

5. Стефанова Л.Б., Щербakov А.М., Сорокин Д.В., Шатская В.А., Красильников М.А. Механизм устойчивости к гипоксии клеток эстрогеннезависимого рака молочной железы: роль белков эпителиально-мезенхимального перехода Snail и бета-катенина. Молекулярная медицина. 2013; 1: 26–30.
6. Щербakov А.М., Стефанова Л.Б., Андреева О.Е., Сорокин Д.В., Красильников М.А. Роль Snail-сигнального пути в развитии устойчивости к гипоксии клеток рака молочной железы. Технологии живых систем. 2012; 9 (9): 63–7.
7. Scherbakov A.M., Andreeva O.E., Shatskaya V.A., Krasil'nikov M.A. The relationships between snail1 and estrogen receptor signaling in breast cancer cells. Journal of cellular biochemistry. 2012; 113 (6): 2147–55.
8. Weis W.I., Nelson W.J. Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. J. Biol. Chem. 2006; 281 (47): 35593–7.
9. Jin T., George Fantus I., Sun J. Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. Cell Signal. 2008; 20 (10): 1697–1704.
10. Lee S.Y., Jeon H.M., Ju M.K., Kim C.H., Yoon G., Han S.I., Park H.G., Kang H.S. Wnt/Snail signaling regulates cytochrome C oxidase and glucose metabolism. Cancer research. 2012; 72 (14): 3607–17.
11. Rapisarda A., Uranchimeg B., Sordet O., Pommier Y., Shoemaker R.H., Melillo G. Topoisomerase I-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor 1: mechanism and therapeutic implications. Cancer Res. 2004; 64 (4): 1475–82.
12. Eguchi M., Nguyen C., Lee S.C., Kahn M. ICG-001, a novel small molecule regulator of TCF/beta-catenin transcription. Med. Chem. 2005; 1 (5): 467–72.
13. Lobanova Y.S., Scherbakov A.M., Shatskaya V.A., Evteev V.A., Krasil'nikov M.A. NF-kappaB suppression provokes the sensitization of hormone-resistant breast cancer cells to estrogen apoptosis. Molecular and cellular biochemistry. 2009; 324 (1–2): 65–71.
14. Zheng H., Li W., Wang Y., Liu Z., Cai Y., Xie T., Shi M., Wang Z., Jiang B. Glycogen synthase kinase-3 beta regulates Snail and beta-catenin expression during Fas-induced epithelial-mesenchymal transition in gastrointestinal cancer. European journal of cancer. Epub 9 April 2013.
15. Zhang Q., Bai X., Chen W., Ma T., Hu Q., Liang C., Xie S., Chen C., Hu L., Xu S., Liang T. Wnt/beta-catenin signaling enhances hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via crosstalk with hif-1alpha signaling. Carcinogenesis. 2013; 34 (5): 962–73.

Поступила 01.07.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.831-006.04-074

Н.В. Любимова, М.Г. Томс, Р.Г. Фу, Ю.В. Бондаренко

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, 115478, Москва

Представлены данные сравнительного определения нейроспецифических белков S-100 и GFAP в сыворотке крови 145 нейроонкологических больных и 69 практически здоровых людей. Для больных с глиобластомами (GIV) было установлено выраженное высокодостоверное увеличение концентрации S-100 и GFAP по сравнению с пациентами с анапластическими астроцитомами (GIII), доброкачественными менигиомами (GI), метастатическими поражениями головного мозга и контрольной группы. При этом концентрации S-100 в сыворотке крови больных с анапластическими астроцитомами, доброкачественными менигиомами и метастатическими поражениями головного мозга достоверно не различались между собой, а по отношению к контрольной группе было установлено достоверное повышение содержания белка только в группе больных с церебральными метастазами. Характерной отличительной особенностью GFAP была максимально высокая частота его выявления у больных с глиобластомой (83%) по сравнению с другими группами нейроонкологических больных, а также практически здоровыми донорами, у которых белок практически не определяется. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования GFAP как маркера глиобластомы, а S-100 в качестве дополнительного биохимического критерия поражения ГМ у онкологических больных.

