

СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ДИАГНОСТИКИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА

Доника А.Д., Булычева О.С.

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, e-mail: addonika@yandex.ru

Согласно современным исследованиям, любой воспалительный процесс сопровождается гиперпродукцией и активацией клеток иммунной системы, которые высвобождают ряд цитокинов и факторов роста, играющих ведущую роль в прогрессировании полиорганных нарушений при гнойно-воспалительных заболеваниях[1]. Цитокины – это гликопротеиды, выполняющие функции медиаторов межклеточных сигналов. Важной особенностью является пара- и аутокринный характер их действия на клетки-мишени. Связывание цитокинов с рецепторами на поверхности клетки стимулирует процессы клеточной пролиферации, дифференцировки, роста и секреции. Несмотря на локальный характер действия цитокинов, некоторые из них определяются в системном кровотоке, что может иметь диагностическое значение при гнойно-септических заболеваниях.

В этой связи представляется актуальным определение патогенетически значимых маркеров полиорганных нарушений у больных с гнойно-воспалительными заболеваниями. Результаты общеклинических исследований в большинстве случаев недостаточны для понимания тонких механизмов нарушений функции органов и систем у данной категории больных. Патогенез полиорганных нарушений у больных с гнойно-воспалительными заболеваниями очень сложен и до конца не раскрыт. Знание патогенетических механизмов развития полиорганных нарушений имеет не только теоретическое, но и прикладное значение. Механистический подход – только с позиций выявления воспалительных изменений, морфологических находок и различных способов оперативного лечения недостаточен для понимания всего спектра нарушений. Литературные данные свидетельствуют о существовании механизмов интеграции многочисленных медиаторов воспаления, уточнение которых может иметь существенное значение для практического здравоохранения. Применение иммунологического анализа позволит точно оценить степень выраженности полиорганных нарушений у детей с гнойно-септическими заболеваниями, научно обосновать тактику лечения, оценить возможный исход заболевания.

Список литературы

1. Бактериальный эндотоксикоз: взгляд патолога: монография / В.Б. Писарев. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2008. – 306 с.

АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН КАК БИОМАРКЕР ПЛОДНОГО ПЕРИОДА, ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ

Терентьев А.С., Терентьев А.А.

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, e-mail: aaterent@inbox.ru

Впервые выявленный в электрофорезе в 1956 году Бергстрандом о Кзаром, как дополнительная фракция, следующая за альбумином, в сыворотках крови плодов человека, альфа-фетопротейн в 1961 году был иммунохимически идентифицирован как обособленный антиген сыворотки крови человека, свойственный плодному периоду. В 1963 году этот белок был обнаружен Ю.С. Татариновым в сыворотке крови больного первичным раком печени, что подтвердило ранее полученные на мышах результаты Г.И. Абелева и сотрудников (1962 год), выявивших подобный белок в сыворотке крови мышей с химически индуцированной гепатомой. Это открытие стимулировало исследование данного белка и разработку методов, позволяющих использовать выявление альфа-фетопротейна в диагностических целях. Однако применявшиеся методы иммунодиффузии и иммуноэлектрофореза не были достаточно чувствительными. В 1971 году Руслати и Сеппала, разработали метод радиоиммуноопределения альфа-фетопротейна, что резко в 1000 раз повысило чувствительность определения по сравнению с наиболее часто применяемым для этих целей иммунодиффузионным методом, и продемонстрировали наличие этого белка в сыворотке крови взрослых здоровых людей. Этот метод помимо высокой чувствительности являлся и высокотехнологичным методом, что характерно и для пришедшего ему на смену иммуноферментного метода, характеризующегося большей безопасностью и экологичностью.

В связи с возросшим интересом к изучению эмбриональных белков и сходных с ними белков опухолевых тканей в 1973 году было организовано международное общество по онкобиологии ISOBM – International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine и прошел первый его съезд, а в 1980 году съезд ISOBM прошел в СССР, и в том же году вышел первый номер журнала этого общества «Oncodevelopmental Biology and Medicine» (с 1984 года «Tumor Biology»), в котором отцы-основатели ISOBM и редакторы этого журнала Фишман и Хирай так оценили значение открытия АФП как биомаркера: «Хотя идея связи между эмбриогенезом и канцерогенезом обсуждалась уже около 100 лет, только открытие Абелева и Татаринова в 1963 году альфа-фетопротейна (АФП) в гепатоме и фетальной печени человека и мыши при отсутствии его

в печени взрослых стало рубежом, с которого началась новая эра биологии развития, онкобиологии и онкомедицины». С 2008 года ISOBM, сохранив прежнюю аббревиатуру своего названия, стал именоваться «International Society of Oncology & BioMarkers».

