

*Н.В.Севостьянова, Е.М.Малкова, Л.М.Огородова, Л.Н.Уразова,  
Н.В.Чердынцева, С.А.Коломиец, Е.И.Рябчикова*

## ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ОНКОАССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО

НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН; Сибирский государственный медицинский университет;  
Областной онкологический диспансер, Томск; ГНПО "Вектор" пос.Кольцово, Новосибирск

PECULIARITIES OF CANCER-ASSOCIATED PROTEIN EXPRESSION IN LUNG CANCER

*N.V.Sevostyanova, E.M.Malkova, L.M.Ogorodova, L.N.Urazova,  
N.V.Cherdynitseva, S.A.Kolomyets, E.I.Ryabchikova*

### Summary

Thirty patients with low and moderate differentiated squamous-cell lung cancer were examined to investigate expression of cancer-associated proteins. The methods of polymerase chain reaction and immunohistochemistry were used. Epstein-Barr virus antigen and expression of mutant p53 protein were found in the tumor cells of the lung cancer patients. The obtained data of the character of molecular genetic disorders will entail early diagnosis, a choice of anti-tumor agents and their combination for an individual therapy of each patient.

### Резюме

Для изучения экспрессии онкоассоциированных белков было обследовано 30 больных с диагнозом плоскоклеточного рака легкого с низкой и умеренной степенью дифференцировки. В работе использовали методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуногистохимии. Выявлены антиген вируса Эпштейна-Барр и экспрессия "мутантного" белка p53 в опухолевых клетках больных раком легкого. Полученные данные о характере молекулярно-генетических нарушений в будущем будут определять направление ранней диагностики, подбор новых противоопухолевых препаратов и их комбинаций для индивидуального лечения каждого больного.

Ранняя диагностика и прогнозирование течения злокачественных новообразований — наиболее актуальные и важные проблемы современной онкологии. В России, как и в большинстве развитых стран мира, отмечается тенденция к росту заболеваемости злокачественными новообразованиями и смертности от них. В общей структуре онкологических заболеваний рак легкого занимает доминирующие позиции и составляет 14,7%, при этом у мужчин он определяется в 25,3%, у женщин — в 9% случаев [4]. Одним из возможных подходов к оптимизации существующих методов диагностики и терапии этого заболевания может рассматриваться изучение экспрессии онкоассоциированных белков, влияющих на рост, дифференцировку и способность к метастазированию опухолей.

Многочисленные литературные данные свидетельствуют, что патогенез многих заболеваний человека, в том числе и рака, связан с потерей клетками способности к апоптозу [6]. Одним из механизмов этого нарушения являются мутации в генах, контролирующих данный процесс. Это и хорошо изученная гиперэкспрессия гена bcl-2, тормозящего апоптоз, и мутации в гене p53, препятствующие функционированию кодируемого им белка — индуктора апоптоза. Одной

из причин лекарственной резистентности опухолевых клеток являются мутации или дефицит гена p53. При дефектах функционирования этого гена происходит накопление клеток с множественными генетическими поломками, что и лежит в основе опухолевой прогрессии [3].

Рак представляет собой гетерогенную группу заболеваний, обусловленных комплексом различных как эндогенных, так и экзогенных нарушений. Согласно данным литературы, 12% онкологических заболеваний ассоциировано с определенными инфекционными агентами [7]. Доказана этиологическая роль некоторых герпес- и папилломавирусов в возникновении злокачественных новообразований человека. Известно, что наряду с другими канцерогенными факторами вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), представитель семейства герпесвирусов, играет важную роль в этиологии и патогенезе некоторых неопластических заболеваний.

Целью исследования было изучение экспрессии мутантного белка p53 и ядерного антигена ВЭБ при раке легкого.

