

УДК 616.24-006.6:616-097.3

АНТИТЕЛА К НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМ КСЕНО- И ЭНДОБИОТИКАМ И РИСКИ ВОЗНИКНОВЕНИЯ РАКА ЛЕГКОГО

© 2014 А.Н. Глушков¹, Е.Г. Поленок¹, С.А. Мун¹, В.А. Титов², М.В. Костянко³, И.А. Вафин⁴, С.Е. Рагожина⁴

¹ Институт экологии человека СО РАН, Кемерово

² Областной клинический онкологический диспансер, Кемерово

³ Кемеровский государственный университет

⁴ Кемеровский областной центр крови

Поступила в редакцию 10.09.2014

Исследовали особенности образования антител к ксенобиотику бензо[а]пирену и эндобиотикам (стероидным гормонам) в зависимости от полиморфных вариантов гена *GSTM1* у мужчин, больных раком легкого. Было установлено, что риски возникновения рака легкого значительно выше у мужчин носителей *GSTM1*«+» с высоким уровнем IgA- и IgG-антител к бензо[а]пирену и эстрадиолу и носителей делеционного генотипа *GSTM1* с низким уровнем IgG-антител к прогестерону. Таким образом, нами подтверждено ранее высказанное предположение о взаимосвязи образования антител к низкомолекулярным ксено- и эндобиотикам с активностью ферментов их метаболизма.

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

В связи с недостаточной эффективностью современных методов лечения онкологических заболеваний проблема их профилактики остается наиболее актуальной в здравоохранении. Большое значение придается разработке способов определения рисков злокачественных опухолей при интенсивном воздействии химических канцерогенов. С этой целью применяются биохимические [1, 2], молекулярно-генетические [3, 4], цитогенетические [5, 6] и иммунологические [3, 4] методы. Ранее обнаружили повышенное содержание антител (АТ) к бензо[а]пирену (БП), эстрадиолу (ЭС) и прогестерону (ПГ) у больных раком легкого (РЛ) по сравнению со здоровыми людьми [6-9]. Расчет отношения шансов возникновения РЛ показал высокую диагностическую значимость анализа указанных АТ для определения онкологического риска. Предполагается, что образование АТ к низкомолекулярным ксено- и эндобиотикам взаимосвязано с активностью (генетическим полиморфизмом) ферментов биотрансформации [10].

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

Поленок Елена Геннадьевна, кандидат фармацевтических наук, заведующая лабораторией иммунохимии

Мун Стелла Андреевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики

Титов Виктор Александрович, заведующий торакальным отделением

Вафин Илгиз Ахметович, главный врач

Рагожина Светлана Егоровна, заместитель главного врача по медицинской части

Цель работы: выявить возможные ассоциации образования АТ к БП, ЭС и ПГ с полиморфными вариантами гена глутатион-S-трансферазы M1 (*GSTM1*) у здоровых мужчин и больных РЛ.

Материалы и методы. Нами было обследовано 389 мужчин. Из них 164 мужчины 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. Средний возраст мужчин больных РЛ составил $59,1 \pm 7,3$ лет. В группу сравнения вошли условно здоровые мужчины (225 человек) с Кемеровского центра крови, не болеющие РЛ и другими заболеваниями дыхательных путей. Средний возраст здоровых мужчин составил $50,2 \pm 7,8$ лет.

Забор периферической крови осуществлялся согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинской 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. Исследование АТ к БП, ЭС и ПГ проводили с помощью модифицированного нами неконкурентного иммуноферментного анализа [6, 7]. Уровни АТ к гаптенам выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

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

где X= БП, ЭС, ПГ; OD_{X-БСА} – связывание АТ с конъюгатом гаптен-БСА, OD_{БСА} – связывание с БСА.

Для анализа генетического полиморфизма ферментов биотрансформации выделяли геномную ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом. Образцы ДНК хранили при -20°C. Типирование гена *GSTM1(del)* проводили методом мультиплексной ПЦР с флуоресцентной детекцией продуктов в режиме Real-Time с помощью тест-систем, разработанных в ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск). Подробно методика описана в работе [11]. 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 χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность вариации и U-критерия Манна-Уитни. 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 [12] и рассчитаны величины AUC, характеризующие прогностическую значимость показателей.

