

Краевой
онкологический
диспансер,
г. Краснодар

ЗНАЧЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ГРУПП РИСКА И РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ (НА ПРИМЕРЕ РАКА ЯИЧНИКОВ И РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ)

Н.В. Порханова

Определение показателей упомянутых маркеров в «условно здоровой» популяции не позволяет сформировать группы повышенного онкологического риска и не представляет диагностической ценности для раннего выявления онкологического процесса.

В настоящее время измерение уровней опухолевых маркеров широко используется в диагностике, лечении и при наблюдении за состоянием онкологических больных. Опухолевые маркеры – это вещества, образующиеся в связи с измененным метаболизмом злокачественно трансформированной клетки, а потому при возникновении опухоли их уровни повышаются. Определение опухолевых маркеров проводят в гистологическом материале или биологических жидкостях (гормональные опухолевые маркеры).

Опухолевые маркеры известны с 1928 года, когда была открыта молекула ХГЧ, а затем её связь с хориокарциномой. С тех пор определение ХГЧ используется для диагностики и контроля лечения этой опухоли. Позднее было установлено, что уровень ХГЧ изменяется и при наличии других трофобластических опухолей, что дает возможность контролировать динамику опухолевого процесса.

Каждый год открывается несколько новых опухолевых маркеров, которые пополняют наши знания о механизмах возникновения и развития онкологических заболеваний.

Год	Автор	Маркер
1928	Асхейм и Зондек	ХГЧ
1936	Гутман	Кислая фосфатаза простаты
1963	Абелев	АФП
1965	Голд	РЭА
1979	Копровский, Ванг	СА 19-9, ПСА
1983	Куфэ	СА 15-3

Опухолевые маркеры открывают новые возможности в лечении онкологических заболеваний: они позволяют дифференцировать злокачественные и доброкачественные опухоли, определять стадию заболевания и, главное, своевременно выявлять и диагностировать рецидив. Поэтому измерение уровня соответствующего маркера может решающим образом повлиять на эффективность лечения.

При исследовании опухолевых маркеров следует учитывать их индивидуальную информативность при различных формах рака, а так же динамику их уровней в ходе наблюдения.

Специфичность отдельно определяемого опухолевого маркера недостаточно высока, она повышается, прежде всего, при комбинации нескольких маркеров.

Надежность исследования с помощью опухолевых маркеров зависит от их чувствительности и специфичности, т.е. вероятности получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов.

Существуют маркеры главные, второстепенные и дополнительные

Главный маркер – маркер, который имеет высокую чувствительность и специфичность к определенному виду опухоли.

Второстепенный маркер имеет низкую чувствительность и специфичность для данной опухоли, параллельное его выявление с главным маркером повышает вероятность выявления опухоли.

Дополнительный маркер имеет, как правило, более низкую чувствительность и специфичность при диагностике данного заболевания, но бывает специфичным для конкретного органа (т.е. имеет высокую органоспецифичность). Кроме того, возрастание его уровня связано с рецидивом опухоли.

Опухолевые маркеры и их клиническое значение

Рак – это болезнь, связанная с аномальным ростом и развитием клеток. Как только нарушается биологический контрольный механизм, возникают опухолевые клетки. Понимание биологических процессов, связанных с нормальным ростом клеток, клеточным циклом, онтогенезом, гибелью клеток, а также патологических процессов, таких как неопластическая трансформация, развитие и метастазирование опухоли, могло бы помочь не только при поиске новых опухолевых маркеров, но и в выборе наилучшего из них для диагностики и оценки эффективности лечения пациентов со злокачественными новообразованиями.

Большинство клеток в зрелом возрасте находится в конечной стадии дифференцировки. На этой стадии увеличение количества клеток приводит к гиперплазии или к неоплазии. Гиперплазией называется контролируемый процесс, при котором происходит рост количества клеток, следствием которого является увеличение объема органа или ткани. Неоплазия является процессом, при котором рост количества клеток связан со снижением или полным отсутствием контрольных механизмов. Неконтролируемое клеточное деление приводит к образованию аномальной массы ткани, т.е. к тому, что известно под названием «опухоль».

Опухолевые клетки могут отличаться от нормальных ферментативным аппаратом, метаболическими изменениями, потерей дифференциации, повышенной инвазивностью, потерей чувствительности к медикаментам. Эти различия являются следствием не только неконтролируемого клеточного роста, но и атипичного клеточного развития (например, вследствие многочисленных генетических мутаций в ходе онкогенеза). В настоящее время известно ограниченное количество качественных различий между нормальными и раковыми клетками, количественные различия выражены более ярко. Многие из них зависят от стадии развития опухоли, которая коррелирует со степенью дифференциации клеток. Наиболее злокачественными являются анапластические опухоли. Доброкачественные опухоли обладают низкой скоростью роста.

Если хотя бы один из двух основных процессов – дифференциация или пролиферация – перестанет регулироваться, появляется вероятность трансформации нормальных клеток в опухолевые.

В продвинутой стадии болезни к быстрой пролиферации присоединяется снижение дифференциации клеток. Новыми веществами, которые продуцируются клетками при этом процессе, являются раково-эмбриональные белки или эктопические молекулы. В высоких концентрациях появляются соединения, соответствующие фетальным тканям и не встречающиеся в зрелых тканях. Появление таких опухолевых маркеров связано с прогрессирующей стадией развития опухоли, нарушенной регуляцией роста и плохим прогнозом.

