

ФГУ «НИИ онкологии
им. Н.Н.Петрова
Росмедтехнологий»,
Санкт-Петербург

ХОРИОНИЧЕСКИЙ ГОНАДОТРОПИН КАК МАРКЕР ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ

Е.В.Цырлина, Т.Е.Порошина

Хорионический гонадотропин (ХГ) является наиболее совершенным маркером беременности и трофобластических опухолей. Вне этих состояний уровень ХГ очень низок. Высокая специфичность продукции ХГЧ и особенности его строения делают его незаменимым при диагностике и мониторинге трофобластических новообразований

Хорионический гонадотропин (ХГ) является наиболее совершенным маркером беременности и трофобластических опухолей. Вне этих состояний уровень ХГ очень низок, а при всех процессах, связанных с образованием трофобласта, содержание этого гормона в сыворотке и экскреция его с мочой значительно повышается [1, 2].

Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) по своей химической структуре является гликопротеином с молекулярным весом около 46кДа, состоящим из двух различных субъединиц альфа и бета, связанных нековалентно друг с другом (рис. 1).

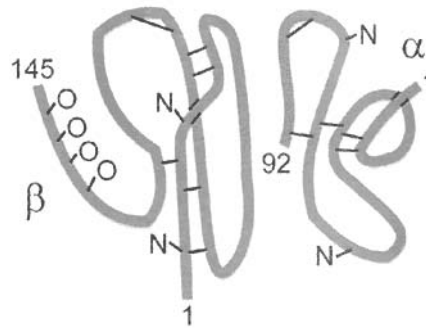


Рис.1. Хорионический гонадотропин—: α-субъединица и β-субъединица. Чёрточками показаны дисульфидные мостики, буквами N и O— N-и O-связанные олигосахариды

Альфа-субъединица ХГЧ (α-ХГЧ) идентична с альфа-субъединицами гормонов гипофиза ТТГ, ФСГ и ЛГ [31] и состоит из 92 аминокислот, связанных пятью дисульфидными мостиками. Бета-субъединица (βХГЧ) специфична для ХГЧ и отличает его от других белковых гормонов. Она состоит из 145 аминокислот, в том числе 12 цистеинов, образующих 6 дисульфидных связей в положениях 9-57, 38-90, 34-88, 23-72, 26-110 и 93-100, причем первые три образуют «цистиновый узел» (cystine knot), имеющий видовую специфичность и определяющий пространственную конформацию и стабильность молекулы β-субъединицы [39], аналогичное строение имеет и α-субъединица ХГЧ [34]. Аминокислотная последовательность первых 114 аминокислот β-субъединицы ХГЧ на 85% гомологична ЛГ, на 36% - ФСГ и на 46% - ТТГ. Высокая гомология между ЛГ и ХГЧ и тот факт, что они взаимодействуют с общим рецептором, определяет сходство их биологических и иммунологических свойств.

Важную часть молекулы ХГЧ составляют углеводы [14], на которые приходится около 30% его молекулярной массы (см. табл.1). Имеются аспарагиновые N- и сериновые O- связанные углеводные цепочки. O-связанные олигосахариды имеют довольно простую структуру и не влияют на биологическую активность гормона [34], тогда как N-связанные отличаются более сложным строением и характеризуются видовой и тканевой специфичностью. Альфа- субъединица ХГЧ содержит два N-связанных углеводных комплекса; β-субъединица имеет 6 олигосахаридных цепей, 2 из которых присоединены N-гликозидной связью по остаткам аспарагина, а 4 -O-гликозидной связью между остатками N-ацетилгалактозамина и группой OH остатков серина C-концевого участка полипептидной цепи. Углеводные компоненты ХГ необходимы для соединения субъединиц, поддержания конформации его молекулы, они защищают полипептидные цепи субъединиц от расщепле-

Таблица 1

Структура различных ХГЧ молекул, определяемых в сыворотке и моче при беременности и трофобластической болезни и раке [14]

Молекула ХГЧ	α субъединица, полипептид	α субъединица N-связ. олигосах.	β субъединица, полипептид	β субъединица N-связ. олигосах.	β субъединица O-связ. олигосах.
ХГЧ МВ 36,500	92 нерасщепл. аминокислоты	11 (моносахариды + дисахариды)	145 нерасщепл. аминокислоты	11 дисахаридов + фукоза	3 (трисахариды)
гХГЧ МВ 40,000	92 нерасщепл. аминокислоты	12 (моно и дисахариды + фукоза)	145 нерасщепл. аминокислоты	14 трисахаридов + фукоза	6 (гексасахариды)
Расщ. ХГЧ МВ 36,500	92 нерасщепл. аминокислоты	11 (моно и дисахариды)	145 аминокислот, расщепл. β 47-48, β 43-44, или β 44-45	11 дисахаридов + фукоза	3 (трисахариды)
ХГЧ без термин С пептида МВ 29,000	92 нерасщепл. аминокислоты	11 (моно и дисахариды)	1-92 аминокислоты, С-терм. пептид отсутств.	11 дисахаридов + фукоза	3 (трисахариды)
Своб. β субъединица МВ 22,000	нет α субъединицы	нет	145 нерасщепл. аминокислоты	11 дисахаридов + фукоза	3 (трисахариды)
Расщепл. Своб. β субъединица МВ 22,000	нет α субъединицы	нет	145 аминокислот, расщепл. β 47-48, β 43-44, или β 44-45	11 дисахаридов + фукоза	3 (трисахариды)
β сog-фрагмент (моча) МВ 9,500	нет α субъединицы	нет	Два пептида β 6-40, связанных с β 55-92	3-5 олигосахаридов	нет

ния протеолитическими ферментами. Удаление углеводных остатков приводит к значительному уменьшению периода полужизни ХГ в организме.

Комбинация двух белковых цепей и 8 боковых углеводных цепочек объясняет значительную гетерогенность структуры ХГЧ.

ХГЧ продуцируется и секретируется клетками цитотрофобласта и синцитиотрофобласта. Показано в культуре клеток, что с постепенной дифференциацией цитотрофобласта в синцитиотрофобласт секреция ХГЧ увеличивается с 60 до 350 ИЕ/л/мкг ДНК [29]. ХГЧ может вырабатываться опухолями трофобласта, а также новообразованиями яичка, яичника, мочевого пузыря и некоторыми другими. В частности, описана продукция ХГЧ клетками остеосаркомы [24]. В небольших количествах ХГЧ продуцируется в гипофизе [26].

ХГЧ может синтезироваться и редким видом трофобластических опухолей - эпителиоидными, которые по своему строению отличаются от клеток трофобласта и могут находиться как в матке, так и в других органах. К 2007 году описано только 25 таких опухолей [41, 45].

