

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ АДЕНОМИОЗА: СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ И ВОЗМОЖНЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

А. Сорокина, кандидат медицинских наук, **Г. Тотчиев**, доктор медицинских наук, профессор, **Р. Зиганшин**, кандидат медицинских наук, **Г. Арапиди**, РУДН, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
E-mail: anna_sorokina77@mail.ru

Гетерогенная клиническая картина, различная локализация эндометриодных гетеротопий, а также тяжесть жалоб отражают сложность патогенеза эндометриоза и позволяют предположить существование нескольких механизмов его развития. С помощью высокопроизводительных и чувствительных методов анализа экспрессии белков можно обнаружить изменения молекулярных реакций еще до клинических проявлений заболевания, что позволит раньше его диагностировать, а следовательно, и лечить, и прогнозировать его течение.

Ключевые слова: аденомиоз, масс-спектрометрия.

Эндометриоз — одна из наиболее загадочных проблем современной гинекологии. В структуре гинекологических заболеваний эндометриоз занимает 3-е место после воспалительных заболеваний и миомы матки, поражая до 50% женщин репродуктивного возраста. В последнее время отмечена тенденция к более быстрому прогрессированию и тяжелому течению заболевания именно у женщин этой возрастной категории. Возрастает число больных с «необъяснимым» бесплодием, у которых во время лапароскопии обнаруживают «малые формы» эндометриоза, нетипичные или микроскопические изменения, что свидетельствует о многообразии проявлений патологического процесса и наличии его латентных стадий.

Высказывается мнение, что «внутренний эндометриоз матки» — аденомиоз — следует считать совершенно самостоятельным заболеванием. При этом подчеркивают, что клиническая картина, диагностика, профилактика, методы лечения при аденомиозе имеют существенные особенности. Аденомиоз не может возникнуть в результате «ретроградной менструации» через маточные трубы, как утверждает одна из наиболее признанных теорий — имплантационная.

К сожалению, этиология и патогенез эндометриоза, несмотря на многочисленные исследования, остаются невыясненными. Нет, однако, сомнений в том, что эндометриоз является типичным представителем мультифакториальных заболеваний. В основе многих из них лежит нарушение молекулярных механизмов как синтеза, так и особенно транспорта многих регуляторных белков. Выдвижение этого постулата послужило основанием для присуждения в 2001 г. Нобелевской премии.

Определив специфичные для аденомиоза белки, можно создать инновационные методы его диагностики, прогнозирования и лечения, лучше понять механизм его развития, обосновать перспективы терапии.

Привлекательность использования плазмы (сыворотки) крови для диагностики заболеваний человека обусловлена главным образом тем, что она наиболее полно представляет фенотип человека, его состояние в конкретный момент [2]. Еще одно немаловажное достоинство плазмы (сыворотки) крови — ее доступность, поскольку она является самым применяемым в медицинской практике первичным клиническим образцом.

Из сывороточных маркеров эндометриоза в клинике чаще всего применяют СА-125. Установлено, что концентрация СА-125 в сыворотке крови больных эндометриозом повышается в лютеиновую фазу и во время менструации, а в фолликулиновую фазу остается неизменной. У здоровых женщин таких циклических колебаний не наблюдается. Однако увеличение продукции этого высокомолекулярного гликопротеина и повышение его уровня в сыворотке крови может происходить и при раке яичников, поджелудочной железы, легкого, желудочно-кишечного тракта [3], что широко используется в целях дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей яичников. Однако низкая специфичность метода вызывает определенный скепсис в отношении его дальнейшего распространения, что в полной мере относится и к аденомиозу.

У больных эндометриозом как в перитонеальной жидкости, так и в периферической крови повышено содержание С-реактивного белка и некоторых цитокинов, включая сывороточный амилоид А (SAA), фактор некроза опухоли- α (ФНО α), белок хемотаксиса макрофагов-1 (MCP-1), интерлейкины — ИЛ (ИЛ6 и ИЛ8), родственный хемокиновый рецептор-1 (CCR-1) [1]. Это еще раз свидетельствует о том, что эндометриоз — местное заболевание, но с системными клиническими проявлениями.

Вероятно, анализ экспрессии белков, определенных в сыворотке крови, интересен с точки зрения как дальнейшего изучения механизмов развития эндометриоза, так и диагностики.

В целях поиска в сыворотке крови новых маркеров эндометриоза логично использовать постгеномные методы анализа, среди которых ведущие позиции занимают протеомные технологии.

