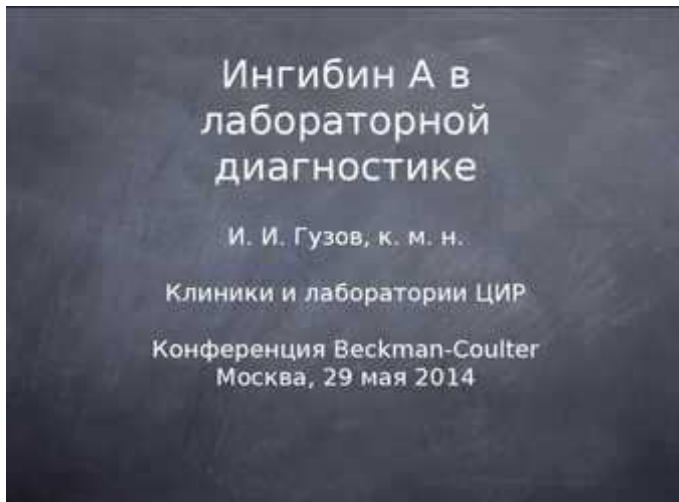


Ингибин А в лабораторной диагностике: пренатальный скрининг и не только

Игорь Иванович Гузов, к.м.н.

Доклад на конференции Beckman-Coulter 29 мая 2014 г.

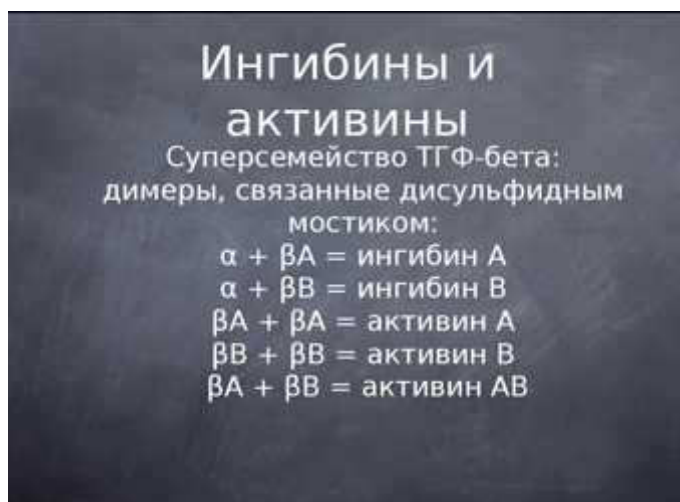
Введение в проблему



Когда внутри лабораторного сообщества и среди акушеров-гинекологов заходит речь об ингибине А, преобладает мнение, что это лишь часть пренатального скрининга, хотя о нем многие лишь слышали, но не все, как говорится, держали в руках. Это связано с обновлением поколений реактивов, и со сменой производителей, которые выпускали моноклональные антитела. Расцвет ингибина пришелся на начало 2000-х годов, когда он был активно включен в пренатальный

скрининг, так называемый четверной тест. Ингибин А упоминали также, когда говорили об опухолях женских гениталий. Но этот период сменился этапом, когда ингибин стал использоваться редко и не всеми лабораториями. В своем докладе мне хочется показать, что дальнейшее развитие лабораторной диагностики, биологии, медицинской науки в этой области может привести к достаточно важным, если не революционным сдвигами в понимании репродуктивной функции.

Ингибины и активины: строение и регуляция. Создание реагентов для определения ингибина и активина

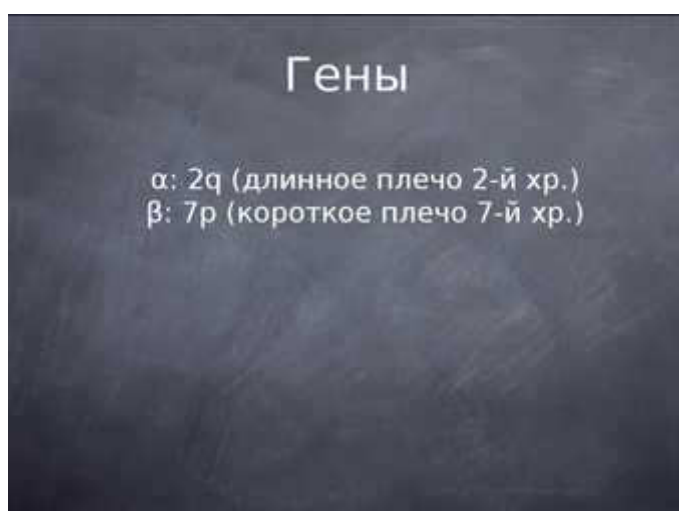


Рассмотрим регуляцию этой системы суперсемейства трофобластического фактора роста бета. Все семейство представлено гомологичными друг другу димерами. Цепь альфа и два варианта бета-цепи в разных комбинациях, как кубики или как части мозаики, образуют биологически активные соединения. Цепь альфа плюс цепь бета А - ингибин А. Цепь альфа плюс цепь бета - ингибин В. Комбинации двух бета-цепей также представляют собой три различных

вида активинов. На что следует обратить внимание? В системе достаточно интересная рецепторная регуляция: различные комбинации одних и тех же факторов по-разному воздействуют на одни и те же рецепторы. В результате мы получаем фактические