Результаты и обсуждение. В результате молекулярно-генетического анализа не удалось выявить различия между сравниваемыми группами по полиморфизму *GSTM1*. Делеция гена

обнаружена в 101 случае из 223 (45%) у здоровых мужчин и в 55 случаях из 127 (43%) у больных РЛ. Уровни IgA и IgG-АТ к БП, ЭС были повышены у больных РЛ (рис. 1). Уровни IgA-ПГ не отличались значимо, а IgG-ПГ оказались ниже у больных по сравнению со здоровыми. Таким образом, при анализе более широких выборок больных и здоровых мужчин в настоящем исследовании подтверждены ранее полученные результаты [7-9].

Кроме того, выяснилось, что повышенные уровни АТ к БП и ЭС значимо чаще встречаются при РЛ (табл. 1). При этом рассчитанные риски РЛ (OR) возрастают в 1,8-3,5 раза. Низкие значения уровней указанных АТ свидетельствуют о невысоких рисках РЛ (0,3-0,5). Расчет показателей AUC показал хорошую (0,6-0,65) и отличную (0,84-0,85) диагностическую значимость анализа IgG и IgA-АТ, соответственно, для определения рисков РЛ.

Для достижения цели работы рассчитали медианы уровней АТ у носителей нормального и делеционного генотипов *GSTM1* (табл. 2). Не обнаружили различия между ними по IgA-АТ ни у больных РЛ, ни в группе сравнения. В то же время у здоровых мужчин уровни IgG-АТ при делеции *GSTM1* оказались выше, чем при *GSTM1*«+» (IgG-ЭС и IgG-ПГ статистически значимо, $p=0,003$ и $0,015$ соответственно). У больных РЛ наблюдалась противоположная тенденция – при делеции *GSTM1* уровни АТ были ниже, хотя и статистически недостоверно.

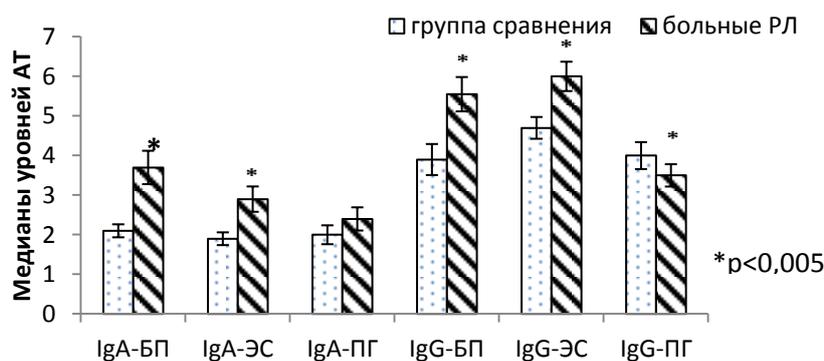


Рис. 1. Медианы уровней антител классов А и G (IgA, IgG) к БП, ПГ и ЭС у здоровых мужчин и больных РЛ

При сравнении исследуемых групп отдельно для *GSTM1*«0» и *GSTM1*«+» выяснилось следующее. Максимально выраженное статистически более значимое превышение уровней АТ у больных РЛ зафиксировано у носителей *GSTM1*«+» для АТ-БП и АТ-ЭС. Например, значение p при сравнении групп по IgA-БП у носителей *GSTM1*«+» составило 0,000001, а при делеции гена – 0,0005 (менее достоверно). При

сравнении групп по IgG-БП значение p у носителей *GSTM1*«+» составило 0,000001, а при делеции гена – 0,91 (статистически недостоверно). Противоположная ситуация обнаружена при анализе АТ-ПГ. У больных РЛ с делецией *GSTM1* уровни IgG-ПГ были значительно ниже, чем у здоровых (медианы 2,7 и 4,8 соответственно) при $p=0,000001$. Разница между группами при *GSTM1*«0» была менее выражена ($p=0,05$).