В процессе биосинтеза ХГ вначале на отдельных матричных РНК синтезируется полипептидная цепь каждой из субъединиц в виде соответствующих молекул-предшественников с более высокой молекулярной массой. Синтез и присоединение олигосахаридных цепей происходят в процессе трансляции субъединиц и после ее завершения. Субъединицы объединяются в одну молекулу в грубом эндоплазматическом ретикулуме.

Секреция свободных субъединиц ХГЧ происходит либо вследствие независимой регуляции их синтеза, либо из-за их несостоявшейся ассоциации. Существование независимой регуляции синтеза α - и β -субъединиц доказывается тем фактом, что соотношение количеств α - и β -субъединиц ХГЧ изменяется в процессе развития плаценты.

Так, в первом триместре беременности уровень мРНК α -субъединицы в 2 раза выше, чем мРНК β -субъединицы ХГЧ, в конце беременности в плаценте наблюдается заметное снижение уровней мРНК обеих субъединиц, но соотношение субъединиц α : β возрастает до 12:1 [8]. Таким образом, регуляция продукции субъединиц ХГЧ происходит независимо, но в целом они продуцируются в количестве, достаточном для обеспечения возможности образования биологически активного гетеродимера. В то же время имеются данные, указывающие на существование механизмов, препятствующих образованию димера ХГЧ. Одним из путей нарушения взаимодействия субъединиц является гипергликозилирование α -субъединицы, что мешает ее способности вовлекаться в образование полной молекулы ХГЧ [6].

Кластер генов, кодирующих β -субъединицы ХГЧ и ЛГ, локализован на 19-й хромосоме в области 13,3 длинного плеча [7, 38]. В нем содержится шесть копий гена β -ХГЧ, расположенных друг за другом в прямой и обратной последовательности и один ген β -ЛГ на правом конце кластера. Присутствие нескольких активных генов β -ХГЧ определяет высокий уровень продукции ХГЧ в начале беременности.

Молекула ХГЧ сравнительно легко диссоциирует на субъединицы (рис.2). Деградация ХГЧ начинается с одиночного расщепления между 47 и 48 аминокислотами β -субъединицы [6]. Это приводит к резкой потере функциональной активности ХГЧ и сокращению времени его стабильности в крови (с 13.00 часов до 22 часов) [42]. ХГЧ с расщепленной β -субъединицей не способен взаимодействовать с рецепторами ЛГ/ХГ клеток желтого тела и стимулировать продукцию прогестерона, и, возможно, выступает в роли антагониста нативного гормона [16].

После распада субъединиц расщепленная молекула β -ХГЧ теряет С-терминальный пептид (область 93-145

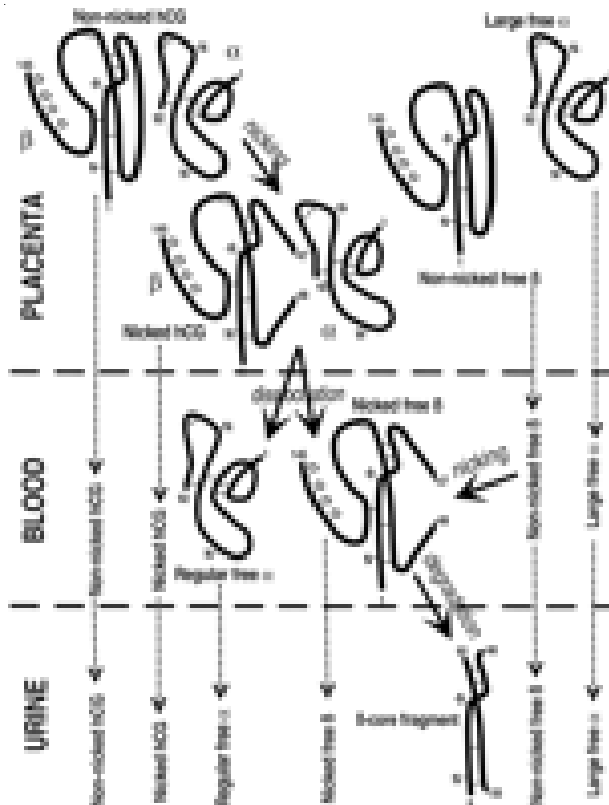


Рис.2. Структура ХГЧ и его дериватов из работы L.A. Cole [12]. Черные линии представляют полипептидные цепочки, цифры на концах линий обозначают количество аминокислот в цепочке, тонкие линии – дисульфидные связи, буквами N- и O- обозначены места присоединения олигосахаридов, стрелки обозначают переход молекул из плаценты в кровь и мочу и их расщепление и деградацию

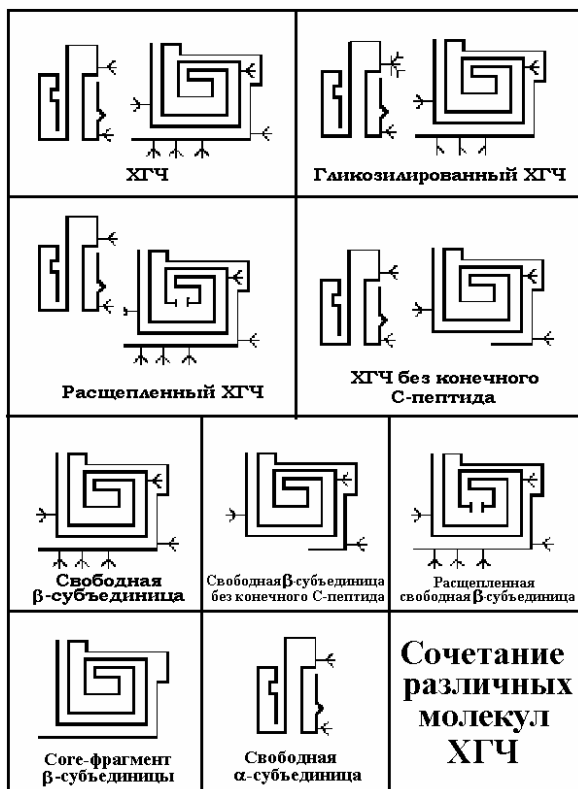


Рис. 3. Схема деградации молекулы ХГЧ [17]

аминокислот) и деградирует до конечного продукта распада ХГЧ – β-core -фрагмента (два участка β-субъединицы, 6-40 и 55-92, соединенные четырьмя дисульфидными связями (см. рис.2).

