

ПЛАЦЕНТАРНАЯ ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА В ОНТОГЕНЕЗЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Сухарев А.Е., Ахушкова Л.М., Булах Н.А., Ермолаева Т.Н.

ГОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия»

Астраханское региональное общественное учреждение по содействию научным исследованиям (АРОУСНИ) «ГРАНТ», Астрахань, Россия, e-mail: alexandr.suharev2010@yandex.ru

Плацентарную щелочную фосфатазу (ПЩФ) относят к белкам, ассоциированным с беременностью и опухолевым ростом. ПЩФ образуется в плаценте и фетальных тканях, в крови женщин выявляется с 3–4 недель беременности в количестве от 1,0 до 64ЕД, сохраняясь в кровотоке после родов в течение 10–14 дней.

ПЩФ является маркером герминогенных опухолей, обнаруживается в биологических жидкостях, эпителиальных клетках, фибробластах стромы и эндотелии новообразующихся сосудов опухолевой ткани при раке лёгкого и других органов, что следует учитывать при назначении лечения.

Ключевые слова: плацентарная щелочная фосфатаза, беременность, эмбриогенез, малигнизация, диагностическое значение.

PLACENTAL ALKALINE PHOSPHATASE IN THE ONTOGENY AND PATHOLOGY

Sukharev A.E., Achushkova L.M., Bulakh N.A., Ermolajeva T.N.

Astrakhan state medical academy

Astrakhan regional social department of science "GRANT", Astrakhan, Russia, e-mail: alexandr.suharev2010@yandex.ru

Placenta and cancer tissues are source of placental alkaline phosphatase (PLAP) in blood sera of pregnant women and oncology patients accordingly. PLAP reveal on the placental and fetal tissues, and blood circulation from 3 – 4 weeks of pregnancy, and kept in sera after delivery during 10-14 days from 1 to 64 MU, respectively. The PLAP is the marker of germinal tumors on the biological fluid, epithelial cells, stromal fibroblasts and endothelium new-formed vessels of cancer tissues of the lung and other organs. That is notice for treatment.

Key words: placental alkaline phosphatase, pregnancy, embryogeny, malignancy, diagnostic estimate

Актуальность. Плацентарную щелочную фосфатазу (ПЩФ) относят к белкам, ассоциированным с беременностью и опухолевым ростом [9; 10]. ПЩФ поступает в кровотоки матери после 12 недель беременности вплоть до периода родов в количестве от 1,0 до 100,0 Ед/л. Изоэнзимы ПЩФ обнаруживаются не только в плацентарном синцитиотрофобласте, эмбриональных и опухолевых тканях, но и в сыворотке крови здоровых мужчин и женщин в минорных количествах: от 0,1 до 1,6 мкг/л или 0,06–1,85 Ед/л [2; 5; 8; 9; 11; 12; 13; 16]. Этот факт вызывает интерес к дальнейшей идентификации и изучению тканевых структур, продуцирующих ПЩФ.

Цель работы: исследовать содержание ПЩФ в некоторых тканях и сыворотке крови человека в онтогенезе и при патологии для определения её диагностического значения.

Объект исследования. Водно-солевые и бутаноловые экстракты, гистологические срезы плодовой, дефинитивной и патологически изменённой легочной ткани (159 образцов), плаценты (6), костей, печени, почек, желудка, кишечника головного мозга от 26 плодов 9–36 недель внутриутробного развития, 60 образцов бронхиального секрета (мокроты), 329 сывороток крови беременных, 26 – родильниц, 350 сывороток крови больных злокачественными новообразованиями, 390 – больных с хроническими воспалительными заболеваниями внутренних органов, 290 – здоровых доноров (160 женщин и 130 мужчин).