антагонисты. Второй особенностью этой системы является то, что она эволюционно очень стабильна. Несмотря на то, что система очень древняя, она имеет очень малую вариабельность между различными видами. Именно эта малая вариабельность явилась одной из самых больших трудностей на пути развития реактивов для определения этих факторов, так как эти вещества присутствуют практически у всех млекопитающих (возможно, не только у млекопитающих), участвуя в двух важнейших биологических процессах: эмбриогенеза и репродукции. Невероятная эволюционная стабильность и высокая степень гомологии приводят к тому, что при образовании моноклональных антител их очень тяжело получить. Еще одной причиной, по которой было сложно получить реактивы для этих систем, является то, что в данном случае имеется целая группа соединений с достаточно разными функциями. Внутри соединений цепи связаны ковалентно, дисульфидными мостиками. И для того, чтобы получить хорошие реактивы, которые определяли бы вот эти самые соединения, необходимо было получить моноклональные антитела, которые могли бы специфично определять конфигурации этих димеров. То есть антитела не против отдельных эпитопов цепей альфа или бета, а против их комплексов. Были найдены достаточно интересные решения: обработка перекисью водорода системы, которая приводила к тому, что окисляются остатки метионина. При этом резко повышается иммуногенность системы и возможность точной диагностики похожих друг на друга димеров. Вначале формируется предшественник альфа-цепи, достаточно длинный, дальше происходит соединение с бета-цепью, получаются промолекулы ингибина А или ингибина В, после этого происходит отщепление этой бета-цепи. Определение комплекса промолекулы позволяет иногда проводить более точную диагностику источника появления ингибина в крови, потому что концентрация молекул, которые идут из яичников во время беременности и молекул из плацентарного комплекса, будет разной.

Источники ингибина. Генетика синтеза ингибинов

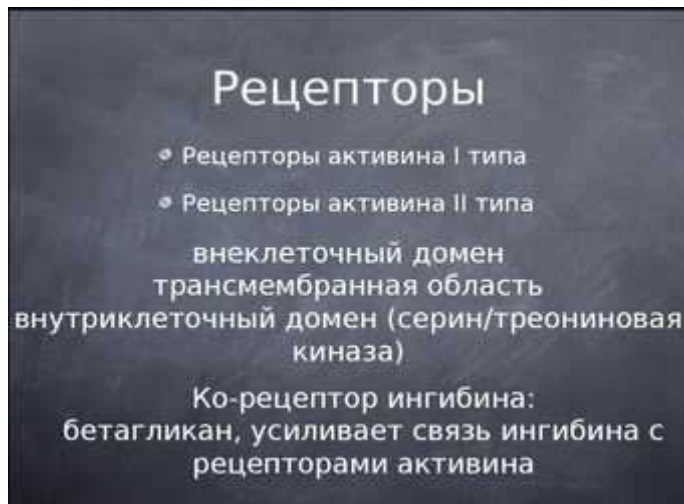


Итак, что может являться источником ингибина А? Это важно отметить, в том числе, в контексте выявления синдрома Дауна. Вы все слышали, что ингибин А значительно повышается при синдроме Дауна в сыворотке крови матери. Но обратите внимание, что ген альфа-цепи находится на длинном плече 2-й хромосомы, а бета-цепи - на коротком плече 7-й хромосомы. То есть разные хромосомы участвуют в синтезе этих белков. Интересно, что задействована 2-я хромосома, наша

вторая родная человеческая хромосома. По сути мутантная по отношению к другим приматам, потому что она образовалась из слияния двух хромосом, которые у остальных приматов существуют отдельно. После возникновения в нашем организме этой второй (по

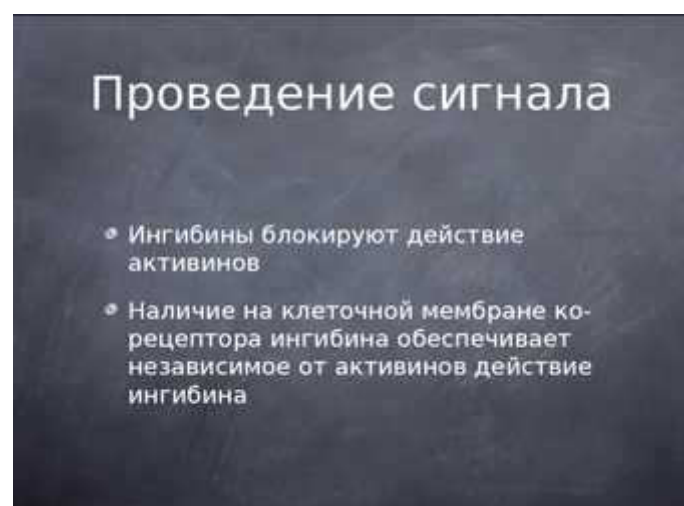
величине) хромосомы, у человека пропала возможность перекрестного соединения с другими приматами. Человек выделился как отдельная ветвь эволюции. Обратите внимание, что никакого отношения к 21 хромосоме эта система не имеет. Это указывает на древность этой системы и, во-вторых, на сложность регуляции. Можно предположить, что здесь участвуют генетические и эпигенетические регуляторы. Это хорошо видно на примере участия ингибина А в диагностике пузырного заноса, где работают в основном мужские гены, а женские гены эпигенетически выключены.

Рецепторный аппарат. Взаимодействие активина и ингибина



Чтобы понять, как работает эта система, нужно уделить особое внимание работе рецепторного аппарата. Многие здесь пока не изучено. Наверняка, в скором времени мы выясним, каким образом происходит биологическое воздействие этих гормонов, которые очень близки к цитокинам. И не зря эти вещества называются семейством трофобластического фактора.

