

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПІДХОДИ ДО РОЗРОБКИ ДІАГНОСТИЧНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ЕМБРІОНАЛЬНИХ АНТИГЕНІВ

Виявлено, що в сироватках крові тварин з різними модельними пухлинами є антитіла, здатні перехресно реагувати з ембріональними протеїнами курки (ЕПК). Частота виявлення перехресно-реактивних проти ЕПК антитіл не залежить від штаму пухлини. Такі антитіла можуть бути виявлені вже на ранніх стадіях пухлинного росту; зміна рівня антитіл протягом пухлинного процесу та зв'язок між об'ємом пухлинного вузла і рівнем антитіл залежить від виду модельної пухлини.

Ключові слова: пухлина, антитіла, тест-система, антиген, онкозахворювання.

Потреба у розробці малоінвазивних методів ранньої діагностики залишається однією з найактуальніших у сучасній онкології. Незважаючи на наявність широкого кола діагностичних тест-систем, які базуються на виявленні у сироватці крові пухлиноасоційованих антигенів (так званих біомаркерів пухлинного росту), їх застосування, навіть у комбінації з іншими методами діагностики, залишається малоінформативним та недостатнім для раннього виявлення онкозахворювання [1, 2]. Останнім часом в науковій літературі все частіше з'являються дані щодо можливості створення діагностичних панелей на основі виявлення в сироватках крові онкохворих антитіл проти пухлиноасоційованих антигенів для проведення ранньої або диференційної діагностики злоякісних новоутворень та моніторингу ефективності терапії [1, 3, 4, 5]. Такі аутоантитіла можуть бути виявлені на ранніх стадіях пухлинного росту, а інколи – ще навіть до клінічного прояву хвороби [2, 4, 6, 7]. Тому, на думку деяких вчених, їх можна розглядати як «репортери» канцерогенезу [1, 4]. Мішенями для розпізнавання аутоантитілами можуть бути як пухлиноасоційовані антигени, так і білки-учасники канцерогенезу [4]. Найчастіше такі антитіла взаємодіють із висококонсервативними функціональними доменами білків, тому здатні розпізнавати гомологічні молекули представників інших видів тварин. За даними літератури, ембріональні клітини курки експресують білки, гомологічні до пухлинних антигенів людини (білок ядерної пори *Nup88* [8], *MAGE*-подібний білок [9]) та миші (ФНО-подібний білок) [10]. Тому метою нашої роботи було дослідити в сироватках крові мишей з різними модельними пухлинами наявність та рівень антитіл, що здатні зв'язуватись з ксеногенними ембріональними протеїнами кур-

(ЕПК); виявити зв'язок між рівнем продукції таких антитіл та об'ємом пухлинного вузла.

Матеріали та методи

Були використані миші ліній C57Bl та Balb/c розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Всі дослідження проводили згідно з Міжнародними правилами проведення робіт з експериментальними тваринами.

Для індукції пухлин тваринам лінії C57Bl внутрішньом'язово (в/м) вводили суспензію пухлинних клітин карциноми легені Льюїс (КЛЛ) або меланоми B-16 з розрахунку 4×10^5 або 5×10^5 клітин/мишу відповідно; мишам лінії Balb/c в/м – суспензію клітин саркоми 37 (S37) або раку Ерліха (РЕ) з розрахунку 5×10^5 клітин/мишу.

Сироватки крові (СК) тварин з пухлинами отримували на 7-му, 14-ту, 21-шу та 28-му доби пухлинного росту; за необхідності СК заморожували і зберігали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Рівень антитіл (Ат) визначали методом імуноферментного аналізу (ІФА), який проводили як описано в [11]; СК використовували в розведенні 1:20. В СК мишей з пухлинами визначали рівень Ат, що реагують з «власними» антигенами (Аг) відповідних пухлинних штамів, а також перехресно реагують з ембріональними протеїнами курки (ЕПК). ЕПК з клітин семиденних ембріонів та пухлинні антигени (ПА) отримували шляхом ЕДТА-екстракції [12]. Антигени вносили у 96-луночні планшети в концентрації 0,3 мг/мл. Для детекції сироваткових Ат в ІФА використовували вторинні поліклональні антитіла проти імуноглобулінів миші, мічені пероксидазою (SIGMA). Результати реакції реєстрували на автоматичному рідері MicroELISA (Stat Fax 2100, США).