Методы исследования. В экстрактах и гистологических срезах ПЩФ определяли с помощью моноспецифической тест-системы, полученной в нашей лаборатории. Тест-антиген представлен раствором ПЩФ, выделенной из плаценты методом водно-солевой и бутаноловой экстракции на трис-глициновом буфере (рН 8,6) и очищенной по методу Lehman [10]. Тест-антисывороткой служила моноспецифическая антисыворотка к ПЩФ, полученная иммунизацией кроликов с последующей дополнительной абсорбцией дефинитивными тканями по общепринятой методике [5]. В экстрактах тканей и сыворотках крови ПЩФ выявляли методом встречного иммуноэлектрофореза (ВИЭФ). Иммуноэлектрофореграммы отмывали в забуференном физиологическом растворе хлорида натрия и обрабатывали смесью нафтол-AS-фосфат и прочный синий РР по Берстону [3]. Линии преципитации, образованные антисывороткой и ПЩФ, окрашиваются в интенсивный синий цвет. Чувствительность ВИЭФ для ПЩФ равна 1 ЕД Боданского [5]. В реакции иммунофлуоресценции на криостатных срезах тканей использовали эту же антисыворотку и ослиные антитела против иммуноглобулина кролика, меченные флуоресцином, производства НИИ вакцин и сывороток им. Н.Ф. Гамалея [1]. Статистическую обработку проводили с использованием критерия Стьюдента [5].

Результаты и обсуждение

Плацента. В связи с тем, что становление синтеза ПЩФ в плаценте хорошо описано в литературе, мы специально этот вопрос не исследовали. По данным авторов [5; 6; 7; 8], активность ПЩФ отмечается в синцитиотрофобласте с 16 недель внутриутробного периода развития. Мы выявили, что ПЩФ методом встречного иммуноэлектрофореза определяется как в водно-солевых, так и бутаноловых экстрактах зрелой плаценты, причём наибольшее количество фермента экстрагируется бутанолом из её мембранных фрагментов, оставшихся после водно-солевой экстракции, соответственно, титры 1:512 и 1:2048. Гистохимическим методом высокая активность ПЩФ отмечается в эндотелии сосудов, синцитиотрофобласте плаценты.

Сыворотка крови беременных. Частота обнаружения ПЩФ возрастает по мере развития беременности с 6,4% в первом триместре до 100% к концу срока беременности.

Примечателен факт обнаружения ПЩФ в сыворотке крови в 2-х из 3-х образцов первого месяца беременности (3 и 4 недели). Появление ПЩФ в кровотоке матери в столь ранние сроки нельзя объяснить продукцией ПЩФ плацентарной тканью, так как она ещё практически отсутствует. В данном случае вопрос об источнике сывороточной ПЩФ остаётся открытым. С 4-го месяца беременности, после завершения периода формирования плаценты, частота обнаружения и титр ПЩФ в кровотоке матери начинают возрастать с 13,3 до 68,7% и 1–1/8 титра (1–8 ЕД Боданского, соответственно) к 8-му месяцу. Значительное увеличение частоты обнаружения ПЩФ в сыворотке крови наблюдается с 5-го месяца беременности. Это совпадает с периодом интенсивного развития головного мозга плода, роста и дифференцировки всех его органов [14].

К моменту родов (10 месяцев) у всех женщин (100%) в сыворотке крови ПЩФ присутствует в количестве 8–32 ЕД (до 64 ЕД в отдельных случаях), что определено нами как количество ПЩФ, необходимое для нормального протекания беременности [2; 14]. При поздних гестозах 2–3 степени титр ПЩФ в кровотоке снижается до 0–4 ЕД, что может указывать на плацентарную недостаточность [2].

Обращает на себя внимание впервые выявленный нами факт наличия ПЩФ в крови родильниц, где она определяется в титре 1/8–1/32 (8–32 ЕД) до момента выписки из стационара (8–14 дней). При этом мы обратили также внимание на суточные колебания (повышение – понижение – повышение – понижение) титра ПЩФ у родильниц в динамике послеродового периода. У этих пациенток отсутствует плацента, тогда как наличие ПЩФ, причём с суточными колебаниями её концентрации в крови в течение 1–2 недель, позволяет предположить наличие другого, кроме плаценты, источника ПЩФ. Не исключено, что им является сокращающаяся матка. Так, в большинстве случаев у родильниц мы наблюдали даже повышение уровня ПЩФ в крови после родов, по сравнению с родовым периодом, что не согласуется с данными о периоде её полураспада [2]. При изучении сывороток крови 26 женщин в более отдаленные сроки постнатального периода (через месяц после родов и более) методом ВИЭФ мы не выявили в них ПЩФ.