Опухолевыми маркерами называют соединения, которые продуцируются опухолевыми клетками или

организмом в ответ на развитие опухоли. От соединенных, продуцируемых нормальными клетками, они отличаются или качественно (опухолеспецифичные), или количественно (ассоциированные с опухолью, присутствующие также и в нормальных клетках). Речь может идти об антителах, локализованных на поверхности мембран, метаболических ферментах или фрагментах цитоплазматических структур, которые освобождаются при гибели клеток. После этого их можно определять в кровяном русле или других биологических жидкостях.

Определение опухолевых маркеров следует рассматривать как дополнительный диагностический метод с относительной применимостью и точностью для каждого диагноза.

Идеальный опухолевый маркер должен удовлетворять следующим критериям:

- продуцироваться только злокачественными клетками;
- являться органоспецифичным;
- появляться в высоких концентрациях в биологических жидкостях;
- его концентрация должна коррелировать с:
 - размером опухоли;
 - со стадией заболевания;
 - с прогнозом;
 - с эффектом лечения.
- он должен позволять проводить диагностику всей опухолевой ткани.

Маркер, отвечающий всем перечисленным выше требованиям, до настоящего времени не обнаружен.

Сегодня известно более 200 опухолевых маркеров, и их количество постоянно растет. Существует несколько принципов классификации онкомаркеров. Наиболее часто их группируют по химической структуре или по биологической функции, которую они выполняют в организме. С химической точки зрения их можно разделить на гликопротеины, полипептиды, углеводные детерминанты гликопротеинов, гликолипиды, белки, полиамины, иммуноглобулины и др. По биологической функции они делятся на онкофетальные антигены, гормоны, ферменты, рецепторы и соединения, роль которых до конца не выяснена.

Классификация онкомаркеров по их биологической функции

Онкофетальные антигены:

- Раково-эмбриональный антиген
- Альфа-фетопротеин
- Хорионический гонадотропин человека
- СА 125
- СА 15-3
- СА 19-9

Ферменты:

- Кислая фосфатаза простаты
- Лактатдегидрогеназа
- Нейроспецифическая енолаза
- Специфический антиген простаты

Гормоны:

- Адренкортикотропный гормон
- Антидиуретический гормон
- Кальцитонин
- Паратгормон
- Пролактин

Рецепторы:

- Прогестероновые
- Эстрогеновые

Другие соединения:

- Ферритин
- Бета-2-микроглобулин
- Иммуноглобулины
- Тканевой специфический антиген

Большинство онкомаркеров относится к онкофетальным антигенам. Речь идет о веществах, которые обнаруживаются в относительно высоких концентрациях в тканях эмбриона, где они появляются на поверхности дифференцирующихся клеток (дифференцировочные антигены) и играют важную роль в развитии плода. У взрослых людей их уровень значительно ниже, а биологическая функция неизвестна. При большинстве опухолевых заболеваний их концентрация заметно повышается. Характерно, что наиболее часто онкофетальные маркеры появляются при дифференцированных опухолях, а их уровень коррелирует с размером опухоли. Поэтому их определение играет важную роль для прогнозирования заболевания и контроля за ходом лечения.

Обладающие ферментативной активностью опухолевые маркеры являются второй по распространенности группой маркеров, которую можно разделить на две группы: ферменты, способствующие пролиферации клеток (нейроспецифическая енолаза) и ферменты, присутствующие в клетках нормальной ткани и имеющие определенную биологическую функцию (высокая ткане- и органо- специфичность).

Опухолевые маркеры гормоны продуцируются специализированными эндокринными клетками (кальцитонин) или синтезируются эктопически (ХГЧ при бронхолегочной карциноме). Наиболее часто их используют для контроля за ходом медикаментозного лечения или в послеоперационном периоде.

Для гормонально-зависимых опухолей одновременно с их ростом увеличивается и количество рецепторов. В отличие от предыдущих групп маркеров, которые обнаруживаются в сыворотке крови, в данном случае речь идет о тканевых маркерах, измерение которых проводят в биопсийном материале. Эти маркеры используют для определения прогноза, а также выбора наиболее подходящей терапии.

Последняя группа онкомаркеров относится к соединениям, продуцируемым нормальными тканями организма. Однако их концентрация резко возрастает в ходе неспецифической реакции организма на развитие опухоли (ферритин, β_2 -микроглобулин, иммуноглобулины).

Использование онкомаркеров:

скрининг → оценка эффективности терапии →

прогноз → длительное наблюдение с целью раннего выявления рецидивов и генерализации заболевания.

Скрининг - критериями для скринингового теста являются эффективность раннего обнаружения заболевания и правильность теста.

Оценка эффективности терапии. Для ряда онкологических заболеваний существуют маркеры, пригодные для оценки эффективности проводимой терапии.

Рак молочной железы

Динамика	CA 15-3	РЭА (СЕА)
Снижение уровня после лечения	66%	61%
Постоянный уровень при стабильном состоянии	73%	50%
Повышение уровня при рецидиве	80%	65%

В 30% случаев уровень CA 15-3 не снижается при достаточно успешном лечении, что может привести к ложному заключению о неправильно выбранной терапии. Однако высокая чувствительность в случае рецидива болезни позволяет успешно использовать этот маркер в сочетании с анализом клинической картины.

При опухолевых процессах в толстом кишечнике показательной является концентрация РЭА, которая повышается у 85% пациентов. Регулярные ее измерения (по 2-3 раза в месяц) можно использовать для контроля за ходом лечения. Повторное нарастание уровня (минимум в 2 раза) свидетельствует о неэффективности лечения. CA 19-9 отражает подобные изменения несколько хуже, чем РЭА (СЕА).

Выбор исследуемых маркеров.