Обследовано 30 больных раком легкого, средний возраст которых составил 56,7 года, причем мужчины преобладали ( $n=25$ ). В 20 случаях был определен

плоскоклеточный рак с низкой, в 10 случаях — с умеренной степенью дифференцировки. Среди обследованных лиц преобладали больные ( $n=20$ ) с III стадией заболевания — T2-3N0-2M0. У 4 больных была диагностирована II стадия — T1-2N0-1M0, у 3 больных — I стадия T1N0M0 и еще в 3 случаях IV — T3-4N1-2M0-1 (10%). Все пациенты оперированы в торако-абдоминальном отделении НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН Томска.

Фрагменты опухолей легкого, полученные при оперативном вмешательстве, фиксировали в 10% растворе формалина. Критерием для отнесения опухоли к тому или иному гистологическому варианту служило преобладание в ней (более 50–70%) структурных элементов, характерных для данного классификационного варианта.

Выделение ДНК из фрагментов опухолей, заключенных в парафиновые блоки, проводили по стандартной методике с использованием протеиназы К и экстракции фенолом-хлороформом [2]. Присутствие в клетках опухолей генетических последовательностей ВЭБ определяли стандартной методикой полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением диагностических наборов фирмы "Лабораторная диагностика" (Россия).

Иммунопероксидазную реакцию проводили на парафиновых срезах ткани опухоли. Депарафинизацию и регидратацию выполняли стандартными методиками. Для открытия антигена срезы обрабатывали в СВЧ-печи в течение 5–7 мин. Эндогенную пероксидазу ингибировали с использованием 0,3% перекиси водорода. В качестве I антител применяли моноклональные антитела для выявления ВЭБ (*nuclear antigen*) — NCL-EBV-PE2 (Clone G3-E31) и для выявления p53 Protein (DO-7) — NCL-p53-DO-7-FITC ("Novocastra Laboratories, Ltd.", Великобритания), в качестве II антител использовали универсальные биотинированные антитела и авидин-биотиновый комплекс (*ABC-Elite, Vector, США*). Для визуализации реакции использовали диамино-бензидин-тетрагидрохлорид ("Novocastra Laboratories, Ltd.", Великобритания). Оценку результатов реакции проводили при помощи светового микроскопа *Jenaval* ("Carl Zeiss, Jena", Германия) определением количества клеток с положительной реакцией в ядре на 1000 опухолевых. Полученные данные обрабатывали с помощью непараметрических статистических методов.

Методом ПЦР генетический материал ВЭБ выявлен в клетках опухолей 26 из 30 (86,6%) обследованных больных раком легкого. Так как злокачественный рост сопровождается мощной инфильтрацией опухоли иммунокомпетентными, в том числе лимфоидными, клетками, которые являются перmissive системой для изучаемого вируса, полученный результат является, вероятно, суммарным. Для верификации полученных данных был проведен иммуногистохимический анализ. Присутствие в клетках опухоли вирусспецифической информации определяли по наличию в ядрах опухолевых клеток интенсивного ок-

рашивания ядерного антигена ВЭБ. Экспрессия изученного антигена была выявлена в 80% случаев — у 24 из 30 обследованных больных. В 57% опухолевых клеток экспрессия определялась как в участках некроза, так и отдельно в ядрах онкоцитов.

В настоящее время широко дискутируется вопрос об участии ВЭБ в патогенезе неоплазий человека в основном эпителиального происхождения. По данным литературы, прямые доказательства участия ВЭБ в возникновении рака желудка дала детекция в клетках опухоли методом гибридизации *in situ* таких вирусных маркеров, как ранние мРНК (EBER-1) ВЭБ и латентные белки. Из 614 изученных случаев рака желудка в 66 (10,7%) наблюдался позитивный сигнал EBER-1. Этот сигнал отсутствовал в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах и нормальных клетках [1].