Легочная ткань. ПЩФ начинает выявляться в водно-солевых экстрактах в фетальной лёгочной ткани с 26 недель внутриутробного развития плода в 72,7% случаев в количестве $4,2 \pm 1,8$ ЕД. К моменту рождения частота обнаружения этого фермента снижается до 30% ($1,4 \pm 0,4$ ЕД), а в дефинитивной ткани лёгких ПЩФ не определяется (табл. 1). Определение ПЩФ в бутаноловых экстрактах фетальных органов позволило выявить небольшие количества этого антигена (1–2 ЕД) в печени, в почках, ЖКТ, лёгких. Отсутствие ПЩФ в сыворотках крови плодов и водно-солевых экстрактах других фетальных органов, кроме лёгких, исключают возможность попадания её из плаценты и делает допустимым предположение о синтезе её в плодовой лёгочной ткани и других органах [2; 5]. Иммуноморфологические исследования с антисывороткой к ПЩФ методом непрямой иммунофлюоресценции Кунса подтвердили наличие ПЩФ в клетках эмбрионального эпителия фетального лёгкого. Интенсивное свечение отмечается преимущественно в области наружных мембран клеток [5].

Костная ткань. Нами обнаружена высокая активность ЩФ гистохимическим методом в зоне активного новообразования костной ткани (зона роста, периостальный

слой и эндотелий новообразующихся сосудов и гаверсовых каналов). Использование непрямого метода Кунса с моноспецифической антисывороткой к ПЩФ показало наличие ПЩФ плацентарного типа в указанных тканевых структурах [6].

Таким образом, с помощью различных методик (энзимоиммуноэлектрофорез, иммуноморфологический и иммуногистохимический методы) мы выявили наличие ПЩФ плацентарного типа не только в ткани плаценты, но и в других эмбриональных тканях [6; 15].

ПЩФ не обнаруживается в лёгочной ткани при хронических неспецифических заболеваниях легких (ХНЗЛ) и у здоровых людей. В водно-солевых экстрактах малигнизированной легочной ткани ПЩФ выявляется в 61,5–70% образцов (табл. 1).

Таблица 1 – Обнаружение ПЩФ в водно-солевых экстрактах легочной ткани методом ВИЭФ

Легочная ткань	Всего	% обнаружения	ЕД Боданского
Фетальная:			
16–25 нед.	11	0	0
26–32 нед.	11	72,7	4,2±1,8*
33–40 нед.	10	30,0	1,4±0,4**
Дефинитивная	19	0	0
Рак лёгкого:	52	61,5	5,1±2,1
высокодифференцированный	9	44,4	1,0±0,5*
умереннодифференцированный	24	54,2	3,5±1,6**
низкодифференцированный	19	78,9	8,2±1,4**
Околоопухолевая	40	70	12,6±2,4**
ХНЗЛ	16	0	0

*, ** p < 0,001.

Изучение гистологических срезов раковых опухолей также показало довольно высокую частоту (до 72,7%) обнаружения ПЩФ в эпителиальных клетках и строме рака лёгкого, причём наибольшая активность отмечена в аденокарциномах и низкодифференцированных формах рака. Эта же закономерность подтверждена и при иммуноэнзимохимическом анализе экстрактов рака лёгкого (табл. 1). Выявлено достоверно более высокое (в 8 раз) содержание ПЩФ в низкодифференцированном раке

лёгкого, по сравнению с высокодифференцированным ($p < 0,001$). ПЩФ обнаруживается также и в околоопухолевой лёгочной ткани, взятой на расстоянии 5–15 см от края опухоли в количестве $12,6 \pm 2,4$ ЕД. Иммуногистохимически специфическое свечение отмечается в эндотелии новообразующихся сосудов и фибробластах. Этот факт паранеопластической продукции ПЩФ, так же как и другие антигенные отличия околоопухолевой легочной ткани и опухоли при раке легкого, обнаружены впервые А.Е. Сухаревым [5].