- Неправильный выбор маркеров по отношению к данному заболеванию означает, что при данном диагнозе не происходит повышения уровня исследуемых маркеров

- В начальной стадии заболевания, при небольшой массе опухоли нельзя ожидать значительной концентрации.

- Лечение (операция, химиотерапия), приводящие к полному удалению опухоли, обязательно должно сопровождаться снижением уровней онкомаркеров до нормы.

- Необходимо принимать во внимание факторы, которые могут оказать влияние на уровень исследуемого маркера (например, повышение ПСА при массаже предстательной железы).

Фаза клинической оценки.

- Заболевания печени и почек, влияющие на метаболизм онкомаркеров могут изменять результаты анализа.

- При длительном наблюдении пациентов решающим является не абсолютный показатель уровня маркера, а динамика изменения его концентрации.

Вывод:

1. Опухолевые маркеры необходимо определять одним и тем же методом в одной и той же лаборатории.

2. На уровни опухолевых маркеров может оказать влияние ряд факторов (как на стадии подготовки к анализу, так и при его проведении).

3. Для правильной клинической оценки необходимо тесное сотрудничество лаборатории и клиницистов.

Характеристика отдельных опухолевых маркеров

Раково-эмбриональный антиген (РЭА, СЕА).

РЭА является фетальным белком, который обнаруживается в эпителиальных клетках пищеварительного тракта и бронхов. В первом триместре беременности он присутствует в клеточной цитоплазме, а затем становится составной частью поверхностных клеточных мембран плода. У взрослых людей РЭА продуцируется в очень ограниченном количестве эпителиальными клетками бронхов, молочной железы и кишечного тракта. РЭА метаболизируется в печени.

Повышенные уровни у больных со злокачественными заболеваниями:

- Рак желудка
- Рак толстого кишечника
- Рак прямой кишки
- Рак легких
- Рак молочных желез
- Рак яичников
- Рак матки
- Рак простаты

Показания к исследованию:

- Оценка эффективности лечения карциномы желудка, толстого кишечника, прямой кишки
- Прогноз развития заболевания при карциноме толстого кишечника и прямой кишки
- Оценка эффективности лечения карциномы молочной железы (совместно с СА 15-3)
- Дифференциальная диагностика опухолей яичников
- Оценка эффективности лечения рака легких (опыт)

Материал для исследования:

- Сыворотка (плазма)
- Плевральная жидкость
- Асцит
- Суставная жидкость
- Кистозная жидкость (молочная железа, яичник)

Норма: 0-3 нг/мл

Альфа-фетопротеин (АФП, AFP)

АФП вырабатывается желточным мешком и печенью плода. Его концентрация в фетальной плазме достигает 3 г/л между 10 и 13 неделями развития плода, а затем постепенно снижается по мере приближения к родам, до 80 мг/л. Снижение уровня АФП продолжается и после рождения ребенка и к 2-летнему возрасту достигает концентрации 10 мг/л, типичной для взрослых здоровых людей.

АФП плода попадает в амниотическую жидкость. Динамика уровней АФП в околоплодных водах соответствует уровням в фетальной сыворотке, однако эти показатели в два раза ниже и достигают максимума около 40 мг/л в 15 неделе развития плода. В материнской сыворотке крови уровень АФП, наоборот, повышается в течение бе-

ременности и достигает максимума за 1-2 месяца до родов (приблизительно 400 мг/л).

Повышенные уровни у больных со злокачественными заболеваниями:

- Первичный рак печени (за исключением анапластической формы)
- Метастазы злокачественных опухолей в печень (при бронхогенной карциноме, раке молочной железы, раке прямой и сигмовидной кишки)

- Рак яичника
- Рак яичка
- Рак желудка
- Рак толстого кишечника
- Рак поджелудочной железы
- Рак молочной железы
- Бронхиальные опухоли

Показания к исследованию:

- Диагностика первичного рака печени (гепатобластомы, гепатоцеллюлярный рак)
- Контроль за ходом лечения первичного рака печени
- Диагностика и контроль лечения опухолей герминального происхождения (вместе с ХГЧ)
- Наблюдение больных с положительным анализом на НВ-Аг и циррозом печени для обнаружения рецидива заболевания и, прежде всего, для раннего выявления малигнизации.

Материал для исследования:

- Сыворотка (плазма)
- Плевральная жидкость
- Асцит
- Кистозная жидкость (яичник)
- Амниотическая жидкость
- Желчь

Норма: 0-15 нг/мл.

ПСА (PSA, специфический антиген простаты)

Присутствует в простатической жидкости, семенной жидкости, здоровой и трансформированной ткани простаты, а так же в метастазах простатического происхождения. Продуцируется парауретральными железами. В очень низких концентрациях обнаруживается у женщин.

В сыворотке крови ПСА присутствует в трех главных формах – свободный ПСА, связанный с альфа-2-макроглобулином, связанный с альфа-1-интихимотрипсином.

Повышенные уровни у больных со злокачественными заболеваниями:

- Рак простаты
- Рак легких
- Рак прямой и сигмовидной кишки
- Гепатоцеллюлярная карцинома
- Рак надпочечника
- Рак молочной железы

Показания к исследованию:

- Диагностика рака простаты
- Оценка эффективности терапии при раке простаты

- Контроль при радикальной простатэктомии
- Дифференциальный диагноз между гипертрофией простаты и раком

- Наблюдение за ходом болезни при гипертрофии простаты с целью выявления процесса малигнизации

- Скрининг рака простаты
- Прогностический фактор рака молочной железы при исследовании в цитоллизе и сыворотке (опыт)

Материал для исследования:

- Сыворотка (плазма)
- Кистозная жидкость (молочная железа)

Норма: 0-4 нг/мл.