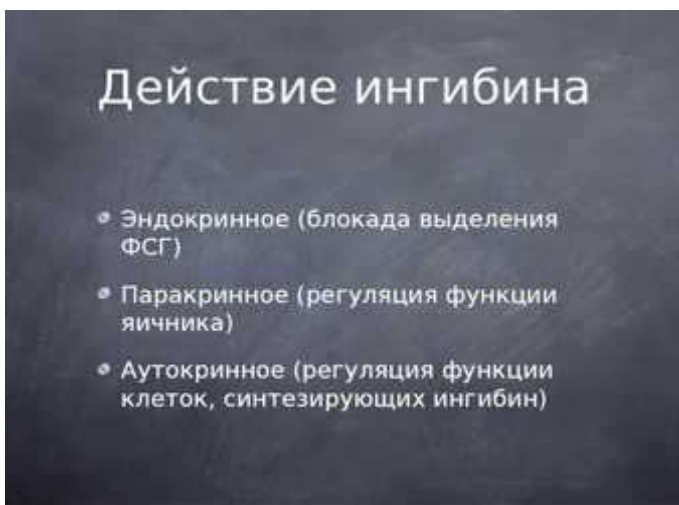
Итак, в рецепторном аппарате есть рецепторы активина первого типа и рецепторы активина второго типа. Все эти рецепторы имеют внеклеточный домен, с которым соединяется димер; трансмембранную область и внутриклеточный домен, который включает в себя фермент киназу. Ингибины тоже соединяются с этими рецепторами с низкой степенью афинности и отменяют действие активинов. Таким образом, эти вещества являются прямыми антагонистами, не очень жесткими, не очень сильными. Но в некоторых клетках и в некоторых тканях, в отдельные периоды функционирования клетки появляется дополнительный белок – это гликан, ко-рецептор ингибина. Когда рядом с рецепторами активина экспрессируется рецептор ко-рецептора ингибина, резко меняется структура димера ингибина, при этом резко повышается афинность соединения ингибина с рецепторами активина, и тогда резко усиливается биологическое действие ингибина. Поэтому существуют ситуации, когда действие ингибина и активина на рецепторы активина значительно разнесено, то есть ингибин гораздо сильнее действует на клетку, чем активин.



Проведение сигнала

Ингибин блокирует действие активина, и наличие на клеточной мембране ингибина обеспечивает независимое от активина действие ингибина.

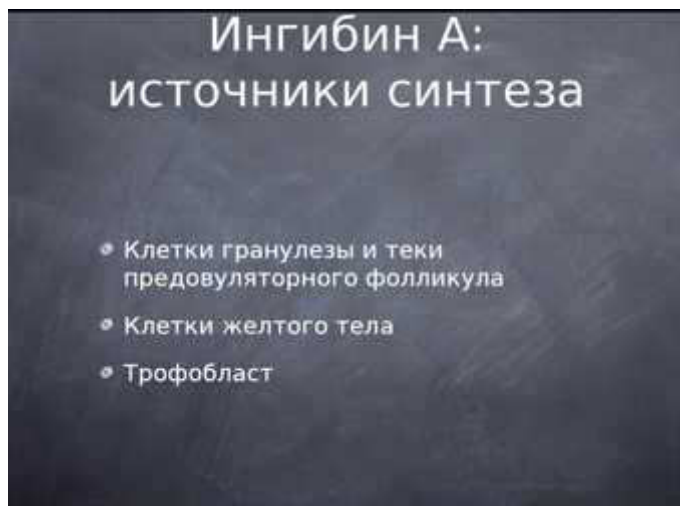
Действие ингибина: эндокринное, паракринное, аутокринное



Действие ингибина более архаичное по сравнению с действием более поздней, появившейся в результате эволюции, системы гонадотропинов ЛГ, ФСГ, пролактина и стероидных гормонов. Оно разделяется по способу воздействия на эндокринную систему. Ингибин блокирует выделение ФСГ гипофиза, активин - стимулирует выделение ФСГ, но при этом еще и проявляет его биологическое действие. Важное значение имеет

паракринное воздействие ингибина А и ингибина В на уровне яичниковых структур, то есть там, где они и выделяются. Уже хорошо изучены механизмы аутокринного действия, то есть модуляция ингибинами и активинами тех клеток, тех тканевых структур гранулёзы, которые их и вырабатывают. Эти три механизма хорошо друг с другом связаны, обеспечивая комплексность действия этих гормонов, трудно воспроизводимую *in vitro*.

Ингибин у женщин и мужчин



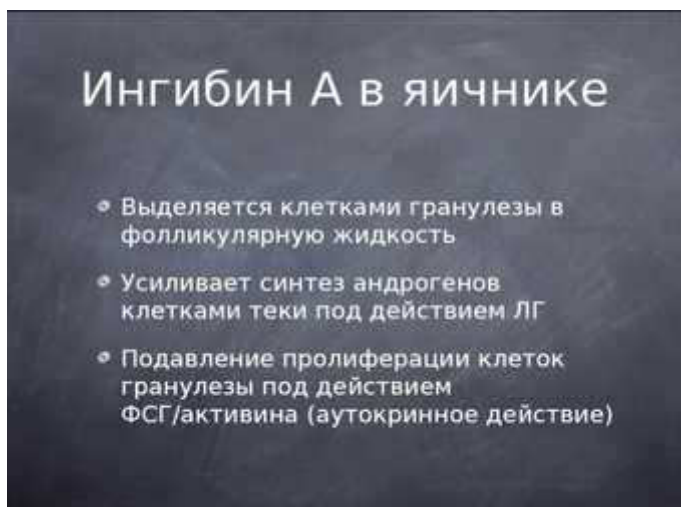
Обратите внимание на источники синтеза всего комплекса этих гормонов, ингибинов и активинов. Это клетки гранулёзы и теки фолликула, клетки желтого тела и трофобласт. То есть, мы имеем дело с системой, которая в основном сконцентрирована на репродуктивной регуляции. Также надо сказать, что достаточно значимое количество ингибинов и активинов выделяется в процессе эмбриогенеза и внутри нервной трубки, и

внутри древней области целома, и клетками агниума. То есть ингибины и активины — участники эмбриогенеза и репродуктивной функции.