Ключевые слова: S-100, GFAP, сыворотка крови, опухоли головного мозга

Дифференциальная диагностика первичных и метастатических опухолей головного мозга (ГМ) остается одной из актуальных проблем современной нейроонкологии. Информативность и специфичность основных, используемых в настоящее время методов нейровизуализации (КТ, МРТ) часто оказываются недостаточными для надежной дифференцировки новообразований ГМ разной этиологии [1]. В связи с этим существует необходимость поиска дополнительных

неинвазивных способов их выявления и дифференцировки на самом раннем этапе диагностического исследования. Известно, что в процессе развития интракраниальных опухолей ЦНС, в частности глиом, головной мозг подвергается как механическому, так и токсическому воздействию со стороны растущей опухоли. При этом реакция мозговых структур, в частности глиии и астроцитов, может определять состав нейроспецифических белков (НСБ), которые экспрессируются нормальными и опухолевыми клетками в крови. Кроме того, некроз самой опухоли также может оказывать влияние на представительство этих белков в циркуляторном русле, однако точный механизм этого процесса до сих пор остается неизвестным. Повышенные уровни таких нейроспецифических белков, как основной белок миелина (МВР), S-100, нейроспецифическая енолаза (NSE) и глиофибрилярный

Для корреспонденции:

Любимова Нина Васильевна, д-р биол. наук, проф., вед. науч. сотр. лаб. клин. биохимии
Адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24
E-mail: biochimia@mtu-net.ru

кислый протеин (GFAP) были обнаружены в цереброспинальной жидкости при различных острых и хронических неврологических нарушениях. Концентрация S-100, NSE and GFAP также была повышена в сыворотке крови пациентов, особенно при острых повреждениях головного мозга [5].

В норме гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) препятствует проникновению различных веществ как из паренхимы мозга в кровотоки, так и обратно. По мнению ряда авторов, деструкция мозгового вещества при развитии опухоли ГМ может приводить к увеличению проницаемости ГЭБ [4, 7]. К наиболее специфичным белковым соединениям, которые могут отражать выраженность данного процесса, относят такие НСБ, как глиальный фибриллярный кислый протеин (GFAP) и белок S-100, являющиеся структурными белками цитоскелета и экспрессирующиеся астроглиальными и нейрональными стволовыми клетками [2, 9].

Таким образом, GFAP и S-100 могут служить диагностическими маркерами заболеваний ГМ, которые характеризуются прямым или косвенным вовлечением этих клеток в патологический, в том числе и опухолевый, процесс. Подтверждением этому служат результаты ряда исследований, демонстрирующих повышение содержания GFAP в биологических жидкостях при болезни Альцгеймера, рассеянном склерозе, энцефалите и менингите, травматических повреждениях мозга, глиобластомах [5, 7, 9]. По предварительным данным, определение концентрации НСБ в сыворотке крови и цереброспинальной жидкости больных с патологией мозга может быть использовано в оценке степени повреждения ГЭБ и как следствие ГМ при заболеваниях ЦНС, травмах и опухолях [5, 8, 10, 11].

Целью настоящей работы являлось сравнительное исследование нейроспецифических белков S-100 и GFAP в сыворотке крови больных с первичными и метастатическими опухолями ГМ и практически здоровых людей.