ХГЧ (хорионический гонадотропин человека)

Вместе с лютропином (ЛГ), фоллитропином (ФСГ) и тиреотропином (ТТГ) относится к группе гликопротеиновых гормонов.

Все перечисленные гормоны имеют близкую структуру. Они образованы двумя субъединицами - альфа и бета (альфа у всех одинакова). Биологическую специфичность этих гормонов определяет бета-субъединица, имеющая индивидуальную структуру.

Повышенные уровни у больных со злокачественными заболеваниями:

- Опухоли трофобластного или герминального происхождения (рак яичек, яичников, хорионкарцинома)

- Рак желудка
- Рак печени
- Рак кишечника
- Рак почек

- Мелкоклеточный бронхогенный рак легких (эктопическая секреция)

- Рак матки, яичников, молочных желез)

Показания к исследованию:

- Диагностика пузырного заноса и хорионкарциномы

- Контроль за ходом лечения хорионкарциномы
- Диагностика и контроль опухолей герминального происхождения

Материал для исследования:

- Сыворотка (плазма)
- Плевральная жидкость
- Асцит
- Ликвор

- Амниотическая жидкость
- Моча

Норма: 0-5 МЕ/л.

СА 15-3

У плода он встречается в эпителиальных клетках бронхов и в гепатоцитах, у взрослых является поверхностным антигеном эпителия протоков молочной железы.

Повышенные уровни у больных со злокачественными заболеваниями:

- рак молочных желез
- бронхогенная карцинома

- рак желудка
- рак печени
- рак поджелудочной железы
- рак яичников
- рак эндометрия
- рак матки

Показания к исследованию:

- Диагностика и наблюдение больных раком молочной железы (в комбинации с РЭА)

Материал для исследования:

- Сыворотка (плазма)
- Плевральная жидкость
- Асцит
- Кистозная жидкость (яичник, молочная железа)
- Спинномозговая жидкость

Норма: 0-31,3 U/mL.

СА 125

У плода встречается в эпителиальных клетках дыхательного и пищеварительного тракта. У взрослых образуется эпителиальными клетками.

Повышенные уровни у больных со злокачественными заболеваниями:

- Рак яичников
- Рак матки
- Рак эндометрия
- Рак молочной железы
- Рак поджелудочной железы
- Первичный рак печени
- Рак прямой и сигмовидной кишки
- Рак желудка

- Бронхогенная карцинома

- Метастазы представленных выше карцином в печени.

Показания к исследованию:

- Диагностика и наблюдение за ходом лечения рака яичника, прежде всего серозного типа

- Дополнительный опухолевый маркер рака поджелудочной железы (в комбинации с СА 19-9)

Материал для исследования:

- Сыворотка (плазма)
- Ликвор

Норма: 0-30 U/mL.

СА 19-9

У плода появляется в эпителиальных клетках, прежде всего, в пищеварительном тракте, поджелудочной железе и печени. У взрослых вырабатывается в очень небольшом количестве эпителиальными клетками бронхов и пищеварительного тракта. Выводится из организма исключительно желчью.

Повышенные уровни у больных со злокачественными заболеваниями:

- Рак поджелудочной железы
- Рак желчного пузыря и желчных путей
- Первичный рак печени
- Рак желудка
- Рак прямой и сигмовидной кишки

- Рак молочной железы
- Рак яичника (прежде всего муцинозного типа)
- Рак матки
- Метастазы перечисленных выше карцином в печени.

При мало дифференцированных карциномах его продукция снижается, а при анапластических - совсем отсутствует.

Показания к исследованию:

- Наблюдение за ходом болезни при раке поджелудочной железы (только при благоприятном течении)
- Диагностика и контроль эффективности лечения заболеваний желчного пузыря и желчных путей
- Диагностика и наблюдение за ходом болезни при раке печени (дополнительный маркер к АФП)
- Наблюдение за ходом заболевания при раке прямой и сигмовидной кишки (в комбинации с РЭА)

Материал для исследования:

- Сыворотка (плазма)
- Плевральная жидкость
- Асцит

Норма: 0-37 U/mL.

β_2 -микроглобулин (В2-микроглобулин)

Физиологическая продукция В2-микроглобулина интенсивно происходит в В-лимфоцитах и плазмолцитах. Его можно обнаружить во всех клетках, кроме эритроцитов и клеток трофобласта. Используется главным образом в онкологии и нефрологии.

Повышенные уровни у больных со злокачественными заболеваниями:

- Лейкоз
- Лимфомы
- Множественная миелома

Повышенные показатели при доброкачественных заболеваниях:

- Воспалительные заболевания
- Обширный клеточный некроз (при химиотерапии)
- Хронические заболевания печени и почек
- Почечная недостаточность, прежде всего при лечении гемодиализом.

Показания к исследованию:

- Диагностика множественной миеломы (особенно в продвинутой стадии, наблюдение)
- Выбор целевой терапии при хроническом лимфолейкозе

Материал для исследования:

- Сыворотка (плазма)
- Плевральная жидкость
- Асцит
- Кистозная жидкость

Норма: 0-1500 ug/L.

Комбинация опухолевых маркеров

Определение показателей упомянутых маркеров в «условно здоровой» популяции не позволяет сформировать группы повышенного онкологического риска и не представляет диагностической ценности для раннего выявления онкологического процесса. Клинически значимым является положительная динамика роста показателей маркера. Однако без знаний, к какой конкретно категории риска относится обследуемый, многочисленные определения практически всех биохимических маркеров на протяжении бесконечно длительного срока выглядели бы абсурдными.

