



ЭКСПРЕССИЯ ОПУХОЛЬ АССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКА

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

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина, РАМН, Москва

EXPRESSION OF THE TUMOR-ASSOCIATED PROTEINS IN THE OVARIAN CANCER

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

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

With the help of monoclonal antibodies (MCA-1, MCA-3, G1 class immunoglobulins) and polyspecific antiserum (As) by means of immunoblotting (IB) the increase of the expression of the tumor-associated proteins (TAP) in the samples of the tumor tissues (in 94, 55 and 38% respectively), metastatic lymph nodes — LN(m+) and sera of the patients with ovarian cancer (OC) (in 82, 77 and ~100% of the cases, respectively), was detected. The important feature of As was the reactivity with the samples of the LN (m+) on the numerous proteins (>5-10) in 78% of the patients. The statistical analysis of the data using Student t-criterion revealed the significant differences (MCA-1, MCA-3) in the expression of the markers in the tumor tissues and blood sera of the oncological patients comparing with the samples of the adjacent tissues, blood sera of the patients with the other tumor localization and healthy donors ($p < 0,05$). The further research using a larger amount of the clinical material and development of the more precise quantitative immunoenzyme analysis to measure TAP, is needed. It is possible that detection of TAP using MCA-1 and As may serve a basis for the creation of the test-system for the immunodiagnostics of the OC and determination of the stage of the tumor process.

Рак яичников (РЯ) занимает ведущее место по смертности среди онкогинекологических больных. Ранняя диагностика рака яичника трудна, так как до настоящего времени не существует специфических диагностических тестов, позволяющих выявить опухоль на начальных этапах развития [1]. Несмотря на кажущееся обилие опухолевых маркеров, современным тестом при РЯ является определение СА-125.

СА-125 — высокомолекулярный гликопротеиновый комплекс, который выявляется в сыворотках больных более чем при 80% всех немужских эпителиальных опухолей яичника серозной, эндометриоидной или низкодифференцированной клеточной гистологии. Попытки выделить низкомолекулярные варианты СА-125 оказались безуспешными [2, 3].

Недостатками способа с использованием СА-125 как маркера для ранней диагностики и уточнения распространенности процесса являются:

- 1) высокий процент ложноотрицательных результатов — от 30—49 до 70—85%;
- 2) высокий процент ложноположительных результатов — 20—22%;
- 3) низкая частота выявления маркера на ранних стадиях (I и II стадиях) заболевания. По данным авторов, у 30% больных при II и у 50% — при I стадии выявить опухоль с помощью СА-125 не представляется возможным [1—5];
- 4) невозможность использования СА-125 для выяснения распространенности процесса на ранних стадиях по той же причине.

Полученные различными авторами результаты подтверждают важную роль первичной

оценки распространенности опухолевого процесса у больных с так называемыми ранними стадиями заболевания (I и II стадиями). Показано, что рецидив заболевания возникает примерно у 40% больных с клинически установленной I стадией заболевания, что свидетельствует о меньшей частоте случаев распространенности опухоли на I стадии [1].

Другим маркером РЯ, помимо СА-125, является опухольассоциированный гликопротеин TAG-72 — муциноподобный высокомолекулярный белок с молекулярной массой 220—400 кД. Он используется в качестве дополнительного маркера у больных муцинозным РЯ, сопровождающимся низким уровнем СА-125 [6]. Однако повышенный сывороточный уровень TAG-72 выявлен также у больных раком желудка (РЖ) и раком молочной железы (РМЖ), и полагают, что маркер может быть использован для мониторинга и прогноза при этих формах патологии [6, 7].

Другим новым потенциальным маркером РЯ является белок — продукт гена WEDC2 (HE4), который амплифицирован в тканях РЯ. Белок выявлен иммуноферментным методом в 80% сывороток крови больных РЯ с 95% специфичностью в большинстве серозных РЯ (на III—IV стадиях болезни) [8].

Повышенная экспрессия и активность семейства Src РТКs (протеинтирозинкиназ — ПТК) обнаружена в некоторых опухолях человека, включая и РЯ [9]. Семейства Src и Fyn РТКs занимают важное место во многих биологических процессах, включая транскрипцию гена, прогрессию опухоли, клеточную адгезию и метастазирование. Обнаружено, что Src-подобные протеинтирозин-

киназы p53/56 lyp совместно с гликопротеином Thy1 формируют комплексы и с другими протеин-тирозинкиназами и/или их субстратами. Эти комплексы имеют огромную молекулярную массу (>10 МДа). Кроме того, FceRI ассоциируется с Src-родственными ПТК p53/56 lyp и перекрестно реагирует с другой им же индуцированной ПТК — pp60 c-Src. Эти и другие киназы фосфорилируют клеточные субстраты, включая бета-и гамма-субъединицы FceRI, pp72 [10]. Также, исследуя активность РТКs, другие авторы заключили, что ее снижение угнетает рост РЯ человека (модель была воспроизведена на nude-мышях) [9].

В качестве новых потенциальных маркеров рассматривают тканевые каликреины, так как обнаружены их повышенные сывороточные уровни у больных РЯ. Однако уже установлено — чувствительность реакции даже в сочетании с СА-125 у этих маркеров не превышает 73% у больных всех стадий РЯ [11].