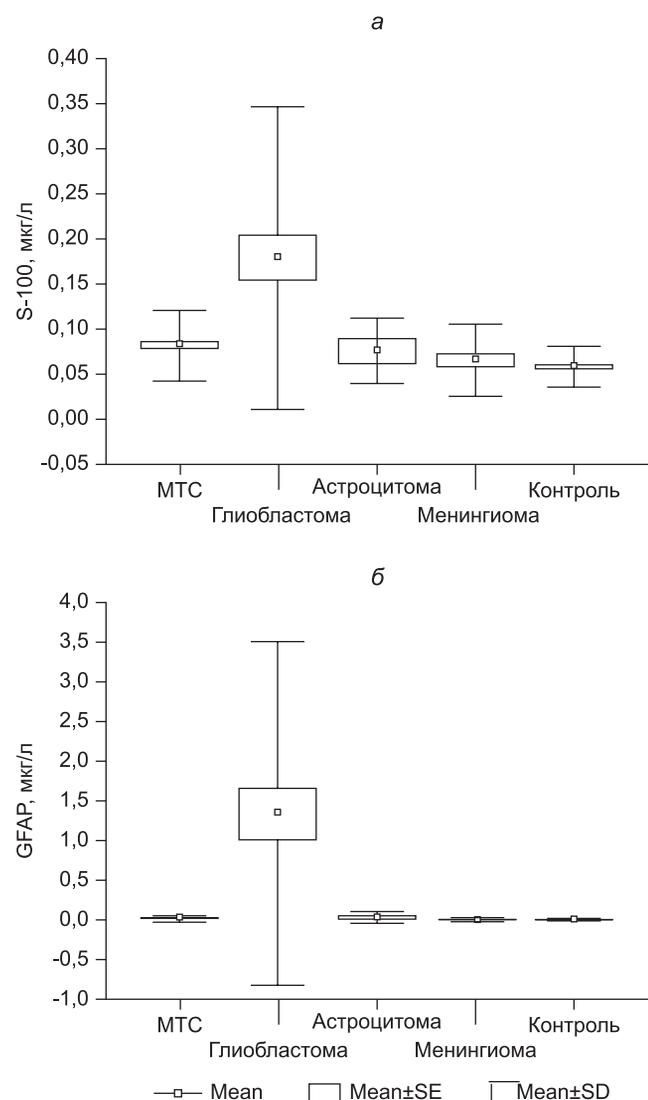
Материалы и методы. В исследование были включены 145 больных (59 мужчины и 86 женщин) с опухолями головного мозга, находившихся на лечении в нейрохирургическом отделении РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН с 2005 по 2011 г. Диагноз устанавливался на основании данных гистологического исследования с учетом морфологических критериев злокачественности в соответствии с классификацией ВОЗ 2007 г. Были выделены 3 группы больных с учетом клинико-морфологических характеристик заболевания: в 1-ю группу вошло 48 больных в возрасте от 18 до 75 лет (медиана 49 лет) с глиальными опухолями высокой степени злокачественности, из них 6 – с анапластическими астроцитомами (GIII), 42 – с глиобластомами (GIV); во 2-ю группу вошло 24 пациента в возрасте от 17 до 72 лет (медиана 48 лет) с доброкачественными менингиомами (GI); 3-ю группу составили 73 пациента в возрасте от 24 до 71 года (медиана 54 года) с церебральными метастазами рака молочной железы ($n=29$), легкого ($n=19$), почки ($n=13$), яичников ($n=4$), толстой кишки ($n=8$). Контрольная группа состояла из 69 практически здоровых людей и в целом не отличалась по полу и возрасту от исследуемых групп больных.

Концентрации нейроспецифических белков S-100 (мкг/л) и GFAP (в мкг/л) определяли в сыворотке крови методом ИФА в плазменном варианте на основе высокоспецифичных моноклональных антител с использованием наборов реактивов компаний «BioVendor» и «CanAg». Статистический анализ данных проводили с помощью метода Kruskal–Wallis. Корреляционные зависимости оценивали при использовании непараметрического критерия Spearman. Пороговые значения определяли на основе ROC-анализа. Различия частот в группах оценивали с помощью непараметрического критерия χ^2 . Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Анализ результатов определения содержания НСБ в сыворотке крови больных с первичными злокачественными глиальными опухолями головного мозга показал, что уровни S-100 и GFAP были высокодостоверно ($p < 0,001–0,0001$) выше, чем у практи-

чески здоровых мужчин и женщин, вошедших в контрольную группу.