За последние десятилетия наибольшего успеха в ранней диагностике злокачественных опухолей яичников и молочной железы добились в группах наследственного риска.

Бурное развитие биологических наук в последнее десятилетие и особенно интенсивные исследования в экспериментально-теоретической онкологии позволили добиться значительных успехов в познании генетических факторов, причастных к возникновению неоплазий у человека. В настоящее время уже нет сомнений в том, что злокачественные опухоли являются болезнями генома. Как известно, процесс канцероматоза многофакторный и многостадийный. В основе его лежат повреждения генетического аппарата половой или соматической клетки (геномные мутации), делающие эту клетку чувствительной к воздействию канцерогенных факторов, способных запустить процесс малигнизации.

Показатель	Маркер		
	Главный	Второстепенный	Дополнительный
Вид заболевания	РЭА (СЕА)		
Рак желудка	РЭА (СЕА), СА 19-9		
Рак прямой и сигмовидной кишки	СА 19-9		
Рак поджелудочной железы	СА 19-9	РЭА (СЕА)	АФП
Рак желчного пузыря и желчных путей	СА 19-9	АФП	
Метастазы в печени	СА 19-9, РЭА, АФП		
Рак легких	РЭА		
Рак молочной железы	СА 15-3	РЭА	
Тератома	АФП, ХГЧ		
Рак яичника	СА 125		
Рак тела матки	СА 125		
Рак простаты	ПСА		
Рак яичка	АФП, ХГЧ		
Рак мочевого пузыря	РЭА		
Лейкоз	В2-микроглобулин		
Злокачественная лимфома	В2-микроглобулин		

Именно это положение позволяет рассматривать изначальные геномные мутации не как фатальную неизбежность возникновения опухоли, а как определенное состояние клетки (предрасположенность), которое, в принципе, можно контролировать путем профилактических мероприятий.

В зависимости от того, в какой клетке произошла первоначальная мутация — половой или соматической, рак может быть наследственным и спорадическим (Гарькавцева Р.Ф., 2001).

В последнее время решение вопросов этиологии, патогенеза и ранней диагностики во многом связывают с медико-генетическими исследованиями, направленными на изучение роли наследственной предрасположенности к развитию РЯ, его генетической гетерогенности и выявление среди родственников пациентки лиц с потенциально высоким риском заболеть этой формой рака (Гарькавцева Р.Ф., 2001). В семьях больных РЯ аналогичная форма рака встречается в 4–6 раз чаще, чем в популяции. В этих семьях также наблюдалось 4-кратное повышение частоты по сравнению с общей популяцией РМЖ. Риск заболеть РЯ для родственниц первой степени родства в таких семьях в 9–10 раз превышает максимальное значение накопленного общепопуляционного риска. Анализ генеза и течения РЯ, основанный на использовании такого подхода, позволил рассматривать это заболевание как мультифакториальное. Вклад генетических факторов в развитие РЯ составил 54 %, соответственно, вклад факторов внешней среды — 46 %. С одной стороны, это соответствует представлениям о сложном взаимодействии обеих групп факторов в развитии РЯ, с другой — говорит о генетической гетерогенности заболевания. Первый уровень этиологической и генетичес-

кой гетерогенности РЯ был установлен в зависимости от характера накопления его и других опухолей в семьях, что позволило выделить 3 группы:

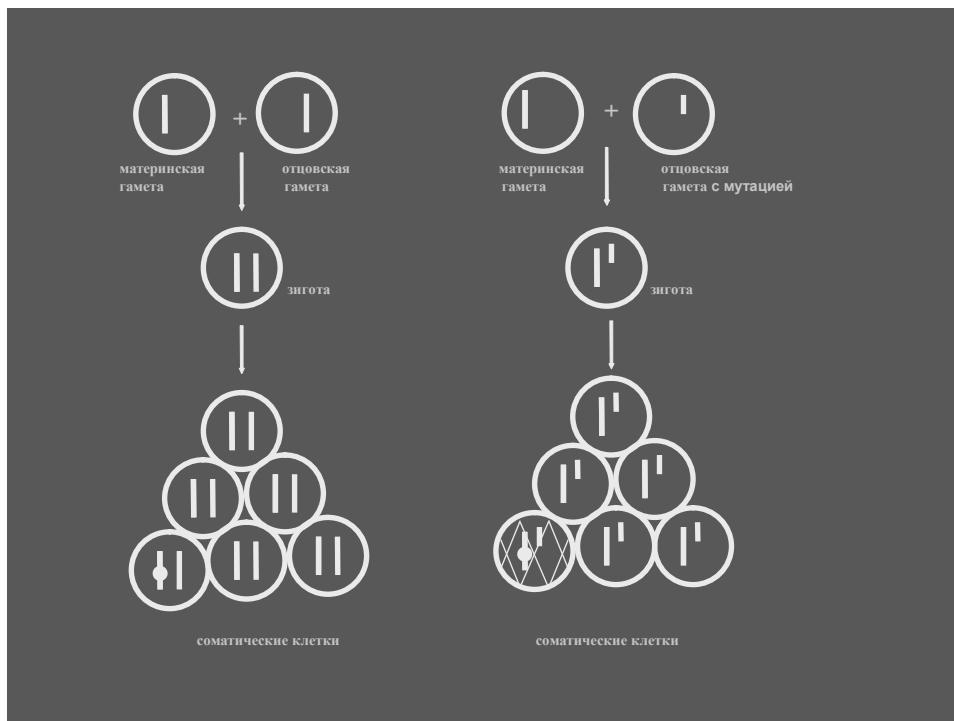
- 1) семьи с накоплением только РЯ — органоспецифический РЯ;
- 2) семьи с накоплением РЯ, ассоциирующего с другими опухолями органов женской репродуктивной системы (РМЖ, рак эндометрия);
- 3) семьи, где РЯ является компонентом синдрома семейного рака (синдром Линча II) и встречается наряду со злокачественными заболеваниями других локализаций — раком прямой кишки, почки и др.