Особенностью ингибина А является то, что это женский гормон. У мальчиков во внутриутробном периоде происходит определенная выработка ингибина А, который регулирует определённые процессы. Это связано с закладкой и развитием репродуктивного аппарата, но практически значимых количеств у мальчиков или у мужчин фактически не

вырабатывается. Возможно, есть какие-то патологические состояния, когда происходит выработка, но это не мужской гормон.

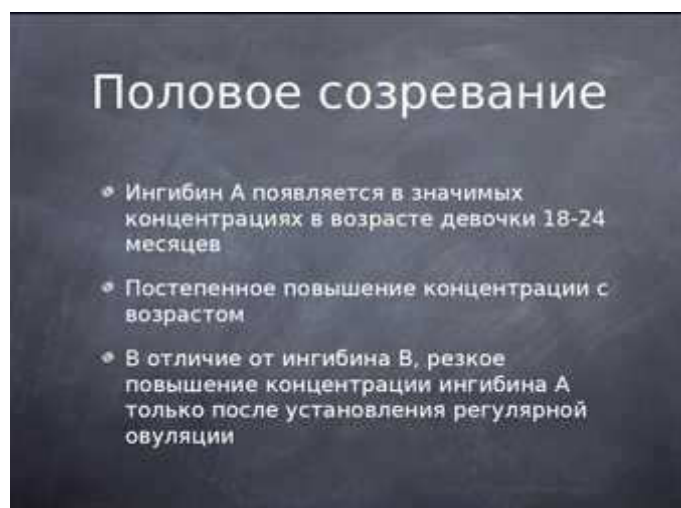
Ингибин А в яичнике



Ингибин А в яичниках выделяется гранулезой в фолликулярную жидкость и усиливает синтез андрогенов клетками теки под действием ЛГ. Напомню, что внутри яичника существуют наружный слой фолликула, он называется «тека», и внутренний слой, который называется «гранулеза». Тека находится под действием ЛГ и вырабатывает андрогены, которые дальше подхватываются и переводятся внутрь фолликула к клеткам гранулезы, где под

действием ФСГ происходит ароматизация, то есть из андрогенов получается эстрадиол. Таким образом, эта регуляция обеспечивает два процесса – это выживание и развитие доминантного фолликула, который может развиваться в условиях такого наружного андрогенного окружения, сжигать эти андрогены, которые идут на синтез эстрадиола (практически весь эстрадиол в течение цикла идет именно из доминантного фолликула). И второе: ингибин А обеспечивает процесс подавления развития других фолликулов, которые подвергаются атрезии. Так обеспечивается моноовуляция, тем самым обеспечивается моноплодная беременность. Также эти регуляторы на паракринном и аутокринном уровнях обеспечивают и качество фолликула, а дальше качество работы желтого тела. В скором времени эти очень важные биологические маркеры будут использоваться для диагностики широкого диапазона состояний, связанного с репродуктивной функцией у женщин.

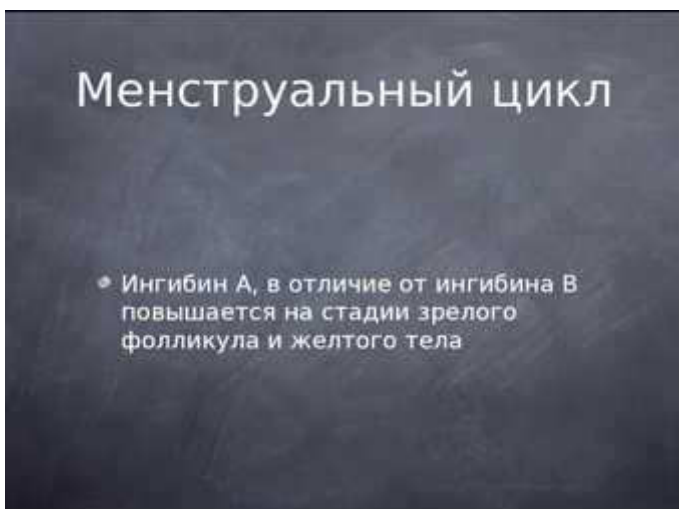
Ингибин А и ингибин В для оценки работы женской репродуктивной системы



При половом созревании ингибин А является более консервативным по сравнению с ингибином В. Они появляются в значимом количестве у девочек в возрасте 18-24 месяцев. И потом постепенно, медленно нарастают к периоду полового созревания. Примерно в период адренархе, когда идет подготовка к менархе, идет значительное и быстрое повышение ингибина В, а ингибин А при этом не повышается. Но с момента установления у девочки нормального

регулярного менструального цикла начинает значительно увеличиваться количество ингибина А.