Бронхиальный секрет. Методом встречного иммуоэлектрофореза ПЩФ в жидкой части мокроты больных ХНЗЛ и раком лёгких не определяется. Методом непрямой иммуофлуоресценции с антисывороткой к ПЩФ выявляется специфическое свечение на +++ (+) клеточных элементов цитологических препаратов из мокроты и аспирационного материала бронхов, полученного при фибробронхоскопии, при раке лёгких в 89%, а при ХНЗЛ – лишь на + (+) – в 25% (табл. 2). При этом среди клеток, содержащих ПЩФ, нам не удалось обнаружить злокачественных. В большинстве случаев они были представлены клетками пролиферирующего бронхиального эпителия с примесью альвеолярных макрофагов и нейтрофилов.

Таблица 2 – Определение ПЩФ в бронхиальном секрете

Больные	Жидкая часть мокроты		Цитологическое исследование мокроты и аспирационного материала		
	Метод ВИЭФ		Интенсивность свечения (иммуофлуоресцентный метод)		
	Всего	% положит.	Всего	+++ (+)	+ (+)
ХНЗЛ*	24	0	16	0*	4 (25%)*
Рак лёгких**	36	0	18	16 (88,9%)**	2 (11,1%)**

*, ** $p < 0,001$.

По нашему мнению, наличие ПЩФ в незлокачественных клетках бронхиального секрета является результатом её паранеопластической продукции в околоопухолевой ткани и может быть косвенным признаком рака лёгкого при перибронхиальной форме его роста [5].

Плевральные выпоты. ПЩФ методом встречного иммуоэлектрофореза обнаруживается в 31,6% в плевральных экссудатах только у больных раком лёгкого (табл. 3).

Таблица 3 – Определение ПЩФ в плевральных выпотах при лёгочной патологии

Диагноз	Число больных	ПЩФ	
		% положит.	ЕД
Неспецифический плеврит (плевропневмония)	31*	0	0
Туберкулёз лёгкого	23*	0	0
Рак лёгкого	19**	31,6	2-16

*, ** $p < 0,001$.

Сыворотка крови. По нашим и литературным данным, частота положительных тестов на ПЩФ в сыворотке крови у больных с незлокачественной патологией различных органов (ХНЗЛ, туберкулёз легких, мастопатия, гастродуодениты, панкреатиты, колиты, пиелонефриты) регистрируется в 2,2% в количестве 1–2 ЕД, а при злокачественных новообразованиях – от 14,1% (рак легких) до 59% (рак яичников) в количестве 2–8 ЕД [2; 5; 8; 9; 11; 12; 13; 16]. При первичном и метастатическом раке печени ПЩФ выявляется методом ВИЭФ в сыворотке крови в 37,5% случаев [2; 5; 7].

Учитывая, что ПЩФ при раке лёгкого обнаруживается в наиболее злокачественных низкодифференцированных опухолях, то появление её в плевральных выпотах, вероятно, обусловлено продукцией опухолевой и околоопухолевой тканей при метастатическом поражении плевры. Установлено, что изоэнзимы ПЩФ обнаруживаются также и в злокачественных опухолях гортани, пищевода, желудка, толстой кишки, печени, простаты, яичек и яичников [2; 5; 6; 7; 8; 9; 12; 13; 16].

Таким образом, в пренатальном онтогенезе изоэнзимы ПЩФ синтезируются в определённых клетках трофобласта, желточного мешка и зародышевых клетках, которые, при возникновении из них опухолевых линий (герминогенные опухоли), возобновляют продукцию ПЩФ в значительных количествах [4]. Согласно гипотезе, объясняющей синтез неопластической клеткой белков, не свойственных данному типу клеток в норме, этот процесс является следствием депрессии генома, сопровождающего неопластическую трансформацию [8; 9; 12]. Следовательно, идентификация ПЩФ в тканях и биологических жидкостях может быть использована в уточняющей диагностике, контроле лечения и мониторинге злокачественных новообразований. Поскольку ПЩФ считается маркёром герминогенных опухолей [4], то обнаружение её при раке легкого и других локализациях, на наш взгляд, следует учитывать при разработке схем химио-, гормонотерапии.