При аналізі результатів визначали коефіцієнт К: $K = D_0/D_k$, де D_0 – оптична густина в лунках із СК мишей-пухлиноносіїв (дослід), D_k – оптична густина в лунках із СК інтактних тварин. Значення $K > 2$ вважали ознакою наявності специфічних антитіл.

Коефіцієнт кореляції Пірсона (r) визначали з урахуванням поправки на величину вибірки [13].

Результати та їх обговорення

У табл. 1 представлено частоту виявлення в СК Ат проти відповідних ПА та ЕПК у тварин із різними модельними пухлинами. Як видно з цієї таблиці, кількість тварин, у СК яких були наявні антитіла проти «власних» ПА та проти ЕПК, приблизно однакова і не залежала від конкретної модельної пухлини. Виняток становили миші із S37, оскільки частота виявлення Ат проти ЕПК була дещо меншою ($p < 0,1$) порівняно із такою проти «власних» ПА. Слід відмітити, що здатність СК мишей з пухлиною (незалежно від штаму) перехресно розпізнавати ЕПК не залежала від того, чи реагує СК з «власними» ПА.

Таблиця 1. Частота виявлення в СК мишей з різними модельними пухлинами Ат проти ПА та ЕПК

Штам пухлини	Частота виявлення Ат проти:	
	«власних» ПА, % (n)	ЕПК, % (n)
S37	91,67±5,64 (22 з 24)	70,83±9,28 (17 з 24)*
PE	81,82±8,42 (18 з 22)	77,27±9,17 (17 з 22)
B-16	75,00±15,31 (6 з 8)	87,50±11,69 (7 з 8)
КЛЛ	83,33±7,61 (20 з 24)	79,17±8,29 (19 з 24)

* $p < 0,1$ порівняно із кількістю тварин, СК яких реагують з «власними» ПА.

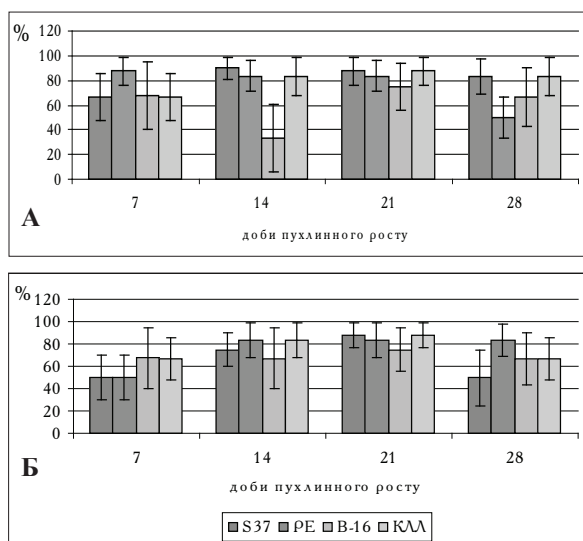


Рис. 1. Динаміка появи в СК мишей з різними модельними пухлинами Ат проти ПА (А) та ЕПК (Б)

Зазначимо, що Ат як проти ПА, так і проти ЕПК реєстрували на ранніх етапах пухлинного росту – на 7-му добу (рис. 1). Зокрема, Ат проти ПА в СК тварин з РЕ в цей термін спостереження були виявлені у 100 % випадків (з поправкою Ван-дер-Вердена $87,5 \pm 11,02$ %), а перехресно-реактивні Ат проти ЕПК – у $50,0 \pm 20,41$ %; частота виявлення в СК мишей з КЛЛ або В-16 Ат, які розпізнавали власні ПА та ЕПК, була однаковою і становила $66,67 \pm 19,25$ та $66,67 \pm 27,22$ % відповідно. У тварин із S37 на ранніх етапах пухлинного росту Ат проти ПА були виявлені у $66,67 \pm 20,41$ % випадків, а проти ЕПК – у $50,0 \pm 20,41$ %. Слід зазначити, що надалі кількість тварин, у СК яких виявляли Ат проти ПА чи ЕПК, суттєво не відрізнялась та не залежала ні від модельної пухлини, ні від терміну спостереження.

Протягом пухлинного процесу рівень Ат проти ПА у мишей з пухлинами (за винятком РЕ) практично не відрізнявся та суттєво не змінювався не залежно від виду модельної пухлини (рис. 2А). У мишей з РЕ було виявлено найнижчий рівень Ат проти ПА (на 14-ту добу $p < 0,05$ порівняно з тваринами, яким була перещеплена КЛЛ або S37, на 21-шу добу – $p < 0,05$ порівняно з мишами, яким була перещеплена КЛЛ або В-16).