Таблица 1. Частота встречаемости низких и высоких уровней IgA- и IgG-антител к БП, ЭС и ПП у здоровых мужчин и больных РЛ

АТ	Группа сравнения (n=225) n / %	Больные РЛ (n=164) n / %	χ^2 , p	OR (95% CI)	AUC
IgA-БП	> 3	69/31	34,2 0,0005	3,5 (2,3-5,5)	0,87
	≤ 3	156/69			
IgA-ЭС	> 2	105/47	19,2 0,0005	2,6 (1,7-4,1)	0,84
	≤ 2	120/53			
IgA-ПП	> 2	112/50	2,9 0,08	1,5 (0,9-2,2)	0,64
	≤ 2	113/50			
IgG-БП	> 4	110/49	12,9 0,001	2,2 (1,4-3,4)	0,65
	≤ 4	115/51			
IgG-ЭС	> 6	77/34	7,8 0,006	1,8 (1,2-2,8)	0,60
	≤ 6	148/66			
IgG-ПП	> 4	112/50	3,5 0,06	0,7 (0,4-1,0)	0,46
	≤ 4	113/50			

Таблица 2. Медианы уровней антител (IgA, IgG) к БП, ЭС и ПП у здоровых мужчин и больных РЛ в зависимости от полиморфных вариантов гена *GSTM1*

АТ	Группа сравнения (N=223)			Больные РЛ (N=127)			<i>GSTM1</i> "0"	<i>GSTM1</i> "+"
	<i>GSTM1</i> "0"	<i>GSTM1</i> "+"	p	<i>GSTM1</i> "0"	<i>GSTM1</i> "+"	p		
	Me±m	Me±m		Me±m	Me±m			
IgA-БП	2,1±0,2	2,1±0,2	0,50	3,3±0,6	3,55±0,8	0,33	0,0005	0,000001
IgA-ЭС	2±0,2	1,75±0,2	0,08	2,7±0,4	2,8±0,6	0,73	0,04	0,0003
IgA-ПП	1,9±0,3	1,95±0,3	0,25	2,2±0,3	2,2±0,5	0,99	0,53	0,75
IgG-БП	4,5±0,6	3,4±0,5	0,10	4,7±0,7	5,95±0,7	0,07	0,91	0,000001
IgG-ЭС	5,2±0,4	4,2±0,3	0,003	5,2±0,6	6,1±0,6	0,62	0,70	0,007
IgG-ПП	4,8±0,5	3,4±0,5	0,015	2,7±0,4	2,65±0,4	0,78	0,000001	0,05

Далее сравнили группы по частоте встречаемости низких и высоких уровней АТ отдельно для носителей *GSTM1*«+» и при делеции этого гена (табл. 3). Обнаружили, что значения χ^2 и OR при *GSTM1*«+» значительно выше, чем при *GSTM1*«0» для АТ-БП и АТ-ЭС. Например, у носителей *GSTM1*«+» при высоких уровнях IgA-БП $\chi^2=22,9$ (p=0,0005) и OR=4,6 (2,4-9,1). А при делеции этого гена $\chi^2=3,9$ (p=0,046) и OR=2,1 (1,01-4,3). При анализе IgG-ПП наблюдалась противоположная ситуация. При делеции *GSTM1* $\chi^2=11,8$ (p=0,001) и OR=3,6 (1,7-7,8) для низких уровней этих АТ. А у носителей *GSTM1*«+» разница между больными и здоровыми вообще отсутствовала.

Сравнение результатов, представленных в табл. 2 и 3 показало, что анализ исследуемых АТ с учетом генотипа *GSTM1* более информативен. Обнаружение высоких уровней АТ-БП и АТ-ЭС у носителей *GSTM1*«+» (табл. 3) сопряжено с более высокими значениями OR по сравнению с

одним только анализом АТ (табл. 2). Например, в первом случае при анализе IgA-БП OR=4,6 (2,4-9,1), а во втором OR=3,5 (2,3-5,5). Обнаружение низких значений IgG-ПП при делеции в *GSTM1* (табл. 3) сопряжено с более высокими значениями OR=3,6 (1,7-7,8) при высоком уровне статистической значимости ($\chi^2=11,8$, p=0,001). Без учета генотипа частота обнаружения низких значений IgG-ПП у больных РЛ статистически не отличалась от здоровых ($\chi^2=3,5$, p=0,06), а показатель AUC был ниже среднего (0,46).

