

УДК 616.24-006.6:616-097.3

## ВЛИЯНИЕ КУРЕНИЯ НА ОБРАЗОВАНИЕ АНТИТЕЛ К ХИМИЧЕСКИМ КАНЦЕРОГЕНАМ И СТЕРОИДНЫМ ГОРМОНАМ У ЗДОРОВЫХ МУЖЧИН И БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

© 2013 А.Н. Глушков<sup>1</sup>, Е.Г. Поленок<sup>1</sup>, В.А. Титов<sup>2</sup>, Н.Е. Вержбицкая<sup>3</sup>, И.А. Вафин<sup>4</sup>,  
С.Е. Рагожина<sup>4</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 22.09.2013

Исследовали антитела к химическому канцерогену бензо(а)пирену и стероидным гормонам, эстрадиолу и прогестерону у здоровых мужчин и больных раком легкого. У курящих больных раком легкого чаще встречались высокие значения соотношений уровней IgA-БП/ПГ > 1,5, IgG-БП/ПГ > 2 и IgG-ЭС/ПГ > 1,5, чем у курящих здоровых мужчин. При этом риски возникновения рака легкого возрастают в 6,1-11,5 раз.

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

Общеизвестна роль курения в возникновении злокачественных опухолей у человека. Ранее предположили, что при канцерогенезе имеют место нарушения иммунохимического гомеостаза [1], проявляющиеся, в частности, в дисбалансе образования: антител (АТ) разных классов к химическим канцерогенам окружающей среды; АТ к низкомолекулярным ксено- и эндобиотикам (стероидным гормонам). У больных раком, в том числе раком легкого (РЛ), были выявлены АТ к химическим канцерогенам [2-4]. Однако до сих пор не исследованы особенности образования АТ к стероидным гормонам при онкологических заболеваниях. Между тем, в легочной ткани и в клетках РЛ обнаружены рецепторы эстрогенов, прогестерона, андрогенов [5, 6]. Предполагается, что эстрогены стимулируют, а прогестерон ингибирует пролиферацию клеток РЛ [7, 8]. В таком случае, АТ к стероидным гормонам способны модулировать их функцию и влиять на процессы канцерогенеза наряду с АТ к химическим канцерогенам.

**Цель работы:** выявить особенности образования АТ к бензо[а]пирену (БП), эстрадиолу (ЭС) и прогестерону (ПГ) у курящих мужчин больных РЛ.

**Материалы и методы.** В обследовании приняли участие 286 мужчин, из них 115 курящих мужчин с диагнозом немелкоклеточный РЛ,

которые поступили на лечение в Областной клинический онкологический диспансер г. Кемерово. Диагноз РЛ в каждом случае был подтвержден морфологически, рентгенологически и эндоскопически. У основной части больных (74%) был диагностирован плоскоклеточный рак, 13% и 10% составили аденокарцинома и крупноклеточный рак и 3% – другие формы РЛ. В группу сравнения вошли условно здоровые мужчины (171 человек) с Кемеровского центра крови, не болеющие РЛ и другими заболеваниями дыхательных путей. Среди них было 76 (44%) курящих и 95 (56%) некурящих. Все обследуемые мужчины были старше 40 лет.

Забор периферической крови осуществлялся согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинской декларацией 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Мин-здрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. Все лица, участвовавшие в исследовании, дали информированное письменное согласие на участие в нем. Исследование АТ к БП, ЭС и ПГ проводили с помощью модифицированного нами неконкурентного иммуноферментного анализа [3]. Конъюгаты БП-бычий сывороточный альбумин (БП-БСА) были синтезированы по оригинальной методике [9]. Конъюгат ЭС-БСА был синтезирован присоединением БСА к эстрадиол-хинонам, полученным окислением ЭС солью Фреми. Конъюгат ПГ-БСА был получен путем конъюгации гемиглутарата 21-гидро-киспрогестерона 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, ЭС, ПГ;  $OD_{X-БСА}$  – связывание АТ с конъюгатом гаптен-БСА,  $OD_{БСА}$  – связывание с БСА.