Важным метаболитом ХГЧ является его гипергликозилированный вариант (см. рис.2 и рис.3). Гликозилированный ХГЧ (гХГЧ) продуцируется инвазивными цитотрофобластическими клетками ранней беременности в отличие от нормального ХГЧ, который образуется в синцитиотрофобласте. гХГЧ обладает способностью аутокринного действия на клетки, в которых он вырабатывается, но очень слабо стимулирует продукцию прогестерона, тогда как эндокринный эффект ХГЧ во многом обеспечивается действием на клетки желтого тела. Другое отличие гХГЧ состоит в том, что он является промотором процессов имплантации яйцеклетки и инвазии хорионкарциномы и семиномы. Эти функции обеспечиваются за счет его действия на клетки цитотрофобласта через рецепторы трансформирующего фактора роста (ТФР-бета). Инвазивные свойства гХГЧ доказаны в эксперименте, где эти свойства блокировались специфическими антителами к гХГЧ [19].

Биологические свойства ХГЧ

ХГЧ стимулирует стероидогенез в половых железах за счет биологического воздействия, сходного с действием ЛГ. У небеременных женщин ХГЧ вызывает созревание фолликулов, овуляцию и образование желтых тел в яичниках, стимулирует синтез прогестерона и эстрогенов. У мужчин ХГ стимулирует секрецию тестостерона и дигидротестостерона половыми железами, инициирует и поддерживает сперматогенез. ХГЧ обеспечивает нормальное развитие беременности, препятствует отторжению зародыша за счет воздействия на иммунные процессы. Рецепторы ЛГ и ХГЧ очень широко распространены в органах репродуктивной системы, что позволяет заключить, что физиологическая роль ХГЧ шире, чем это считалось ранее. ХГЧ улучшает рецептивность матки, воздействуя на эндометрий и стромальную функцию фибробластов, и стимулирует ангиогенез эндометрия [27].

Тест-системы для определения ХГЧ и его дериватов

Определение ХГЧ в моче и сыворотке осуществлялось сначала в биологическом тесте, а затем радиоиммунологическим методом с поликлональными антителами к β-субъединице, что позволяло измерять равным образом все типы β-субъединицы ХГЧ (расщепленный и не расщепленный β-ХГЧ, свободную β-субъединицу и core-фрагмент β-субъединицы). Затем этот метод был заменен иммуноферментным методом типа сэндвич с моноклональными антителами [32]. Сегодня иммунохимическое определение ХГЧ в моче, плазме и сыворотке крови является основным методом диагностики нормально протекающей и патологической беременности, пузырного заноса, трофобластической болезни, хорионэпителиомы и ряда других опухолей.

На различных молекулах ХГЧ имеются множественные места связывания, к которым выработаны соответствующие антитела. Пять различных мест связывания антител идентифицированы на нерасщепленном ХГЧ, четыре отдельных места на расщепленном ХГЧ, два на свободной β (или α)-субъединице, шесть на нерасщепленной свободной β -субъединице, пять на расщепленной свободной β -субъединице и четыре места связывания на центральном β -фрагменте. Во всех тестах определения ХГЧ имеется по крайней мере одно антитело против бета-субъединицы, поэтому термин бета-ХГЧ используют обычно для любых методов определения ХГЧ или β -ХГЧ. Однако на свободной β -ХГЧ выявляются два эпитопа ($\beta 6$ и $\beta 7$), антитела к которым не взаимодействуют с молекулой ХГЧ [15], и, следовательно, при их использовании могут возникать определенные различия в получаемых результатах анализов.

Большинство наборов для определения ХГЧ включают несколько антител, ориентированных на различные места связывания молекулы ХГЧ и его подтипов. Некоторые тест-системы определяют только ХГЧ, другие определяют семь связанных с ХГЧ молекул. Это объясняется тем, что коммерческие наборы для определения ХГЧ, выпускаемые фирмами, используют разные наборы антител и, следовательно, могут выявлять несходные молекулы. Одни определяют только нерасщепленный ХГЧ, другие нерасщепленный ХГЧ и свободную β -субъединицу, третьи – расщепленный и нерасщепленный ХГЧ и свободную β -субъединицу и, наконец, есть наборы, которые определяют все типы молекул, включая core-фрагмент β -субъединицы. В крупных фирмах ХГЧ тест-системы создаются с использованием антител к различным участкам β -субъединицы вместе с антителами, направленными на C-терминальный пептид β -субъединицы, на ХЧГ димер, на свободные β - и α -субъединицы. В результате такого разнообразия используемых антител коммерческие тест-системы для определения ХГЧ могут измерять достаточно широкий спектр связанных с ним молекул.

Ограниченное число систем определяют core-фрагмент β -субъединицы, основную форму β -ХГЧ, присутствующую в моче. Использование различных комбинаций

антител в коммерческих системах приводят к тому, что получаемые при определении ХГЧ результаты могут значительно расходиться. В крайних случаях определяемые уровни могут различаться в 50 раз и давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты [12]. В табл. 2 приводится список молекул ХГЧ, рекомендованных ВОЗ и Международной федерацией клинической химии для определения при диагностике беременности и трофобластических опухолей.

Ложноположительные и ложноотрицательные результаты определения ХГЧ

Определение содержания ХГЧ является, как правило, высокочувствительным и очень точным методом диагностики, однако в ряде случаев использование в коммерческих системах различных комбинаций антител приводит к тому, что результаты определения ХГЧ могут значительно расходиться, а также давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты.

В случае трофобластических опухолей определение повышенного уровня ХГЧ играет ведущую роль в постановке диагноза. На основании результатов лабораторных исследований пациентам может быть назначена химиотерапия или операция и в отсутствие клинического подтверждения диагноза. Это требует в сомнительных случаях тщательной перепроверки результатов лабораторных анализов.

Чаще всего лабораторные тесты определяют общий ХГЧ, общий β -ХГЧ (ХГЧ + β субъединицу ХГЧ), свободную β -субъединицу. При проведении специального исследования качества анализа ХГЧ [10] выявлены ошибки определения общего ХГЧ в 22 из 235 лабораторий (9,3%) и общего β -ХГЧ в 8 из 61 лаборатории (13,1%). Ошибки в определении зависят от особенностей строения самой молекулы ХГЧ, а также от создаваемых наборов и специфичности антител, используемых для выявления различных дериватов ХГЧ [20].

