

УДК 618.19-006.6:616-097.3

## АНТИТЕЛА К КСЕНО- И ЭНДОБИОТИКАМ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2012 Т.П. Аносова<sup>1</sup>, Е.Г. Поленок<sup>1</sup>, М.П. Аносов<sup>1</sup>, К.С. Красильникова<sup>1</sup>,  
М.В. Костянко<sup>1</sup>, Н.Е. Вержбицкая<sup>3</sup>, Е.А. Гуров<sup>1</sup>, И.А. Вафин<sup>4</sup>, С.Е. Рагожина<sup>4</sup>,  
А.В. Антонов<sup>2</sup>, А.Н.Глушков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт экологии человека СО РАН, Кемерово

<sup>2</sup> Кемеровский областной онкологический диспансер

<sup>3</sup> Кемеровское патологоанатомическое бюро

<sup>4</sup> Кемеровский областной центр крови

Поступила в редакцию 02.10.2012

Исследовали антитела (АТ) к ксено- и эндобиотикам – бензо(а)пирену (БП), эстрадиолу (ЭС) и прогестерону (ПГ) у больных раком молочной железы (РМЖ) и здоровых женщин. У больных РМЖ чаще, чем у здоровых, встречались уровни АТ выше пороговых значений: для IgG АТ-БП>3, АТ-ЭС>3, АТ-ПГ >2; для IgM АТ-БП>3, АТ-ЭС>2, АТ-ПГ >2. Шансы возникновения РМЖ возрастают в 2-3 раза при наличии повышенных уровней АТ к трем гаптенам. Показатели уровней IgG АТ-ПГ и IgM АТ-ЭС имеют высокую прогностическую значимость в оценке шансов возникновения РМЖ и могут использоваться в качестве биомаркеров данного вида онкопатологии. Ключевые слова: *рак молочной железы, антитела, бензо[а]пирен, эстрадиол, прогестерон*

Заболееваемость раком молочной железы (РМЖ) в России на протяжении многих лет находится на первом месте и составляет 19,8% от общего числа онкопатологии у женщин [1]. В связи с этим исследования роли экзогенных и эндогенных факторов, влияющих на возникновение, развитие и прогноз течения болезни по-прежнему являются актуальными. Известно, что важную роль в процессе пролиферации и мета-

стазирования РМЖ имеют стероидные гормоны [2, 3]. Предполагается, что химические канцерогены группы полициклических ароматических углеводородов, в частности, бензо[а]пирен (БП), принимают участие в возникновении РМЖ [4]. Особый интерес вызывают исследования антител (АТ) к низкомолекулярным ксено- и эндобиотикам при бластомогенезе, коль скоро такие АТ могут существенно влиять на проявление биологических свойств и стероидных гормонов, и химических канцерогенов [5, 6]. Изучением антител (АТ) к БП и его аддуктам с ДНК занимались лишь несколько групп авторов. Petruzzelli S. et al. [7] выявили АТ к аддуктам БП с ДНК у индивидуумов, проживающих в крупном индустриальном центре, особенно у курящих при наличии рака легкого в анамнезе. Chagnaud J.L. et al. [8] впервые обнаружили повышенные уровни АТ к БП класса А (IgA АТ-БП) у больных раком и предраком молочной железы. Взаимосвязей между гистологической формой рака, размером опухоли, наличием или отсутствием метастазов и уровнями АТ к БП выявлено не было. Ранее нами были выявлены IgA АТ-БП у больных РМЖ [9]. Исследования АТ к эндобиотикам (стероидным гормонам) у больных РМЖ не проводились.

**Цель работы:** изучить особенности образования IgG и IgM АТ к БП, прогестерону (ПГ) и эстрадиолу (ЭС) у больных раком молочной железы, определить их прогностическое значение.