Глушков Андрей Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, директор. E-mail: ihe@list.ru

Поленок Елена Геннадьевна, кандидат фармацевтических наук, заведующая лабораторией иммунохимии

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

Титов Виктор Александрович, заведующий торакальным отделением

Вафин Илгиз Ахметович, главный врач

Рагожина Светлана Егоровна, заместитель главного врача по медицинской части

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 Йетса на непрерывность вариации и U-критерия Манна-Уитни при уровне значимости  $p < 0,05$ . Риск возникновения РЛ оценивали с помощью величины OR с доверительным интервалом (CI) при 95% уровне значимости. Для оценки пороговых значений уровней АТ был проведен ROC-анализ [10] и рассчитаны величины AUC, характеризующие прогностическую значимость показателей.

**Результаты и обсуждение.** В табл. 1 представлены значения уровней АТ к исследованным

соединениям у здоровых мужчин (некурящих и курящих) и у курящих больных РЛ. Выяснилось, что у здоровых курящих мужчин по сравнению с некурящими уровни всех исследуемых АТ, за исключением IgA-БП, не имеют статистически значимых отличий. Уровни IgA-БП значимо выше у курящих. Статистически значимые различия обнаружены между курящими здоровыми и больными РЛ. У последних уровни IgA-БП, IgA-ЭС, IgG-БП выше, а уровни IgG-ПГ ниже в 1,3-1,5 раза. Полученный результат свидетельствует о том, что образование АТ к низкомолекулярным ксено- и эндобиотикам зависит не столько от канцерогенной нагрузки (небольшие отличия между здоровыми курящими и некурящими), сколько от внутренних инди-видуальных факторов организма (значительные различия между курящими больными и здоровыми).

**Таблица 1.** Уровни антител классов А и G (IgA, IgG) к бензо[а]пирену (БП), эстрадиолу (ЭС) и прогестерону (ПГ) в сравниваемых группах

	Группа сравнения		Больные РЛ курящие (N=115) Me±m	P <sub>M-W</sub>	
	некурящие (N=95) Me±m	курящие (N=76) Me±m		1-2	2-3
	IgA-БП	1,8±0,2	2,5±0,3	3,7±0,6	<b>0,024</b>
IgA-ЭС	1,7±0,2	2,0±0,3	2,8±0,4	0,173	<b>0,002</b>
IgA-ПГ	1,9±0,3	1,9±0,5	2,2±0,3	0,172	0,952
IgG-БП	3,3±0,6	4,5±0,9	6,0±0,9	0,170	<b>0,015</b>
IgG-ЭС	4,7±0,4	4,8±0,6	6,1±0,7	0,277	0,136
IgG-ПГ	3,7±0,5	4,4±0,8	3,0±0,6	0,104	<b>0,007</b>

Внутренними факторами, по мнению многих исследователей, являются особенности метаболизма химических канцерогенов и стероидных гормонов, а именно активность ферментов биотрансформации, которая зависит от полиморфизма кодирующих их генов и определяет количество аддуктов низкомолекулярных метаболитов с макромолекулами [11-13]. Далее с помощью регрессионного анализа мы исследовали взаимосвязи уровней АТ разных классов (IgA, IgG) к БП, ЭС и ПГ, а также АТ одного класса (IgA или IgG) к БП и ЭС, к БП и ПГ, ЭС к ПГ. Результаты регрессионного анализа возможных взаимосвязей приведены в табл. 2. В уравнении линейной регрессии общего вида  $y = a \cdot x + b$  коэффициент корреляции «а» показывает, во сколько раз изменяется уровень IgA-БП (у) при изменении уровня IgG-БП (x) на одну единицу. Видно, что у больных РЛ взаимосвязи между уровнями IgG- и IgA-БП, ЭС, ПГ более выражены (коэффициенты «а» превышают соответствующие значения в обеих подгруппах сравнения). У больных РЛ коэффициент «а» в 2,2-4,8 раз выше, чем у здоровых некурящих и курящих мужчин соответственно. Это означает, что при одинаковых уровнях IgG-БП, ЭС и ПГ уровни соответствующих IgA-АТ у курящих больных РЛ выше, чем у здоровых мужчин, некурящих и курящих.

