие патологических процессов на ранних этапах без видимых симптомов заболевания и идентифицировать новые мишени для лекарств, а также для разработки новых диагностических подходов.

Протеомика включает в себя: 1) различные методы разделения белков, в том числе двумерный электрофорез 2) масс-спектрометрическую идентификацию молекулярной массы и чтения последовательностей разделенных белков 3) анализ полученных результатов методами биоинформатики.

Таким образом, эти технологии позволяют выявлять тонкие изменения белкового состава не только в тканях самих органов, но и в сывороточных белках на ранних стадиях опухолевых процессов.

Однако при протеомном анализе существует ряд проблем.

Так, биоптат, полученный от больного, как правило, содержит неоднородную ткань. В него, помимо опухолевых клеток, входит и эндотелий сосудов, а также он может включать и другие ткани. Эти примеси увеличивают количество анализируемых белков в сотни и тысячи раз, на фоне которых опухолевые маркерные белки (или белки-мишени) могут теряться. Кроме того, разделение сывороточных белков методом двухмерного электрофореза затруднено из-за большого количества альбумина и иммуноглобулинов, которые также могут маскировать белки мишени, содержание которых в плазме в тысячи раз меньше [20].

В связи с этим в настоящее время для анализа биопсийного материала применяется лазерная микродиссекция, позволяющая прицельно забирать только опухолевые клетки, а также система белковых чипов с масс-спектрометрической детекцией, основанной на механизме SELDI (поверхностно-усиленная лазерная десорбция). Последняя позволяет избежать перегрузки доминирующих белков в пробе путем хроматографического разделения белков в микрочипе.

Ученые из Национального совета по здравоохранению и медицинским исследованиям Австралии провели исследование, объединяющее лазерную микродиссекцию эпителиальных опухолевых клеток с электрофорезом, для выявления белковых маркеров раковых клеток яичников. Было представлено по два двумерных электрофореза, сделанных для биоптатов из пяти микродиссекций РЯ (3 инвазивных РЯ и 2 неинвазивных РЯ с низким потенциалом малигнизации) [21]. Впоследствии было проведено сравнение двумерных электрофорезных карт, приготовленных из лизатов после микродиссекции. Гели, приготовленные из проб больных с I стадией РЯ, взятых у больных с низкодифференцированным и высокодифференцированным раком, отличались друг от друга. 13 белков присутствовали во всех трех случаях высокодифференцированного рака и отсутствовали или очень слабо экспрессировались в низкодифференцированных опухолях; 10 белков, наоборот, были найдены только в пробах низкодифференцированных опухолей. Из этих 23 белков, отличающихся в пробах, взятых из низкодифференцированных и высокодифференцированных опухолей, 6 белков, присутствующих только в низкодифференцированных опухолях, в дальнейшем были идентифицированы с помощью масс-спектрометрии, после чего их наличие было подтверждено Western-blot анализом. Дальнейший анализ показал, что белки FK506, RhoGDI и гликолиза 1 специфичны и уникальны для инвазивного рака по сравнению с неинвазивным. На эти белки были получены антитела (АТ), с помощью которых вышеперечисленные белки были идентифицированы в крови, взятой у больных с инвазивным раком.

Таким образом, эти специфические маркеры опухолей могут быть основой для диагностических наборов или быть терапевтической мишенью.

Белок RhoGDI участвует в апоптозе раковых клеток, а также в инвазии и метастазировании.

FK 506 кДа связывающий белок присутствует в виде нескольких форм с молекулярной массой 12, 25, 52 кДа. Функция каждой из форм активно исследуется.

Ученые из Национального института рака (США), используя выше перечисленные маркеры, разработали надежный тест ранней диагностики РЯ [22]. Были взяты пробы крови у 116 женщин с объемными образованиями брюшной полости и проведен их анализ. На основании этого теста у 50 женщин был обнаружен РЯ, включая 18 случаев РЯ первой стадии. Также обнаружилось, что у 63 из 66 здоровых женщин нет рака, а в остальных 3 случаях (5%) был поставлен ошибочный диагноз. Основным успехом данного метода явилось определение пациентов с ранней стадией развития РЯ. Ученые утверждают, что для проведения теста необходима капля крови и результат будет получен через 30 минут. Данный тест может быть также использован и для идентификации других типов рака, хотя он еще не получил широкого распространения и пока недоступен для использования в клинике. Если этот анализ внедрить как скрининговое исследование, впоследствии его можно будет использовать у женщин с высоким риском развития заболевания.