Как правило, определение ХГЧ при нормальной беременности от 7-й недели и до конца не создает трудностей, т.к. основной молекулой, которая синтезируется в пла-

Таблица 2
Список молекул ХГЧ, рекомендованных для исследования Международной федерацией клинической химии (МФКХ) и ВОЗ

Молекула	Обозначение	Описание	Мол.вес
Хорионический гонадотропин человека	ХГЧ	ХГЧ, лишенный свободных и расщепленных форм	36,500
Расщепленный ХГЧ	ХГЧр	Частично деградированный ХГЧ, не имеющий пептидного мостика в β -ХГЧ в области 40-50	36,500
β -субъединица ХГЧ	β -ХГЧ	β -ХГЧ, разъединенная с β -ХГЧ	22,000
Расщепленная? β -субъединица ХГЧ	β -ХГЧр	Частично деградированный β -ХГЧ, не имеющий пептидного мостика в β -ХГЧ в области 40-50	22,000
β -core фрагмент ХГЧ (моча)	β -ХГЧсф	Остаток - β ХГЧ 6–40, соединенный дисульфидным мостиком с β -ХГЧ 55–92	9,500

центе, является нативный ХГЧ, определяемый всеми тест-системами. При трофобластической болезни в большом количестве продуцируются различные подтипы молекулы ХГЧ (см. табл.2), что, следовательно, может создавать определенные проблемы для диагностики и мониторинга этого заболевания.

Если используемая тест-система не имеет антител против той или другой молекулы, возникающей в результате синтеза в опухолевой клетке или деградации общего ХГЧ, могут получаться ложноотрицательные результаты [35].

В случае трофобластической болезни, когда значение ХГЧ падает ниже 100 мИЕ/мл, расщепленный ХГЧ и β -субъединица становятся основным или единственным источником ХГЧ, определяемым иммунологически. Следует упомянуть случаи, где рецидив хорионэпителиомы произошел незамеченным, т.к. при лабораторном исследовании не были выявлены расщепленные формы ХГЧ. Ложнонегативные результаты были также получены, когда исследователи не определяли свободную β -субъединицу, анализ которой является обязательным, когда уровень общего ХГЧ становится очень низким (< 3 ИЕ/л). Как показано в работе Cole L. и Butler S. [14], из 9 тестов, используемых для определения ХГЧ, 5 не определяли свободной β -субъединицы. Следовательно, эти 5-тест систем не пригодны для мониторинга ХГЧ-продуцируемых опухолей.

Аналогично расщепленная свободная β -субъединица является единственной молекулой ХГЧ, которая обнаруживается в сыворотке пациентов с нетрофобластическими опухолями: эмбриональными, мочевого пузыря, желудочно-кишечного тракта и легких.

Другим примером возможного получения ложноотрицательных результатов являются случаи появления ХГЧ без С-терминального пептида β -субъединицы. Если тест-система содержит антитела против этого деривата ХГЧ, результат определения будет отрицательным. В то же время, по данным Cole L. и Sutton J. [21], около 50% американских лабораторий создают антитела против С-терминального пептида β -субъединицы. В результате при слепом контрольном анализе 6 из девяти исследованных тест-систем не определяли или неверно определяли ХГЧ, лишённый С-терминального пептида β -субъединицы.

С другой стороны, в ряде случаев используемые антитела связываются с молекулами, отличными от ХГЧ и его дериватов, давая ложноположительный ответ. Так, при обследовании с помощью тест-систем фирм Beckman, DPC и Abbott по определению семи основных вариантов молекулы ХГЧ 59 пациенток с подтвержденной, трофобластической болезнью и 12 женщин с ложноположительным повышением ХГЧ было показано, что только наборы фирмы DPC определяли 5 нестандартных форм β -ХГЧ и не давали ложноположительных результатов [14].

Влиять на результаты анализов могут и присутствующие в сыворотке гетерофильные антитела. Это группа эндогенных антител, которые являются бивалентными человеческими антителами против других человеческих или человекоподобных антител. Человеческие антитела

могут обладать способностью к видовым перекрестам и связываться с животными антителами, в частности, с теми, которые используются в ХГЧ тесте. Эти перекрестно специфичные бивалентные антитела способны конкурировать с ХГЧ в соединении с захватывающими и мечеными антителами. Таким образом, их присутствие в крови может быть источником ложноположительных тестов. Обработка сыворотки до определения ХГЧ реагентом, блокирующим антитела, позволяет устранить ложноположительные тесты или снизить их значение больше чем на 50%. Обычно, чтобы избежать ложноположительных результатов, к пробам добавляют избыток неспецифических антител или животной сыворотки. Показано также, что снижение уровня ХГЧ после химиотерапии в случае ложноположительных тестов может быть не результатом воздействия на предполагаемую опухоль, а следствием снижения уровня гетерофильных антител под влиянием цитостатиков.

В работе Cole L. и Butler S. [14] представлено американское исследование, начатое в 1998 г., в котором сделана попытка оценить частоту и причину получения ложноположительных результатов при определении ХГЧ. Специальная служба проводила сопоставление данных анамнеза пациентов, результатов предшествующих исследований ХГЧ с указанием тест-систем, которые использовались, и величин общего, расщепленного, гипергликозилированного ХГЧ, свободной β -субъединицы и согефрагмента β -субъединицы, полученных при контрольном определении в сыворотке и моче этих больных. В рамках этого исследования в течение трех с половиной лет наблюдались 160 пациентов. В большинстве случаев поставленный ранее диагноз беременности, пузырного заноса или трофобластической болезни был подтвержден. Однако были выявлены и ложноположительные результаты. Это означает, что использованные в лабораториях антитела определяли молекулы, отличные от ХГЧ. К 2002 г в комиссии были собраны данные о 88 женщинах с предположительным ложноположительным уровнем ХГЧ. Аналогичные данные получены в Лионе, где с 1999 г по 2005 г проведен анализ результатов обследования 167 пациентов с трофобластическими опухолями, и у 54 человек (66%) были получены ложные результаты, которые повлекли за собой назначение химиотерапевтического лечения [28]. Ложноположительные результаты определения ХГЧ описаны и у больных трофобластической болезнью, находящихся в состоянии стойкой ремиссии [25].

С целью устранения возможных диагностических ошибок были предложены специальные критерии оценки исследования ХГЧ. Результат определения ХГЧ можно считать ложноположительным, если [14]:

1. Результаты анализов, выполненные в разных лабораториях, расходятся более чем в 5 раз.
2. В моче отсутствуют определяемые количества ХГЧ и относящиеся к ХГЧ молекулы.
3. В сыворотке определяются обычно не обнаруживаемые молекулы (например, соге фрагмент β -субъединицы).

4. Разведение сыворотки в 3 и 10 раз не дает пропорционального изменения концентрации ХГЧ.

5. Использование специальных соединений, блокирующих гетерофильные антитела, (heterophilic antibodies blocking reagent), меняет результат анализа.