При анализе взаимосвязей АТ одного класса, но к разным соединениям, выяснилось следующее.

Искомые взаимосвязи обнаруживаются во всех исследуемых группах. Во всех случаях они прямые, линейные, средней силы ( $r = 0,66-0,74$ ) или сильные ( $r = 0,8-0,92$ ). Для больных РЛ характерно увеличение уровней IgA и IgG-ЭС при одних и тех же уровнях IgA и IgG-БП по сравнению со здоровыми, курящими и некурящими. И наоборот, при одних и тех же уровнях IgA и IgG-БП, у больных РЛ уровни IgA и IgG-ПГ ниже, чем у здоровых. Еще более выражены различия между сравниваемыми группами по характеру взаимосвязей АТ к ЭС и ПГ. При одних и тех же уровнях IgA и IgG-ПГ у больных РЛ уровни IgA и IgG-ЭС значительно выше, чем у здоровых.

Обнаружение описанных выше взаимосвязей послужило основанием для расчета соотношений уровней АТ разных классов к одному гаптену, а также соотношений уровней АТ одного класса к разным гаптенам. После этого с помощью ROC-анализа мы определили критические точки – границы между курящими здоровыми мужчинами и больными РЛ и по частоте встречаемости высоких (>) и низких (≤) значений этих соотношений рассчитали риски (OR) возникновения РЛ у курящих мужчин. В табл. 3 приведены полученные результаты. Величина AUC демонстрирует прогностическую значимость анализа (совокупная оценка чувствительности и специфичности метода) при рассчитанных границах указанных соотношений. Выяснилось, что наибольшие различия между

куращими мужчинами, здоровыми и больными РЛ, имеют место при высоких значениях соотношений IgA-БП/ПГ (>1,5) и IgG-БП/ПГ (>2). Величины AUC при этих значениях составляют 0,88 и 0,95, а риск РЛ (OR) возрастает до 6,1 и 11,4. При низких

значениях указанных соотношений ( $\leq 1,5$  и  $\leq 2$ ) OR снижается до 0,2-0,1. Достаточно информативен показатель IgG-ЭС/ПГ >1,5 (OR=11,5 при AUC=0,85).

**Таблица 2.** Особенности взаимосвязей между антителами классов А и G (IgA, IgG) к бензо[а]пирену (БП), эстрадиолу (ЭС) и прогестерону (ПГ) у здоровых мужчин и больных раком легкого (РЛ)

у	х	Группа сравнения				Больные РЛ	
		некурящие (N=95)		курящие (N=76)		курящие (N=115)	
		$r_s$ (p)	$y=a*x+b$	$r_s$ (p)	$y=a*x+b$	$r_s$ (p)	$y=a*x+b$
IgA-БП	IgG-БП	0,32 (0,0002)	$y=0,11x+1,7$	0,18 (0,11)	$y=0,05x+2,3$	0,61 (0,00001)	$y=0,24x+2,9$
IgA-ЭС	IgG-ЭС	0,36 (0,0004)	$y=0,13x+1,4$	0,32 (0,004)	$y=0,08x+1,8$	0,55 (0,00001)	$y=0,21x+1,9$
IgA-ПГ	IgG-ПГ	0,22 (0,03)	$y=0,06x+1,2$	0,16 (0,17)	$y=0,05x+2,4$	0,51 (0,00001)	$y=0,14x+2,1$
IgA-ЭС	IgA-БП	0,67 (0,00001)	$y=0,4x+1,1$	0,66 (0,00001)	$y=0,55x+0,8$	0,7 (0,00001)	$y=0,67x+0,2$
IgA-ПГ	IgA-БП	0,65 (0,00001)	$y=0,45x+1,5$	0,58 (0,00001)	$y=0,66x+0,9$	0,58 (0,00001)	$y=0,31x+1,1$
IgA-ЭС	IgA-ПГ	0,79 (0,00001)	$y=0,39x+1,1$	0,68 (0,00001)	$y=0,43x+1,1$	0,81 (0,00001)	$y=1,33x-0,1$
IgG-ЭС	IgG-БП	0,74 (0,00001)	$y=0,47x+2,8$	0,67 (0,00001)	$y=0,43x+3,3$	0,66 (0,00001)	$y=0,54x+2,9$
IgG-ПГ	IgG-БП	0,80 (0,00001)	$y=0,63x+1,5$	0,66 (0,00001)	$y=0,64x+2,0$	0,66 (0,00001)	$y=0,47x+0,7$
IgG-ЭС	IgG-ПГ	0,86 (0,00001)	$y=0,66x+2,1$	0,81 (0,00001)	$y=0,61x+2,3$	0,92 (0,00001)	$y=1,08x+2,5$

