

А.П. Кузьменко¹
 Г.В. Диденко¹
 Е.Г. Шпак¹
 А.Н. Турчак²
 Л.И. Воробьева²
 Г.П. Потеня¹

¹Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины

²Национальный институт рака МЗ Украины, Киев, Украина

Ключевые слова: рак тела матки, ксеногенные эмбриональные антигены, антигены микроорганизмов, иммуноферментный анализ, диагностика, мониторинг заболевания.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ СЫВОРОТОК КРОВИ БОЛЬНЫХ ПРИ ПЕРВИЧНОМ РАКЕ ТЕЛА МАТКИ И ЕГО РЕЦИДИВАХ С БЕЛКАМИ *V. megaterium* H

Цель: изучение возможности использования белков из ксеногенных эмбриональных тканей и из микроорганизмов *V. megaterium* H и *V. subtilis* B-7025 для диагностики и мониторинга рака тела матки (РТМ). **Объект и методы:** проведены исследования белков эмбрионов курицы (26 кДа), культуральной жидкости (64 кДа) и цитоплазмы (70 кДа) *V. megaterium* H, культуральной жидкости (70 кДа) *V. subtilis* B-7025 в ИФА-тесте (ИФА — иммуноферментный анализ) с сыворотками крови животных с модельными опухолями разного гистогенеза и сыворотками крови больных РТМ, фибромиомой матки и доноров. **Результаты:** установлено, что все исследованные белки реагируют в ИФА-тесте с сыворотками крови мышей с опухолями. Реактивность с сыворотками крови больных РТМ и фибромиомой матки (но не доноров) выявлена только для белков культуральной жидкости и цитоплазмы *V. megaterium* H. Активность последних в тесте с сыворотками крови больных РТМ (как после начала лечения, так и спустя 1 год при наличии рецидива) достоверно превышает таковую в анализе с сыворотками крови пациенток с фибромиомой матки. **Вывод:** полученные результаты обосновывают возможную перспективность использования созданной тест-системы для уточнения диагноза РТМ и мониторинга после лечения.

ВВЕДЕНИЕ

По данным Национального канцер-регистра Украины, заболеваемость (грубый показатель) раком тела матки (РТМ) в 2011 и 2012 гг. составила соответственно 31,0–29,9 и 16,7–16,1 на 100 тыс. женского населения. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями в женской популяции Украины РТМ занимает 3-е место (8,6%), смертности от онкопатологий — 8-е (5,3%) [1]. Возникновение этой злокачественной опухоли напрямую зависит от возраста: риск развития РТМ повышается в 2–3 раза за каждые 5 лет репродуктивного периода; пик частоты РТМ отмечают в возрасте 60–70 лет. У 78% больных выявленное заболевание соответствует I–II стадии по классификации FIGO, что объясняется особенностями клинической манифестации. Несмотря на усовершенствование методов лечения, 5-летняя выживаемость больных не изменилась за последние 20 лет и составляет 69,7%. В связи с этим традиционное представление о благоприятном течении и прогнозе РТМ требует пересмотра, поскольку 30% пациенток умирают от прогрессирования заболевания [2].

На сегодня не выявлены достоверные маркеры для уточненной диагностики РТМ. Например, опухолевый маркер СА-125 является показателем про-

гноза серозно-папиллярного РТМ и опухолей с отсутствием экспрессии гормональных рецепторов, однако неспецифичен для диагностики РТМ. В настоящее время достаточно перспективными для создания диагностических тест-систем злокачественных новообразований считаются онкофетальные/эмбриоспецифические антигены, что обусловлено их «универсальностью». Последняя связана с тем, что злокачественная трансформация клетки часто сопровождается реэкспрессией эмбриональных белков, поэтому одни и те же онкофетальные антигены могут появляться в опухолях разного гистогенеза [3–5]. Еще одним перспективным направлением в разработке диагностических тест-систем может быть использование перекрестно-реагирующих антигенов микроорганизмов и опухолей, в частности антигенов *V. megaterium* H и *V. subtilis* B-7025 [6, 9].

