

Е.Г. Поленок, Т.П. Аносова, М.П. Аносов, К.С. Красильникова, Е.А. Гуров, В.А. Титов,
Н.Е. Вержбицкая, И.А. Вафин, С.Е. Рагожина, А.Н. Глушков

АНТИТЕЛА К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

Институт экологии человека СО РАН (Кемерово)
Областной клинический онкологический диспансер (Кемерово)
Кемеровское патологоанатомическое бюро (Кемерово)
Кемеровский областной центр крови (Кемерово)

Исследованы особенности иммунного ответа на химический канцероген бензо[а]пирен (БП) у мужчин больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Выявлены изотипические различия в образовании антител (АТ) к БП у больных НМРЛ по сравнению со здоровыми. У мужчин с НМРЛ чаще наблюдаются повышенные уровни IgG АТ-БП. При этом шанс возникновения НМРЛ возрастает почти в 2 раза при высоких уровнях АТ-БП класса G.

Ключевые слова: антитела, бензо[а]пирен, немелкоклеточный рак легкого

ANTIBODIES TO BENZO[A]PYRENE IN SERUM OF PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER

E.G. Polenok, T.P. Anosova, M.P. Anosov, K.S. Krasilnikova, E.A. Gurov, V.A. Titov,
N.E. Verzhbitskaja, I.A. Vafin, S.E. Ragozhina, A.N. Glushkov

Institute of Human Ecology SB RAS, Kemerovo
Regional clinical oncology hospital, Kemerovo
Pathologoanatomic bureau, Kemerovo
Regional centre of blood, Kemerovo

The features of immune response to chemical carcinogen benzo[a]pyrene (Bp) at the patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) are investigated. The isotypical distinctions in formation of antibodies (Ab) to Bp at the men with NSCLC in comparison with healthy are revealed. There were more often observed the high levels of IgG Ab-Bp at the men with NSCLC. Thus risk of occurrence NSCLC grows almost in 2 times at high levels of Ab-Bp of a class G.

Key words: antibodies, benzo[a]pyrene, non-small cell lung cancer

Рак легкого (РЛ) занимает лидирующее место среди онкологических заболеваний. Ежегодно в России заболевают РЛ свыше 63000 человек, при этом 34,2 % выявляются уже в IV стадии заболевания [5]. В структуре онкологической заболеваемости РЛ занимает первое место среди мужского населения и составляет 25 % от всех злокачественных новообразований, доля РЛ среди женщин составляет 4,3 %. Несмотря на новые технологии лечения и возможность раннего выявления, РЛ по-прежнему остается заболеванием с высоким уровнем летальности — пятилетняя выживаемость составляет 10–15 % [1]. По гистологическому типу 80–85 % всех случаев РЛ относится к немелкоклеточному раку легкого (НМРЛ), причем у мужчин доминирует плоскоклеточный тип карциномы, а у женщин чаще диагностируется аденокарцинома [13].

По данным МАИР большинство случаев заболевания РЛ связано с воздействием химических канцерогенов, в том числе полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), представителем которых является бензо[а]пирен (БП) [1, 8, 13]. На сегодняшний день хорошо изучены механизмы его ферментативного окисления и детоксикации в организме человека. Однако роль иммунной системы в регуляции химического гомеостаза низкомолекулярных соединений, в том числе и в

адаптации к БП, изучена недостаточно [10]. Авторами ряда работ [7, 12] в экспериментах *in vivo* и *in vitro* показано, что антитела (АТ) к химическим канцерогенам способны тормозить или стимулировать возникновение злокачественных опухолей в зависимости от изотипа и количества. Имеются данные о том, что АТ к аддуктам БП с макромолекулами организма (ДНК, белки) обнаруживаются у работников канцерогеноопасных предприятий с длительной экспозицией к БП [3, 11], у лиц, подверженных воздействию низких доз ПАУ в силу своей профессиональной деятельности [9], у курящих индивидуумов [14] и у больных раком молочной железы и органов желудочно-кишечного тракта [2, 6]. Поэтому изучение роли и функции антител к БП, которые могут иметь диагностическое и прогностическое значение при других онкологических заболеваниях, по-прежнему остается актуальной задачей.