Цель настоящей работы — исследование методом иммуноблоттинга (ИБ) распределения опухольассоциированных белков (ОАСБ) в образцах опухолевых тканей, в условно нормальных тканях (УНТ), тканях лимфатических узлов (с метастазами и без метастазов) — ЛУ(м+) и ЛУ(м-), сыворотке крови у больных РЯ как для характеристики опухоли, так и для исследования возможностей использования полученных данных для диагностики, прогноза и/или мониторинга.

Материалы и методы

Образцы опухолевых тканей и ткани, взятые на расстоянии 5 см от опухоли, получены из отдела патологической анатомии; сыворотки больных и здоровых доноров — из лаборатории биохимии НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Данные по гистологическим диагнозам, распределению по стадиям опухоли и проведенному лечению больных получены из архивов патологоанатомического отдела и НИИ клинической онкологии. Исследовано 32 образца опухолевых тканей яичника. Возраст больных колебался от 33 до 75 лет. Аденокарциномы РЯ были представлены серозной ($n=17$), муцинозной ($n=2$), эндометриоидной ($n=3$) и другими гистологическими формами ($n=10$). Исследованы также ткани ЛУ(м+) ($n=15$), доброкачественные опухоли яичников ($n=4$), УНТ ($n=6$). С учетом стадии заболевания больные распределились следующим образом: I ($n=7$), II ($n=2$), III ($n=20$) и IV ($n=1$). Среди образцов опухолевых тканей 2 образца было от больных после проведенной ранее химиолучевой терапии. В работе использованы также ткани опухолей с другой локализацией: РМЖ ($n=3$), рак легкого (РЛ, $n=1$), рак почки (РП, $n=2$), рак кишечника ($n=1$), рак пищевода ($n=1$) с соответствующими УНТ.

Получение лизатов клеток. Для получения лизатов образцы опухолевых тканей, ткани ЛУ и УНТ обрабатывали с использованием буфера, содержащего 100 ммоль/л NaCl, 0,1% SDS, 10 ммоль/л трис-HCl (pH7,5), 1 ммоль/л ЭДТА, 0,5% тритон, 1 ммоль/л PMSF, 0,02% азида натрия. Лизаты центрифугировали при 10 тыс. г в течение 10 мин [12].

Сыворотки крови больных. Для поиска мембранных белков сыворотки крови подвергали ультрацентрифугированию при 125 тыс. г в течение 1 ч. Осадок растворяли в буфере для нанесения образцов с 2% 2-β-меркаптэтанолом (2-ME) и подвергали электрофорезу в 8% ПААГ по U.K. Laemmli [12, 13]. В работе были использованы также сыворотки здоровых доноров (ЗД) и больных с соматическими заболеваниями (СЗ, $n=10$).

Антисыворотки. Антисыворотка Ас-1 получена к 3М KCl-экстракту клеток HEp-2 (карцинома гортани, HeLa-подобная); Ас-2 — к полосе преципитации между Ас-1 и образцом УНТ слизистой оболочки желудка человека [12, 14]; Ас-4 (мышинная) — к белкам из 2 образцов РЯ человека. Мышам четырехкратно вводили в область шеи препарат белка, состоящий из пула двух образцов РЯ (цистаденокарциномы), по 100 мкг на инъекцию. Через неделю после последней инъекции брали кровь из орбитальной вены, предварительно усыпив мышей эфиром.

Меченные ФИТЦ и пероксидазой антисыворотки к иммуноглобулинам кролика мыши получены из ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи.

Моноклональные антитела. МКА-1 (1F3-2D4) и гибридомы — 4B8, 2D7, 1D3, 4C6 (мышинные, IgG1) — получены к мембранным белкам клеток HEp-2 [12, 14]; МКА-3 — к аффинно-очищенным (с использованием Ас-2) белкам из образца УНТ слизистой оболочки желудка человека. Асциты получены с помощью введения гибридомных клеток мышам BALB/c, предварительно обработанных 0,5 мл пристана. Фракции иммуноглобулинов, выделенные из асцитов, очищали с помощью ионнообменной хроматографии и использовали в дальнейшей работе.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Для проведения ИБ 10–20 мкл образца, содержащего 50–70 мкг белка и 2–10 мкг сыворотки крови из разведения 1:100, в буфере, содержащем 2% 2β-ME и 2% ДСН, подвергали электрофорезу в 8% ПААГ по U.K. Laemmli. Белки переносили на нитроцеллюлозный фильтр «Hybond-C-Extra» (Amersham, Великобритания) в электрическом поле напряжением 2 В/см в течение 20 ч. Фильтры с белками обрабатывали по общепринятой методике. Ас-4 и МКА использовали в разведении 1:2000. Выявление реакции МКА и Ас-4 с белками было проведено с использованием вторых биотинилированных

ных антител или по методике ECL⁺ в соответствии с протоколом Amersham Pharmacia Biotech (Швеция) [12, 14].

Гистохимический метод. Криостатные срезы фиксировали 4% параформом на 0,1 М фосфатном буфере (забуференный физиологический раствор — ЗФР) с 0,5% пикриновой кислотой в течение 15 мин. Срезы инкубировали во влажной камере с Ас-4, МКА-1 в разведении 1:100 при 4°C и после отмывки ЗФР обрабатывали антителами, меченными ФИТЦ.