Применение высокочувствительных методов радиоиммуноопределения и иммуноферментного определения АФП позволило достоверно продемонстрировать наличие небольших концентраций (5-7 мкг/л) АФП в сыворотке крови взрослых здоровых людей и определить диагностический уровень АФП, характерный для гепатоцеллюлярного рака (20 мкг/л, превышение нормального уровня в 3-5 раз). Повышение уровня АФП до 20 мкг/л и несколько выше может быть связано с острыми и хроническими гепатитами, циррозами печени, тирозинемией, недоразвитием вилочковой железы. Следует заметить, что для 40-45% гепатом не характерен увеличенный синтез АФП и поэтому при их развитии не удастся выявить повышенного содержания альфа-фетопротеина в крови таких больных, тест на АФП у таких больных не чувствителен на присутствие патологии. Поэтому в настоящее время принято считать наивысшей положительной результативностью теста на АФП при гепатоцеллюлярном раке 55-60%. Увеличение концентрации АФП в сыворотке крови взрослых особей является признаком возникновения патологических состояний, в первую очередь опухолевых заболеваний, таких как первичный рак печени и тератокарцинома. Повышение уровня АФП выявлено также в отдельных случаях рака желудка, панкреатобластомы и рака легкого.

Наибольшей чувствительностью при иммуноопределении АФП обладают методы, основанные на радиоиммуноопределении. С их помощью удается определять АФП при его минимальном содержании 0,2-1 мкг/л. Усовершенствованные методы энзимо-иммуноопределения приблизились по чувствительности к ним, выявляя до 0,5-3 мкг/л АФП. Предел чувствительности электрохемиллюминесцентных методов – 0,4 мкг/л. И наименее чувствительными являются нефелометрические методы, основанные на иммуноагглютинации латексных частиц – 5 мкг/л. Все эти методы позволяют определять АФП в сыворотке крови здоровых взрослых людей, хотя нефелометрические – на пределе чувствительности, способны выявлять изменение уровня АФП в крови при развитии патологического процесса, и широко, и успешно применяются для скрининга и мониторинга гепатоцеллюлярного рака.

Изучение альфа-фетопротеина позволило выявить, что по химической структуре АФП человека является гликопротеином, содержащим до 3-5% углеводов. Его молекулярная масса колеблется в пределах 69-70 кДа, в зависимости

от содержания углеводов. Первичная структура АФП определена как прямым секвенсом молекулы, так и на основе нуклеотидной последовательности его м-РНК, продукт трансляции которой у человека содержит 609 а.о. (SwissProt P02771), в ходе процессинга отщепляется 18 а.о., и в состав зрелой молекулы АФП человека входит 591 а.о. Эти данные были установлены как для гепатомного, так и для эмбрионального АФП.

Биологические функции АФП до настоящего времени остаются невыясненными. В различных экспериментальных моделях, как *in vitro*, так и *in vivo*, обнаружен целый набор видов биологической активности АФП человека и некоторых животных. В различных экспериментах была показана его способность специфически связывать и переносить ненасыщенные жирные кислоты. Наряду с жирными кислотами (главным образом, полиненасыщенными: арахидоновой, С20:4, и докозагексаеновой, С22:6), АФП из разных источников способен связывать и транспортировать ионы металлов, эстрогены, билирубин, ретиноиды, флавоноиды, фитоэстрогены, экотоксиканты, разные красители, а также лекарства. Выявлены также иммуномодулирующая и апоптозрегулирующая активности АФП. Предполагается, что иммуносупрессивное действие АФП опосредуется рецепторами, существующими на поверхности иммунокомпетентных клеток. Рядом исследователей показано, что клетки иммунной системы обладают способностью узнавать и специфически связывать АФП. Обнаружено существование рецепторов для АФП с молекулярной массой 62-65 кДа на поверхности перитонеальных макрофагов у крыс и моноцитов периферической крови человека, а также активированных лимфоцитов у мышей. В целом, на поверхности иммунокомпетентных клеток выявлено два типа рецепторов: один с высокой специфичностью и малой связывающей емкостью, другой – с низкой аффинностью и большой связывающей емкостью. Следует заметить, что рецепторы для АФП изучены недостаточно и полностью не охарактеризованы. Нет данных о их первичной и пространственной структуре, о строении гена, кодирующего их синтез.

Данные, связанные с выявлением различных видов биологической активности АФП, неполны и противоречивы. По нашему мнению, различия в функциональной активности препаратов АФП, полученных разными авторами, связаны с особенностями выделения и очистки белка и разной степенью его микроденатурации, а также наличием примесей в этих препаратах.