*Аносова Татьяна Петровна, научный сотрудник лаборатории иммунохимии. E-mail: tm-retrovichi@mail.ru*

*Поленок Елена Геннадьевна, кандидат фармацевтических наук, заведующая лабораторией иммунохимии*

*Аносов Михаил Петрович, научный сотрудник лаборатории иммунохимии*

*Красильникова Ксения Сергеевна, научный сотрудник лаборатории иммунохимии*

*Костянко Михаил Владимирович, ведущий инженер-технолог лаборатории иммунохимии*

*Вержбицкая Наталья Евгеньевна, кандидат медицинских наук, заведующая патолого-морфологическим отделом*

*Гуров Евгений Александрович, ведущий инженер-технолог лаборатории иммунохимии*

*Вафин Илгиз Ахметович, главный врач*

*Рагожина Светлана Егоровна, заместитель главного врача по медицинской части*

*Антонов Александр Витальевич, заведующий маммологическим отделением*

*Глушков Андрей Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, директор*

**Материалы и методы.** В обследовании приняли участие женщины в постменопаузе, больные РМЖ (n=123), с гистологическим диагнозом инфильтрующая карцинома, которые поступали в Областной клинический онкологический диспансер г. Кемерово. У большинства женщин была выявлена II стадия заболевания (71,5%), I и III стадии составили 2,5% и 26% соответственно. Средний возраст женщин – 61,6±9,5 лет. В группу сравнения вошли условно здоровые женщины (n=50), у которых в анамнезе не было заболеваний молочной железы. Средний возраст женщин группы сравнения – 53,8±6,8 лет. Материалом для анализа послужила сыворотка крови, которая забиралась в аликвоты и хранилась при –20°C в течение недели. Забор материала осуществлялся согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинкской декларацией 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. Все лица, участвовавшие в исследовании, дали информированное письменное согласие на участие в нем. Определение АТ к БП, ЭС и ПГ проводили с помощью модифицированного нами неконкурентного иммуноферментного анализа [10]. Конъюгаты БП-бычий сывороточный альбумин (БП-БСА) были синтезированы по оригинальной методике [11]. Конъюгат ЭС-БСА был синтезирован присоединением БСА к эстрадиолхинонам, полученным окислением ЭС солью Фреми. Конъюгат ПГ-БСА был получен путем конъюгации гемиглутарата 21-гидроксипрогестерона и БСА карбодиимидным способом. Уровни АТ к гаптенам выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

$$AT-X=(OD_{X-БСА}-OD_{БСА})/OD_{БСА}$$

где X= БП или ЭС или ПГ;  $OD_{X-БСА}$  – связывание АТ с конъюгатом гаптен-БСА,  $OD_{БСА}$  – связывание с БСА. Уровень АТ-X показывает, во сколько раз связывание с гаптеном превышает связывание с белком-носителем.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием ППП STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., USA). Ненормальный характер распределения показателей определили с помощью критерия Шапиро-Уилка и в дальнейшем статистически значимые различия между группами выявляли с помощью непараметрического критерия  $\chi^2$  с поправкой Йейтса 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. Для оценки пороговых значений уровней АТ был проведен ROC-анализ [12] и рассчитаны величины AUC, характеризующие прогностическую значимость показателей. В качестве отличных классификаторов, имеющих высокую прогностическую значимость, учитывали показатели уровней АТ к гаптенам с  $AUC>0,8$ .

**Результаты и обсуждение.** В результате проведенных исследований выявлено наличие IgG и IgM АТ к БП, ЭС и ПГ у больных РМЖ и у здоровых женщин. У женщин с РМЖ уровни IgG АТ к БП, ЭС и ПГ были в 1,7-1,9 раз выше по сравнению со здоровыми (медианы: АТ-БП 3,6 против 1,9,  $p=0,002$ ; АТ-ЭС 4,6 против 2,7,  $p=0,002$ ; АТ-ПГ 3,2 против 1,7,  $p=0,0006$  соответственно). Та же закономерность прослеживается и для АТ класса М: у женщин с РМЖ уровни АТ к трем гаптенам превышали таковые у здоровых женщин в 1,6-1,8 раз (медианы: АТ-БП 3,6 против 2,3,  $p=0,00005$ ; АТ-ЭС 2,6 против 1,4,  $p=0,00005$ ; АТ-ПГ 4,2 против 2,7,  $p=0,002$  соответственно).