Целью данной работы является изучение возможности использования белков из ксеногенных эмбриональных тканей и из микроорганизмов *V. megaterium* H и *V. subtilis* B-7025 для диагностики и мониторинга РТМ.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Из ксеногенных эмбриональных тканей (4-, 7- и 10-суточные куриные эмбрионы) и фильтратов

культуральной жидкости *B. megaterium H* и *B. subtilis B-7025*, цитоплазмы и мембран указанных микроорганизмов выделены и очищены белковые фракции, которые в дальнейшем исследовали в качестве тест-антигенов. Белки получали: из куриных эмбрионов — методом ЭДТА-экстракции; из фильтратов культуральной жидкости — методом осаждения сульфатом аммония; из цитоплазмы микробных клеток — методом ультразвуковой дезинтеграции с дальнейшим осаждением сульфатом аммония; из клеточных стенок микроорганизмов — используя лизирующий буфер, с дальнейшим осаждением сульфатом аммония. Методики выделения детально описаны ранее [7–9]. Состав белковых фракций анализировали с использованием SDS-электрофореза [10]; концентрацию белка в пробах определяли по методике [11]. Предварительный отбор антигенов разного происхождения для конструирования скрининговой тест-системы проводили с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) [12]; доза антигенов, используемых для сорбции на планшетах, составляла 0,3 мг/мл. Первый этап отбора заключался в обнаружении в перечисленных выше белковых фракциях антигенов, которые реагируют с сыворотками крови мышей с модельными опухолями (саркома 37, карцинома легкого Льюис). Как оказалось, частота положительных проб ИФА с сыворотками крови мышей против антигенов гомологичных опухолей, белковых компонентов культуральной среды или цитоплазмы *B. megaterium H*, культуральной среды *B. subtilis B-7025*, а также эмбриональных куриных белков (7-суточные эмбрионы) практически не отличалась и не зависела от гистогенеза опухоли (рис. 1). На основании полученных результатов для дальнейшего исследования отобраны белки 7-суточных куриных эмбрионов (молекулярная масса 26 кДа), культуральной среды (64 кДа) и цитоплазмы (70 кДа) *B. megaterium H*, культуральной среды *B. subtilis B-7025* (70 кДа), которые имеют антигены, перекрестно-реагирующие с антителами сывороток крови мышей с опухолями.

Отобранные белки были использованы для создания панели антигенов, которую тестировали в ИФА [12] с сыворотками крови 18 пациенток с верифицированным диагнозом РТМ стадии T2–T3N0–N1M0 (получили лечение и находились под наблюдением в дальнейшем в Национальном институте рака МЗ Украины), 10 больных с фибромиомой матки и 10 доноров. Сыворотки крови больных РТМ исследовали дважды: после установления верифицированного диагноза и через год после проведенного лечения. Возраст включенных в исследование составлял от 37 до 76 лет (среднее значение — $56,3 \pm 8,3$ года). Все женщины дали информированное согласие на использование их сыворотки крови в исследовательских целях.

По стандартной методике проводили внутривенный забор крови в дозе 5 мл; полученные образцы центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 мин. Препараты сохраняли при -20°C .

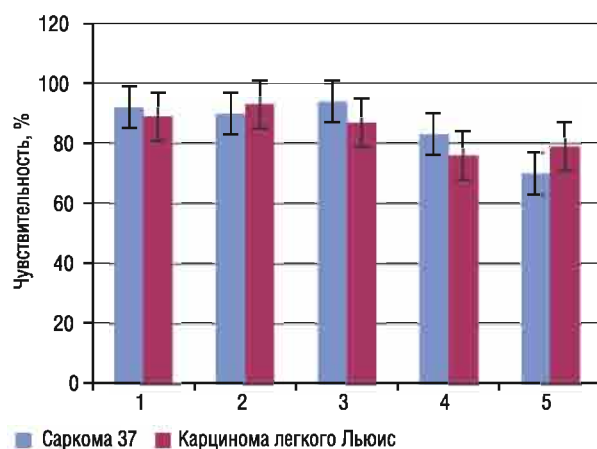


Рис. 1. Частота положительных результатов ИФА сывороток крови мышей с модельными опухолями против гомологичных опухолевых антигенов (1), белкового компонента культуральной среды *B. megaterium H* (2), белкового компонента цитоплазмы *B. megaterium H* (3), белкового компонента культуральной среды *B. subtilis B-7025* (4), эмбриональных пептидов 7-суточного куриного эмбриона (5)

Диагностическую ценность каждого антигена (положительность результатов) определяли по формуле:

$$ДК = (ОПн/ОПд) - 0,3,$$

где ДК — диагностический коэффициент; ОПн — оптическая плотность раствора в лунках с сывороткой крови пациенток с РТМ или фибромиомой матки; ОПд — оптическая плотность раствора в лунках с сывороткой крови практически здоровых доноров.

Результаты ИФА считали положительными (диагностически ценными) при $ДК > 1,2$. При построении графиков уровень реакции сыворотки крови доноров (или интактных животных) принимали за 0.