Выводы: ранее высказанное предположение о взаимосвязи образования АТ к низкомолекулярным ксено- и эндобиотикам с активностью ферментов их метаболизма получило подтверждение. Одна из основных задач клинической иммунохимии канцерогенеза, а именно, создание комплекса иммунологических и молекулярно-генетических методов определения риска онкологических заболеваний [10], представляется решаемой и полезной с практической

точки зрения. Анализ АТ к химическим канцерогенам окружающей среды и стероидным гормонам в сочетании с генетическим полиморфизмом ферментов биотрансформации рекоменду-

ется для дальнейших клинических испытаний в разработке методов профилактики РЛ и других злокачественных опухолей.

Таблица 3. Частота встречаемости низких и высоких уровней антител (IgA, IgG) к БП, ЭС и ПГ у мужчин в зависимости от полиморфных вариантов гена *GSTM1*

АТ	Группа сравнения n / %	Больные РЛ n / %	χ^2 , p	OR (95% CI)
<i>GSTM1</i> «+»				
IgA-БП > 3	31/25	44/61	22,9	4,6 (2,4-9,1)
	≤ 3	28/39	0,0005	0,2 (0,1-0,4)
IgA-ЭС > 2	52/43	47/65	8,4	2,5 (1,3-4,0)
	≤ 2	25/35	0,005	0,4 (0,2-0,8)
IgA-ПГ > 2	60/49	37/51	0,02	
	≤ 2	35/49	0,9	
IgG-БП > 4	54/44	50/69	10,6	2,9 (1,5-5,6)
	≤ 4	22/31	0,002	0,3 (0,2-0,7)
IgG-ЭС > 6	32/26	38/53	12,7	3,1 (1,6-6,1)
	≤ 6	34/47	0,001	0,3 (0,2-0,6)
IgG-ПГ > 4	53/43	23/32	2,1	
	≤ 4	49/68	0,2	
<i>GSTM1</i> «0»				
IgA-БП > 3	37/37	30/55	3,9	2,1 (1,01-4,3)
	≤ 3	25/45	0,046	0,5 (0,2-0,9)
IgA-ЭС > 2	51/50	37/67	3,4	
	≤ 2	18/33	0,06	
IgA-ПГ > 2	50/50	32/58	0,8	
	≤ 2	23/42	0,4	
IgG-БП > 4	55/54	32/58	0,08	
	≤ 4	23/42	0,8	
IgG-ЭС > 6	44/44	22/40	0,06	
	≤ 6	33/60	0,8	
IgG-ПГ > 4	58/57	15/27	11,8	0,3 (0,1-0,6)
	≤ 4	40/73	0,001	3,6 (1,7-7,8)

Работа выполнена в рамках проекта № 59.1.1. Программы фундаментальных научных исследований СО РАН.