Рассчитанные с помощью ROC-анализа пороговые значения АТ оказались следующими: для IgG АТ-БП>3, АТ-ЭС>3, АТ-ПГ >2; для IgM АТ-БП>3, АТ-ЭС>2, АТ-ПГ >2. Выяснилось, что у женщин с РМЖ чаще встречаются повышенные уровни IgG АТ к БП и к стероидным гормонам, чем у здоровых женщин. При этом шансы возникновения РМЖ увеличиваются в 2,4-2,7 раз (табл. 1). При анализе АТ класса М к трем гаптенам была обнаружена такая же закономерность. У женщин больных РМЖ чаще встречались АТ к БП, ЭС и ПГ выше пороговых значений, чем у женщин в группе сравнения. Но при этом шансы развития РМЖ были несколько выше (в 2,6-3,2 раза).

Далее мы исследовали зависимость уровней АТ к БП, ЭС и ПГ от стадии заболевания РМЖ. Выяснилось, что у больных РМЖ II стадии уровень IgG АТ в 1,7-2,0 раза выше, чем у здоровых женщин (медианы: АТ-БП 3,7 против 1,9,  $p=0,0008$ ; АТ-ЭС 4,6 против 2,7,  $p=0,002$ ; АТ-ПГ 3,4 против 1,7,  $p=0,0009$  соответственно). Для АТ класса М наблюдалась та же закономерность: уровень АТ к БП, ЭС, ПГ был в 1,6-1,9 раз выше, чем у здоровых женщин (медианы: АТ-БП 3,9 против 2,3,  $p=0,0001$ ; АТ-ЭС 2,7 против 1,4,  $p=0,0002$ ; АТ-ПГ 4,2 против 2,7,  $p=0,004$  соответственно). У больных РМЖ III стадии уровень IgG АТ-ПГ был в 1,9 раз выше, чем в группе сравнения (медиана 3,2 против 1,7,  $p=0,009$ ) и уровни IgM АТ ко всем

трем гаптенам были в 1,5-1,8 раз выше по сравнению со здоровыми женщинами (медианы: АТ-БП 3,5 против 2,3,  $p=0,008$ ; АТ-ЭС 2,5 против 1,4,  $p=0,0004$ ; АТ-ПГ 4,6 против 2,7,

$p=0,01$  соответственно). Статистически значимой разницы по уровням АТ ко всем трем гаптенам между больными РМЖ II и III стадии не было выявлено.

**Таблица 1.** Частота встречаемости повышенных уровней антител к бензо[а]пирену (АТ-БП), эстрадиолу (АТ-ЭС) и прогестерону (АТ-ПГ) у больных РМЖ и у здоровых женщин

Показатели	Группа сравнения (n=50) n / %	Больные РМЖ (n=123) n / %	$X^2, p$	OR (95% CI)	AUC
IgG					
АТ-БП > 3	17/34	72/59	7,6; 0,007	2,7; (1,3-5,7)	0,87
АТ-ЭС > 3	23/46	83/67	6,0; 0,01	2,4; (1,2-5,0)	0,80
АТ-ПГ > 2	22/44	84/68	7,8; 0,006	2,7; (1,3-5,7)	0,99
IgM					
АТ-БП > 3	18/36	73/59	6,9; 0,009	2,6; (1,2-5,4)	0,84
АТ-ЭС > 2	17/34	75/61	9,3; 0,003	3,0; (1,4-6,4)	0,99
АТ-ПГ > 2	31/62	103/84	8,4; 0,005	3,2; (1,4-7,1)	0,79

**Таблица 2.** Частота встречаемости повышенных уровней антител к бензо[а]пирену (АТ-БП), эстрадиолу (АТ-ЭС) и прогестерону (АТ-ПГ) у больных РМЖ в зависимости от стадии заболевания