Статистическая обработка. Определение достоверности различий проводили по *t*-критерию Стьюдента между данными по выявлению ОАСБ в опухолевых тканях яичника, сыворотках крови больных по сравнению с УНТ и сыворотками крови ЗД и больных с СЗ [15]. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Проведено исследование по выявлению ОАСБ с помощью МКА-1, МКА-3 и Ас-4 методом ИБ в образцах тканей РЯ, в УНТ и в тканях ЛУ(м+) и ЛУ(м-). Интенсивная и умеренная реакция по р34 (один из ОАСБ, выявленных нами ранее) [12, 14] методом ИБ с помощью МКА-1 обнаружена в 30 (94%) из 32 образцов тканей больных РЯ. В УНТ интенсивная реакция отмечена в 2 (33%) из 6 случаев. Отсутствие реакции МКА-1 с р34 часто сопровождалось появлением белков р28-29 кДа (рис. 1, табл. 1).

Позитивная реакция выявлена в серозном РЯ в 16 (94%) из 17 образцов, в 1 из 2 образцов муцинозного РЯ, во всех 3 случаях эндометриоидного рака, в 10 из 10 образцов РЯ другого гистологического типа, в 14 (93%) из 15 случаев метастазов РЯ в ЛУ. Позитивная реакция обнаружена у всех больных I—II стадией (I стадия — в 7 из 7 образцов, II стадия — в 2 из 2 случаев) и в 18 (90%) из 20 образцов тканей у больных III стадией. Положительная реакция по этим белкам отмечена также у больной IV стадией. В 23 (77%) из 30 случаев у больных III ста-

дией выявлена сочетанная реакция в образцах опухолевых тканей не только по р34, р25—28, но и по р30—33, р34—36 (возможно, это изоформы р34). Была обнаружена позитивная реакция и по другим эпитопам (р72—74, р137, р250, р>250 — множественные белки) в 20 из 30 (67%) образцов опухолевых тканей.

На рис. 1, а показана позитивная реактивность для МКА-1 и Ас-4 с р34 из образца РЯ. В других образцах РЯ Ас-4 реагирует позитивно еще и с низкомолекулярными компонентами — р14—16. Не выявлено положительной реакции с ОАСБ из образца РЯ с помощью других гибридом.

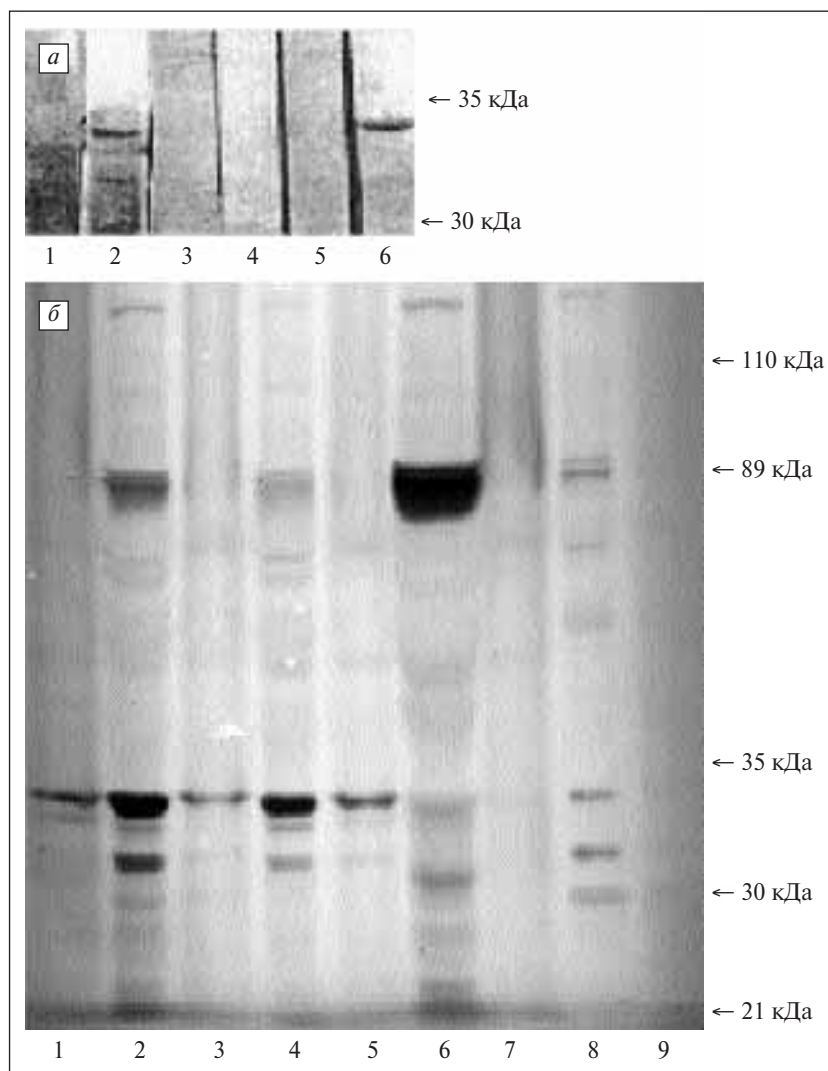


Рис. 1. Выявление ОАСБ в образцах опухолевых тканей и сыворотках крови онкологических больных методом ИБ с помощью: а — Ас-4, МКА-1 и других гибридом; б — МКА-1 в редуцирующих и нередуцирующих условиях. образцы 2, 6 — р34-38 выявлены в образце опухолевой ткани яичника с помощью Ас-4 и МКА-1 соответственно; 1, 3, 4, 5 — другие гибридомы — 4В8, 2Д7, 1Д3, 4С6; образцы: 1 — карцинома яичника № 7 (серозный двусторонний рак, Т1сN × M0); 2—5 — метастазы и карцинома яичника № 5 (двусторонняя малодифференцированная цистаденокарцинома, Т3N × M0) в редуцирующих (2, 4) и нередуцирующих (3, 5) условиях соответственно; 6—9 — метастазы и карцинома яичника № 4 в редуцирующих и нередуцирующих условиях (гранулезоклеточная опухоль, Т1N × M0) соответственно