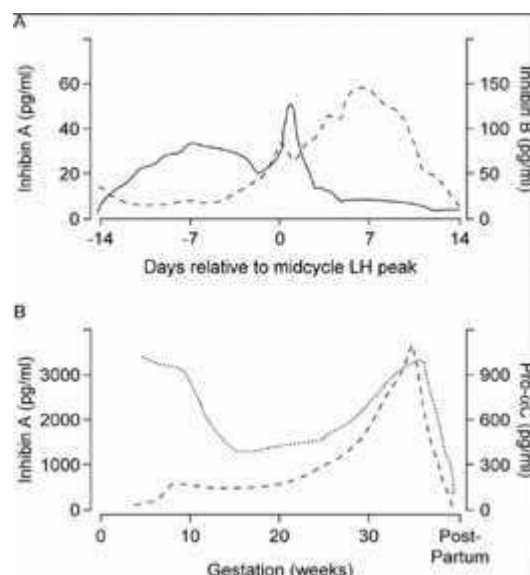
Ингибин А и менструальный цикл



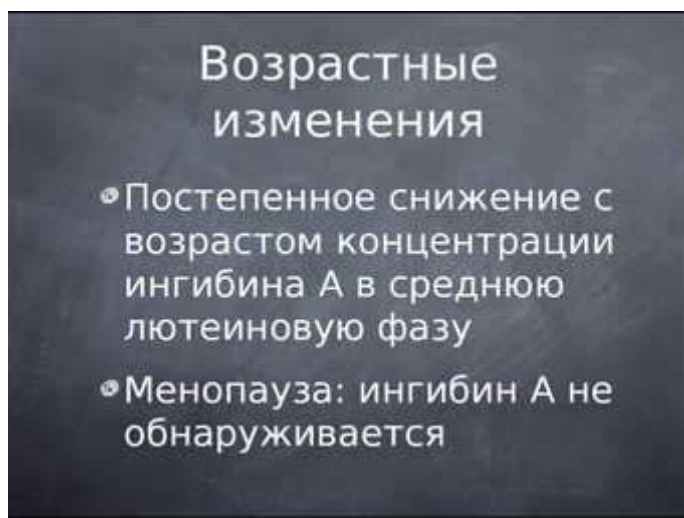
Во время менструального цикла ингибин А ведет себя очень интересно. Из-за этого интересного поведения он пока еще не вошел в комплекс диагностики различных нарушений овуляции и менструального цикла. В отличие от ингибина В ингибин А повышается на стадии фолликула и желтого тела. Поведение ингибина В позволяет использовать его как маркер овариального резерва, в том числе, в EFORT-тесте, в диагностике преждевременного истощения

яичника, оценки той стадии биологического возраста, в котором находится женщина.

Ингибин В сначала повышается к поздней фолликулярной фазе, дальше слегка повышается в период предовуляторного фолликула, дальше его уровень резко падает. Ингибин А ведет себя совершенно по-другому, как марафонец, который идет на длинные дистанции. Он практически не повышается в раннюю и среднюю фолликулярную фазу, но когда резко идет в рост доминантный фолликул, появляется небольшой предовуляторный пик, и огромный пик когда идет желтое тело. Изучение динамики ингибина А во вторую фазу цикла является очень хорошим прогностическим фактором того, как будет наступать беременность, возможно ли получить беременность с применением вспомогательных репродуктивных технологий.



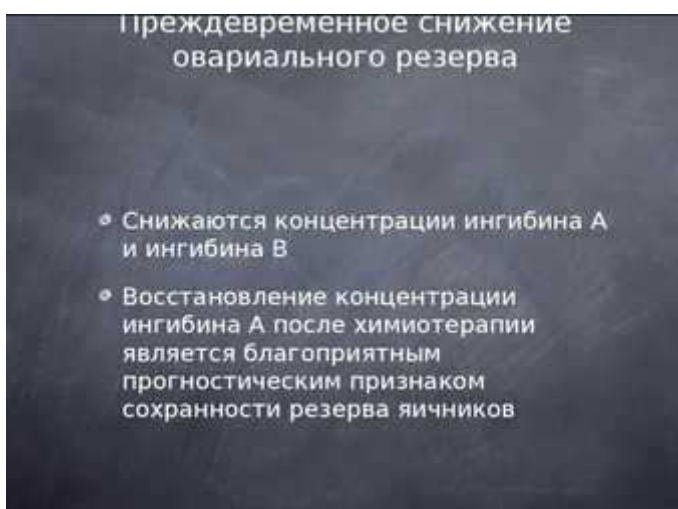
Менопауза



Ингибин А, как и ингибин В, снижается с приближением периода менопаузы. В период менопаузы и после практически перестает определяться. Но, ингибин А можно наблюдать в лютеиновую фазу. В период фазы желтого тела и снижения ингибина А, также параллельно происходит падение ингибина В. Он и здесь проявляет

определенную консервативность: ингибин А начинается снижаться после ингибина В. То есть, первым снижением репродуктивного резерва показывает АМГ, дальше присоединяется ингибин В, и, только потом, ингибин А. Поэтому в ситуациях, когда важно оценить репродуктивный резерв, достижение возраста невозможности наступления беременности, оценки вероятности удачной ЭКО, оценки срока менопаузы, иногда бывает очень важно понять уровень ингибина А: опустился он уже или еще нет или еще есть надежда на развитие беременности. С учетом того, что репродуктивный возраст в данный момент у женщин повышается по разным причинам, это очень актуальный на сегодняшний день вопрос.

Возможность развития беременности и удачной ЭКО. Резерв яичников



При преждевременном снижении овариального резерва снижается концентрация ингибина А и ингибина В. В наш Центр обращается много женщин с проблемой снижения функции яичников, причем количество таких женщин с каждым годом растет, что может быть связано и со спецификой нашего Центра, куда обращаются пациентки с очень сложными случаями. Поэтому сравнение уровня ФСГ и ингибина В в раннюю фолликулярную фазу и ингибина А в

позднюю фолликулярную фазу может помочь в оценке того, с какой скоростью нужно стараться добиться беременности, а также дифференцировать временные безобидные повышения фолликулостимулирующего гормона от грозных симптомов невозможности наступления беременности у женщин репродуктивного возраста.