Чувствительность тест-системы для каждого из исследованных белков определяли по формуле: количество положительных результатов/общее количество проб в каждой группе $\cdot 100\%$.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критериев Фишера — Стьюдента и χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реакция исследуемых образцов сыворотки крови 10 доноров на все используемые тест-антигены была оценена как отрицательная ($ДК < 1,2$). Разница с соответствующими показателями у больных РТМ была статистически значимой ($p < 0,05$) для белков культуральной жидкости или цитоплазмы *B. megaterium H*. Показатели для этих же антигенов, полученные при исследовании сывороток крови пациенток с фибромиомой матки, превышали таковые у доноров на уровне тенденции.

Сравнение чувствительности отдельных антигенов предложенной тест-системы для больных РТМ и фибромиомой матки (рис. 2) показало, что диагностическую чувствительность имеют белки культуральной жидкости *B. megaterium H* и цитоплазмы этого же микроорганизма: частота положительных

показателей, полученных в ИФА с образцами сыворотки крови больных РТМ, была достоверно выше по сравнению с таковой больных фибромиомой матки. Диагностическая чувствительность антигенов культуральной жидкости *B. subtilis B-7025* и 7-суточных куриных эмбрионов достоверно не отличалась у больных РТМ и пациенток с фибромиомой матки ($p > 0,05$ для обоих антигенов).

Диагностическая чувствительность созданной тест-системы для больных РТМ составила: на белковый компонент культуральной жидкости *B. megaterium H* — 80%; на белковый компонент культуральной жидкости *B. subtilis B-7025* — 4%; на белковый компонент цитоплазмы *B. megaterium H* — 80%; на белковый компонент 7-суточных эмбрионов курицы — 9%.

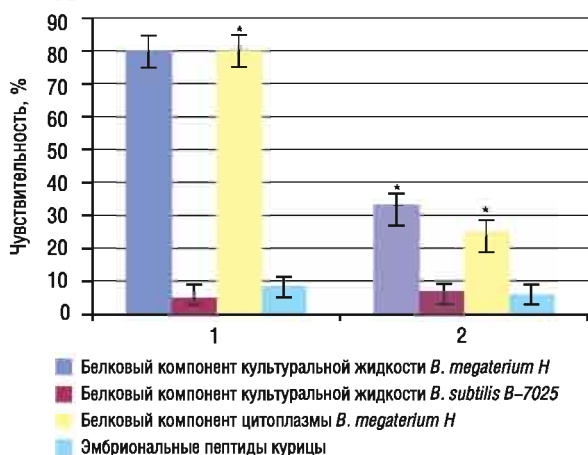


Рис. 2. Чувствительность сконструированной тест-системы у больных РТМ (1) и фибромиомой матки (2). * $p < 0,05$

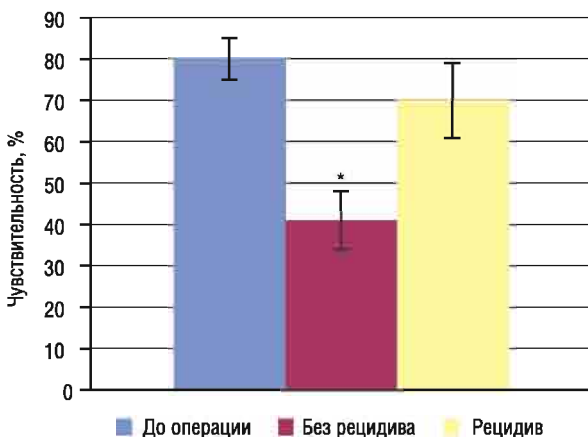


Рис. 3. Чувствительность сконструированной тест-системы при наличии или отсутствии рецидива РТМ. * $p < 0,05$

Поэтому в последующих исследованиях сывороток крови пациенток с РТМ (спустя 1 год после лечения) применяли тест-систему, включающую белковые компоненты только культуральной жидкости и цитоплазмы *B. megaterium H*. Анализ результатов использования такой тест-системы показал, что при возникновении рецидива РТМ исследуемые показатели достоверно возросли ($p < 0,05$) по срав-

нению с показателями пациенток без признаков рецидивирования (рис. 3). В то же время показатели в обеих подгруппах были ниже, чем при первом обследовании пациенток (после установления диагноза). Полученные результаты могут свидетельствовать о возможности мониторинга течения заболевания и использования предложенной тест-системы для раннего выявления рецидива РТМ.

ВЫВОДЫ

1. Охарактеризованы и отобраны в экспериментальных моделях антигены микробного происхождения (из культуральной среды и цитоплазмы *B. megaterium H*), реагирующие с сыворотками крови животных с опухолями разного гистогенеза.