Рівні Ат проти ЕПК піддавались більш вираженим змінам (Рис. 2Б). Так, на 7-у добу пухлинного росту найвищий рівень Ат був виявлений у мишей з S37 ($p < 0,05$ порівняно з тваринами, яким була перещеплена В-16 або РЕ). Проте до 28-ї доби спостереження рівень Ат у СК мишей

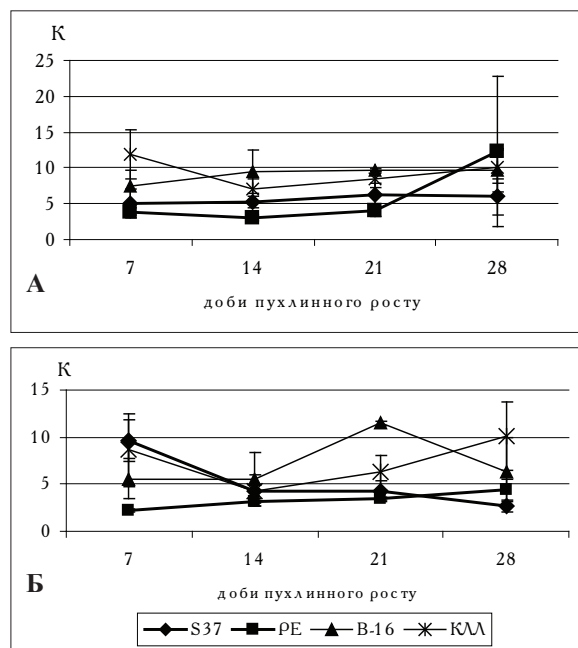


Рис. 2. Динаміка зміни рівня Ат проти ПА (А) та ЕПК (Б) в СК мишей з різними модельними пухлинами

з S37 поступово і достовірно (порівняно з 7-ю добою) знижувався. У мишей з РЕ, навпаки, на 7-у добу пухлинного росту рівень Ат проти ЕПК був найнижчим ($p < 0,05$ порівняно з мишами, яким була перещеплена S37), але достовірно зростав до 28-ї доби пухлинного росту. У мишей з КЛЛ або В-16 рівні Ат проти ЕПК суттєво не змінювались протягом часу спостереження.

Для виявлення залежності між розміром пухлинного вузла та рівнем продукції антитіл проти ПА і ЕПК розраховували коефіцієнти кореляції (табл. 2). У мишей з РЕ ріст пухлинного вузла супроводжувався збільшенням рівня продукції антитіл як проти ПА ($r = 0,75$; $p < 0,05$), так і проти ЕПК ($r = 0,67$; $p < 0,05$). У мишей з меланою В-16 коефіцієнт кореляції в обох випадках не досягнув достовірних значень. У тварин з КЛЛ кореляційного зв'язку між об'ємом пухлини та рівнем продукції Ат проти ПА не спостерігали, проте виявили виражений кореляційний зв'язок ($r = 0,42$; $p < 0,07$) між розмірами пухлинного вузла та рівнем продукції антитіл проти ЕПК. Цікаво відмітити, що у тварин з S37 кореляційного зв'язку між об'ємом пухлини та рівнем продукції антитіл проти ПА саркоми виявлено не було, натомість спостерігали виражений негативний зв'язок ($r = -0,48$, $p < 0,07$) між ростом пухлини та продукцією антитіл проти ЕПК.

Таблиця 2. Коефіцієнт кореляції (r) між об'ємом пухлинного вузла та рівнем продукції антитіл проти ПА або ЕПК у тварин з різними модельними пухлинами

Штам пухлини	Об'єм пухлини та рівень продукції Ат проти:	
	«власних» ПА	ЕПК
S37	0,04	-0,48**
РЕ	0,75*	0,67*
В-16	0,64	0,47
КЛЛ	0,26	0,42**

* – $p < 0,05$;

** – $p < 0,07$.

Таким чином, отримані нами результати узгоджуються з літературними даними, згідно з якими у СК тварин з пухлинами виявляють антитіла, що здатні вступати у реакції перехресного реагування з ембріональними антигенами [14]. Цікавим є той факт, що в нашому дослідженні були використані ксеногенні для мишей-пухлиноносіїв ембріональні білки курки, але, не зважаючи на значну філогенетичну віддаленість, СК мишей-пухлиноносіїв все одно були здатні перехресно реагувати з ембріональними білками.