На рис. 1, б показана позитивная реакция в районе р34, выявленная с помощью МКА-1 с образцами карцином яичника №7, 5 (с метастазами в редуцирующих), и не выявлено позитивной реактивности по каким-либо белкам в нередуцирующих условиях. Помимо р34, в 2 образцах карцином (№5 и 4) и их метастазах выявлены р72—74 только в редуцирующих условиях. Интенсивность реакции по р34, р72—74 в редуцирующих условиях в образце ткани метастаза была больше, чем в нередуцирующих условиях.

Ранее нами показано, что при исследовании образцов опухолевых тканей с другой (нежели РЯ) локализацией с помощью МКА-1 позитивная реактивность была выявлена в 47% случаев [12, 14]. Таким образом, специфичность выявления ОАСБ с помощью МКА-1 составляет 53%.

Умеренная положительная реакция отмечена в 2 (33%) из 6 образцов УНТ яичника и в 1 (25%) из 4 образцов доброкачественных опухолей яичника. Сравнение данных по выявлению ОАСБ в опухолевых тканях яичника с помощью МКА-1 с выявлением ОАСБ в УНТ и тканях доброкачественных опухолей показало, что различия в экспрессии ОАСБ статистически достоверны ($p=0,015$ и $p=0,002$ соответственно).

С помощью Ас-4 было исследовано 19 образцов тканей РЯ и в 9 (47%) из них обнаружена позитивная реакция по р14, р25—28 и/или р53. Умеренная и интенсивная реакция выявлена в 9 (60%) из 15 образцов серозного РЯ, в 11 (92%) из 12 образ-

цов ЛУ(м+) и не отмечена ни в одном из 4 образцов опухолей другого гистологического типа. Позитивная реакция обнаружена в тканях ЛУ(м-) у 1 из 2 больных I стадией болезни (гистологическое исследование не выявило метастатических клеток), в образце тканей ЛУ(м+) — у больной II стадией и во всех 9 образцах тканей ЛУ(м+) — у больных III стадией. Позитивная реакция по ОАСБ отмечена у 3 (50%) из 6 больных I стадией, у 6 (55%) из 11 больных III стадией и не выявлена в образцах тканей ($n=2$) доброкачественных опухолей яичника и в УНТ ($n=2$). Позитивная реакция, помимо р14, р25—28, в образцах тканей ЛУ(м+) у больных III стадией выявлена и по другим эпитопам: в большинстве случаев (7 из 9, 78%) это были множественные белки — 14, 28—30—39, 48—53, 250—300 кД. При этом отсутствие позитивной реакции в 2 случаях, по-видимому, было обусловлено лечебным патоморфозом в тканях после проведенного химиотерапевтического лечения. Множественные белки не были обнаружены в тканях ЛУ(м+) и ЛУ(м-) у больных I—II стадией болезни.

Следовательно, наличие множественных белков в тканях ЛУ находится в прямой зависимости от стадии заболевания и, возможно, свидетельствует о метастатическом процессе. Сравнение данных по выявлению множественных ОАСБ в ЛУ(м+) с помощью Ас-4 у больных III—IV стадией с выявлением этих белков у больных I—II стадией показало, что различия в экспрессии множественных ОАСБ в этих группах статистически достоверны ($p=0,0001$, $p<0,05$). Позитивная реактивность с ОАСБ в образцах опухолевых тканей с другой (нежели РЯ) локализацией с помощью Ас-4 обнаружена в 4 (24%) из 17 образцов. Исходя из этого специфичность выявления ОАСБ с использованием Ас-4 составила 76%, чувствительность выявления ОАСБ для больных РЯ I—II стадии — 38% (для I стадии — 50%) — см. рис. 1, табл. 2.

С помощью МКА-3 было исследовано 12 образцов тканей РЯ и 5 — тканей ЛУ. Позитивная реактивность по р14, р53, р~250 в опухолевых тканях выявлена в 6 из 12 (50%) образцов и во всех 4 образцах ЛУ(м+). Следует отметить, что в ЛУ(м-) отмечена лишь слабая реактивность по р53(+) и р~250. Во всех случаях выявлен р~250 — и в тканях РЯ, и в ЛУ(м+). Множественные белки ($n>3$) обнаружены в 2 из 4 образцов тканей ЛУ(м+) (с эти-

Таблица 1. Выявление экспрессии ОАСБ с помощью МКА-1 методом ИБ в образцах опухолевых тканей у больных РЯ и сравнение с выявлением их в УНТ и тканях доброкачественных опухолей яичника

РЯ, гистологические типы, стадии болезни	Число позитивных случаев (р34, р25—28 кДа)
Аденокарциномы	
серозная	16/17 (94%)*
муцинозная	1/2
эндометриоидная	3/3
другие типы	10/10
Метастазы	14/15 (93%)*
Стадии TNM**	
T I	7/7
T II	2/2
T III	18/20
T IV	1/1
Всего исследовано образцов тканей РЯ	30/32 (94%)**
УНТ яичника	2/6 (33%)***
Ткани доброкачественных опухолей яичника	1/4 (25%)***

Примечание. Здесь и в табл. 2—3: в числителе представлено число положительно реагирующих образцов, в знаменателе — общее количество образцов, * % позитивной реактивности; ** TNM-стадии по международной классификации гинекологов FIGO (1988); *** различия в выявлении белков между опухолевыми тканями и УНТ, доброкачественными опухолями яичника — статистически достоверны ($p<0,05$).