В соответствии с полученными данными вариабельность концентрации S-100 была наименьшей у практически здоровых людей, при этом зависимости белка от пола и возраста установлено не было. В то же время для больных со злокачественными опухолями ГМ была характерна выраженная вариабельность S-100. При этом наиболее высокие значения белка обнаружены у больных с глиобластомой (0,72–0,91 мкг/л), медиана составила 0,145 мкг/л, тогда как у больных с астроцитомами медиана была существенно ниже и соответствовала 0,069 мкг/л. Медианы у больных с доброкачественными менингиомами и метастатическим поражением мозга были также невысокими, составляя 0,061 и 0,072 мкг/л. Следует отметить, что достоверное увеличение концентрации S-100 в группе больных с глиобластомами установлено по отношению ко всем включенным в исследование группам больных и контрольной группе ($p < 0,004–0,00001$). Концентрации S-100 в сыворотке крови больных с анапластическими астроцитомами, доброкачественными менингиомами и метастатическими поражениями ГМ достоверно не различались между собой, а по отношению к контрольной группе было установлено достоверное повышение уровня



Уровни S-100 и GFAP в сыворотке крови больных с опухолями головного мозга и в контрольной группе.

белка ($p < 0,002$) только в группе больных с метастазами в ГМ. Сравнительный анализ показал, что высокодостоверно чаще ($p < 0,004$) S-100 определялся у больных со злокачественными глиомами (64,6%), причем наиболее часто – в группе глиобластом (69%). Значительно реже этот белок определялся в остальных группах нейроонкологических больных: у пациентов с анапластическими астроцитомами отмечен всего один (16,7%) случай, с доброкачественными менингиомами 4 (16,7%) случая, с метастазами в головной мозг 21 (28,8%) случай повышения концентрации белка S-100.

Характерной отличительной особенностью GFAP было наличие у подавляющего большинства (68 из 69) практически здоровых людей концентраций, которые были ниже предела чувствительности метода (0,1 мкг/л). Обнаружение, концентрации GFAP, равной 0,112 мкг/л, лишь в одном из 69 наблюдений можно объяснить тем, что у людей этой возрастной категории (старше 50 лет) может существовать скрытая цереброваскулярная патология, проявляющаяся появлением в сыворотке крови НСБ в невысокой концентрации. Таким образом, частота выявления GFAP в сыворотке крови практически здоровых людей была близка к нулю (1,5%). Сравнительный анализ по группам показал, что высокодостоверно чаще ($p < 0,0001$) GFAP определялся у больных со злокачественными глиомами (75%), причем наиболее часто в группе глиобластом (83,3%). В то же время у пациентов с анапластическими астроцитомами отмечен всего один (16,7%) случай из 6 повышения концентрации GFAP. При этом концентрация белка была относительно невысокой и составила 0,170 мкг/л, что может свидетельствовать о гетерогенной морфологической структуре глиомы с участками от анапластической астроцитомы (GIII) до глиобластомы (GIV). При доброкачественных менингиомах не было ни одного наблюдения, а у больных с метастазами в головной мозг – 4 (5,5%) случая незначительного повышения GFAP (0,128–0,167 мкг/л). Связь частоты выявления GFAP с полом и возрастом не установлена ни в одной из групп, включая контрольную.

Как следует из рисунка, наибольшее (более чем в 200 раз) превышение его содержания по сравнению с показателем контрольной группы установлено в группе пациентов с астроцитомами высокой степени злокачественности ($p < 0,0001$). Для этой группы больных была характерна выраженная вариабельность концентраций белка (от 0 до 8,89 мкг/л), причем максимальные концентрации белка были зафиксированы у больных с диагнозом глиобластомы. Медиана в группе больных с глиобластомами составила 0,212, тогда как в остальных исследуемых группах, включая больных с анапластическими астроцитомами (G III), она соответствовала нулю.

Для оценки диагностической значимости изучаемых НСБ нами были рассчитаны их пороговые значения на основе данных, полученных в контрольной группе, которые составили для белка S-100 0,1 мкг/л и для GFAP 0,128 мкг/л.

В группе больных с доброкачественными менингиомами белок S-100 превышал пороговое значение в 16,7% наблюдений, тогда как концентрация GFAP у всех больных была ниже 0,128 мкг/л. При метастатическом поражении головного мозга частота увеличения концентрации S-100 и GFAP в сыворотке больных была выше и составила 28,8 и 5,5% случаев соответственно. В группе больных с первичными злокачественными опухолями, а именно в группе глиобластом, частота повышения уровней S-100 и GFAP оказалась максимальной – 69 и 83,3% соответственно при специфичности обоих белков 91 и 96% соответственно.