Для изучения молекул, вовлеченных в развитие аденомиоза, используют двухмерный электрофорез в полиакриламидном геле (2D-PAGE). В ходе исследования, недавно проведенного Zhang (2006), в сыворотке крови и эндометрии была обнаружена совершенно разная экспрессия 11 белков [31].

H. Liu (2007) анализировал экспрессию белков в аденомиотических нормальных тканях матки. Анализ выполнялся с использованием комбинации 2D-PAGE, масс-спектрометрии и биоинформатики. В аденомиотической ткани отмечалась дисрегуляция 12 белков, 10 из которых были успешно идентифицированы [10].

В ткани аденомиотического очага наблюдается высокая экспрессия 4 белков цитоскелета. Один из них — актин, основной компонент клеточных микрофиламентов, обеспечивающий подвижность клеток, передачу сигнала и синтез белка. Walter (2001) сообщил о наличии экспрессии актина стромальными клетками эндометриодных очагов [24]. Другой компонент цитоскелета с повышенной экспресси-

ей – тропомиозин, белок, связанный с клеточной трансформацией. Кератин-10 и цитokerатин-2 представляют собой двоянные субъединицы цитоскелета, образующие 1 димер. Н. Liu (2007) обнаружил повышение их экспрессии в очагах аденомиоза. Инвазивная природа аденомиоза может быть объяснена повышением продукции этих 4 белков цитоскелета в его очагах [10].

Предполагают, что активные формы кислорода или свободные радикалы могут повышать скорость роста и адгезию клеток эндометрия. Н. Lui (2007) обнаружил повышение содержания нового фермента пероксидазы человека (novel human peroxidase enzyme) у женщин с аденомиозом в сравнении с таковым в контроле [10], что можно расценить как свидетельство в пользу немаловажной роли окислительного стресса в развитии и прогрессировании аденомиоза.

Молекулы основного комплекса гистосовместимости I-го класса (MHC-I) играют важную роль в представлении антигенов и обеспечении Т-клеточного цитолиза. Антиген MHC-I доставляет активационные сигналы CD8⁺ Т-лимфоцитам путем связывания с Т-клеточным рецептором и вызывает цитотоксичность клеток, содержащих MHC-I [17]. Zhang (2006) обнаружил снижение экспрессии человеческого лейкоцитарного антигена (HLA)-ABC и D-рецепторов в периферической крови и перитонеальной жидкости больных с эндометриозом [30]. Xu и соавт. (2001) также выявили снижение экспрессии HLA I-го класса в очагах аденомиоза по сравнению с таковой в нормальном эндометрии [28]. Эти данные наряду с полученными Н. Lui (2007) указывают на нарушение антигенпрезентирования в очагах эндометриоза, что может вести к неадекватному удалению эктопического эндометрия и ускорению развития эндометриоза [10].

Белки теплового шока (БТШ) синтезируются клетками в ответ на физические и химические стимулы, включая тепловой шок, стероиды и окислительное повреждение. БТШ участвуют в процессах апоптоза, антигенпрезентировании, клеточной защите и канцерогенезе. Данные Н. Lui (2007) об уровне экспрессии БТШ-27 соответствуют полученным ранее результатам Ота (1997), обнаружившего более высокую экспрессию HSP27, чем в контроле, в нормально расположенном эндометрии у больных с аденомиозом и эндометриозом [10, 16]. Yu (2002) также определил заметно более высокую экспрессию HSP27, чем в контроле, в нормально и эктопически расположенном эндометрии при эндометриозе [30]. Аномально увеличенную экспрессию HSP27 при аденомиозе можно нормализовать путем терапии даназолом [18]. Это указывает на то, что возможно участие HSP27 в осуществлении иммунного ответа при развитии эндометриоза, а даназол действует как иммуномодулятор при лечении эндометриоза [25].

Фосфолипидатмутаза-1 и статин – 2 белка с высоким уровнем экспрессии в образцах, полученных от больных аденомиозом. Фосфолипидатмутаза-1 – фермент, участвующий в метаболизме глюкозы. Аномальная его экспрессия была обнаружена в различных опухолях [14]. Статин представляет собой высококонсервативный цитоплазматический белок, участвующий в превращении микротрубочек и быстрой реорганизации цитоскелета. Однако роль повышения экспрессии этих белков при аденомиозе до конца не ясна. К сожалению, выявленные при аденомиозе изменения уровня экспрессии вышеперечисленных белков невысоко специфичны для данного заболевания, что не позволяет исполь-

зовать их в качестве диагностических маркеров. Поэтому поиск новых высокоспецифичных и чувствительных биомаркеров аденомиоза по-прежнему актуален. С нашей точки зрения, наиболее перспективный подход к решению этой задачи – пептидно-белковое профилирование плазмы и сыворотки крови с использованием масс-спектрометрии.