В опухолях человека наиболее часто выявляются мутации гена p53. Согласно данным литературы, не менее 50% опухолей человека экспрессирует мутированную форму гена p53 (*mtp53*). Продукт гена опухолевого супрессора p53 — ядерный фосфопротеин, состоящий из 393 аминокислотных остатков, постоянно синтезируется клетками, однако очень быстро распадается. Выделяют 2 типа гена p53 — нормальный, или "дикий" (*wild*), и мутантный *mtp53*. Нормальный белок *wtp53* сиквенспецифически связывается с ДНК клеток эукариот и становится фактором транскрипции, супрессирует многие онкогены и гены факторов роста, но активирует некоторые гены факторов дифференцировки [5]. Пролиферативную активность опухолевых клеток в настоящем исследовании оценивали по экспрессии *mtp53*, которая выявлялась у 22 из 30 больных. В 50% опухолевых клеток больных были обнаружены белковые продукты *mtp53*. Белок *mtp53* выявлялся в ядрах уплощенных клеток и полигональных онкоцитов, что свидетельствует об участии выявленных нами продуктов в процессах клеточной пролиферации.

Рак легкого относится к новообразованиям с высоким уровнем летальности, от которого в России умирает более 20% онкологических больных. Наши исследования были проведены на гистологическом материале 30 больных, из которых у 20 (66,6%) наступил летальный исход. Корреляционный анализ показал сочетанное присутствие в опухолевых клетках 12 из 20 умерших больных белка *mtp53* и ядерного антигена ВЭБ. У 5 больных с неблагоприятным исходом заболевания выявлено более 67% опухолевых клеток с экспрессией p53. У 10 больных с благоприятным течением заболевания не было выявлено опухолевых клеток с *mtp53*. Это, возможно, свидетельствует о снижении резистентности клеток к химиотерапии, что и создает условия для ее успешного проведения.

Ген *wtp53* дикого типа, его мРНК и белковый продукт являются короткоживущими, их периоды полураспада не превышают нескольких минут. Однако даже при незначительном повреждении структуры ДНК содержание белка p53 в клетке резко увеличивается

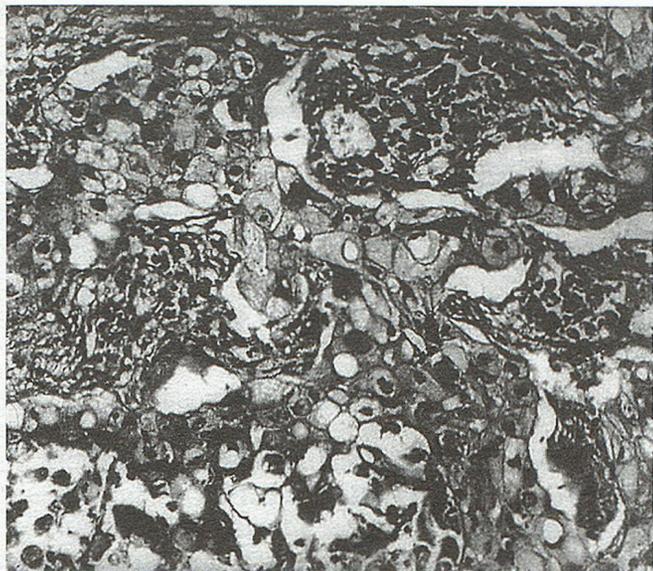


Рис.1. Плоскоклеточный низкодифференцированный рак легкого. Структура опухоли. Окраска гематоксилин и эозин (ув. 180).

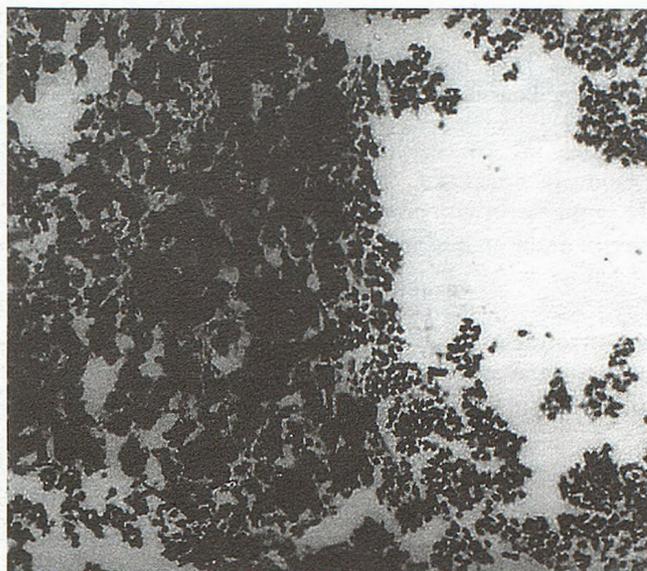


Рис.2. Плоскоклеточный низкодифференцированный рак легкого. Иммуногистохимия р53. Окраска DAB (ув. 180).