ми же белками была отмечена позитивная реактивность у МКА-1 и Ас-4). Множественные белки ($n > 3$) были выявлены также с помощью МКА-3 в 3 из 17 образцов (~18%) в опухолях других локализаций. Таким образом, чувствительность выявления ОАСБ в тканях РЯ с помощью МКА-3 составляет 50%, а специфичность — 82%. Сравнение данных по выявлению ОАСБ в тканях РЯ с помощью Ас-4 и МКА-3 с выявлением ОАСБ в УНТ и тканях доброкачественных опухолей показало, что различия в экспрессии ОАСБ статистически недостоверны ($p > 0,05$) — см. табл. 2.

С помощью МКА-1 было исследовано 39 сывороток больных РЯ, позитивная реакция по р25—28, р48—53—55 выявлена в 32 образцах (82%), преимущественно у больных III стадией. Интенсивность реакции находилась в прямой зависимости от стадии болезни. При исследовании с помощью МКА-1 сывороток больных с другой локализацией опухоли позитивная реакция отмечена в 7 (28%) из 25 образцов по р48/р53—55 (+/++) у больных РМЖ и РЖ, по р48—55—65 — у больного РЛ и у одного больного с СЗ — по р50—60. В результате чувствительность выявления ОАСБ составила 82%, а специфичность — 72%.

В ультраосадках (УОС) всех 13 сывороток крови больных РЯ с помощью Ас-4 обнаружены

белки р48—53—55 кД; при этом в сыворотках больных ($n=25$) с другой локализацией опухоли белки р48—53—55 либо не были выявлены, либо отмечена очень слабая реактивность ($n=6$, 28%). С образцами сывороток крови больных I стадией РЯ реактивность Ас-4 была значительно меньше. Таким образом, чувствительность выявления ОАСБ с помощью Ас-4 составила ~100%, а специфичность — 72% (табл. 3).

С помощью МКА-3 было исследовано 13 образцов сывороток крови больных РЯ. Позитивная реактивность отмечена либо по р48—53—55 ($n=10$, 77%), либо по р53—55—65 ($n=3$). Однако умеренная положительная реактивность выявлена также в 9 из 29 образцов (31%) с другой локализацией опухоли: у больных РЖ ($n=2$), РЛ ($n=1$), РМЖ ($n=2$) и СЗ ($n=4$). Исходя из этого чувствительность выявления ОАСБ составила по предварительным данным 77%, а специфичность — 69%. Сравнение данных по выявлению ОАСБ в сыворотках больных РЯ с помощью МКА-1, МКА-3 и Ас-4 по сравнению с выявлением ОАСБ в сыворотках больных с другой локализацией опухоли и ЗД показало, что различия в экспрессии ОАСБ статистически достоверны ($p=0,0001$, $p=0,015$, $p=0,01$ соответственно, $p < 0,05$) — см. табл. 3.

Таблица 2. Выявление экспрессии ОАСБ с помощью Ас-4, МКА-3 методом ИБ в образцах опухолевых, условно нормальных тканей и тканей ЛУ у больных РЯ

РЯ, гистологические типы, стадии болезни	Число выявленных позитивных случаев	
	с помощью Ас-4 (р14 кДа)	с помощью МКА-3 (р14, р25—28 кДа)
Аденокарциномы		
Серозная	9/15 (60%)*	2/6 (33%)*
Муцинозная	—	—
Эндометриоидная	0/2	1/1
Другие типы	0/2	3/3
Метастазы	11/12 (92%)*	4/4
Стадии TNM		
T I	3/6 (50%)*	3/5 (60%)*
Мет. (м-)	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
T II	0/2	0/1
(м+)	1/1	1/1
T III	6/11 (55%)*	2/6 (33%)*
(м+)	9/9	3/3
T IV	—	—
Сочетания белков, выявленные в метастазах:		
р14, р25—28, р53	2/9 (22%)*	1/12 (8)*
множественные белки	7/9 (78%)**	2/4
(р34—36, р39, р43, р50, р125—135, р160, р250, р>250)		
Всего исследовано образцов тканей РЯ	9/19 (47%)*	6/12 (50%)*
УНТ	0/2 (0%)*	0/7 (0%)*
Доброкачественные опухоли яичников	$\frac{1}{4}$ (25%)*	Нд

Примечание. Здесь и в табл. 3—4: Нд — нет данных. *% позитивной реактивности; **1) отрицательные значения в выявлении множественных белков в 2 образцах метастазов связаны, по нашему мнению, в одном случае с преобладанием в ткани метастаза солидных структур, а в другом — с тем, что ткань была взята после проведения химиотерапевтического лечения; 2) различия в выявлении множественных белков в ЛУ(м+) у больных II—III стадией (7/9, 78%) и ОАСБ в ЛУ(м-) у больных I стадией (0/3, 0%, $p < 0,05$) статистически достоверны; *** различия в выявлении белков между опухолевыми тканями и УНТ и доброкачественными опухолями статистически недостоверны ($p > 0,05$); **** различия в выявлении белков между опухолевыми тканями и УНТ статистически достоверны ($p < 0,05$).