Примечание:  $r_s$  – коэффициент корреляции по Спирмену

**Таблица 3.** Частота встречаемости высоких (>) и низких ( $\leq$ ) величин соотношений исследуемых АТ у курящих мужчин, здоровых и больных раком легкого (РЛ)

Соотношения АТ	Группа сравнения (N=76) n / %	Больные РЛ (N=115) n / %	$\chi^2, p$	OR (95% CI)	AUC
1. IgA-БП/ЭС >1,5 $\leq 1,5$	21/28 55/72	63/55 52/45	12,6 0,001	3,2 (1,6-6,2) 0,3 (0,2-0,6)	0,70
2. IgA-БП/ПГ >1,5 $\leq 1,5$	19/25 57/75	77/67 38/33	30,6 0,0005	6,1 (3,0-12,3) 0,2 (0,1-0,3)	0,88
3. IgA ЭС/ПГ >1,1 $\leq 1,1$	25/33 51/67	75/65 40/35	17,9 0,0005	3,8 (1,9-7,4) 0,3 (0,1-0,5)	0,72
4. IgG-БП/ЭС >1,5 $\leq 1,5$	16/21 60/79	41/36 74/64	3,9 0,045	2,1 (1,01-4,3) 0,5 (0,2-0,9)	0,73
5. IgG-БП/ПГ >2 $\leq 2$	8/11 68/89	66/57 49/43	40,4 0,0005	11,4 (4,8-28,5) 0,1 (0,04-0,2)	0,95
6. IgG ЭС/ПГ >1,5 $\leq 1,5$	14/18 62/82	83/72 32/28	50,8 0,0005	11,5 (5,4-24,9) 0,1 (0,04-0,2)	0,85

**Выводы:** полученные результаты свидетельствуют о том, что особенности образования АТ к химическим канцерогенам и к стероидным гормонам обусловлены не только внешним воздействием (в данном случае курение), но и эндогенными факторами организма. К последним можно отнести:

- количество аддуктов указанных низкомолекулярных соединений с макромолекулами организма, т.к. именно они являются индукторами гаптен-специфической иммунной реакции;

- HLA-гаплотип, т.к. именно система HLA играет ключевую роль в иммунном распознавании

чужеродных агентов (в данном случае гаптен);

- IL-статус, т.к. именно он определяет взаимодействие клеток в иммунном ответе и в конечном итоге уровень АТ той или иной специфичности, того или иного класса.

Разработанная нами методология исследования АТ может представляться перспективной для изучения иммунохимических механизмов адаптации человека к низкомолекулярным ксено- и эндобиотикам в комплексе с анализом ферментов их биотрансформации, ферментов репарации ДНК, HLA- и IL-статусов организма. С практической точки зрения наиболее информативными в

определении риска РЛ у курящих мужчин представляются анализы IgA-БП, IgG-ПГ, IgG-ЭС и IgG-ПГ с расчетом соотношений IgA-БП/ПГ, IgG-БП/ПГ, IgG-ЭС/ПГ.