благодаря его стабилизации, так как главная функция этого белка состоит в охране целостности генома клетки [8]. Биологическое либо физическое повреждение ДНК клетки служит для *wtp53* сигналом для индукции синтеза белка *p21* — ингибитора циклинзависимых киназ и пролиферативного ядерного антигена *PCNA*, который останавливает цикл развития клетки на границе митотических фаз  $G_1/S$  (блок  $G_1$ ) [9]. Нормальный ген *wtp53* фенотипически доминантен по отношению к мутантному, но высокий уровень продукции мутантного гена может подавлять действие нормального. Белок *mp53* в отличие от нормального проявляет свойства онкобелков. Он не обладает способностью останавливать клетки с поврежденной ДНК в  $G_1$ -фазе митоза, и они начинают репликацию ДНК на поврежденной матрице, что увеличивает возможность их злокачественной трансформации. Функциональная инактивация *wtp53* способствует трансформации нормальных клеток в опухолевые и прогрессии уже возникшей опухоли [10].

### Заключение

Изучаемые ДНК- и РНК-содержащие онкогенные вирусы, несмотря на их различия, обладают рядом общих свойств, в частности они лишь инициируют патологический процесс, принимая участие в усиленной пролиферации клеток-мишеней, следовательно, для возникновения опухоли необходимо воздействие дополнительных кофакторов. Как правило, до начала неопластического процесса, после первичного инфицирования, проходит латентный период, длящийся иногда десятилетия. У лиц, инфицированных онкогенными вирусами, опухолевое заболевание может и не возникнуть, но они, как правило, составляют группу повышенного онкологического риска.

Новые знания о молекулярно-генетических особенностях опухолевых клеток позволяют совершен-

ствовать имеющиеся методы диагностики и терапии злокачественных новообразований. Следовательно, возрастает диагностическое значение на молекулярном и биохимическом уровнях имеющихся в клетках опухоли нарушений. Проведенные исследования показали, что в опухолевых клетках больных раком легкого экспрессируются ядерный антиген ВЭБ и мутантный белок гена *p53*, которые являются кофакторами при возникновении опухолей. Было отмечено, что неблагоприятный исход заболевания у больных раком легкого сопровождался высоким содержанием *mp53* в опухолевых клетках. Именно характер молекулярно-генетических нарушений будет определять в будущем направление ранней диагностики, подбор новых противоопухолевых препаратов и их комбинаций для индивидуальной терапии. Кроме того, иммуногистохимические и молекулярные методы исследования позволят, используя молекулярно-биологические маркеры опухолевого роста, с высокой степенью точности выявлять наличие предопухолевых изменений, а также злокачественных образований на ранних стадиях.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Гурцевич В., Сенюта Н., Павлиш О. Рус. журн. "ВИЧ/СПИД и родств. пробл." 2002; 1: 22–32.
2. Дейвис К. Анализ генома. Методы. М.; 1990.
3. Лукьянова Н.Ю., Кулик Г.И., Чехун В.Ф. Роль генов *p53* и *bcl-2* в апоптозе и лекарственной резистентности опухолей. *Вопр. онкол.* 2002; 2: 121–127.
4. Мерабишвили В.М., Дятченко О.Т. Статистика рака легкого (заболеваемость, смертность, выживаемость). *Практ. онкол.* 2000; 3: 3–7.
5. Новиков В.С. Программированная клеточная гибель. СПб: Наука; 1996.
6. Степанова Е.В., Лактионов К.К., Полоцкий Б.Е. и др. Прогностические маркеры плоскоклеточного рака легкого. *Рус. онкол. журн.* 2001; 5: 22–25.
7. Тюляндин С.А. Молекулярная патология рака легкого: новые терапевтические возможности. *Практ. онкол.* 2000; 3: 43–48.