Целью нашей работы было изучить особенности образования АТ к БП у больных НМРЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В обследовании приняли участие 311 мужчин. Из них — 241 мужчина с диагнозом НМРЛ, которые поступили на лечение в Областной клинический онкологический диспансер г. Кемерово. Диагноз

НМРЛ в каждом случае был подтвержден морфологически, рентгенологически и эндоскопически. У основной части больных был диагностирован плоскоклеточный рак (69 %), 15 и 12 % составили аденокарцинома и крупноклеточный рак, и 4 % — другие формы НМРЛ. Средний возраст больных НМРЛ $56,9 \pm 4,7$ года.

В группу сравнения вошли условно здоровые мужчины (70 человек), не болеющие РЛ. Средний возраст здоровых мужчин — $50,9 \pm 6,9$ года. Забор периферической крови проводился с информированного согласия участников исследования и в соответствии с этическими нормами Хельсинской декларации (2000 г.). Образцы сыворотки крови обследуемых забирались в аликвоты и хранились при -70°C .

Исследование АТ к БП проводили с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа в собственной модификации [4]. В лунки полистирольных иммунологических планшетов вносили по 100 мкл конъюгата БП с бычьим сывороточным альбумином (БСА, Amresco, США) в натрий-фосфатном буфере (PBS, pH 7,4) в концентрации 2 мкг/мл и инкубировали при температуре 25°C в течение ночи. Для оценки фонового связывания с белком в отдельные лунки вносили неконъюгированный БСА. Для удаления несвязавшегося конъюгата БП-БСА планшеты промывали 3 раза раствором PBS, содержащим 0,05 % Tween 20 (Amresco, США) (PBST). Для предотвращения неспецифического связывания во все лунки вносили по 250 мкл блокирующего раствора (0,5 % БСА в PBST) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Сыворотки крови разводили блокирующим раствором: для IgA АТ к БП сыворотку разводили 1:20, IgG — 1:100, IgM — 1:50. В лунки вносили по 100 мкл в дуплетах разведенной сыворотки крови, инкубировали в течение 1 ч при 37°C на шейкере. Затем вносили по 100 мкл конъюгата АТ кролика против Ig человека с пероксидазой хрена («Sigma», Германия), инкубировали в течение 1 ч при 37°C на шейкере. После каждого этапа инкубации планшеты промывали 4–5 раз PBST. Регистрацию адсорбированных на планшете АТ проводили с помощью субстратного буфера, содержащего 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ, США), на фотометре (Пикон, Россия) при

длине волны 450 нм. Уровень АТ к БП выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

$$\text{АТ-БП} = (\text{OD}_{\text{БП-БСА}} - \text{OD}_{\text{БСА}}) / \text{OD}_{\text{БСА}}$$

где $\text{OD}_{\text{БП-БСА}}$ — оптическая плотность связывания с конъюгатом БП-БСА, $\text{OD}_{\text{БСА}}$ — оптическая плотность связывания с БСА. Величина уровня АТ-БП показывала, во сколько раз связывание с канцерогеном превышает связывание с белком-носителем. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью ППК Statistica 6.0. Ненормальный характер распределения показателей определили с помощью критерия Шапиро — Уилка и в дальнейшем статистически значимые различия между группами выявляли с помощью непараметрического критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность вариации и U-критерия Манна — Уитни при уровне значимости $p < 0,05$. Отношение шансов (OR) рассчитывали с доверительным интервалом (CI) при 95 % уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

АТ к БП трех классов (А, G, M) были выявлены как у больных НМРЛ, так и у здоровых мужчин. Однако между группами была обнаружена разница по средним показателям АТ-БП. Так, средний уровень IgG АТ-БП был в 1,3 раза выше у больных НМРЛ по сравнению со здоровыми мужчинами (медианы: 3,6 против 2,7 соответственно, $p = 0,027$). По средним показателям IgA и IgM АТ-БП сравниваемые группы не отличались.