Диагностика онкологических состояний

Очень важный момент использования данных маркеров — диагностика онкологических состояний. Онкология у нас молодеет. При выявлении онкологии для лечения используются различные цитостатические препараты. Они же применяются и врачами-ревматологами (например, при красной волчанке). Важно понять, восстановится ли репродуктивная функция у женщины после серьезной цитостатической терапии? Восстановится ли репродуктивная функция после такого химического воздействия? Если ингибин А восстанавливается в среднюю лютеиновую фазу, то есть во вторую фазу цикла, значит такая пациентка перспективна с точки зрения возможного наступления беременности и дальнейших родов. Если же ингибин А не восстанавливается, то вероятно, цитостатики нанесли непоправимый урон репродуктивному здоровью женщины, и надеяться на получение хорошей яйцеклетки, которая оплодотворится, уже не приходится.

Ингибин А и беременность малого срока

Беременность малого срока

- Концентрация ингибина А постепенно повышается, а ингибина В — не меняется

Ингибин А — это очень важный и перспективный анализ для диагностики целого ряда нарушений беременности малого срока. Почему? Потому что концентрация ингибина А постепенно повышается в течение первого триместра, а концентрация ингибина В не меняется.

Ингибин А повышается постепенно и достигает пика на 9-10 неделе беременности. Дальше наступает фаза плато, и дальше пик

происходит уже ближе к родам, где-то в середине 30-й недели. После родов происходит падение. Иная кривая концентрации предшественника ингибина А. Это как бы незаконченный ингибин А, который идет из яичника. Он играет малую роль в регуляции репродуктивного процесса. Именно оценка концентрации ингибина А во время беременности позволяет выявить ряд проблем в репродуктивной системе, что важно для врача акушера-гинеколога.

Угрожающий выкидыш

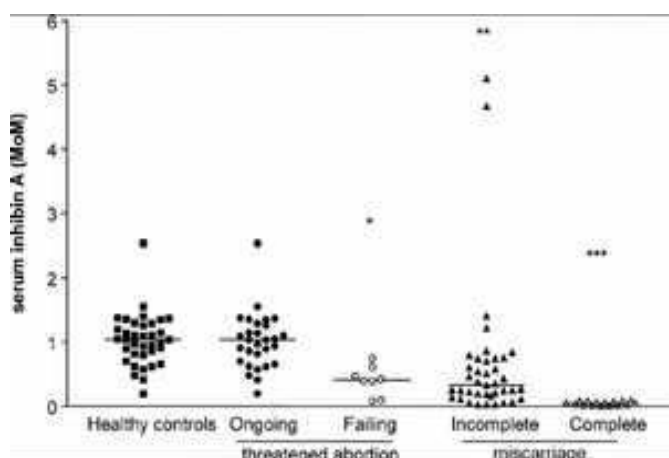
Угрожающий выкидыш

- Нормальные значения ингибина А указывают на благоприятный прогноз для беременности
- Снижение ингибина А ниже 0,5 МоМ при нормальном уровне ХГЧ — неблагоприятный прогноз

Рассмотрим стандартную ситуацию с угрожающим выкидышем. У пациентки наступает беременность, но развивается как-то не так, появляются какие-то кровянистые выделения. Врач, который проводит УЗИ, не обнаруживает никаких отклонений: вроде бы и сердцебиение есть, и размеры плода соответствует сроку. Но, если мы добавим определение ингибина А, то получим совершенно две разные группы беременных. Если концентрация ингибина А нормальная,

то беременность будет протекать дальше успешно, если нет, то беременность остановится. Это достаточно ранний маркер риска ранней остановки беременности. Повлиять на сложившуюся ситуацию мы не можем, но это позволит оценить ситуацию и подготовиться к ней психологически.

Значимо снижение ингибина А ниже 0,5 МоМ. МоМ показывает, насколько отличается концентрация анализа от среднего на данный день беременности. Если ингибин снижается ниже 0,5 МоМ, то прогноз неблагоприятный.



Также оценка уровня ингибина А имеет значение в оценке необходимости выскабливания полости матки. На Западе после произвольного выкидыша выскабливание делается в 15 % случаев. У нас практически в 100%, что приводит к нанесению урона для слизистой оболочки матки, приводит к воспалительным процессам. Если после произвольного выкидыша ингибин А понижается, то не нужно прибегать к выскабливанию. Если же он обнаруживается в большом количестве и не снижается, то скорей всего, после выкидыша есть остатки плацентарной ткани в организме. Это требует более внимательного отношения к данной пациентке, возможно, показано выскабливание.

Ингибин А и привычное невынашивание беременности

Привычное невынашивание беременности

- При привычном невынашивании беременности уровни ингибина А в I триместре беременности значимо ниже, чем у здоровых женщин
- Снижение ингибина А обнаруживается до появления первых клинических признаков нарушения развития беременности

При привычном невынашивании беременности ингибин А в первом триместре значительно ниже, чем у здоровых беременных женщин. Мы получаем некую группу конституционных пациенток, у которых резко снижается один из важных показателей плацентарной функции. Повлиять на это мы не можем. Но из этого следует достаточно много важных выводов. Возможно, здесь участвует мужской фактор, поскольку плацента работает под действием

мужских генов. Именно они должны обеспечить развитие беременности. До беременности мы не можем провести такую оценку, только во время.