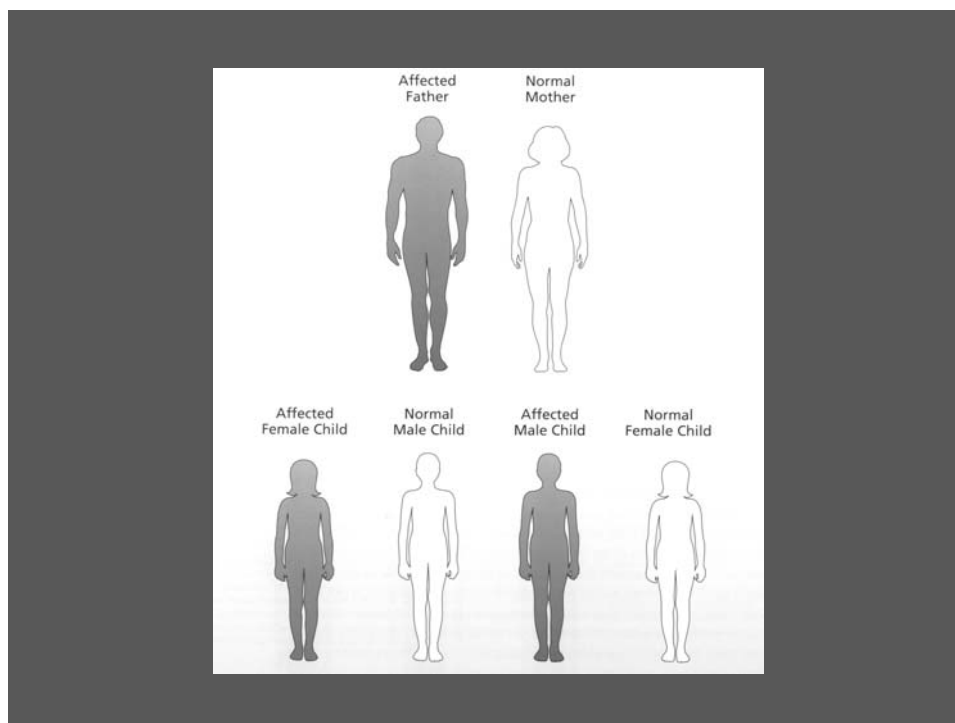
Семейная (органоспецифическая) форма РЯ наследуется аутосомно-доминантно и напрямую зависит от числа родственниц 1 или 2 степени родства:

- 1) если РЯ болели 2 родственницы 1 степени родства (мать, сестры, дочери), риск заболевания составляет 50 %;
- 2) если РЯ болели одна родственница 1 степени родства и одна родственница 2 степени (бабушка, тетья, двоюродная сестра, внучка), риск заболевания повышен в 3–10 раз;
- 3) если РЯ болела одна родственница 1 степени родства, то риск развития РЯ повышен в 2–4 раза.

Синдром Линча II — наследственная форма рака прямой кишки (без полипоза) в сочетании с аденокарциномами яичников, матки, молочной железы, желудка, опухолями почек, легких. Риск заболевания РЯ повышен в 3 раза.

По данным Канцеррегистра ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, в 1050 обследованных семьях с наследственной предрасположенностью за период 1983–2005 гг. было выявлено 230 (21,9%) больных с различной онкологической патологией.





Рак яичников – мультифакториальное заболевание, одной из главных причин которого является наличие генов предрасположения - онкогенов BRCA- 1 и 2.

Эти гены вовлечены в поддержание стабильности генома.

Мутации в генах BRCA – 1 и 2 по данным мировой литературы могут являться причиной от 10 до 30 % случаев возникновения рака яичников.

Благодаря выявлению этих мутаций в ДНК-праймерах мы можем оценить частоту и, собственно вклад мутантных аллелей во встречаемость рака яичников в нашей стране, тем более что во всех развитых странах диагностика мутаций является обязательным компонентом клинической онкологии.

Мы оцениваем частоту founder мутаций в гене BRCA-1 в случайных выборках больных раком яичников. А именно BRCA1 5382insC и BRCA1 4153delA, который локализуется в коротком плече 17 хромосомы.

Клетки, сохраняющие хотя бы один интактный аллель рецессивного онкогена, остаются нормальными, поэтому у здоровых индивидуумов периодически возникающие соматические мутации не приводят к трагическим последствиям.

Но у носителей зародышевой раковой мутации каждая соматическая клетка имеет лишь одну неповрежденную копию гена, поэтому для возникновения клона соматических клеток с онкопатологией достаточно повреждения генетического материала хотя бы одной соматической клетки-мишени.

При анализе передачи доминантной мутации от гетерозиготного носителя и здоровой матери было доказано, что риск рождения больной девочки от такого отца составляет 25 %, также 25 % составляет вероятность рож-

дения мальчика гетерозиготы (носителя мутантных аллелей), который в свою очередь передаст мутантные аллели внучке изучаемого пробанда.

Роль BRCA-1 в развитии рака молочной железы

- 4-5 % всех случаев рака молочной железы
- 20 % необычных форм РМЖ (молодой возраст, передача по женской линии, билатеральные раки).

