

П.2. Инновационные технологии в морфологической диагностике опухолевого роста

Зелкин¹ А.Н., Фрейнд¹ Г.Г., Кацнельсон² М.Д., Лицын³ С.Н., Верник³ С., Шэхам-Диаманд³ Й.
**ЗНАЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ОБОСНОВАНИЯ
ПРИМЕНЕНИЯ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ
ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В ДИАГНОСТИКЕ РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ**

¹*Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е.А. Вагнера, г. Пермь*

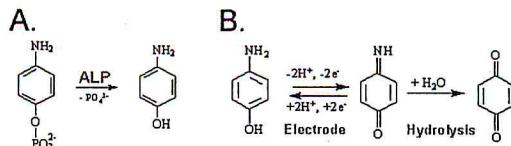
²*Пермский национальный исследовательский политехнический университет, г. Пермь*

³*Тель-Авивский Университет, Тель-Авив, Израиль*

Рак толстой кишки занимает четвертое место в структуре смертности от злокачественных новообразований в развитых странах. Заболеваемость в Пермском крае составляет 38 человек на 100000 населения (2010г.). По показателю запущенности он на втором месте (до 75% случаев диагностируется на III – IV стадиях). Выявление рака толстой кишки на ранних стадиях существенно влияет на прогноз заболевания, морфологическое исследование биоптатов является ведущим методом диагностики. В настоящее время все большее значение в диагностике новообразований приобретают методы, сочетающие морфологию и микроэлектронику. Вследствие высокой чувствительности и широкого линейного диапазона интенсивно исследуются электрохимические биосенсоры, в основе которых лежат амперометрические датчики [1]. Посредством амперометрических иммуносенсоров разрабатываются методы выявления опухолей различных локализаций [2]. Известно, что среди всех тканей организма в эпителии слизистой оболочки толстой кишки продукция щелочной фосфатазы самая высокая. Во многих слабодифференцированных клеточных линиях колоректального рака уровень экспрессии щелочной фосфатазы очень низок, почти отсутствует [3], а ее активность составляет лишь 0001 ед./мг белка, тогда как в дифференцированных клетках кишечного эпителия активность может достигать >0,7 ед./мг белка [4]. Кроме того, морфологические исследования с использованием цитохимических и имmunогистохимических методов, основанных на сравнении уровня экспрессии щелочной фосфатазы в нормальных и злокачественных тканях толстой кишки на модели перевиваемых опухолей выявили резкое падение экспрессии щелочной фосфатазы в опухолевой ткани [5]. До сих пор не проводилось непосредственное исследование содержания щелочной фосфатазы с помощью электрохимического метода в биоптатах рака прямой кишки.

Цель исследования – провести амперометрические измерения активности щелочной фосфатазы в биоптатах опухоли и неизмененной слизистой оболочки толстой кишки, сопоставить результаты морфологического и электрохимического методов исследования.

Материалы и методы. Результаты. Исследовали 88 биоптатов от 44 пациентов, полученных при ведении эндоскопического исследования толстой кишки на базе Пермского краевого онкологического диспансера. Перед началом измерений биоптаты объемом 2 мм^3 промывали фосфатным буфером, затем исследовали электрохимически уровень щелочной фосфатазы. В каждом исследовании вели контрольные измерения щелочной фосфатазы (в лунку чипа вместо биоптата добавляли щелочную фосфатазу (Sigma No. P7640). Электрохимическая реакция представлена ниже:



*А. Субстрат (*p*-аминофенилфосфат) подвергается дефосфорилированию под действием щелочной фосфатазы. Б. Образовавшийся *p*-аминофенол окисляется на электроде с потенциалом 0,22 В, создавая ток.*

Хроноамперометрию проводили в восьмиканальном высокочувствительном портативном потенциостате «PalmSens» (фирма «Palm Instruments BV», Нидерланды), оборудованном восьмиканальным мультиплексором, дающим возможность одновременно проводить измерения в восьми электрохимических ячейках. При проведении анализа использовали аппарат, изготовленный в лаборатории Тель-Авивского университета, содержащий электрические контакты электродов, изготовленные методом трафаретной печати, в сочетании с эффективным перемешиванием по принципу всасывания/вытеснения. Вследствие высокого содержания щелочной фосфатазы в биоптатах здоровой слизистой оболочки толстой кишки регистрировался сигнал тока, который значительно отличается от силы тока, наблюдаемого при исследовании биоптатов опухолей. Средняя величина силы тока, зарегистрированная при исследовании биоптатов опухолей, составила 3,16 нА, в то время как при исследовании биоптатов здоровой слизистой оболочки, она составила 5,15 нА. В целях подтверждения результатов, полученных с помощью биосенсора, было проведено гистологическое исследование образцов (окраска гематоксилином и эозином). Установлено, что содержание щелочной фосфатазы в образцах ткани опухоли коррелирует со степенью дифференцировки adenокарциномы: низкодифференцированные опухоли отличаются более низкой активностью щелочной фосфатазы.

Выходы

1. Амперометрический метод обладает высокой чувствительностью для определения активности щелочной фосфатазы в биоптатах опухолей и здоровой слизистой оболочки толстой кишки.
2. Наблюдаются различия в активности щелочной фосфатазы в биоптатах adenокарциномы толстой кишки и слизистой оболочки толстой кишки вне опухоли.
3. При низкодифференцированных опухолях активность щелочной фосфатазы минимальная.

Литература

1. J. Wang. Electrochemical biosensors // Biosensors and Bioelectronics. – 2006. – No. 21. – p.1887 – 1892.
2. D. Dan, X. Xiaoxing, W. Shengfu, and Z. Aidong. Electrochemistry in medicine and biochemical applications // Talanta. – 2007. – No.71. – p.1257 – 1262.
3. Y. Paitan, I. Biran, N. Shechter, D. Biran, J. Rishpon, and E. Z. Ron. Monitoring aromatic hydrocarbons by whole cell electrochemical biosensors // Anal. Biochem. – 2004. – No. 335. – p. 175 – 183.
4. J. R. Gum, W. K. Kam, J. C. Byrd, J. W. Hicks, M. H. Sleisenger, and Y. S. Kim. Electrochemistry in medicine and biochemical applications // J. Biol. Chem. – 1997. – No. 262. – p. 1032.
5. A. Giatromanolaki, E. Sivridis, E. Maltezos, and M. I. Koukourakis. Down-regulation of intestinal-type alkaline phosphatase in the tumor vasculature and stroma provides a strong basis for explaining amifostine selectivity // Semin. Oncol. – 2002. – No. 29. – p. 14 – 21.