Далее была проанализирована частота встречаемости низких и высоких уровней АТ-БП в исследуемых группах. Данные представлены в таблице 1. Выяснилось, что у больных НМРЛ чаще встречался высокий уровень IgG АТ-БП (> 2) в отличие от группы сравнения (75 % против 60 % соответственно, $\chi^2 = 5,0$; $p = 0,03$). При этом шанс возникновения онкологического заболевания увеличивается почти в 2 раза (OR = 1,96; 95 % CI 1,1–3,6). Что касается АТ-БП классов А и М, у больных НМРЛ чаще встречались повышенные уровни АТ-БП этих классов (64 % против 36 % соответственно, $\chi^2 = 0,8$; $p = 0,37$), но различия статистически не значимы.

Анализ характера образования АТ-БП в зависимости от курения показал следующее. Между больными НМРЛ и здоровыми мужчинами ку-

Таблица 1
Частота встречаемости низких и высоких уровней АТ-БП у больных НМРЛ и у здоровых мужчин

Показатели	Группа сравнения (n = 70)	Больные НМРЛ (n = 241)	χ^2, p	OR (95 % CI)
	n / %	n / %		
IgA АТ-БП > 2	40/57	154/64	0,8	
≤ 2	30/43	87/36		
IgG АТ-БП > 2	42 /60	180/75	5,0 0,03	1,96 (1,1–3,6)
≤ 2	28/40	61/25		
IgM АТ-БП > 2	40 /57	154/64	0,8	
≤ 2	30/43	87/36		

рящими или некурящими различий выявлено не было. Однако внутри исследуемых групп между курящими и некурящими различия были обнаружены. У курящих больных НМРЛ средние уровни IgA и IgM АТ-БП были в 1,3–1,9 раза выше, чем у некурящих больных (медианы: IgA 2,7 против 1,4 соответственно, $p = 0,04$; IgM 2,7 против 2,1 соответственно, $p = 0,04$). У курящих мужчин группы сравнения средний уровень IgA АТ-БП в 2 раза превышал таковой у некурящих этой же группы (медианы: 2,9 против 1,4 соответственно, $p = 0,02$).

В группе больных НМРЛ у курящих чаще встречались повышенные уровни IgA АТ-БП по сравнению с некурящими больными мужчинами (66 % против 33 % соответственно, $\chi^2 = 3,81$; $p = 0,05$), но различия были не значимы ввиду малой выборки некурящих больных НМРЛ. Так же в группе больных НМРЛ у курящих чаще регистрировались повышенные уровни IgM АТ-БП в отличие от некурящих этой же группы (47 % против 8 % соответственно, $\chi^2 = 5,5$; $p = 0,02$). В группе сравнения тоже были обнаружены различия в частоте встречаемости высоких и низких уровней АТ-БП: у курящих чаще встречались повышенные уровни IgA АТ-БП в отличие от некурящих мужчин этой же группы (70 % против 40 % соответственно, $\chi^2 = 5,1$; $p = 0,02$).

В зависимости от гистологического типа статистически значимые различия между больными НМРЛ и здоровыми мужчинами были выявлены только при плоскоклеточной форме РЛ (рис. 1). Средний уровень IgG АТ-БП у больных плоскоклеточным раком легкого (ПРЛ) был в 1,3 раза выше, чем у здоровых мужчин (медианы: 3,4 против 2,7 соответственно, $p = 0,04$).

У больных ПРЛ чаще встречались высокие уровни IgG АТ-БП (74 % против 60 % соответственно, $\chi^2 = 4,1$; $p = 0,04$). При этом шанс возникновения ПРЛ увеличивается почти в 2 раза ($RR = 1,9$; 95 % CI 1,0–3,6). Высокий уровень IgG АТ-БП наблюдался и у больных крупноклеточным раком легкого, но ввиду малого количества наблюдений различия были статистически мало значимы (83 % против 60 % в группе сравнения, $\chi^2 = 3,81$; $p = 0,05$).