Таблица 3. Выявление экспрессии ОАСБ в сыворотках крови больных РЯ методом ИБ с помощью МКА-1, Ас-4, МКА-3 в зависимости от стадии болезни

Показатель	МКА-1	Ас-4	МКА-3
Стадии TNM*			
Т I	4/5	5/5	3/5**
Т II	1/1	1/1	1/1
Т III	25/31	7/7	7/7
Т IV	2/2	Нд	Нд
Всего исследовано образцов сывороток	32/39 (82%)*	0/13 (~100%)	10/13 (77%)**

Примечание. * % позитивной реактивности; ** еще с 2 образцами была выявлена позитивная реактивность по р53—55—65; *** позитивная реактивность МКА-3 с р48—53—55 (n=10), однако МКА-3 было позитивным и совместное использование этих данных с р53—55—65 (n=3) может дать ~100% положительной реактивности.

Методом непрямой иммунофлюоресценции на криостатных срезах с помощью МКА-1 выявлена позитивная реактивность с 2 образцами РЯ, а с помощью Ас-4 обнаружена положительная реакция в 3 образцах РЯ (серозная РЯ, n=2, и андробластома, n=1) по сравнению с 16 образцами тканей с другой локализацией опухоли. МКА-1 положительно реагировало также с ОАСБ опухолей другой локализации — с 6 (27%) из 22 образцов РЖ и соответствующими УНТ (рис. 2).

Учитывая полученные результаты, мы полагаем, что на начало заболевания (I стадия) указывают:

— реакция слабой и умеренной интенсивности Ас-4, обоих МКА (МКА-1 и МКА-3) с белками УОС сывороток больных — р48—53—55—(65) кД;

— отсутствие реакции Ас-4 и МКА-3 с множественными белками (р14, 25—28, 30—34, 53, 12—135, 150, 250, >250 кД) в образцах тканей ЛУ и опухоли (см. табл. 2).

О распространенности процесса (II, III и IV стадии) свидетельствуют:

— интенсивная реакция Ас-4 и МКА-1 с белками сывороток крови больных в районе р48—53—55 кД;

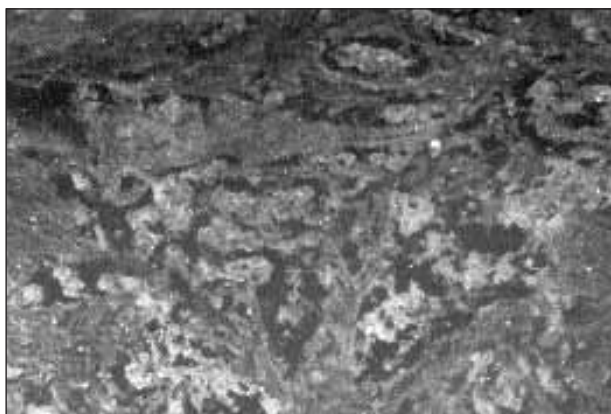


Рис. 2. Выявление ОАСБ на криостатных срезах опухолевых тканей яичника иммуногистохимическим методом с помощью МКА-1 (x 90). Позитивная реактивность МКА-1 с клетками опухоли яичника (андробластома)

— сочетанное выявление интенсивной реакции с белками сывороток крови р48—53—55—(65) кД с помощью МКА-1, МКА-3 и Ас-4;

— выявление позитивной реакции МКА-1, МКА-3, Ас-4 с множественными белками (р14, 25—28, 30—34, 53—55, 120—160, 250, >250 кД) в образцах тканей ЛУ(м+) (см. табл. 3).

При сопоставлении полученных результатов с данными клинического обследования по СА-125 обнаружено, что эти значения практически слабо отражают степень распространности процесса. Высокие уровни были отмечены как при I стадии болезни (740, 879, 1095 Ед/мл), так и при последующих (от 340 до 15 342 Ед/мл). Повышенный уровень СА-125 обнаружен также при доброкачественной опухоли яичника.

Обсуждение

Исследования последних лет показали, что при РЯ происходит нарушение регуляции экспрессии многочисленных калликреиновых генов [16, 17]. Тканевые калликреины (hK) кодируют 15 генов, tandemно расположенных на 19-й хромосоме (19q13,4) и имеющих значительную гомологию на уровне как генов, так и белков. Гены обозначают KLK, а кодирующие их белки — hK. Гены кодируют сериновые протеазы. По сравнению с СА-125 hK6 и hK10 считают более специфичными маркерами, так как повышение сывороточных концентраций этих протеаз не обнаружено при доброкачественных опухолях яичника. hK6 выявляют у 68% больных серозным, 33% — эндометриоидным и 9% — муцинозным РЯ. Специфичность одновременного исследования СА-125 и hK6 составляет 90%, при этом чувствительность при РЯ всех стадий — 72%, а при РЯ I—II стадий — 42%. Похожая специфичность (90%) и чувствительность (73%) обнаружены при одновременном исследовании СА-125 и hK10, также при РЯ всех стадий, а при РЯ I—II стадии чувствительность при той же специфичности составляет 51%. Экспрессия hK10 характерна для серозного РЯ поздних стадий [13, 18, 19] (табл. 4).