Выполненный в настоящем исследовании анализ позволил установить закономерность, заключающуюся в достоверном повышении содержания белков S-100 и GFAP в

сыворотке крови больных со злокачественными глиомами по сравнению с показателями контрольной группы, а также больных с доброкачественными менингиомами и метастатическими церебральными новообразованиями. При этом в группе злокачественных глиом были получены кардинальные различия по изученным НСБ и особенно GFAP между глиобластомами и анапластическими астроцитомами.

Учитывая данные других авторов [5, 10], свидетельствующие о зависимости уровней GFAP в сыворотке крови больных с глиобластомами от объемов опухоли и опухолевого некроза, можно предположить, что повышенная секреция GFAP обусловлена персистирующим повреждением головного мозга и большой зоной некроза в мозговой ткани, которые обычно сопровождают глиобластома. Этот факт может свидетельствовать о том, что глиобластома как наиболее злокачественные из всех опухолей ГМ секретируют НСБ в большей концентрации, прежде всего за счет массы опухолевых клеток, а также большего повреждения ГМ, сопровождающего рост опухоли. Кроме того, НСБ могут высвобождаться в циркуляторное русло также в результате увеличения проницаемости ГЭБ.

Таким образом, концентрации S-100 и GFAP в сыворотке крови больных с глиобластомами были высокодостоверно повышены по сравнению с соответствующими показателями пациентов с анапластическими астроцитомами, доброкачественными менингиомами, метастатическим поражением головного мозга и контрольной группы. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования GFAP как маркера глиобластомы, а S-100 в качестве дополнительного биохимического критерия поражения ГМ у онкологических больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Campos S., Davey P., Hird A. et al. Brain metastasis from an unknown primary, or primary brain tumour? A diagnostic dilemma. *Current Oncology*. 2009; 16(1): 62–6.
2. Eng L.F. The glial fibrillary acidic protein: the major protein constituent of glial filaments. *Scand. J. Immunology*. 1982; 15(9): 41–51.
3. Farrell C.Z., Risan W. Normal and abnormal development of the blood-brain barrier. *Micrisc. Res. Tech.* 1994; 27(6): 495–506.
4. Jung C.S., Foerch C., Schancer A., Heck A., Plate K.H., Seifert V. Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain*. 2007; 130(12): 3336–41.
5. Lamers K.J.B., Vos P., Verbeek M.M., Rosmalen F., van Geel W.J.A., van Engelen B.G.M. Protein S-100B, neuron-specific enolase (NSE), myelin basic protein (MBP) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebrospinal fluid (CSF) and blood of neurological patients. *Brain Research Bulletin*. 2003; 61: 261–4.
6. Long D.M. Capillary ultrastructure and the blood-brain barrier in human malignant brain tumors. *J. Neurosurg.* 1996; 32(6): 127–44.
7. Missler U., Wiesmann M., Wittmann G., Magerkurth O. Measurement of Glial Fibrillary Acidic Protein in human blood: analytical method and preliminary clinical results. *Clin Chem*. 1999; 45(1): 138–41.
8. Missler U., Wiesmann M. Measurement of S-100 protein in human blood and cerebrospinal fluid: analytical method and preliminary clinical results. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1995; 33: 743–8.
9. Oh D., Prayson R.A. Evaluation of epithelial and keratin markers in glioblastoma multiforme: an immunohistochemical study. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1999; 123(10): 917–20.
10. Rosengren L. E., Lycke J., Andersen O. Glial fibrillary acidic protein in CSF of multiple sclerosis patients: relation to neurological deficit. *J. Neurol. Sci.* 1995; 133: 61–5.
11. Sedaghat F., Notopoulos A. S-100 protein family and its application in clinical practice. *Hippokratia*. 2008; 12(4): 198–204.

Поступила 01.07.13