Пузырный занос

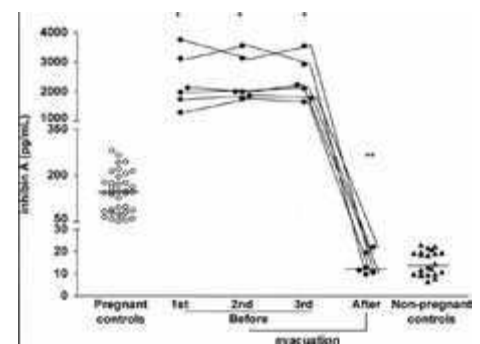
Пузырный занос

- Ингибин А — более надежный биохимический маркер, чем ХГЧ (неперекрывающиеся зоны значений)
- Падение уровня ингибина А до нормальных значений — надежный признак отсутствия остатков хорионической ткани

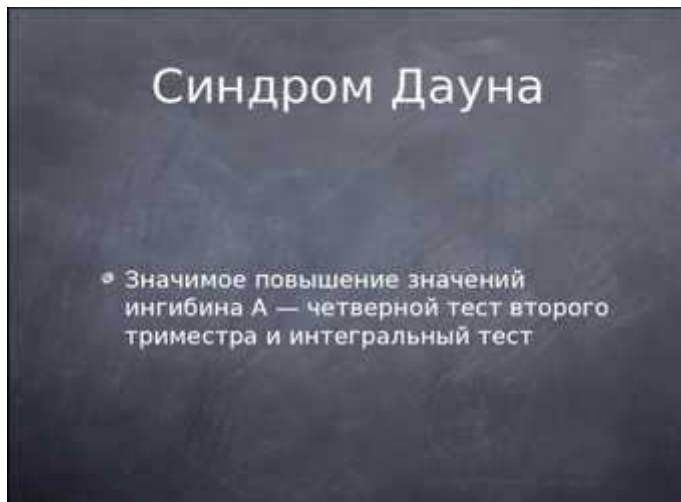
Пузырный занос и риск развития хорионэпителиомы также являются показаниями, в которых может быть использован ингибин А. Традиционно в диагностике используется ХГЧ. Но исследования показывают, что ХГЧ менее надежный, чем ингибин А. Ингибин А дает четкие неперекрывающиеся зоны. При пузырном заносе в разы повышена концентрация ингибина А, что важно, в том

числе, и для диагностики неполного пузырного заноса.

Падение значений важно видеть для исключения риска развития каких-то процессов, которые могут потребовать дополнительного лечения или даже исключения риска доброкачественной опухоли.



Синдром Дауна, ингибин А, четверной тест, интегральный тест

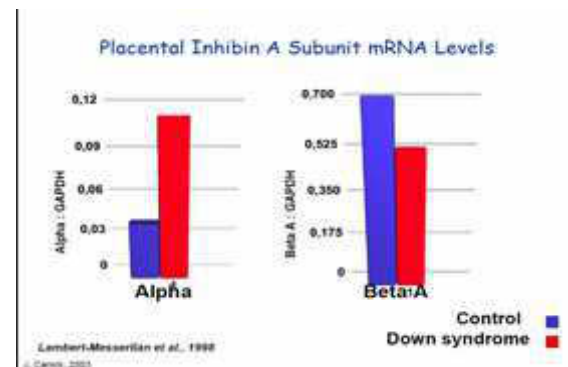


При синдроме Дауна ингибин А входит в два важных теста: это четверной тест второго триместра и интегральный тест.

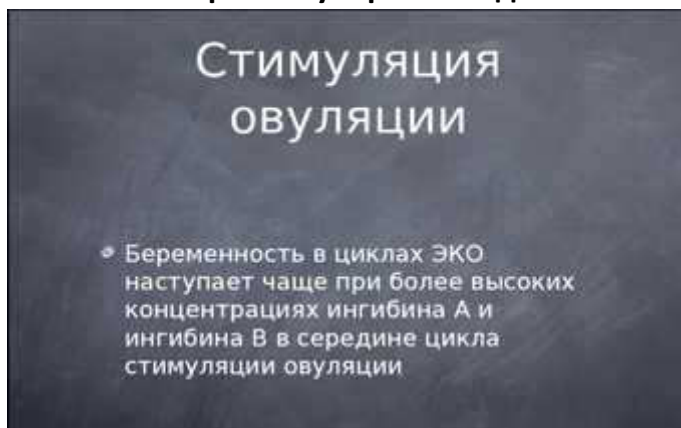
В ближайшее время произойдет вытеснение пренатального скрининга пренатальной диагностикой по клеткам плода в крови матери. Но наработки по медианам ингибина А очень значимы. И оценка уровня ингибина А во втором триместре беременности вне диагностики синдрома

Дауна, скорее всего, останется, потому что повышение ингибина А встречается не только при синдроме Дауна, но и при риске нарушений плацентарной функции. На данный момент в наших клиниках уже реально используется диагностика кариотипа плода в крови матери. Одновременно существует и пренатальный скрининг.

Очень интересные исследования, которые касаются экспрессии альфа и бета-субъединиц при синдроме Дауна. При синдроме Дауна альфа-единица повышается, а бета-единица даже меньше единицы. Тем не менее, общая концентрация ингибина А в крови у женщины повышена.



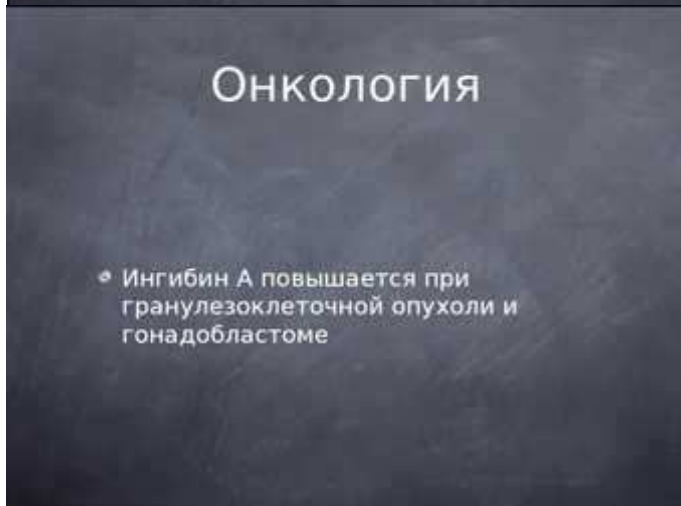
Ингибин А в фолликулярной жидкости



Очень перспективно использование ингибина А в фолликулярной жидкости для оценки успеха протоколов ЭКО и мониторинг ингибина А в перiovуляторный период и во время функционирования фазы желтого тел. Ряд исследований показали, что при высоких цифрах ингибина А беременность наступает гораздо чаще. При низких цифрах процент успешной подсадки при ЭКО ниже.