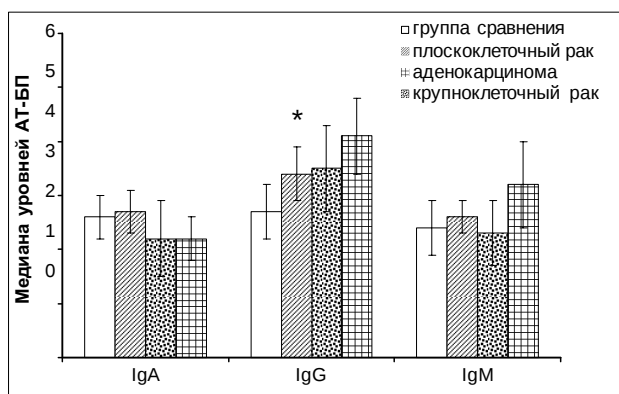


Рис. 1. Медианы уровней АТ-БП классов А, G, М при разных гистологических формах рака легкого. * – значимое отличие от группы сравнения по U-критерию Манна – Уитни ($p = 0,04$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования выявлены изотипические различия в образовании АТ к химическому канцерогену БП у больных НМРЛ по сравнению со здоровыми мужчинами. У больных НМРЛ чаще наблюдался высокий уровень IgG АТ-БП. При этом шанс возникновения НМРЛ возрастает почти в 2 раза при высоком уровне IgG АТ-БП (> 2). Фактор курения оказывает влияние на средние показатели уровней АТ-БП классов А и М как у здоровых мужчин, так и у больных НМРЛ. У курящих мужчин чаще встречаются повышенные уровни IgA и IgM АТ-БП. Но между курящими больными НМРЛ и здоровыми мужчинами различий по средним показателям уровней АТ-БП трех классов выявлено не было. Определение уровня IgG АТ-БП может иметь диагностическое значение и для определения риска возникновения ПРЛ: при высоких значениях IgG АТ-БП шанс возникновения онкопатологии почти в 2 раза выше. Таким образом, анализ АТ к БП может иметь значение не только для оценки канцерогенной нагрузки, но и для определения индивидуальной чувствительности к ксенобиотикам и канцерогенного риска.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-Кузбасс № 10-04-98003-р_сибирь_a.

ЛИТЕРАТУРА

- Бахлаев И.Е., Толпинский А.П. Рак легкого: учеб. пособие. – Петрозаводск: изд-во ПГУ, 2000. – 74 с.
- Глушков А.Н., Аносова Т.П., Небесная Н.Г. Изотипические особенности антител к полициклическим ароматическим углеводородам у больных раком молочной железы, желудка, толстой и прямой кишки // Эксперимент. онкология. – 1996. – № 18. – С. 426–428.
- Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Мун С.А., Ларин С.А. и др. Антитела к бензо[а]пирену как маркер канцерогенной нагрузки у рабочих углеперерабатывающей промышленности // Гигиена и санитария. – 2010. – № 2. – С. 53–56.
- Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Савченко Я.А. и др. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия // Рос. иммунол. журн. – 2011. – Т. 5. – № 1. – С. 39–44.
- Мерабишвили В.М., Дятченко О.Т. Статистика рака легкого (заболеваемость, смертность, выживаемость) // Прак. онкология. – 2000. – № 3. – С. 3–7.
- Chagnaud J.L., Faiderbe S., Geffard M. Identification and immunochemical characterization of IgA in sera of patients with mammary tumors // Int. J. Cancer. – 1992. – Vol. 50. – P. 395–401.
- Curtis G., Ryan W., Stenback F. Antibody stimulation of benzo[a]pyrene carcinogenesis // Cancer Lett. – 1978. – Vol. 4. – P. 223–228.
- Fucic A., Gamulin M., Ferencic Z., Rokotov D.S. et al. Lung cancer and environmental chemical exposure: a review of our current state of knowledge with

reference to the role of hormones and hormone receptors as an increased risk factor for developing lung cancer in man // Toxicologic Pathology. — 2010. — N 38. — P. 849—855.