8. Фильченков А.А, Стойка Р.С. Апоптоз и рак. Киев: Морион; 1999.
9. Чумаков П.М. Функция гена р53: выбор между жизнью и смертью. Биохимия 2000; 1: 34–47.
10. Bratstrom D., Bergqvist M., Lamberg K. et al. Complete sequence of p53 gene in 20 patients with lung cancer: comparison with chemosensitivity and immunohistochemistry. Med. Oncol. 1998; 15: 255–261.

Поступила 14.01.03

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК [616.24-006.6-092:612.017.1]-078

*А.В.Бажин, О.Н.Шифрина, М.С.Савченко, Н.К.Тихомирова, А.Г.Чучалин*

## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ELISA И ИММУНОБЛОТА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ ПРОТИВ РЕКОВЕРИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ МЕЛКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМОЙ ЛЕГКИХ

НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ;  
Институт пульмонологии Минздрава РФ, Москва

APPLICATION OF ELISA AND IMMUNOBLOTTING METHODS FOR DETECTION OF ANTI-RECOVERIN AUTOANTIBODIES IN SERA OF SMALL-CELL LUNG CARCINOMA PATIENTS

*A.V.Bazhin, O.N.Shifrina, M.S.Savchenko, N.K.Tikhomirova, A.G.Chuchalin*

### Summary

Paraneoplastic (onconeural) antigens involve normal high-specific for the nervous system proteins which could be also expressed by tumor cells outside the nervous system. While entering the blood vessels paraneoplastic antigens initiate an autoimmune process resulted in production of autoantibodies which evoke paraneoplastic neurological syndrome occurrence. One of the paraneoplastic antigens — Ca<sup>2+</sup>-binding protein recoverin — can be expressed by some tumors' cells and induce autoimmune injury of the retina. We compared ELISA and immunoblotting methods to detect autoantibodies against recoverin in sera of lung cancer patients and demonstrated the ELISA to be non-specific whereas the immunoblotting is quite sensitive and specific for serial analysis of sera of lung cancer patients to detect the anti-recoverin autoantibodies.

### Резюме

К паранеопластическим (онконеуральным) антигенам относят белки, которые в норме высокоспецифичны для нервной системы, но при злокачественной трансформации могут экспрессироваться также клетками раковой опухоли, локализованными вне нервной системы. При попадании в кровяное русло паранеопластические антигены иницируют аутоиммунный процесс, в результате чего генерируются аутоантитела, которые, преодолевая гематотканевый барьер, вызывают развитие паранеопластического неврологического синдрома. Один из паранеопластических антигенов — Ca<sup>2+</sup>-связывающий белок рековерин — может экспрессироваться клетками некоторых опухолей и тем самым индуцировать аутоиммунный процесс, приводя в конечном счете к развитию аутоиммунной дегенерации сетчатки. В этой работе мы провели сравнение применения методов ELISA и иммуноблота для определения аутоантител против рековерина в сыворотке крови больных раком легких и показали, что метод ELISA неспецифичен, в то время как иммуноблот обладает необходимыми специфичностью и чувствительностью, достаточными для серийного анализа сыворотки крови больных раком легких на присутствие в них аутоантител против рековерина.

Паранеопластические (онконеуральные) антигены — белки, в норме высокоспецифичные для нервной системы, при злокачественной трансформации могут экспрессироваться также клетками раковой опухоли. При попадании в кровяное русло паранеопластические антигены индуцируют аутоиммунный процесс, в результате чего генерируются аутоантитела, которые, преодолевая гематотканевый барьер, вызывают

развитие того или иного паранеопластического неврологического синдрома [6].

Одним из паранеопластических антигенов является Ca<sup>2+</sup>-связывающий белок рековерин, который в норме присутствует в сетчатке глаза позвоночных [1] и ингибирует фосфорилирование зрительного пигмента родопсина [4,5,7]. При некоторых злокачественных опухолях, например при мелкоклеточной