Показатели	Группа сравнения (n=50) n / %	Больные РМЖ II стадии (n=88)			Больные РМЖ III стадии (n=32)		
		n / %	$X^2, p$	OR (95% CI)	n / %	$X^2, p$	OR (95%; CI)
IgG							
АТ-БП > 3	17/34	53/59	7,8; 0,006	2,9; (1,3-6,5)	18/56	3,1; 0,08	---
АТ-ЭС > 3	23/46	60/68	5,6; 0,02	2,5; (1,2-5,5)	19/59	3,4; 0,06	---
АТ-ПГ > 2	22/44	61/69	7,5; 0,007	2,9; (1,3-6,3)	21/66	2,8; 0,09	---
IgM							
АТ-БП > 3	18/36	53/59	6,6; 0,01	2,7; (1,2-5,9)	18/56	2,5; 0,11	---
АТ-ЭС > 2	17/34	52/59	7,1; 0,009	2,8; (1,3-6,2)	21/66	6,6; 0,01	3,7; (1,3-10,6)
АТ-ПГ > 2	31/62	73/83	6,5; 0,01	2,9; (1,3-7,2)	28/88	5,1; 0,02	4,3; (1,2-17,1)

По частоте встречаемости повышенных уровней АТ к БП, ЭС и ПГ статистически значимые различия со здоровыми женщинами были получены только у больных РМЖ II и III стадий. При РМЖ II стадии чаще встречались IgG и IgM АТ к БП, ЭС и ПГ выше пороговых значений по сравнению со здоровыми женщинами (табл. 2). При этом шанс возникновения РМЖ возрастает в 2,5-2,9 раз. У больных РМЖ III стадии чаще встречались повышенные уровни только IgM АТ к ЭС и ПГ по сравнению со здоровыми женщинами. При этом шансы возникновения РМЖ были несколько выше (в 3,7-4,3 раза). Статистически значимой разницы по уровню АТ к гаптенам между больными РМЖ I стадии и здоровыми женщинами не было выявлено ввиду, возможно, малого количества наблюдений.

**Выводы:** в результате исследования обнаружены антитела классов G и M к ксенобиотику БП и эндобиотикам ЭС и ПГ у больных РМЖ и у здоровых женщин. Уровни АТ к БП, ЭС и ПГ были выше у больных РМЖ, чем у здоровых женщин ( $p<0,05$ ). При этом у больных РМЖ чаще встречались уровни АТ выше пороговых значений: для IgG АТ-БП>3, АТ-ЭС>3, АТ-ПГ >2; для IgM АТ-БП>3, АТ-ЭС>2, АТ-ПГ>2. Шансы возникновения РМЖ возрастают в 2-4 раза при повышенных уровнях АТ к трем гаптенам.

Рассчитанные показатели AUC показывают, что выбранные нами маркеры (АТ к химическому канцерогену и стероидным гормонам) являются отличными классификаторами. Особо следует выделить IgG АТ-ПГ и IgM АТ-ЭС, которые демонстрируют самую высокую

прогностическую значимость в оценке шансов возникновения РМЖ из всех исследованных показателей, характеризуются самым высоким значением AUC (0,99) и могут использоваться в качестве маркеров РМЖ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Сидоренко, Ю.С. Проблемы первично-множественных процессов у больных раком молочной железы / Ю.С. Сидоренко, Т.В. Шелякина, Е.В. Тимова и др. // Сибирский онкологический журнал. 2010. №1 (37). С.18-22.
2. Russo, J. Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells / J. Russo, M. Hasan Lareef, G. Balogh et al. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2003. Vol. 87, № 1. P. 1-25.
3. Ориновский, М.Б. Экспрессия молекулярно-генетических маркеров в опухолях молочной железы / М.Б. Ориновский, Л.Е. Гуревич, Г.Н. Швецова и др. // Сибирский онкологический журнал. 2006. № 1(17). С. 18-23.
4. Russo, J. Neoplastic transformation of human breast epithelial cells by estrogens and chemical carcinogens / J. Russo, Q. Tahin, M. Hasan Lareef et al. // Environmental and Molecular Mutagenesis. 2002. Vol. 39. P. 254-263.
5. Glushkov, A.N. Induction of immunological tolerance to the chemical carcinogens in the early ontogenesis // Medical Hypotheses. 2001. № 1. P. 123-124.
6. Glushkov, A.N. Immunostimulation of the chemical-induced carcinogenesis in the phase of initiation // Medical Hypotheses. 2002. № 5. P. 501-503.
7. Petruzzelli, S. Serum antibodies to benzo(a) pyrene diol epoxide DNA adducts in the general population: effects of air pollution, tobacco smoking and family history of lung diseases / S. Petruzzelli, A. Seli, N. Pulera et al. // Cancer Res. 1998. Vol. 58, № 18. P. 4122-4126.
8. Chagnaud, J.L. Identification and immunochemical characterization of IgA in sera of patients with mammary tumors / J.L. Chagnaud, S. Faiderbe, M. Geffard // Int. J. Cancer. 1992. V. 50. P. 395-401.
9. Глушков, А.Н. Изотипические особенности антител к полициклическим ароматическим углеводородам у больных раком молочной железы, желудка, толстой и прямой кишки / А.Н. Глушков, Т.П. Аносова, Н.Г. Небесная и др. // Экспериментальная онкология. 1996. № 18. С. 426-428.
10. Глушков, А.Н. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные аберрации в лимфоцитах периферической крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия / А.Н. Глушков, Е.Г. Поленок, Т.П. Аносова Т.П. и др. // Российский иммунологический журнал. 2011. Т. 5(14), № 1. С. 39-44.
11. Glushkov, A.N. Synthesis of polycyclic aromatic hydrocarbon-protein conjugates for preparation and immunoassay of antibodies / A.N. Glushkov, M.V. Kostjanko, S.V. Chernov et al. // Rus. J. Immunol. 2002. V. 7 (1). P. 42-46.
12. Zweig, M.H. ROC plots: a fundamental evaluation in clinical medicine / M.H. Zweig, G. Campbell // Clinical Chemistry. 1993. V.39, № 4. P. 561-577.