(Научные проекты № 10-06-00621а, № 09-06-00933а, поддержанные грантами РГНФ.)

Список литературы

1. Башкаев И.С. Метод флуоресцирующих антител // Руководство по иммунологии. – М. : Медицина, 1973. – С. 330–341.
2. Беда Н.А. Плацентарная щелочная фосфатаза и острофазовые белки в иммунохимической оценке течения беременности и некоторой онкопатологии : дисс. ... канд. мед. наук. – М., 2002. – С. 9–27.
3. Берстон М. Гистохимия ферментов. – М. : МИР, 1965. – С. 137–217.
4. Мацко Д.Е., Иванцов А.О. Патологическая анатомия герминогенных опухолей // Практическая онкология. – 2006. – Т. 7. – № 1. – С. 6–15.
5. Сухарев А.Е. Тканевые и сывороточные острофазовые белки в клинической оценке неспецифических заболеваний и рака легких : дисс. ... докт. мед. наук. – М., 1992. – С. 89–119.
6. Сухарев А.Е. [и др.] Плацентарная щелочная фосфатаза и острофазовые белки в клинико-лабораторной оценке факторов повышенного геморрагического риска в акушерстве : монография. – Москва–Астрахань, 2006. – С. 44–67.
7. Сухарев А.Е. [и др.] Определение изоэнзимов плацентарной щелочной фосфатазы методом встречного иммуноэлектрофореза в сыворотках крови больных гепатобилиарной патологией // Лабор. дело. – 1987. – № 8. – С. 572–574.
8. De Broe M., Pollet D. Multicentr Evaluation of Human Placental Alkaline Phosphatase as a Possible Tumor-Associated Antigen in Serum // Clinical Chemistry. – 1988. – № 34. – P. 10–16.
9. Fishman W.H., Singer R.W. Ectopic Isoenzymes. Expression of Embryonic Genes in Neoplasia // Cancer-Comprehensive Treatise. – London, 1975. – Vol. 3. – № 5. – P. 57–80.
10. Lehman F.G., Lehman W. Regan-Isoenzyme Isolierung der alkalischen Phosphatase aus Menschlicher Placenta und Entwicklung // Vern. Dtsch. Ges. Inn. Med. 80 Kongr. Wiesbaden, 1974, Munchen, 1974. – P. 1658–1661.
11. Millan J.L. Mammalian Alkaline Phosphatases: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. – 2006. – P. 187–205.
12. Stigbrand T., Millan J.L., Fishman W.H. The genetic basis of alkaline phosphatase isoenzyme expression // Isozymes current topics in biological and medical research. – New York, 1982. – Vol. 6. – P. 93–117.
13. Stingham S.-T. et al. Specific immunoassays for placental alkaline phosphatase as a tumor marker // J-Biomed-Biotechnol. – 2006. – № 5. – P. 560–587.

14. Sukharev A.E. et al. Immunochemical study of placental alkaline phosphatase (PLAP), lactoferrin (LF) and C-reactiv protein (CRP) in blood serum of pregnant and parturient women // Biomarkers and environment. Cechtuma. – 2001. – Vol. 4. – № 1–2. – P. 27.

15. Sukharev A. et al. The detection of placental alkaline phosphatase (PLAP) in embrionic and malignant tissues : The Third Intern. Conf. On Cancer-induced Bone Diseases, nov. 16-18, 2001, Awaji, Japan // J. of Bone and Mineral Metabolism. – 2001. – Vol. 19, suppl. – P. 68.

16. De Voorde A. et al. Screening of sera and tumor extracts of cancer patients using monoclonal antibody directed againts human placental alkaline phosphatase // Eur. J. Cancer Clin. Oncol. – 1985. – Vol. 21. – № 1. – P. 65–71.

Рецензенты:

Лазько А.Е., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патанатомии Астраханской государственной медицинской академии, г. Астрахань.

Бойко О.В., д.м.н., профессор кафедры Молекулярной биологии и биохимии ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет», г. Астрахань.

Работа получена 24.10.2011