Технологические ограничения не позволяют напрямую анализировать такие сложные белковые смеси, как, например, протеомы плазмы или сыворотки крови, включающие в себя более 100 тыс. белков с различиями по относительному содержанию на 10–12 порядков [2]. В связи с этим используются разные методы, позволяющие выделять из такой сложной смеси белков и пептидов относительно узкие и воспроизводимые по составу фракции, которые в дальнейшем анализируют, используя методы масс-спектрометрии. Один из них – времяпролетная масс-спектрометрия с усиливаемой лазерной десорбцией-ионизацией поверхностью (SELDI-TOF MS, surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry) [13]. Суть этого метода заключается в использовании в качестве масс-спектрометрической мишени поверхностей, избирательно связывающих наборы белков на основе адсорбционных, электростатических или специфических аффинных взаимодействий.

Фракционирование сложных смесей биологических молекул происходит прямо на поверхности масс-спектрометрической мишени, которую после процедуры связывания целевых веществ с поверхностью и отмывки от примесей помещают в масс-спектрометр для анализа. Масс-спектры образцов, полученных от пациентов с подтвержденным диагнозом исследуемого заболевания и лиц контрольной группы, сравнивают с применением специализированного программного обеспечения и методов математической статистики. В литературе описаны примеры успешного применения этого метода для выявления различий между сывороткой крови здоровых людей и больных раком желудка [21], прямой кишки [19], предстательной железы [18], гепатоцеллюлярной карциномой [8], раком эндометрия [32] или другими онкологическими заболеваниями [9, 26, 33–35].

В последнее время активно используют выделение из сыворотки крови репрезентативных наборов пептидов с помощью высокопроизводительных, легко поддающихся автоматизации способов фракционирования, в основе которых лежат разные варианты хроматографии с последующей регистрацией выделенных пептидов методом времяпролетной MALDI-масс-спектрометрии [5, 11, 15, 20, 22, 23, 27].

Эта технология обладает рядом преимуществ перед SELDI. Во-первых, фракционирование на модифицированной поверхности масс-спектрометрической мишени SELDI менее чувствительно, чем фракционирование в объеме, что обусловлено значительно меньшей площадью поверхности плоской масс-спектрометрической мишени для SELDI, на которой происходит разделение (обогащение) образца.

Во-вторых, разрешение и чувствительность масс-спектрометров для SELDI значительно уступают таковым у современных MALDI-масс-спектрометров, что в первом случае дополнительно ограничивает качество и чувствительность масс-спектрометрического анализа.

Наконец, специфичность и селективность определения в сыворотке крови маркеров соответствующих заболеваний методом SELDI редко достигают 90% (как правило, эти значения находятся в диапазоне 80–85%) [8, 9, 18, 32, 33],

в то время как при фракционировании сыворотки крови на магнитных микрочастицах или микроколонках эти показатели приближаются к 95–97% [5, 11, 15, 20, 22, 23].

Теоретическая модель образования биомаркеров и их ассоциации с высокомолекулярными белками-носителями плазмы (сыворотки крови) была предложена и экспериментально подтверждена ранее D.H. Gebo [7]. В соответствии с этой моделью пептиды (включая и потенциальные биомаркеры заболеваний), содержащиеся в плазме крови в исчезающе малых концентрациях, способны накапливаться и длительное время сохраняться в кровеносном русле благодаря сорбции на основных белках крови (альбумин, иммуноглобулины, тиреоглобулин).

Высокое содержание альбумина в элюатах, полученных после фракционирования сывороток крови на магнитных микрочастицах с функционализированной поверхностью, было подтверждено при исследовании элюатов 1D-электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

В последние 2–3 года рядом исследователей были предложены методы поиска сывороточных биомаркеров разных заболеваний (рака яичников в том числе), основанные на выделении и идентификации связанных с альбумином пептидов [7, 11, 12]. Эти методы позволили выделить и идентифицировать в сыворотке крови значительное количество пептидов, ранее в ней не обнаруживавшихся. Однако созданные на их основе классификационные модели по чувствительности и специфичности принципиально не отличались от разработанных ранее с использованием других методов фракционирования сыворотки крови.