Ложноположительное повышение уровня β -ХГЧ у небеременных женщин может происходить вследствие повышения его уровня в менопаузе [37]. Известно, что ХГЧ продуцируется в гипофизе, уровень его в перименопаузе составляет 6,4 +/- 3,2 МЕ/л, а в постменопаузе 11,6 +/- 7,0 МЕ/л и выше. Для дифференциальной диагностики в этом случае рекомендуется использовать пробу с эстрогенами, которые подавляют продукцию гонадотропинов. Необходимо подчеркнуть, что больные с повышением β -ХГЧ неясного генеза требуют длительного, регулярного обследования. В Charing Cross and Weston Park Hospital в Лондоне с 1981 по 2004 г. наблюдалось 14 таких женщин, у которых постоянно определяли повышенное содержание в сыворотке ХГЧ без каких-либо признаков трофобластических новообразований. У троих из них, однако, через 9-20 месяцев была диагностирована хорионэпителиома, но у 11 пациенток причина повышенного уровня ХГЧ так и не была установлена. Авторы исследования приходят к заключению, что больные с повышенным содержанием в крови и моче уровня ХГЧ требуют постоянного наблюдения, т.к. клинически опухоль может проявиться через много месяцев и даже лет [37].

Ложноположительные результаты анализа ХГЧ могут появляться в результате определения молекулы ХГЧ, которая продуцируется не трофобластом, а в других тканях. Это могут быть ХГЧ-подобные молекулы, лишенные углеводного компонента, свойственного плацентарному гормону, и, возможно, не обладающие его биологической активностью. Клетки трофобласта не единственные, где может синтезироваться ХГЧ, но в других клетках не происходит гликозилирования молекулы ХГЧ, что превращает белок в гормон [47].

Нормальная беременность

Нормальные значения ХГЧ у взрослых здоровых людей колеблются от 0 до 15 мМЕ/мл. Уровень ХГЧ растет с

первых дней беременности, еще до прикрепления оплодотворенной яйцеклетки к стенке матки, но активная продукция ХГЧ обеспечивается синцитиотрофобластом и регистрируется сразу после имплантации [11]. В моче и крови беременных женщин присутствуют различные виды ХГЧ—деградированные, гипер- и гипо- гликозилированные молекулы, свободные субъединицы, большие субъединицы и их фрагменты. Основным маркером беременности является свободная β -ХГЧ. В кровоток матери свободная β -ХГЧ поступает вследствие секреции клетками трофобласта, а также как один из продуктов распада ХГЧ [4, 12, 14]. Расщепление ХГЧ связывают с плацентарными макрофагами, лейкоцитарная эластаза которых чувствительна к определенному строению длинной петли β -ХГЧ. В связи с этим появление свободной β -ХГЧ в крови может зависеть от количества или активности плацентарных макрофагов [36].

Важное значение имеет исследование при беременности различных гликозилированных форм ХГЧ. Показано, что появление в сыворотке того или иного типа гормона определяется тем, какие клетки доминируют на данном сроке беременности. В частности, в цитотрофобластах синтезируются более гликозилированные, а в синцитиотрофобласте менее гликозилированные формы ХГЧ [33]. Гипергликозилированный ХГЧ является доминирующей формой ХГЧ, продуцируемой в течение 2-й и 3-й недель от начала беременности (табл.3). Во время первой, второй, третьей и последующих недель беременности гипергликозилированный ХГЧ постепенно замещается нативным ХГЧ. По мере развития беременности доля гипергликозилированного деривата в общем ХГЧ падает от >80, 63,50, 25% до <1% [9,23]. Если в день имплантации ГлХГЧ составляет в моче менее 50% общего ХГЧ, это показатель плохой перспективы беременности, т.к. ГлХГЧ - показатель инвазии оплодотворенной яйцеклетки [40].

Гликозилированный ХГЧ является информативным маркером угрозы прерывания беременности и преэклампсии, а также маркером трофобластической болезни, если не происходит его снижения после 3-й недели беременности [13].

Помимо ХГЧ плацента является источником образования гормонов и других биологически активных ве-

Таблица 3
Содержание различных вариантов молекулы ХГЧ в сыворотке и моче при беременности, трофобластической болезни и хорионэпителиоме [14]

Молекулы ХГЧ	Беременность	Пузырный занос			Хорионэпителиома	Другие опухоли
	7 нед. до родов	До удаления	После удаления ХГ>100ЕД/л	После удаления ХГ ≤ 100ЕД/л		
ХГЧ	+++	+++	+++	+	+/-	
Гипергликоз. ХГЧ	+	+	+	+	+++	
Расщепленный ХГЧ	+	+	+	++	+	
ХГЧ без С-конечн. пептида на β -ХГЧ		+/-	+/-	+/-		
Свободн. β -ХГЧ	+	+	+	++	+	
Расщепл. β -ХГЧ				++	+	++
Core фрагмент β -ХГЧ (моча)	+++	++	++	+++	+	+++

ществ, важных для нормального течения беременности и развития плода. В ней синтезируется прогестерон, соматомаммотропин (СМТ), или плацентарный лактоген, стимулирующий у беременных формирование секреторных отделов молочных желёз, тиреотропин (ТТГ), выделен фактор роста фибробластов - полипептид, стимулирующий размножение клеток мезодермального происхождения, трансферрин - белок, необходимый для размножения практически всех клеток, а также для переноса железа. Одни и те же клетки париетальной и базальной частей децидуальной оболочки могут содержать пролактин и релаксин. В цитотрофобласте найден релаксин, а в синцитиотрофобласте - пролактин и/или плацентарный лактоген. Релаксин - гормон из семейства инсулинов, в течение беременности оказывает расслабляющее действие на миометрий, перед родами приводит к расширению маточного зева и повышению эластичности тканей лонного сочленения. Кортиколиберин, вероятно, определяет срок наступления родов.

ХГЧ в диагностике пузырного заноса, трофобластической болезни и хорионэпителиомы

Понятие “трофобластическая болезнь” обобщает несколько форм патологических состояний трофобласта: полный и частичный пузырный занос, инвазивный пузырный занос, хориокарциному, трофобластическую опухоль на месте плаценты и эпителиоидную трофобластическую опухоль. К злокачественным трофобластическим опухолям относятся инвазивный пузырный занос, хориокарцинома, трофобластическая опухоль плацентарного ложа и эпителиоидная трофобластическая опухоль.

ХГЧ является идеальным высокочувствительным маркером для выявления трофобластических опухолей и злокачественных новообразований, возникающих из зародышевых клеток.

Как и при нормальной беременности, в крови и моче обнаруживаются ХГЧ, его свободные субъединицы, деградированные молекулы и молекулы с разными боковыми олигосахаридными цепочками (см. табл. 3, рис. 2 и рис.3).