Благодарность. Авторы благодарят академика Л.Н. Иванову за содействие в развитии выбранного направления исследований; сотрудников лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН Аносову Т.П., Аносова М.П., Красильникову К.С., Гурова Е.А. за техническую поддержку настоящей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Гуляева, Л.Ф. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков в химическом канцерогенезе / Л.Ф. Гуляева, В.А. Вавилин, В.В. Ляхович – Новосибирск, 2000. 83 с.
2. Землянова, М.А. Современные подходы к оценке метаболизма ксенобиотиков при поступлении в организм из внешней среды / М.А. Землянова, Ю.Л. Кольдибекова // Экология человека. 2012. № 8. С. 8-13.
3. Суханов, В.А. Роль физиологических факторов в прогнозировании риска развития онкологических заболеваний на основе полиморфизма системы ферментов метаболизма ксенобиотиков / В.А. Суханов, Л.А. Пирузян // Физиология человека. 2010. Т. 36, № 6. С. 122-137.
4. Аткарская, Н.В. Полиморфизм генов биотрансформации ксенобиотиков и контроль клеточной пролиферации в ассоциации с риском развития рака дыхательных путей / Н.В. Аткарская, Т.М. Зава-рыкина, Г.П. Жижина, Е.Б. Бурлакова // Молекулярная медицина. 2012. № 6. С. 52-56.
5. Минаева, В.И. Хромосомные aberrации у жителей Кемеровской области, проживающих на территориях с различным уровнем загрязнения атмосферного воздуха // Известия Самарского научного центра РАН. 2012. Т. 14, № 5(2). С. 483-485.
6. 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.
7. Глушков, А.Н. Влияние курения на образование антител к химическим канцерогенам и стероидным гормонам у здоровых мужчин и больных раком легкого / А.Н. Глушков, Е.Г. Поленок, В.А. Титов и др. // Известия Самарского научного центра РАН. 2013. Т. 15, № 3(6). С. 1765-1768.

8. Глушков, А.Н. Антитела к химическим канцерогенам и стероидным гормонам у больных раком легкого / А.Н. Глушков, Е.Г. Поленок, Н.Е. Вержбицкая и др. // Российский иммунологический журнал. 2014. №2. (в печати).
9. Поленок, Е.Г. Антитела к бензо[а]пирену в сыворотке крови больных немелкоклеточным раком лёгкого / Е.Г. Поленок, Т.П. Аносова, М.П. Аносов и др. // Бюллетень ВШЦ СО РАМН. 2012. №3(85). Часть 2. С. 151-154.
10. Глушков, А.Н. Клиническая иммунохимия канцерогенеза: новые задачи и перспективы // Российский иммунологический журнал. 2013. Т. 7(16), № 1. С. 27-34.
11. Гордеева, Л.А. Сочетание материнских полиморфизмов CYP1A2*1F и GST при врождённых пороках развития у плода и новорожденных / Л.А. Гордеева, О.А. Глушкова, Н.А. Ермоленко и др. // Медицинская генетика. 2011. № 11. С.9-15.
12. Zweig, M.H. ROC plots: a fundamental evaluation in clinical medicine / M.H. Zweig, G. Campbell // Clinical Chemistry. 1993. . 39, № 4. P. 561-577.

ANTIBODIES TO THE LOW-WEIGHT XENO- AND ENDOBIOTICS AND RISK OF LUNG CANCER

© 2014 A.N. Glushkov¹, E.G. Polenok¹, S.A. Mun¹, V.A. Titov², M.V. Kostyanko³, I.A. Vafin⁴, S.E. Ragozhina⁴

¹ Institute of Human Ecology SB RAS, Kemerovo

² Regional Clinical Oncology Hospital, Kemerovo

³ Kemerovo State University

⁴ Regional Blood Center, Kemerovo

The features of the formation of antibodies to the xenobiotic benzo[a]pyrene and endobiotics (steroid hormones), depending on the polymorphisms of GSTM1 gene were investigated in men with lung cancer. It has been found that the risk of lung cancer significantly higher in *GSTM1 positive* men with high levels of IgA- and IgG-antibodies to benzo[a]pyrene and estradiol and in *GSTM1 null* men with low level of IgG-antibodies to progesterone. Thus, we have confirmed the previously stated assumption about the relationship of antibody to low-weight xeno- and endobiotics with the activity of enzymes of their metabolism.

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

Andrey Glushkov, Doctor of Medicine, Professor, Director.

E-mail: ihe@list.ru

Elena Polenok, Candidate of Pharmacy, Chief of the Immunochemistry Laboratory

Stella Mun, Candidate of Medicine, Senior Research Fellow at the Immunogenetic Laboratory

Viktor Titov, Head of the Thoracic Department

Ilgiz Vafin, Main Physician

Svetlana Ragozhina, Deputy Main Physician on Medicine