Сывороточные и тканевые уровни других hK (hK8, hK9, hK11, hK14) при РЯ также повышены. Однако уровни экспрессии этих hK меньше, чем в предыдущем случае, и часто сочетаются с повышенной экспрессией при опухолях с другой локализацией. Тканевая экспрессия hK еще недостаточно изучена и по имеющимся данным не превышает (как на уровне гена, так и на уровне белка) 55—60%. Для многих hK (hK2, hK3, hK5, hK6, hK14) показано образование комплексов с цирку-

Таблица 4. Характеристика чувствительности и специфичности выявления экспрессии известных биомаркеров (А) и сравнение с характеристиками экспрессии опухольассоциированных белков (Б)

Биомаркеры	Чувствительность, %		Специфичность, %
	I—II стадия	III—IV стадия	
А			
СА-125	83		52
СА-125 (при пороговом значении СА-125 35 Ед/мл)	65		97
hK6	90	Нд	52
	95		47
	21—26		
hK6+СА-125	72		90
	42		
hK10	54		90
hK10+СА-125	73	Нд	90
	51		
HE 4 (WFDC2)	Нд	80	96
Мультивариантная модель	83		94
Мультивариантная модель + СА-125	74		97
Тканевая экспрессия калликреинов (hK8, KLK4, KLK5, KLK9)	44—60		Нд
Б			
ОАСБ выявлены в сыворотке крови больных РЯ с помощью:			
МКА-1	82		72
МКА-3	77		69
Ас-4	~100*		76
ОАСБ выявлены в опухолевых тканях больных РЯ с помощью:			
МКА-1			
в опухолевых тканях	94	90	53
в ЛУ(м+)	~100*		
МКА-3			
в опухолевых тканях	55	33	82
в ЛУ(м+)	~100*		
Ас-4			
в опухолевых тканях	38 (для I стадии 50)	55	76
в ЛУ(м+)	92%53		

Примечание. (м+) — метастазы, обнаруженные гистологическим методом в ЛУ; * данные предварительные, учитывая небольшое количество исследованных образцов.

лирующими ингибиторами протеаз, что затрудняет их определение иммунологическими методами. На современном этапе полагают, что единственный опухолевый маркер не может предоставить всю необходимую информацию для диагностики, прогноза и мониторинга РЯ и, следовательно, классический опухолевый маркер РЯ — СА-125 — следует использовать с hK (hK6, hK8, hK10, hK11, hK14), а также с другими кандидатами в маркеры, чтобы расширить возможности ранней диагностики при этой патологии [7, 16, 17, 20, 21].

В настоящее время известны способы диагностики и прогноза у больных РЯ с использованием нескольких белков [3, 11]. Z. Zhang и соавт. (2004) предложили способ молекулярно-биологической диагностики РЯ. Авторами были открыты и рассмотрены в качестве биомаркеров аполипопротеин А1 (apolipoprotein A1), транстиретин (transthyretin — prealbumin) и ингибитор интер- α -трипсина, тяжелая цепь (human inter- α -trypsin inhibitor, heavy chain H4), и при чувствительности 83% модель имела специфичность 94%. Авторы считают, что это статистически более значимо, чем СА-125 при той же чувствительности 83%, которая может дать специфичность только 52%

(причем уровни Са-125 повышены только в 50% случаев у больных РЯ I—II стадиями). С другой стороны, было показано, что СА-125 при пороговом значении 35 Ед/мл имеет специфичность 97% и, соответственно, чувствительность 65%. При данной фиксированной специфичности использование мультивариантной модели (МВ-модели) и 3 биомаркеров в результате дает 74% чувствительности. Недостатками этого способа, по мнению авторов, являются трудности статистического анализа; кроме того, улучшение чувствительности в определении ранних стадий РЯ с помощью МВ-моделей также повышает ложноположительный результат среди больных с доброкачественными заболеваниями [11]. Авторы отмечают, что предложенный ими способ молекулярно-биологической диагностики РЯ очень сложен и дорог, поэтому не может быть использован для массового скрининга (см. табл. 4).

При сравнении характеристик чувствительности и специфичности выявления известных маркеров с ОАСБ было обнаружено, что чувствительность определения ОАСБ в сыворотке крови больных РЯ с помощью МКА-1 несколько ниже (82%), чем у СА-125 (83%) и у МВ-модели (83%),

а специфичность — выше (72%) по сравнению с СА-125 (52%), но ниже, чем у МВ-модели (97%). Чувствительность выявления ОАСБ с помощью МКА-3 и АС-4 составляет 77 и ~100% соответственно, однако эти данные — предварительные, поскольку образцов РЯ было исследовано мало (13), специфичность у обеих сывороток выше, чем у СА-125, но ниже, чем у МВ-модели и у некоторых hK (hK6, hK10, HE4), а чувствительность выявления последних — ниже, чем в нашей модели (см. табл. 4).

Обнаружение множественных белков в тканях ЛУ(м+) у больных РЯ с помощью Ас-4 является важной особенностью, способствующей, с нашей точки зрения, постановке диагноза и характеризующей распространенность процесса (II—IV стадии по международной классификации гинекологов FIGO, 1988).