РОЛЬ BRCA-1 в развитии РЯ:

- распределение мутаций полностью отлично от таковых в РМЖ
- нет выраженных ассоциаций с необычными формами
- до 30 % спорадического рака яичников
- его диагностика рекомендована всем больным РЯ.

В нашем исследовании для оценки founder- мутаций были выбраны случайные группы пациентов, получавших терапию по поводу рака яичников в г. Санкт-Петербурге и Краснодарском крае, с целью исключить географические вариации в распределении мутантных аллелей.

Изучались две наиболее частых вышеупомянутых мутаций в гене BRCA-1.

В исследование было включено 503 пациенток с раком яичника, проходивших лечение в Краевом клиническом онкологическом диспансере г. Краснодара за период с 2001 по 2008 гг. У 196 женщин был диагностирован серозный рак яичников, у 153 - муцинозный рак, у 104 - эндометриоидный рак. Средний возраст пациенток составил 55 лет (интервал: 25-72 года). Для ДНК-анализа случайным образом были отобраны 188 случаев РЯ.

Молекулярный анализ выполнялся методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции.

Материалом для исследования служили архивные патоморфологические препараты, полученные из удалённых в ходе операции нормальных тканей пациенток. Выделение ДНК производилось посредством стандартного протокола [Imyanitov E.N. et al., 2006]. При помощи микротомы были получены секции толщиной 20 мкм, которые депарафинизировались посредством инкубации в трех сменах ксилола по 500 мл при температуре 37°C. Длительность инкубации в каждой смене ксилола составляла 20 минут. Частичную регидратацию тканей осуществляли инкубацией по 10 минут в 3 сменах этанола (96%, затем 80% и 70% - по 500 мкл) при комнатной температуре. После удаления этанола секции подсушивали на воздухе и помещали в 200 мкл лизирующего раствора (10мМ Трис-НСl, рН=8,3; 1 мМ EDTA; 2% Тритон X-100, протеиназы К – до 500 мкг/мл). Лизис проводился при 60°C, в течение 12-24 часов, после чего образцы инкубировались 10 минут при 95°C с целью полной инактивации протеиназы К. Полученный лизат десятикратно разводили бидистиллированной водой.

Детекция повторяющихся мутаций

Для детекции повторяющихся мутаций в генах BRCA1, BRCA2, CHEK2 и NBS1 были отобраны аллели, представленные в работе Sokolenko et al., 2007: BRCA1 5382insC, BRCA1 4153delA, BRCA1 185delAG, BRCA1 300T>C, BRCA2 6174delT, CHEK2 1100delC, CHEK2 IVS2+1G>A и NBS1 657del5. Анализ первых 7 мутаций осуществлялся методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (iCycler iQ Real Time Detection System (Bio-Rad)) с использованием красителя SYBR Green I. Делеции NBS1 657del5 детектировались при

помощи обычной ПЦР с последующим электрофоретическим разделением фрагментов в полиакриламидном геле. Последовательности праймеров, применяемых для ДНК-анализа, указаны в табл. 1.

ПЦР реакции выполнялись в стандартных условиях: 10 мкл ПЦР-смеси включали 1 мкл тканевого лизата (примерно 50 нг геномной ДНК), 1 ед Taq-полимеразы для «горячего старта», однократный ПЦР буфер (рН 8.3), 1.5 мМ MgCl₂, 200 мкМ дНТФ, 0.5 мМ каждого олигонуклеотида и 0,5-кратный SYBR Green I. ПЦР начиналась с активации полимеразы посредством инкубирования смеси при 95°C в течение 10 минут. Амплификация выполнялась в течение 50 циклов (денатурация – при 95°C в течение 35 сек., гибридизация олигонуклеотидов – от 60°C до 65°C для различных праймеров в течение 1 мин, элонгация – при 72°C в течение 1 мин). После активации полимеразы при 95°C в течение 10 минут. Каждый сет амплификации включал контрольные образцы с гомо- и гетерозиготными образцами, а также негативный контроль. Для контроля специфичности фрагментов использовался анализ кризиса плавления.

Частота BRCA1 5382insC у больных составила – 19,1%. Несколько меньший вклад в заболеваемость рака яичников был зарегистрирован для BRCA1 4153delA в онкогене, данные повреждения в Санкт-Петербурге встретились в 0,5% случаев, а в Краснодарском крае в 0,47%.

Таким образом, как минимум каждый 5 случай РЯ в Российской Федерации связан с носительством founder-мутаций в гене BRCA-1.

В своей работе мы провели ДНК-тестирование 54 ближайших родственниц пациенток по поводу рака яичников с выявленными мутациями в гене BRCA-1.



У 6 (11,1%) из них была обнаружена BRCA1 5382insC (причем у одной из пациенток данная мутация выявлена у всех дочерей).

У 1 (1,8%) обнаружена BRCA1 4153delA.

Все они находятся уже в течение 34 месяцев под наблюдением нашей клиники.

В результате мониторинга (осмотр, УЗИ, СА-125) у одной из наблюдаемых женщин (54лет) выявлена опухоль яичника. Женщине выполнено оперативное лечение. При гистологическом исследовании - пограничная папиллярная цистаденома. У 3 женщин, носительниц мутаций в гене BRCA1, выявлены фоновые и предраковые заболевания.

Так как диагностика подобных генетических дефектов является вполне возможной с точки зрения трудоемкости и стоимости, то представляется целесообразным подвергать ДНК- тестированию всех пациентов с раком яичников.

Эти мероприятия позволят выявить не только больных с BRCA – ассоциированными раками яичников, но и на следующем этапе обследовать родственниц этих пациенток.