Как видно из приведенного выше примера, методы, используемые в протеомике, вполне успешно можно применять для поиска новых маркеров не только РЯ, но и других заболеваний.

Кроме того, очень редко встречаются маркеры строго специфичные для той или иной патологии. В связи с этим поиск новых белковых маркеров для диагностики, а также белков мишеней для разработки новых терапевтических подходов в лечении РЯ является крайне актуальной проблемой на сегодняшний день.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисенко С.А., Прокопенко П.Г. (1986) Опухоли яичников, с.61-69.
2. Бохман Я.В. (1989). Руководство по онкогинекологии, с.123-131.
3. Жордания К.И. (1998) Совр. онкология, 2, 52-55.
4. Emmert-Buck M., Gillespie J., Paweletz C. (2000) Mol. Carcinog. 27, 158-165.
5. Kennedy A, Hart W. (1996) Cancer. 78, 278-286.
6. Keller D, Zeng X, Wand W, Zhand Q. (2001) Mol. Cell., 7, 283-292.
7. Сосновская И.Ю., Умникова Н.И., Бобров М.Я. (2000) V Всерос. съезд онкол. с.418-419.
8. Гедерим М.Н. (2000) Факторы прогноза при начальных стадиях рака яичников. Автореф. дисс. канд. наук, 32.
9. De Priest P, Gallion H, Pavlik E. (1997) Gynecol. Oncol. 65, 408-414.
10. Бохман Я.В., Гарманова Н.В., Теличенас А.И. (1981) Новые методы диагностики и лечения в онкогинекологии, 52-58.
11. Панченко С.В., Жордания К.И. (2000) Матер. V Всерос. съезда онкологов, с.110-129.
12. Жордания К.И. (1992) Оптимизация диагностики и лечения рака яичников. Дисс. докт.наук, 153.
13. Шелепова В.М., Порханова Н.В. (1997) Вест. онкол. науч. центра. РАМН. 1, 21-25.
14. Прокопенко П.Г. (1993) Идентификация и иммунохимическое тестирование белковых маркеров рака яичников. Дисс. докт.наук, 195.
15. Bonner R, Cole K, Pohida T. (1997) Science. 278, 1481-148.
16. Essman F, Wieder T, Otto A. (2001) J.Biochem. 346, 777-782.
17. Макаров О.В., Борисенко С.А. (1996), Профилактика, диагностика и лечение рака яичников. Методическое пособие. 3, 36-40.
18. Neubauer G, King A, Rappsilber J, Calvio C. (1998) Nat. Genet., 20, 46-50.
19. Макаров О.В. (1990) Патогенетические основы диагностики и лечения рака яичников. Дисс. докт.наук, 118.
20. Banks R, Dunn M, Forbes M. (1999) Electrophoresis. 20, 689-700.
21. Keller D, Zeng X, Wand W, Zhand Q. (2001) Mol. Carcinog. 24, 248-253.
22. Liotta L., Hensley M. (2001) Nat. Genet. 13, 115-124.

Поступила 03.09.02.

EARLY PROTEOMICS OF OVARY CANCER: MYTH OR REALITY.

O. V. Makarov¹, V. M. Govorun², I. N. Taranets¹, E. I. Goufman², A. N. Gritsa², A. I. Archakov²

¹Russian State Medical University, Moscow

²Institute of Biomedical Chemistry Russian Academy of Medical Sciences 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; fax:(095)245-0857

³Russian Research Centre for Oncology Russian Academy of Medical Sciences

Literature data summarizing new approaches and importance of early ovary cancer diagnostics have been reviewed. Alpha-feta-protein (AFP) and SA125 were the most reliable markers for determination of early ovary cancer stages. Nevertheless, these markers don't reflect the disease stage, malignance and they don't possess sufficient specificity. New methodical approaches have recently been introduced. They include combination of 2-D electrophoresis with mass-spectrometry. These methods allow to inventory and identify almost all proteins of various tissues. Using these methods for scanning proteins from biopsies of ovary cancer tissues new markers have been discovered.

Key words: ovary cancer, 2D-electrophoresis, mass-spectrometry, marker proteins.