Гормональными признаками развития хорионэпителиомы являются:

1. Высокие значения ХГЧ, превышающие максимальный уровень (150 000 мМЕ/мл), свойственный нормальной беременности.
2. Отсутствие снижения уровня ХГЧ в сыворотке после 12-й недели беременности.
3. Обнаружение или нарастание титра хорионического гормона после оперативного лечения пузырного заноса.

Уровень ХГЧ при хорионэпителиоме может колебаться в больших пределах от $<10^3$ МЕ/л до 10^4 - 10^5 МЕ/л и $>10^5$. Описано наблюдение хорионэпителиомы у 24-летней женщины, у которой уровень ХГЧ в сыворотке составлял 11 910 000 мМЕ/мл, пациентка получила химиотерапию и через 2 года после достижения ремиссии забеременела и родила здорового ребенка [30].

Ведущую роль в дифференциальной диагностике опухолей, локализирующихся в плаценте, играет определение свободной β -субъединицы ХГЧ. Если свободная β -субъединица ХГЧ составляет $>35\%$ от общего ХГЧ, то в 100% случаев это позволяет утверждать, что речь идет об опухоли, а не о ложноположительном подъеме ХГЧ. В случае же, если доля свободной β -субъединицы ХГЧ превосходит 80%, это показывает, что опухоль имеет плацентарное происхождение [18] и является злокачественной [46].

Критерием диагноза трофобластических новообразований после пузырного заноса, принятых FIGO в 2000 г. [3] является увеличение уровня β -ХГЧ в сыворотке в трех последовательных исследованиях в течение 2 недель (1, 7, 14 дни) и через 6 месяцев и более после удаления пузырного заноса. В норме уровень β -ХГЧ нормализуется через 4–8 недель после операции. Если повышенный уровень β -ХГЧ сохраняется в течение 8 недель, это может свидетельствовать о развитии злокачественной трофобластической опухоли, что требует обязательного повторного обследования больной и принятия решения о терапии. Наблюдение может быть продолжено до 16 недель только, если выявляется прогрессивное снижение уровня ХГЧ. При лечении больных трофобластическими опухолями контроль β -ХГЧ полагается проводить еженедельно до нормализации его уровня, затем первые 3 последующие месяца - каждые 2 недели до нормализации и затем ежемесячно, а через полгода раз в 2 месяца. Показано также, что диагностика хорионэпителиомы после удаления пузырного заноса может быть произведена в более ранние сроки, если использовать соотношение концентраций α -ХГЧ/ХГЧ + β -ХГЧ, β -ХГЧ/ХГЧ+ β -ХГЧ и α ХГЧ/ β -ХГЧ [43,44].

Учитывая значение расщепленных форм и гликозилированного ХГЧ в диагностике злокачественных опухолей трофобласта, были разработаны специальные антитела для выявления этих метаболитов ХГЧ. Показано, что расщепленные формы не появляются при беременности, а гХГЧ присутствует только на очень ранних сроках беременности и через 6 недель исчезает [5]. Определение этих молекул в более поздние сроки является показателем трофобластической опухоли.

Гликозилированный ХГЧ (гХГЧ) может служить также для дифференциальной диагностики трофобластической болезни и хорионэпителиомы. При низком исходном уровне ХГЧ и отсутствии клинических симптомов заболевания основным критерием злокачественного процесса является доля гХГЧ в общем ХГЧ. Уровень гХГЧ существенно увеличивается за 0,5-11 месяцев и расценивается как надежный показатель в дифференцировке хорионэпителиомы и пузырного заноса [12, 14].

Как было показано ранее, циркулирующие ХГЧ (при пузырном заносе) и гипергликозилированный ХГЧ (при инвазивной трофобластической болезни и хорионэпителиоме) становятся расщепленными, когда уровень их снижается после лечения (табл.2). ХГЧ и гликозилированный ХГЧ расщепляется на уровне β -43-44, β -44-45 или β -47-48. Расщепление ведет к быстрой диссоциации молекул и ос-

вобождению расщепленной свободной β -субъединицы. В случае трофобластической болезни, когда значение ХГЧ падает ниже 100 мМЕ/мл, расщепленный ХГЧ и β -субъединица становятся основными или единственными видами ХГЧ, определяемыми иммунологически.

При мониторинге пациентов с трофобластической болезнью важно определять все метаболиты ХГЧ. Важно также предупреждать лаборатории о возможно высоком уровне ХГЧ с тем, чтобы разводить пробы сыворотки.

В некоторых случаях наблюдается большая доля расщепленных молекул и центрального фрагмента β -субъединицы. Такое переключение от нерасщепленных к превалированию расщепленных форм наблюдается после удаления пузырного заноса, после проведения химиотерапии по поводу трофобластической болезни. Если обнаруживаются после лечения расщепленные формы, это показатель того, что остаются некротизированные или не полностью разрушенные клетки трофобласта.

Всем женщинам с различными нарушениями менструального цикла и беременностью в анамнезе, а также у молодых пациенток с метастазами неясной этиологии следует контролировать уровень ХГЧ в сыворотке.

Диагноз хорионэпителиомы подтверждает также обнаружение в сыворотке крови трофобластического β -глобулина, особенно важную роль играет обнаружение этого белка у больных с низкими показателями хорионического гормона (например, при выраженном некрозе опухоли).

Уровень ХГ в моче

Исследование мочи широко использовалось для диагностики и мониторинга больных с трофобластической болезнью. Этот анализ остается важным и сегодня, учитывая, что соединения, которые могут вступать в перекрестную реакцию с антителами и приводить к ложноположительному или ложноотрицательному результату, присутствуют только в сыворотке. Поэтому в сомнительных случаях рекомендуется использовать мочевой тест, чтобы подтвердить или опровергнуть результаты, полученные при исследовании сыворотки.

Нерасщепленная ХГЧ является очень стабильной молекулой. В 1982 г. установлено время ее полураспада 700 ч при 37°C. Нерасщепленный ХГЧ в стерильной сыворотке распадается со скоростью $14 \pm 1,4\%$ в неделю. В моче за неделю распадается $34 \pm 5,6\%$. Однако гликозилированный и расщепленный ХГЧ быстрее диссоциирует на сво-

бодные единицы, которые быстро деградируют до core фрагмента β -субъединицы. Core-фрагмент β -субъединицы является главным метаболитом ХГЧ, определяемым в моче. Он обнаруживается во всех случаях избыточной продукции ХГЧ, и содержание его особенно высоко с 7-й недели беременности, при пузырном заносе и злокачественных опухолях яичника, мочевого пузыря и шейки матки (см.табл.3).

Core фрагмент β -субъединицы является маркером синдрома Дауна плода. Для диагностики синдрома Дауна определение core фрагмента β -субъединицы эффективнее, чем использование других тестов.