Мы полагаем, что выявление ОАСБ с помощью МКА-1 и АС-4 (но не МКА-3, учитывая, что частота выявления множественных белков в ЛУ(м+) с помощью АС-4 — 78%, а у МКА-3 — только 50%) может служить основой создания тест-системы для иммунологической диагностики РЯ и установления стадии распространенности опухолевого процесса. Результаты по обнаружению ОАСБ, полученные с помощью МКА-3,

а также позитивные данные, полученные методом НИФ на срезах тканей РЯ, вероятно, могут служить дополнительным фактором, подтверждающим (при совпадении результатов с МКА-1 и АС 4) выявление ОАСБ при РЯ.

Таким образом, нами получено и охарактеризовано 2 МКА и Ас. С их помощью методом ИБ обнаружено повышение экспрессии ОАСБ в образцах опухолевых тканей, в ЛУ(м+) и сыворотках крови у больных РЯ. Статистическая обработка данных с использованием *t*-критерия Стьюдента выявила достоверные различия в экспрессии биомаркеров в опухолевых тканях (для МКА-1, МКА-3) и сыворотках крови онкологических больных по сравнению с образцами прилежащих тканей, сыворотками крови больных с другой локализацией опухоли и ЗД ($p < 0,05$).

Необходимы дальнейшие исследования с использованием большего количества клинического материала и разработка более точного количественного иммуноферментного анализа с целью измерения содержания ОАСБ при этой патологии и возможного использования полученных данных как для характеристики опухоли, так и для дополнительной иммунологической диагностики, первичной оценки распространенности опухолевого процесса, прогноза и/или мониторинга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жордания К.И. Злокачественные эпителиальные опухоли яичника. *Совр Онкол* 2000;2(2):51—5.
2. Skates S.J., Horick N., Yu Y. et al. Preoperative sensitivity and specificity for early-stage ovarian cancer when combining cancer antigen CA-125II, CA15-3, CA-72-4, and macrophage colony-stimulating factor using mixtures of multivariate normal distributions. *J Clin Oncol* 2004;22(20):4059—66.
3. Wong N.K., Easton R.L., Panico M. et al. Characterization of the oligosaccharides associated with the human ovarian tumor marker CA-125. *J Biol Chem* 2003;278(31):28619—34.
4. Atack D.B., Nisker J.A., Allen H.H. et al. CA-125 surveillance and second-look laparotomy in ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1986;154:287—9.
5. Bast R.C., Boyer C.M., Olt G.J. Ovarian cancer. Biological and therapeutic challenges. London; 1991. p. 265—75.
6. Galiotta A., Pizzi C., Pettinato G. et al. Differential TAG-72 epitope expression in breast cancer and lymph node metastases: a marker of a more aggressive phenotype. *Oncol Rep* 2002;9(1):135—40.
7. Gonzalez V.A.M., Duro G.F., Fraile B.B. et al. Prognostic value of the glycoprotein TAG-72 in patients with gastric cancer. *Int J Biol Markers* 2001;16(2):121—5.
8. Hellstrom I., Raycraft J., Hayden-Ledbetter M. et al. The HE4(WEDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:3695—700.
9. Wiener J.R., Nakano K., Kruzlock R.P. et al. Decreased Src tyrosine kinase activity inhibits malignant human ovarian cancer tumor growth in a nude model. *Clin Cancer Res* 1999;5(8):2164—70.
10. Hakak Y., Martin G.S. Ubiquitin-dependent degradation of active Src. *Curr Biol* 1999;9(18):1039—42.
11. Zhang Z., Bast R.C., Yu Y. et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for detection of early stage ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2004;64(16):5882—90.
12. Боброва Т.С., Чуев Ю.В., Морозов В.А. Иммунологические и биохимические характеристики семейства белков, ассоциированных с некоторыми карциномами человека. *Вестн РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. 2001; (3):25—31.
13. Боброва Т.С. Семейство калликреиновых генов человека: биология и роль в развитии рака яичников и других злобулеваний. *Вестн РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 2006;17(4):3—11.
14. Боброва Т.С., Морозов В.А., Чуев Ю.В., Жордания К.И. Семейство белков выявлено с помощью моноклональных антител 1F3-2D4 (IgG1-класса) в карциномах человека и их мета-стазах. *Рус журн «СПИД, рак и общественное здоровье»*. 2007;11(1):78—9.
15. Закс Л. Статистическое оценивание. Пер. с нем. В.Н. Варигина. М., Статистика; 1976. с. 129—53.
16. Kapadia C., Ghosh M.C., Grass L., Diamandis E.P. Human kallikrein 13 involvement in extracellular matrix degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323(3):1084—90.
17. Yousef G.M., Diamandis E.P. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev* 2001;22:184—204.
18. Ghosh M.C., Grass L., Soosaipillai A. et al. Human kallikrein 6 degrades extracellular matrix proteins and may enhance the metastatic potential of tumor cells. *Tumor Biol* 2004;25(4):193—9.
19. Luo L., Katsaros D., Scorilas A. et al. The serum concentration of human kallikrein 10 represents a novel biomarker for ovarian cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Res* 2003;63:807—11.
20. Borgono C.A., Grass L., Soosaipillai A. et al. Human kallikrein 14. A new potential biomarker for ovarian and breast cancer. *Cancer Res*. 2003;63:9032—41.
21. Yousef G.M., Polymeris M.-E., Grass L. et al. Human kallikrein 5: a potential novel serum biomarker for breast and ovarian cancer. *Cancer Res* 2003;63:3958—65.