С учетом возможных экономических ограничений с этой целью может быть рекомендован анализ IgG-БП и IgG-ПГ с расчетом соотношения IgG-БП/ПГ. Анализ выполняется на одном планшете, с использованием только двух антигенов (БП-БСА, ПГ-БСА) и одного пероксидазного конъюгата против IgG человека. При величине соотношения IgG-БП/ПГ > 2 достигается максимальная разница между больными и здоровыми ( $\chi^2=41,7$ ,  $p=0,0005$ ), максимальный показатель прогностической значимости (AUC=0,92) и риск РЛ (OR=11,8). При IgG-БП/ПГ ≤ 2 риск РЛ снижается до 0,08.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Glushkov, A.N.* Immunostimulation of the chemical-induced carcinogenesis in the phase of initiation/ A.N. Glushkov // *Medical Hypotheses*. 2002. № 5. P. 501-503.
2. *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.
3. *Глушков, А.Н.* Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия / *А.Н. Глушков, Е.Г. Поленок, Т.П. Аносова* и др. // *Российский иммунологический журнал*. 2011. Т. 5(14). № 1. С. 39-44.
4. *Поленок, Е.Г.* Антитела к бензо[а]пирену в сыворотке крови больных немелкоклеточным раком лёгкого /
5. *Polenok, E.G., Anosova, T.P., Anosov, M.P.* and др. // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2012. Т. 3(85). № 2. С. 151-154.
5. *Cavalieri, E.L.* Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators / *E.L. Cavalieri, D.E. Stack, P.D. Devanesan* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. № 94. P. 10937-10942.
6. *Бозуш, Т.А.* Эстрогеновые рецепторы, антиэстрогены и немелкоклеточный рак легкого / *Т.А. Бозуш, Е.А. Дудко, А.А. Беме* и др. // *Биохимия*. 2010, вып. 75(12). С. 1633-1641.
7. *Stabile, L.P.* Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  and show biological responses to estrogen / *L.P. Stabile, A.L. Davis, C.T. Gubish* et al. // *Cancer Res*. 2002. V. 62. P. 2141-2150.
8. *Su, J.M.* Expression of estrogen and progesterone receptors in non-small cell lung cancer: immunohistochemical study / *J.M. Su, H.K. Hsu, H. Chang* et al. // *Anticancer Res*. 1996. V. 16. P. 3803-3806.
9. *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.
10. *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.
11. *Santella, R.M.* Polycyclic aromatic hydrocarbon – DNA and protein adducts in coal tar treated patients and controls and their relationship to glutathione S-transferase genotype / *R.M. Santella, F.P. Perera, T.L. Young* et al. // *Mutation Res*. 1995. V. 334. P. 117-124.
12. *Verdina, A.* Carcinogen-modified DNA and specific humoral immunity toward carcinogen-DNA adducts // *Ann. Ist. Super Sanita*. 2006. V. 42. № 2. P. 189-194.
13. *Reid, M.* Molecular epidemiology of better predict lung cancer risk / *M. Reid, R. Santella, C. Ambrosone* // *Clinical Lung Cancer*. 2008. V. 9. № 3. P. 149-153.

## EFFECT OF SMOKING ON THE ANTIBODY RESPONSE TO CHEMICAL CARCINOGENS AND STEROID HORMONE IN HEALTHY MEN AND LUNG CANCER PATIENTS

© 2013 A.N. Glushkov<sup>1</sup>, E.G. Polenok<sup>1</sup>, N.E. Verzhbitskaya<sup>3</sup>, V.A. Titov<sup>2</sup>, I.A. Vafin<sup>4</sup>, S.E. Ragozhina<sup>4</sup>

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

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

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

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

The antibodies to chemical carcinogen benzo(a)pyrene (Bp) and steroid hormones, estradiol (Es) and progesterone (Pg), were investigated at healthy men and patients with lung cancer (LC). At smoking patients with lung cancer were more frequent high value ratios of levels of IgA-Bp/Pg > 1,5, IgG-Bp/Pg > 2 and IgG-Es/Pg > 1,5 than in healthy male smokers. In this case the risks of lung cancer increases in 6,1-11,5 times.

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

*Andrey Glushkov, Doctor of Medicine, Professor, Director. E-mail: ihe@list.ru; Elena Polenok, Candidate of Pharmacy, Chief of the Immunochemistry Laboratory; Nataliya Verzhbitskaya, Candidate of Medicine, Chief of the Pathologic-Morphology Department; Viktor Titov, Chief of the Thoracic Department; Ilgiz Vafin, Main Physician Svetlana Ragozhina, Deputy Main Physician of Medical Work*