Другие опухоли

У мужчин и небеременных женщин повышение концентрации ХГЧ является достоверным признаком злокачественного роста. Определение ХГЧ рекомендуется применять для диагностики, мониторинга эффективности терапии и раннего выявления рецидивов трофобластических опухолей, хорионкарциномы яичника или плаценты, опухолей яичка, яичника, мочевого пузыря, остеосаркомы. В сыворотке это могут быть ХГЧ, расщепленная свободная β -субъединица, в моче центральный фрагмент β -субъединицы [24]. Расщепленная свободная β -субъединица является единственной молекулой ХГЧ, которая обнаруживается в сыворотке пациентов с нетрофобластическими опухолями: эмбриональными, опухолями мочевого пузыря, желудочно-кишечного тракта и легких. Следовательно, для диагностики этих опухолей пригодны те системы, которые определяют расщепленную свободную β -субъединицу.

Уровень β -ХГЧ при этих опухолях может варьировать от очень низких количеств, определяемых только иммуногистохимически до высокого содержания в сыворотке [24].

Таким образом, высокая специфичность продукции ХГЧ и особенности его строения делают его практически идеальным опухолевым маркером для выявления трофобластических опухолей и злокачественных новообразований, возникающих из зародышевых клеток. Чувствительность данного маркера при выявлении карциномы яичка и плаценты равняется 100%. Обеспечиваемая этим маркером возможность своевременной диагностики и надежного мониторинга заболевания позволяет полностью излечить 95 % больных, у которых отсутствовали метастазы, и 83 % больных с метастазами.

Литература

1. Нечаева И.Д., Дильман В.М. Трофобластическая болезнь. – Л., Медицина. – 1976. – 160 с.
2. Бохман Я.В. Руководство по онкогинекологии. Л. Медицина. – 1989. – 464 с.
3. Benedet J.L., Bender H., Jones H. 3rd, Ngan H.Y., Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers FIGO Committee on Gynaecologic Oncology // Int J Gynaecol Obstet. – 2000. – Vol.70. – № 2. – P. 209-262.
4. Berger P., Surgeon C., Bidart J.M., Paus E., Gerth R., Niang M., Bristow A., Birken S., Stenman U.H. The ISOBM TD-7 Workshop on hCG and related molecules. Towards user-oriented standardization of pregnancy and tumor diagnosis: assignment of epitopes to the three-dimensional structure of diagnostically and commercially relevant monoclonal antibodies directed against human chorionic gonadotropin and derivatives// Tumour Biol. – 2002. – Vol. 23. – №1. – P.1-38.

5. Birken S, Kovalevskaya G, O'Connor J. Immunochemical measurement of early pregnancy isoforms of HCG: potential applications to fertility research, prenatal diagnosis, and cancer // Arch Med Res. – 2001. – Vol.32. – №6. – P.635-643.
6. Blithe DL, Iles RK. The role of glycosylation in regulating the glycoprotein hormone free alpha-subunit and free beta-subunit combination in the extraembryonic coelomic fluid of early pregnancy // Endocrinology. – 1995. – Vol.136. – P.903-910.
7. Boorstein W. R., Vamvakopoulos N. C., Fiddes J. C. Human chorionic gonadotropin β -subunit is encoded by at least eight genes arranged in tandem, inverted pairs // Nature. – 1982. – Vol. 300. – P. 419-422.
8. Boothby M, Kukowska J, Boime I. Imbalanced of human choriogonadotropin alpha, beta subunits reflects the steady state levels of the corresponding mRNAs // JBC. – 1983. – Vol.258. – P.9250-9253.
9. Butler SA, Kbanlian SA, Cole LA. Detection of early pregnancy forms of human chorionic gonadotropin by home pregnancy test devices // Clin Chem. – 2001. – Vol.47. – №12. – P.2131-2136.
10. Cao ZT, Rej R. Are laboratories reporting serum quantitative hCG results correctly? // Clin Chem. – 2008. – Vol.54. – №4. – P.761-764.
11. Carreiro-Lewandowski E. Pregnancy testing: detection of human chorionic gonadotrophin (HCG) // J Med Technol. – 1986. – V3. – P.473-476.
12. Cole LA. Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites // Clin Chem. – 1997. – Vol. 43. – №12. – P.2233-2243.
13. Cole LA. Hyperglycosylated hCG // Placenta. – 2007. – Vol.28. – №10. – P.977-986.
14. Cole L, Butler S. Detection of hCG in Trophoblastic disease. The USA hCG reference Service Experience // J.Reprod Med. – 2002. – Vol. 47. – P.433-444.
15. Cole LA, Kardana A. Discordant results in human chorionic gonadotropin assays // Clin. Chem. – 1992. – Vol. 38. – P.263-270.
16. Cole LA, Kardana A, Andrade-Gordon P. et al. The heterogeneity of hCG: III. The occurrence, biological and immunological activities of nicked hCG // Endocrinology. – 1991. – Vol.12. – P. 1559-1567.
17. Cole LA, Kardana A, Park S.Y., Braunstein G.D. The deactivation of hCG by nicking and dissociation // J Clin Endocrinol Metab. – 1993. – Vol.76. №3. – P.704-710.
18. Cole LA, Kbanlian SA, Muller C.Y., Giddings A, Kohorn E, Berkowitz R. Gestational trophoblastic diseases: 3. Human chorionic gonadotropin-free beta-subunit, a reliable marker of placental site trophoblastic tumors // Gynaecol Oncol. – 2006. – Vol.102. – № 2. – P.160-164.
19. Cole LA, Kbanlian SA, Riley J.M., Butler SA. Hyperglycosylated hCG in gestational implantation and in choriocarcinoma and testicular germ cell malignancy tumorigenesis // J Reprod Med. – 2006. – Vol.51. – № 11. – P.919-929.
20. Cole LA, Shababi S, Butler SA, Mitchell H, Newlands E.S., Behrman H.R., Verrill H.L. Utility of commonly used commercial human chorionic gonadotropin immunoassays in the diagnosis and management of trophoblastic diseases // Clin Chem. – 2001. – Vol.4. – №2. – P.308-315.
21. Cole LA, Sutton J.M. Selecting an appropriate hCG test for managing gestational trophoblastic disease and cancer // J. Reprod Med. – 2004. – Vol.49. №7. – P.545-553.
22. Cole LA. Hyperglycosylated hCG // Placenta. – 2007. – Vol.28. – №10. – P.977-986.
23. O'Connor J.F., Ellish N, Kakuma T., Schlatterer J, Kovalevskaya G. Differential urinary gonadotrophin profiles in early pregnancy and early pregnancy loss // Prenat Diagn. – 1998. – Vol.18. – P.1232-1240
24. Demirtas E, Krishnamurthy S, Tulandi T. Elevated serum beta-human chorionic gonadotropin in nonpregnant conditions // Obstet Gynaecol Surv. – 2007. – Vol.62. – №10. – P.675-679.
25. Diaz Mucoz de la Espada VM, Arranz Arijia JA, Khosravi Shabi P, Encinas Garcia S, Alvarez Alvarez R, González Beca R. False-positive beta-human chorionic gonadotropin values in the follow-up of gestational trophoblastic disease // Clin. Transl. Oncol. – 2007. – Vol.9. – №5. – P.332-334.
26. Dirnbofer S, Hermann M, Hittmair A, Hoermann R, Kapelari K, Berger P. Expression of the human chorionic gonadotropin-beta gene cluster in human pituitaries and alternate use of exon 1 // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1996. – Vol.81. – №12. – P.4212-4217.
27. Filicori M, Fazleabas A.T., Huhtaniemi I, Licht P, Rao Ch.V., Tesarik J, Zygmunt M. Novel concepts of human chorionic gonadotropin: reproductive system interactions and potential in the management of infertility // Fertil. Steril. – 2005. – Vol.84. – №2. – P.275-284.
28. Golfier F, Labrousse C, Frappart L, Mathian B, Guastalla J.P., Trillet-Lenoir V, Hajri T, Schott A.M., Raudrant D. Evaluation of treatment relating to gestational trophoblastic tumor registered to the French Trophoblastic Disease Reference Center (TDRC) in Lyon from 1999 to 2005 // Gynaecol. Obstet. Fertil. – 2007. – Vol.35. – №3. – P.205-215.
29. Handschub K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, Fournier T. Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells // Placenta. – 2007. – Vol.28. – № 2-3. – P.175-184.
30. Hsieh T.Y., Hsu K.F., Kuo P.L., Huang S.C. Uterine choriocarcinoma accompanied by an extremely high human chorionic gonadotropin level and thyrotoxicosis // J. Obstet. Gynaecol. Res. – 2008. – Vol. 34. – № 2. – P.274-278.