Синтез АФП у эмбриона начинается с возникновением самых первых очагов кроветворения. Во время эмбрионального развития АФП синтезируется, в основном, печенью плода

и висцеральной энтодермой желточного мешка. В некоторой степени на отдельных стадиях внутриутробного развития он может синтезироваться эмбриональной почкой, поджелудочной железой и энтодермой желудочно-кишечного тракта. Концентрация АФП нарастает и достигает максимального значения, до 10 мг/мл ($\sim 10^{-4}$ М), в сыворотке крови плода человека на 12-16-й неделе внутриутробного развития. Учитывая высокую определенность наших знаний относительно молекулярной массы АФП человека, которую можно для каждой гликоизоформы АФП посчитать калькуляционно, мы здесь параллельно приводим приблизительную молярную концентрацию АФП. После этого максимума уровень АФП резко снижается, составляя к моменту рождения до 0,1 мг/мл ($\sim 10^{-6}$ М). В норме в сыворотке крови взрослого человека АФП обнаруживается в концентрациях – до 5-7 нг/мл ($\sim 10^{-10}$ М). Изменение уровня АФП в материнской сыворотке является диагностическим тестом для обнаружения некоторых нарушений развития плода. Так, существенные повышения уровня АФП происходят при дефектах развития нервной трубки у плода, а снижение его количества характерно для синдрома Дауна. Постоянное присутствие АФП в сыворотках крови здоровых взрослых людей свидетельствует о его биологической значимости на всех этапах онтогенеза человека, а его концентрации сопоставимы с концентрациями инсулина и эпидермального фактора роста, и целого ряда цитокинов.

Рядом исследователей (Фергюсон-Смит, 1983; Блеза, 2000; Алдж, 2004; Нагата, 2005) были получены данные о наследственных патологиях, при которых выявляется повышенное содержание АФП в сыворотке крови больных с самыми различными заболеваниями. Оказалось, что патологии вызваны аминокислотными заменами, связанными с мутациями, в ядерном факторе гепатоцитов. Идентифицированы два пункта (55 аминокислотный остаток – цистеин замещен на аланин, и 119 аминокислотный остаток – глицин замещен на аланин) мутационных замен в участке ядерного фактора гепатоцитов, связывающем промотер гена АФП и участвующем в регуляции синтеза АФП.

Многочисленными исследованиями показано, что АФП обладает молекулярной микрогетерогенностью, обусловленной различиями в углеводном составе АФП, синтезируемых в различных тканях. Это определяет наличие изоформ АФП, различающихся значениями PI и способностью связывать лектины. Установлено, что АФП человека содержит один участок гликозилирования – Асн-233. С использованием метода перекрестной иммуноаффинной электрохроматографии показано существование до десяти гликоизоформ АФП

человека. В состав углеводной части могут входить глюкоза, галактоза, манноза, фукоза, N-ацетилглюкозамин и сиаловые кислоты. Так, разветвленная олигосахаридная цепь АФП человека содержит два остатка сиаловых кислот, d-галактозу и d-маннозу. При этом те или иные лектины проявляют специфичность не только к отдельным моносахаридным остаткам, но и ко всей углеводной части. Ткане- и опухолеспецифичность различных гликоформ АФП обусловлена тканевым набором ферментов, осуществляющих реакции гликозилирования. Содержание различных гликоформ АФП в эмбриональных и опухолевых тканях можно использовать для дифференциальной диагностики опухолей и дефектов развития плода. Особенно в этом преуспели японские исследователи.

Изучение связывающей способности АФП по отношению к агглютинирующей чечевицы (LCA-лектин), выявило 3 гликоизоформы АФП с различной диагностической функцией. Одна из них АФП-L3, несущая дополнительный фукозный остаток, является главной изоформой АФП в сыворотках больных гепатоцеллюлярным раком и свидетелем потенциально быстрого роста опухоли и раннего метастазирования, если ее содержание превышает 10% от всего сывороточного АФП, что важно для прогнозирования течения болезни.

5 гликоизоформ АФП выявлены с помощью лектинафинного электрофореза с эритроагглютинирующего фитогемагглютинина (лектин E-PHA), из которых две изоформы АФП-P4 и АФП-P5 особенно важны и интересны для дифференциальной диагностики больных гепатоцеллюлярным раком от пациентов с хроническими заболеваниями печени. Сочетанное определение АФП-L3 и АФП-P4 + P5 позволяет провести раннее распознавание перехода цирроза печени в рак.

С помощью конканавалина А (лектин Con A), с высокой аффинностью связывающего маннозу, выявляется изоформа АФП с высоким содержанием маннозы в его биантенном олигосахариде. Выявление Con A связывающего АФП помогает в дифференциальной диагностике гепатоцеллюлярного рака от других злокачественных новообразований. Применение Con A аффинного электрофореза позволило выявить несколько фракций Con A связывающего АФП в случаях гепатоцеллюлярного рака, в то время как при хронических гепатитах и циррозах выявлялась только одна фракция.