Згідно з нашими дослідженнями, збільшення рівня антитіл з одночасним зростанням об'єму пухлини спостерігали лише для мишей з РЕ (антитіла проти ПА та ЕПК) і КЛЛ (антитіла проти ЕПК), тобто при карциномах. Для меланоми В-16 рівень продукції антитіл не залежав від пухлинного навантаження. У випадку S37 спостерігали негативну кореляцію між продукцією антитіл та збільшенням об'єму пухлини. Подібну ситуацію описують і для хворих із злоякісними пухлинами різних локалізацій, коли збільшення пухлинного об'єму не завжди супроводжується збільшенням частоти чи рівня виявлення Ат проти пухлиноасоційованих антигенів, наприклад антитіла проти p53, NY-ESO-1, сурвівіну, тирозинази, Muc16, PLAP частіше виявляють на більш пізніх стадіях пухлинного росту [3, 15], тоді як максимальну частоту виявлення та більші титри антитіл проти Her2/neu і MUC1 реєструють на ранніх стадіях [3, 5, 16].

Наявність перехресно реактивних Ат проти ЕПК у тварин з пухлиною реєстрували на ранніх етапах пухлинного росту – починаючи з 7 доби. Про виявлення у онкологічних хворих аутоантитіл проти пухлиноасоційованих антигенів на ранніх стадіях пухлинного росту (інколи навіть до клінічного прояву хвороби) повідомляють при раку легені, молочної залози, гепатоцелюлярній карциномі [2, 4, 6, 7, 16].

Частота виявлення в СК мишей з пухлиною Ат проти ЕПК практично не залежала від виду модельної пухлини: в експерименті були використані 2 карциноми (КЛЛ, РЕ), 1 саркома (S37) та 1 меланома (В-16). Перехресно реактивні антитіла були виявлені у 87,5–70,83 % тварин, що було практично на рівні реагування проти ПА «власної» пухлини (за винятком S37, коли частота виявлення Ат проти ЕПК була дещо менша ($p < 0,1$), ніж така проти антигенів S37). За літературними даними, серед хворих з пухлинами різних локалізацій частота виявлення в СК Ат класу G проти пухлинних антигенів p53, MUC1, Her2/neu, с-мус та NY-ESO-1 не перевищує 80,0, 62,9, 55,0, 37,6 та 22,0 % відповідно [3, 15]. Враховуючи отримані нами результати та дані літератури щодо експресії ембріональними клітинами курки білків, які гомологічні до пухлинних антигенів людини (білок ядерної пори *Nup88* [8], MAGE-подібний білок [9]), доцільно дослідити наявність перехресно реактивних з ЕПК антитіл у сироватці крові хворих зі злоякісними пухлинами, особливо з тими, для яких характерна висока частота експресії онкофетальних антигенів (зокрема, рак шлунка, кишківника, підшлункової залози, печінки тощо). У випадку, коли частота виявлення антитіл проти ЕПК у онкохворих виявиться достатньо високою, необхідна подальша робота у зазначеному напрямку

з метою створення діагностичної тест-системи на основі ЕПК для виявлення та моніторингу перебігу пухлинного процесу. Тому, на нашу думку, перспективно виглядає експериментальна перевірка можливості використання ЕПК для конструювання діагностичних тест-систем.

Висновки

1. Частота виявлення в сироватках крові мишей з модельними пухлинами антитіл, які перехресно реагують з ксеногенними ембріональними протеїнами курки, не залежала від штаму пухлини та терміну пухлинного росту.

2. Рівень перехресно реактивних антитіл проти ембріональних протеїнів курки протягом пухлинного росту залежав від штаму модельної пухлини: зменшувався у мишей з саркомою 37, збільшувався у випадку раку Ерліха. У мишей з карциномою Льюїс та меланою В-16 – достовірно не змінювався.

3. Показана наявність кореляційного зв'язку між ростом пухлинного вузла та рівнем перехресно реактивних антитіл проти ембріональних протеїнів курки: у мишей з раком Ерліха та карциномою легені Льюїс – позитивного, у мишей з саркомою 37 – негативного; у тварин з меланою В-16 такий зв'язок не виявлено.