2. Установлено, что реактивность отобранных антигенов в ИФА-тесте с сыворотками крови больных РТМ достоверно превышает таковую в тесте с сыворотками крови пациенток с фибромиомой матки и доноров.

3. Определены уровни чувствительности созданной диагностической тест-системы у больных РТМ после установления диагноза и спустя 1 год после проведения лечения в зависимости от наличия/отсутствия рецидива заболевания.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рак в Україні, 2011–2012. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюл Нац канцер-реєстру України 2013; (14): 8, 50–1.
2. Воробьева ЛИ, Неспрядько СВ, Безносенко МП. Факторы прогноза и особенности рецидивирования начального рака эндометрия. Онкология 2007; 9 (3): 198–200.
3. Мечев ДС, Москалец ОІ, Бондарук ОС та ін. Гормоны та пухлинні маркери: клініко-методичні аспекти: Навч посіб. Київ: ВІЦ Медицина України, 2007. 96 с.
4. Опухолевые маркеры в клинической практике: Пособие для врачей / Под ред: ВФ Сухого. Днепропетровск: АРТ-ПРЕСС, 2003. 44 с.
5. Сергеева НС, Маршуткина НВ. Общие представления о серологических биомаркерах и их месте в онкологии. Практ онкол 2011; 12 (4): 147–54.
6. Затула ДГ, Семерников ВА. Иммунология перекрестно-реагирующих антигенов микроорганизмов и клеток blastom. Киев: Наук думка, 1986. 224 с.
7. Діденко ГВ, Кузьменко ОП, Шпак ЄГ та ін. Оптимізація методів виділення, електрофоретична характеристика та протипухлинна ефективність цитотоксичних метаболітів із фільтрату культуральної рідини *B. subtilis B-7025*. Докл Акад наук України 2012; (7): 185–90.
8. Isaenko EY. Ultrasound use for microbial cells decomposition. Ann Mechnikov Inst 2008; (1): 5–9.
9. Діденко ГВ. Розробка протипухлинних аутовакцин на основі білоквмісних метаболітів *B. subtilis B-7025* та їх вплив на окремі реакції протипухлинного імунітету (експериментальні дослідження). Автореф дис... канд біол наук. Київ: Інститут експерим патології, онкол і радіобіол НАН України, 2008. 19 с.
10. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680–5.
11. Greenberg CS, Craddock PR. Rapid single-step membrane protein assay. Clin Chem 1982; 28 (7): 1725–6.
12. Кэрти Д. Антитела. Методы. М.: Мир, 1991. 230–6.

CROSS REACTIVITY OF SERUM OF PATIENTS WITH PRIMARY CORPUS UTERI CANCER AND ITS RELAPSES WITH *B. megaterium* H PROTEINS

A.P. Kuzmenko, G.V. Didenko, E.G. Shpak,
A.N. Turchak, L.I. Vorobyova, G.P. Potebnya

Summary. Objective: study of possibility to use of proteins from xenogenic embryonal tissues and from the microorganisms of *B. megaterium* H and *B. subtilis* B-7025 for diagnostics and monitoring of corpus uteri cancer (CUC). **Subject and methods:** the investigations of proteins of chicken embryos (26 kDa), the *B. megaterium* H culture fluid (64 kDa) and cytoplasm (70 kDa); *B. subtilis* B-7025 culture fluid (70 kDa) were carried out using ELISA analysis using blood serum of animals with model tumors of different histogenesis, blood serum of patients with CUC, uteri fibromyoma and donors. **Results:** it is set that all investigated proteins cross reacts in an ELISA-test with the serum of tumors-bearing mice. Reactivity of the serum of patients with CUC and patients with a uterus fibromyoma (but not

donors) was detected only for the fluid culture proteins and cytoplasm of *B. megaterium* H. The activity of latter in a test with the blood serum of patients with CUC (both after the beginning of treatment and after 1 year of relapse) for certain exceeds such in a test with the serum of patients with a uterus fibromyoma. **Conclusion:** the obtained results substantiate the possible prospects of using the generated test systems for diagnosis of CUC and monitoring after treatment.

Key Words: corpus uteri cancer, xenogenic embryonal antigens, antigens of microorganisms, ELISA assay, diagnosis, monitoring of disease.

Адрес для переписки:

Потебня Г.П.
03022, Киев, ул. Васильковская, 45
Институт экспериментальной
патологии, онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины
E-mail: iris@onconet.kiev.ua

Получено: 09.04.2014