31. Keutmann H.T., Dawson B., Bishop W.H., Ryan R.J. Structure of human luteinizing hormone alpha subunit// *Endocr. Res. Commun.* – 1978. – Vol.5. – №1. – P.57-70.
32. Kbazaeli M.B., England B.G., Dieterle R.C., Nordblom G.D., Kabza G.A., Beierwaltes W.H. Development and characterization of a monoclonal antibody which distinguishes the beta-subunit of human chorionic gonadotropin (beta hCG) in the presence of the hCG// *Endocrinology.* – 1981. – Vol.109. – №4. – P.1290-1292.
33. Kovalevskaya G., Kakuma T., Schlatterer J., O'Connor J.F. Hyperglycosylated HCG expression in pregnancy: cellular origin and clinical applications// *Mol. Cell Endocrinol.* – 2007. – Vol. 260 – 262. – P. 237-243.
34. Lustbader J.W., Lobel L., Wu H., Elliott M.M. Structural and molecular studies of human chorionic gonadotropin and its receptor// *Recent Prog. Horm. Res.* – 1998. – Vol.53. – P.395-424.
35. Mebra R., Huria A., Gupta P., Mohan H. Choriocarcinoma with negative urinary and serum beta human chorionic gonadotropin (betaHCG)—a case report// *Indian J Med Sci.* – 2005. – Vol.59. – № 12. – P.538-541.
36. McDonald N.Q., Lapatto R., Murray-Rust J. et al. New protein fold revealed by 2.3 Å resolution crystal structure of nerve growth factor // *Nature.* – 1991. – Vol. 354. – P. 411-414.
37. Palmieri C., Dhillon T., Fisher R.A., Young A.M., Short D., Mitchell H., Aghajanian C., Savage P.M., Newlands E.S., Hancock B.W., Seckl M.J. Management and outcome of healthy women with a persistently elevated beta-hCG // *Gynaecol Oncol.* – 2007. – Vol.106. – №1. – P.35-43.
38. Policastro P., Ovitt C.E., Hoshina M. et al. The β -subunit of human chorionic gonadotropin is encoded by multiple genes // *JBC.* – 1983. – Vol. 258. – P. 11492-11499.
39. Ryan R.J., Charlesworth M.C., McCormick D.J., Milius R.P., Keutmann H.T. The glycoprotein hormones: recent studies of structure-function relationships// *FASEB J.* – 1988. – Vol.2. – P.2661-2669.
40. Sasaki Y., Ladner D.G., Cole L.A. Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin and the source of pregnancy failures // *Fertil/Steril.* – 2008. – Vol.89. – № 6. – P.1781-178.
41. Sibb I.M., Kurman R.J. Epithelioid trophoblastic tumor: a neoplasm distinct from choriocarcinoma and placental site trophoblastic tumor simulating carcinoma// *Am. J. Surg. Pathol.* – 1998. – Vol.22. – № 11. – P.1393-1403.
42. Spencer K., Macri J.N., Carpenter P. et al. Stability of intact chorionic gonadotropin in serum. Liquid whole blood and dried whole-blood filter-paper // *Clin. Chem.* – 1993. – Vol. 39. – №6. – P.1064-1068.
43. van Trommel N.E., Ngo Duc H., Massuger L.F., Schijf C.P., Sweep C.G., Thomas C.M. Early identification of persistent trophoblastic disease with serum hCG concentration ratios // *Int. J. Gynaecol. Cancer.* – 2008. – Vol.18. – № 2. – P.318-23.
44. van Trommel N.E., Sweep F.C., Schijf C.P., Massuger L.F., Thomas C.M. Diagnosis of hydatidiform mole and persistent trophoblastic disease: diagnostic accuracy of total human chorionic gonadotropin (hCG), free hCG {alpha}- and {beta}-subunits, and their ratios // *Eur. J. Endocrinol.* – 2005. – Vol. 153. – №4. – P.565-575.
45. Urabe S., Fujiwara H., Miyoshi H., Aribiro K., Soma H., Yoshibama I., Mineo S., Kudo Y. Epithelioid trophoblastic tumor of the lung // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* – 2007. – Vol.33. – №3. – P.397-401.
46. Vartiainen J., Alfthan H., Lehtovirta P., Stenman U.H. Identification of choriocarcinoma by the hCG beta-to-hCG proportion in patients with delayed diagnosis caused by contraceptive use// *Contraception.* – 1998. – Vol.57. – № 4. – P.257-260.
47. Yoshimoto Y., Wolfsen A.R., Hirose F., Odell W.D. Human chorionic gonadotropin—like material: presence in normal human tissues // *Am. J. Obstet. Gynaecol.* – 1979. – Vol.134. – №7. – P.729-733.