Применение магнитных микрочастиц с возможно более широким спектром поверхностной функциональности при профилировании такого сложного объекта, как сыворотка крови, значительно повышает вероятность выявления спе-

цифических биомаркеров конкретного заболевания. Кроме того, при данном протоколе фракционирования снижается влияние неизбежных в клинической практике вариаций способов получения и хранения сыворотки крови на ее масс-спектрометрический профиль, что открывает перспективы использования в биомаркерных исследованиях образцов, хранящихся в существующих банках сывороток, без оглядки на возможные различия в методах их получения.

Необходимо отметить, что все работы по поиску новых биомаркеров заболеваний с использованием протеомных подходов пока не вышли за рамки экспериментальных исследований. Для внедрения этих методов в практическую медицину потребуются значительные усилия, направленные на валидацию найденных белков и пептидов на больших массивах клинических образцов, определение их специфичности по отношению к конкретным заболеваниям, а также их идентификацию.

Масс-спектрометрические методы исследования уже успешно используются при многих заболеваниях. Можно надеяться, что они будут применяться в диагностике аденомиоза.

Список литературы см. на сайте www.rusvrach.ru

POTENTIAL BIOMARKERS OF ADENOMYOSIS: STATE-OF-THE-ART AND POSSIBLE PERSPECTIVES

A. Sorokina, Candidate of Medical Sciences; Professor G. Totchiyev, MD; O. Vasina, R. Ziganshin, Candidate of Medical Sciences, G. Arapidi Russian University of Peoples' Friendship; M.M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences
The heterogeneous clinical picture and various locations of endometrioid heterotopias and severity of complaints reflect the complexity of the pathogenesis of endometriosis and may suggest that there are several mechanisms of its development. High-performance and sensitive protein expression analytical methods can detect changes in molecular reaction just before the clinical manifestations of the disease, which makes it possible to early diagnose and hence to treat the disease, and to predict its course.

Key words: adenomyosis, mass spectrometry.

Правила для авторов

Статьи, направляемые в журнал «Врач», должны быть представлены на дискете или диске (электронная версия) с распечаткой на бумаге (2 экз., через 2 интервала; размер шрифта — 14). Обязательно наличие реферата на русском языке (2–4 предложения) и 4–5 ключевых слов.

В выходных данных следует указать:

- название статьи;
- фамилию, инициалы всех авторов и ученую степень (доктор медицинских наук, профессор; кандидат медицинских наук);
- название учреждения;
- город.

Необходимо приложить рекомендацию руководителя учреждения, а в конце статьи — контактные телефоны, Ф.И.О. автора для связи и электронный адрес.

Объем статьи:

- 6500–13 000 знаков;
- список литературы — 10–15 источников; ссылки на литературу по тексту указываются в квадратных скобках.

Если статья сопровождается рисунками и таблицами, обязательны ссылки на них в тексте.

Подписи под рисунками приводятся на отдельной странице.

Данные таблиц должны соответствовать приводимым в тексте; в таблицах необходимо указать единицы измерения.

Электронный вариант рисунков должен быть выполнен в формате: TIFF, JPG с разрешением 300 dpi.

Список литературы приводится в алфавитном порядке (сначала работы, опубликованные на русском, затем — на иностранных языках): Ф.И.О. авторов, название книги или статьи.

- Если цитируется журнал, приводят его название, год издания, том и номер выпуска, страницы.
- Если цитируется книга — указывают город, издательство, год выпуска и число страниц.
- При ссылке на материалы, доложенные на конференции (съезде), кроме названия тезисов, указывают, где и когда проводилась конференция.
- Цифровые ссылки в тексте на цитируемую литературу должны соответствовать порядковому номеру источника.

Буквенные сокращения в тексте допускаются только после полной расшифровки понятия.

Редакция оставляет за собой право сокращать и редактировать статьи.

Телефон редакции: 8 (499) 246-84-86.

Адрес редакции: Москва, ул. Усачева, д. 11, стр. 1 Г (7-й этаж), офис 706.

Для корреспонденции: 119048, Москва, ул. Усачева, д. 11, стр. 1 Г, офис 706.

E-mail: redvrach@rusvrach.ru