## ESTIMATION OF ANTIBODIES LEVELS TO XENO- AND ENDOBIOTICS AT THE PATIENTS WITH BREAST CANCER

© 2012 Т.П. Аносова<sup>1</sup>, Е.Г. Поленок<sup>1</sup>, М.П. Аносов<sup>1</sup>, К.С. Красилникова<sup>1</sup>, М.В. Костянко<sup>1</sup>, Н.Е. Верзбитская<sup>3</sup>, Е.А. Гуров<sup>1</sup>, И.А. Вафин<sup>4</sup>, С.Е. Рогожина<sup>4</sup>, А.В. Антонов<sup>2</sup>, А.Н. Глушков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Human Ecology SB RAS, Kemerovo

<sup>2</sup>Regional Clinical Oncology Hospital, Kemerovo

<sup>3</sup>Pathoanatomic Bureaus, Kemerovo

<sup>4</sup>Regional Blood Centre, Kemerovo

The antibodies (Abs) to xeno- and endobiotics benzo[a]pyrene (Bp), estradiol (Es) and progesterone (Pg) at the patients with breast cancer and healthy women are investigated. Ab levels above the threshold values are more frequently at the patients with breast cancer (for IgG Ab-Bp > 3, Ab-Es > 3, Ab-Pg > 2; for IgM Ab-Bp > 3, Ab-Es > 2, Ab-Pg > 2). The chances of breast cancer increase by 2-3 times at the presence of elevated levels of Abs to the three haptens. The levels of IgG Ab-Pg and of IgM Ab-Es have a high predictive value in assessing the chances of breast cancer and can be used as biomarkers of this type of cancer pathology.

Key words: breast cancer, antibodies, benzo[a]pyrene, estradiol, progesterone

Tatiana Anosova, Research Fellow of the Immunochemistry Laboratory. E-mail: tm-petrovichi@mail.ru; Elena Polenok, Candidate of Pharmacy, Chief of the Immunochemistry Laboratory; Mikhail Anosov, Research Fellow of the Immunochemistry Laboratory; Kseniya Krasilnikova, Research Fellow of the Immunochemistry Laboratory; Mikhail Kostyanko, Leading Engineer-Expert of the Immunochemistry Laboratory; Natalia Verzhbitskaya, Candidate of Medicine, Chief of the Pathoanatomic Department; Evgeniy Gurov, Leading Engineer-Technologist of the Immunochemistry Laboratory; Ilgiz Vafin, Main Physician; Svetlana Ragozhina, Deputy Main Physician on Medical Work; Alexander Antonov, Chief of the Mammology Department; Andrey Glushkov, Doctor of Medicine, Professor, Director