9. Galati R., Zijno A., Crebelli R., Falasca G. et al. Detection of antibodies to the benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in sera from individuals exposed to low doses of polycyclic aromatic hydrocarbons // J. Exp. Clin. Cancer Res. — 2001. — Vol. 20, N 3. — P. 359—364.

10. Glushkov A.N. Immunostimulation of the chemical-induced carcinogenesis in the phase of initiation // Medical Hypotheses. — 2002. — Vol. 59, N 5. — P. 501—503.

11. Harris C.C., Vahakangas K., Newman M.J., Trivers G.E. et al. Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in peripheral blood lympho-

cytes and antibodies to the adducts in serum from coke oven workers // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1985. — Vol. 82. — P. 6672—6676.

12. Moolten F., Schreiber B., Rizzone A. Protection of mice against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced skin tumors by immunization with a fluorinated analog of carcinogen // Cancer Res. — 1981. — Vol. 41. — P. 452—464.

13. Paggi M.G., Vona R., Abbruzzese C., Malorni W. Gender-related disparities in non-small cell lung cancer // Cancer Letters. — 2010. — Vol. 298. — P. 1—8.

14. Pulera N., Petruzzelli S., Celi A., Puntoni R. et al. Presence and persistence of serum anti-benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct antibodies in smokers: effects of smoking reduction and cessation // Int. J. Cancer. — 1997. — Vol. 70. — P. 145—149.

Сведения об авторах

Поленок Елена Геннадьевна — заведующая лабораторией иммунохимии ИЭЧ СО РАН, кандидат фармацевтических наук (650065, г. Кемерово, пр. Ленинградский, 10; тел.: (3842) 74-28-50; e-mail: ihe@list.ru)

Аносова Татьяна Петровна — научный сотрудник лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН (650055, г. Кемерово, ул. Волгоградская, 35; тел.: (3842) 54-59-52)

Аносов Михаил Петрович — научный сотрудник лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН (650055, г. Кемерово, ул. Волгоградская, 35; тел.: (3842) 54-59-52)

Красильникова Ксения Сергеевна — младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН (650065, г. Кемерово, пр. Ленинградский, 10; тел.: (3842) 74-15-95)

Гуров Евгений Александрович — ведущий инженер-технолог лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН (650065, г. Кемерово, пр. Ленинградский, 10; тел.: (3842) 74-15-95)

Титов Виктор Александрович — заведующий торакальным отделением ФГБУЗ КО Областного клинического онкологического диспансера г. Кемерово (650055, г. Кемерово, ул. Волгоградская, 35; тел.: (3842) 54-18-88)

Вержицкая Наталья Евгеньевна — заведующая патологоанатомическим отделением в ГБУЗ КО ОТ Кемеровском патологоанатомическом бюро (650055, г. Кемерово, ул. Волгоградская, 35; тел.: (3842) 54-65-08)

Вафин Илгиз Ахметович — главный врач ГБУЗ Кемеровского областного центра крови (650050, г. Кемерово, пр. Октябрьский, 22а; тел.: (3842) 72-16-22)

Рагожина Светлана Егоровна — заместитель главного врача по медицинской части ГБУЗ Кемеровского областного центра крови (650050, г. Кемерово, пр. Октябрьский, 22а; тел.: (3842) 72-16-22)

Глушков Андрей Николаевич — директор ИЭЧ СО РАН, доктор медицинских наук, профессор (650065, г. Кемерово, пр. Ленинградский, 10; тел.: (3842) 57-50-79; e-mail: ssheremetova@rambler.ru)