Методом изоэлектрофокусирования были выявлены 3 типа АФП по наличию в них сиаловой кислоты, одна из этих форм msАФП, моносиализированный АФП, оказался строго специфичным для гепатоцеллюлярного рака.

Таким образом, развитие теста на АФП с выявлением его гликозилированных изоформ

открыло важные перспективы для лабораторной дифференциальной диагностики первичного рака печени с другими патологиями печени и другими формами рака.

Выявлены также варианты АФП с заменами 187 аминокислотного остатка – лизина на глутамин и 570 аминокислотного остатка – аланина на глицин.

Так как после оперативного лечения гепатоцеллюлярного рака путем частичной резекции печени в течение 3 лет приблизительно у 70 % больных наблюдается повторная малигнизация, осуществлялись поиски нового диагностического маркера, способного помочь в прогнозе заболевания. Были разработаны морфологические методы, иммуоцитохимические, и не морфологические, основанные на цепной полимеразной реакции, ПЦР-технике. Из них наиболее важным стал метод определения мРНК альфа-фетопротеина. Метод весьма чувствителен и позволяет выявить 1 опухолевую клетку из 10^7 нормальных моноцитов периферийных кровяных клеток. АФП мРНК интенсивно изучалась как замещающий иммуоцитохимический тест для выявления циркулирующих в крови гепатомных клеток путем обратной транскрипции ПЦР. Обладая гораздо более высокой чувствительностью по сравнению с иммуоцитохимическими методами, ПЦР-техника дает также и гораздо больше ложно положительных результатов. Выявление гепатомных клеток в кровотоке и в лимфе позволяет прогнозировать метастазирование и повторную малигнизацию печени.

Подводя к концу обозрение развития лабораторных методов диагностики гепатоцеллюлярного рака, можно констатировать, что почти за 50 лет своего существования тест на АФП сыворотки крови не утратил своих позиций и является наиболее простым, доступным, специфическим и чувствительным тестом, применяемым для скрининга и диагностики гепатоцеллюлярного рака. Использование тестов на гликозилированные формы АФП весьма перспективно, особенно, в дифференциальной диагностике. Применение же ПЦР-техники для выявления АФП мРНК наиболее перспективно для прогноза после оперативного лечения и на предмет выявления метастазирования. Как констатировали в своем обзоре о развитии лабораторных методов диагностики гепатоцеллюлярного рака бельгийские исследователи Дебрайн и Деланж, 2008: «Однако, несмотря на обещающие результаты этих новых потенциальных маркеров, в настоящее время, они могут быть рекомендованы только как дополнительные тесты и не могут еще заменить тест на сывороточный АФП – золотой стандарт опухолевых маркеров для гепатоцеллюлярного рака».

ОЦЕНКА СКРЫТОГО РИСКА ПОВРЕЖДЕНИЯ ЗДОРОВЬЯ ВРЕДНЫМИ ФАКТОРАМИ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

Хадарцев А.А., Хрупачев А.Г., Кашинцева Л.В.
Тульский государственный университет, Тула,
e-mail: tulastra@mail.ru

Результаты исследований ученых Российского НИИ медицины труда показывают, что около 70 % работающих россиян уже за 10 лет до наступления пенсионного возраста имеют серьезную патологию. Как показывает практика, очень часто в момент проявления симптомов заболевания, вредное воздействие на человека уже отсутствует, что является следствием скрытого повреждения здоровья вредными факторами среды обитания в предыдущий период.

Для решения задачи расчета скрытого риска повреждения здоровья вредными факторами окружающей среды, организм человека рассматривается, как совокупность порядка 10^{15} разнообразных клеток, объединенных в органы и ткани, выполняющие строго определенные функции. Принимая данную количественную особенность каждого организма за x , как некий эквивалент «количества здоровья», в дальнейшем будем рассматривать возникновение различных нозологических форм заболеваний, как результат повреждений, возникающих в элементарной составляющей организма – клетке, в результате воздействия вредных факторов различной природы. Для нормального функционирования организму необходимы различные внешние факторы такие как: температура, влажность, радиация, пища, кислород, прочие химические элементы, количество которых обозначим за y .

При этом, только при определенных значениях b – энергетических уровнях и концентрациях веществ, участвующих в процессе метаболизма, образуется постоянство внутренней среды организма – гомеостаз. При первых же признаках появления внешнего или внутреннего «врага» включается сигнал тревоги, и организм мобилизует регуляторные механизмы: в борьбу вступает иммунная система организма, мощность защитных сил которой обозначим – a .

Рассмотренный нами процесс можно представить в виде математической модели Ланкастера – модели описывающей состояние системы при взаимодействии двух сил её составляющих, где параметры x и y – численности участвующих в противоборстве армий: в нашем случае – защитных сил организма и факторов среды обитания (1).

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = -by \\ \frac{dy}{dt} = -ax \end{cases} \quad (1)$$