1. Белоусов П. В. Раково-ассоциированные антигены и антигенные панели в серологической диагностике злокачественных опухолей / П. В. Белоусов, Д. В. Купраш, А. Ю. Сазыкин и др. // Биохимия. – 2008. – Т. 73, Вып. 5. – С. 699–712.
2. Casiano C. A. Tumor-associated Antigen Arrays for the Serological Diagnosis of Cancer / C. A. Casiano, M. Mediavilla-Varela, E. M. Tan // Molecular & Cellular Proteomics. – 2006. – Vol. 5. – P. 1745–1759.
3. Reuschenbach M. A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens / M. Reuschenbach, M. von Knebel Doeberitz, N. Wentzensen // Cancer Immunol. Immunother. – 2009. – Vol. 58. – P. 1535–1544.
4. Tan E. M. Autoantibodies to tumor-associated antigens: reporters from the immune system / E. M. Tan, J. Zhang // Immunol Rev. – 2008. – Vol. 222. – P. 328–340.
5. Lu H. Humoral Immunity Directed against Tumor-Associated Antigens As Potential Biomarkers for the Early Diagnosis of Cancer / H. Lu, V. Goodell, M. L. Disis // Journal of Proteome Research. – 2008. – Vol. 7. – P. 1388–1394.
6. Li Y. p53 autoantibodies predict subsequent development of cancer / Y. Li, A. Karjalainen, H. Koskinen et al. // Int. J. Cancer. – 2005. – Vol. 114, №1. – P. 157–160.
7. Madrid F. F. Autoantibodies in breast cancer sera: candidate biomarkers and reporters of tumorigenesis / F. F. Madrid // Cancer Letters. – 2005. – Vol. 230. – P. 187–198.
8. Schneider J. Developing chick embryos express a protein which shares homology with the nuclear pore complex protein Nup88 present in human tumors / J. Schneider, R. Linares, F. Martinez-Arribas et al. // Int. J. Dev. Biol. – 2004. – Vol. 48. – P. 339–342.
9. Lopez-Sanchez N. Single mage gene in the chicken genome encodes CMage, a protein with functional similarities to mammalian type II Mage proteins / N. Lopez-Sanchez, Z. Gonzalez-Fernandez, M. Niinobe et al. // Physiol Genomics. – 2007. – Vol. 30. – P. 156–171.
10. Wride M. A. Expression of tumor necrosis factor- α (TNF α)-cross-reactive proteins during early chick embryo development / M. A. Wride, E. J. Sanders // Developmental Dynamics. – 1993. – Vol. 198. – P. 225–239.
11. Аутеншлюс А. И. Антитела к гликопротеину *Bacillus megaterium* H у беременных женщин с патологическим течением беременности / А. И. Аутеншлюс, О. В. Иванова, В. В. Гаузер, В. А. Семерников // БЭБиМ. – 1995. – № 8. – С. 203–206.
12. Isokawa K. Identification of transferrin as one of multiple EDTA-extractable extracellular proteins involved early chick heart morphogenesis / K. Isokawa, M. Rezaee, A. Wunsch et al. // Journal of Cellular Biochemistry. – 1994. – Vol. 54. – P. 207–218.
13. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин – М. : Высшая школа, 1990. – 352 с.
14. Brewer G. B. Embryonic vaccines against cancer: An early history / G. B. Brewer, A. R. Mitchell, A. Harandi, J. W. Eaton // Experimental and Molecular Pathology. – 2009. – Vol. 86. – P. 192–197.
15. Taylor D. D. Patient-derived tumor-reactive antibodies as diagnostic markers for ovarian cancer / D. D. Taylor, C. Gercel-Taylor, L. P. Parker // Gynecologic Oncology. – 2009. – Vol. 115. – P. 112–120.
16. Chapman C. J. Autoantibodies in lung cancer: possibilities for early detection and subsequent cure / C. J. Chapman, A. Murray, J. E. McElveen et al. // Thorax. – 2008. – Vol. 63. – P. 228–233.

T. Symchych, O. Karaman, I. Voyeykova, L. Didkivska, H. Didenko, G. Potebnia

EXPERIMENTAL APPROACHES TO ELABORATION ON THE DIAGNOSTIC TEST BASED ON EMBRYO PROTEINS

It was shown that there are antibodies reacting with chicken embryo proteins in serum of mice bearing different experimental tumors. Frequency of cross reacting antibodies appearance did not depend on the tumor strain. Such antibodies can be detected in serum of mice on the early cancer stage; changes in antibodies rate during cancer progression and correlation between tumor volume and antibodies rate depend on the tumor strain.

Keywords: tumor, test based, proteins, antibodies.