Выявление мутаций в онкогене BRCA -1 у здоровых людей с нашей точки зрения имеет колоссальное практическое профилактическое значение и позволит осуществить меры, направленные на предотвращение онкопатологии яичников у здоровых BRCA носителей:

- мониторинг, который бы позволил выявлять прогнозируемые формы рака на ранних стадиях
- введение в практику превентивных хирургических вмешательств.

Все полученные в ходе нашего исследования результаты позволили создать на базе диспансера генетический канцер-регистр, который стал отправной точкой отсчета в формировании скрининговых программ и мер профилактики рака яичников.

Как известно, более 80 % больных РЯ страдают его серозной формой, и именно при этом гистологическом варианте рака наиболее специфичным маркером оказался СА 125. По данным разных авторов, чувствительность метода составляет 75-90 %. При других морфологических формах РЯ (муцинозной, эндометриоидной, светлоклеточной) этот маркер повышен у 30-60 % больных. Чем выше стадия заболевания и выраженнее метастатическое поражение брюшины — тем выше в крови средние показатели СА 125, однако использование этого маркера для скрининга и ранней диагностики невозможно в связи с повышением его уровня при воспалительных доброка-

чественных процессах и низких его значениях при начальных стадиях рака яичников. Однако использование комбинации двух маркеров – СА-125 и НЕ4 – показало совершенно иные результаты в диагностике рака яичников.

Материалом исследования явилась кровь 91 женщины в возрасте от 25-70 лет: 26 - практически здоровые (группа А), 31 - с доброкачественными образованиями яичников (группа В), 34 - с диагнозом рак яичников 1-3 стадии (группа С). За норму СА-125 взяли 0-35 ЕД\мл. По результатам контрольной группы и лабораторных данных норма НЕ4 составила 0-67 рМ. Средний уровень СА-125 и НЕ-4 у пациенток со злокачественным заболеванием яичников – 267,4 рМ и 480,7 ммоль/л, что значительно превышает этот уровень у женщин с доброкачественными образованиями придатков (53 рМ и 41 ммоль\л) и у здоровых женщин (12,3 рМ и 11,2 ммоль/л). При этом уровень СА-125 в группе В повышается в 95% случаев при эндометриоидных кистах яичников. Кроме того, уровень НЕ-4 повышен примерно у 50% пациенток со злокачественным процессом яичников, хотя у них концентрация СА-125 оставалась в норме. В диагностике ранних раков яичников уровень НЕ-4 положительный примерно в 50% случаев. Чувствительность и специфичность составляет 80 и 96%. Из нашего исследования выяснилось, что чувствительность и специфичность СА-125 совместно с НЕ-4 составляет 90 и 98%. Это значительно превышает чувствительность при одиночном использовании каждого из них.

Мониторинг групп высокого риска позволяет осуществить профилактику злокачественных опухолей яичников путем своевременного лечения фоновых процессов и предраковых заболеваний, ранних форм рака. Следует также отметить, что в пределах сформированных групп высокого риска по раку яичников возможно применение всего комплекса необходимых диагностических методик, что немислимо при обследовании всех женщин, обращающихся за гинекологической помощью. Даже при отсутствии классической симптоматики внимательное обследование, применение диагностических методик последовательно, по принципу «от простого к сложному», помогает диагностике.

Тем не менее, даже исключительно тщательный мониторинг носительниц мутаций в гене BRCA1 не гарантирует раннюю диагностику и лечение от онкологического заболевания. Поэтому в развитых странах мира стандарты медицинской помощи подобным женщинам включают профилактические операции.

Список литературы

1. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. Nijmegen breakage syndrome // Arch. Dis. Child. – 2000. – Vol.82. – P400-406.
2. Menkiszak J., Gronwald J., Gyrski B., Jakubowska A., Huzarski T., Byrski T., Foszczycska-Kioda M., Haus O., Janiszewska H., Perkowska M., Brozek I., Grzybowska E., Zientek H., Gyudy S., Kozak-Klonowska B., Urbacski K., Miturski R., Kowalczyk J., Pluzacka A., Niepsuj S., Koc J., Szwiec M., Drosik K., Mackiewicz A., Lamperska K., Stryzyk E., Godlewski D., Stawicka M., Warcho B., Bebenek M., Rozmiarek A., Rzepka-Gyrska I., Narod SA, Lubicki J.
3. Sokolenko A.P., Rozanov M.E., Mitiushkina N.V., Sberina N.Y., Iyevleva A.G., Chekmariova E.V., Buslov K.G., Shilov E.S., Togo A.V., Bit-Sava E.M., Voskresenskiy D.A., Chagunava O.L., Devilee P., Cornelisse C., Semiglazov V.F., Imyanitov E.N. Founder

mutations in early-onset, familial and bilateral breast cancer patients from Russia // *Fam. Cancer.* – 2007. – Vol.6. – P.281-286.

4. *Steffen J., Varon R., Mosor M., Maneva G., Maurer M., Stumm M., Nowakowska D., Rubach M., Kosakowska E., Ruka W., Nowecki Z., Rutkowski P., Demkow T., Sadowska M., Bidzicki M., Gawrychowski K., Sperling K.* Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland // *Int. J. Cancer.* – 2004. – Vol.111. – P.67-71.

5. *Seemanová E., Jarolim P., Seeman P., Varon R., Digweed M., Swift M., Sperling K.* Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2007. – Vol.99. – P.1875-1880.

6. *Plisiecka-Haiasa J., Dansonka-Mieszkowska A., Rembiszewska A., Bidzicki M., Steffen J., Kupryjaczcyk J.* Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) alterations and its protein (nibrin) expression in human ovarian tumours // *Ann. Hum. Genet.* – 2002. – Vol.66. – P.353-359.