Ингибин А и опухоли яичника

Яичник представляет из себя очень сложный орган, с очень большим скоплением разных тканей, и при некоторых опухолях в процесс вовлекается и ингибин А. При различных видах герминативных опухолей



яичника повышаются различные маркеры — АФП, ХГЧ, ЛДГ, эстрадиол, ингибин, тестостерон, андростерон, ДЭА-сульфат. Ингибин значительно повышается при гранулёзноклеточной опухоли яичника. Не всегда повышается при различных гонадобластомах. Чем выше степень дифференцировки, тем чаще ингибин А бывает повышен.

Markers secreted by germ cell and sex cord-stromal tumors of the ovary

	AFP	hCG	LDH	E2	Inhibin	Testost	Andro	DHEA
Germ cell tumors								
Dysgerminoma	-*	±*	+	±	-	-	-	-
Embryonal	±	+	±	±	-	-	-	-
Immature teratoma	±	-	±	±	-	-	-	±
Choriocarcinoma	-	+	±	-	-	-	-	-
Endodermal sinus	+	-	+	-	-	-	-	-
Gonadoblastoma Δ	-	-	-	±	±	±	±	±
Polyembryona	±	+	-	-	-	-	-	-
Mixed germ cell	±	±	±	-	-	-	-	-
Sex cord-stromal tumors								
Thecoma-fibroma	-	-	-	-	-	-	-	-
Granulosa cell	-	-	-	±	+	±	-	-
Sertoli-Leydig	±	-	-	±	±	±	±	±

AFP: alpha-fetoprotein; hCG: human chorionic gonadotrophin; LDH: lactate dehydrogenase; E2: estradiol; testost: testosterone; andro: androstenedione; DHEA: dihydroepiandrosterone.

* Borderline elevations in case reports (<16 ng/ml).

• Low level seen in dysgerminomas with either nondysgerminomatous elements of syncytiotrophoblastic cells.

Δ Type of germ cell-sex cord stromal tumor consisting of neoplastic germ cells and sex cord-stromal derivatives.

UpToDate®

Copyrights apply

У мужчин иногда также повышается при герминативных опухолях.

Ингибин А в дифференциальной диагностике

- Маточные кровотечения
- Гиперпластические процессы эндометрия
- Опухоли яичников при гинекологическом осмотре и/или УЗИ

Обратите внимание, при гранулёзноклеточной опухоли яичника повышаются эстрадиол и тестостерон. То есть состояния, при которых повышается ингибин А, являются гормонально активными. А это значит, что такие состояния, которые могут идти под видом, например, нарушений менструального цикла, дисфункциональных кровотечений, могут скрывать за собой опухоль. А это значит, что ингибин А может использоваться как один из

компонентов дифференциальной диагностики сложно диагностируемых кровотечений и гиперпластических процессов эндометрия. Развиваются клетки гранулёзы, они являются и главным источником ингибина А, и главным источником эстрадиола. Под действием эстрадиола развивается гиперплазия эндометрия, женщина жалуется на кровотечения. А ультразвуковая диагностика не всегда в данной проблеме может помочь. Если мы видим, что в этой ситуации ингибин А повышается, это значит развитие гранулезоклеточной опухоли. Пациентка в данном случае должна быть направлена к онкологу.

Ингибин А — маркер широкого использования

Подводя итоги, мы можем сказать, что ингибин А может перспективно использоваться в целом спектре различных ситуаций, с которыми сталкивается врач акушер- гинеколог в своей работе. Это и оценка менструального цикла, и диагностика причин различных нарушений, и выявление причин невынашивания беременности, и диагностика целого ряда патологий, связанных с беременностью. Врачи должны знать, что существуют такие методы, они эффективны, доступны, и ими можно и нужно пользоваться.

Обсуждение

Должны ли оцениваться ХГЧ, АФП, ингибин, эстриол в пренатальном скрининге не только в рамках диагностики синдрома Дауна, но и оценке течения беременности?

Маркеры второго триместра должны быть, и должны использоваться как маркеры аномалий плода, так и риска нарушений беременности. Но это другая тема, у меня есть целый доклад на тему всех этих маркеров при диагностике ряда состояний. Важно учитывать и то, что на смену пренатального скрининга анеуплоидий пришла неинвазивная диагностика по крови матери. Но использование показателей в качестве самостоятельных биохимических маркеров течения беременности это не отменяет.

У меня были женщины старше 30 лет, у которых показатели МоМ ХГЧ больше 4.

Кроме хромосомных аномалий, маркеры пренатального скрининга могут показать сердечно-сосудистые и иные аномалии, которые очень сложно выявляются. В этом случае должно проводиться регулярное ультразвуковое исследование пациентки.

А можно ли как-то доказать, что у этих женщин все нормально?

Есть два исследования: амниоцентез или исследование фетальных клеток в крови матери. Очень хорошее исследование. С пациенткой заключается договор, берется кровь, пробирка отправляется в Америку в лабораторию. И уже в течение 2 недель по электронной почте присылается результат.