

Эритроцитарный диагностикум для выявления опухолевого процесса

Л.А. Савлучинская¹, И.А. Бакулин², А.А. Молодык¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²компания «Б-Фарм»; Россия, 121309 Москва, ул. Баркляя, 13

Контакты: Людмила Александровна Савлучинская blood-research@yandex.ru

Предложен метод создания эритроцитарного диагностикума, в основе которого лежат данные патента №2452501 (от 10.06.2012) по способу получения сенситина из сыворотки жеребых кобыл, для использования этого фактора в качестве биомаркера для диагностики злокачественных новообразований. В целях выявления практической значимости предложенного диагностикума представлены результаты тестирования сыворотки крови 215 больных с опухолями различных локализаций и 67 лиц без злокачественных новообразований. Проведена оценка полученных результатов по общепринятым критериям для диагностических наборов. При этом чувствительность метода составила 88 %, специфичность – 89 %, точность – 89 %. Доступность и простота постановки реакции, а также быстрота получения ответа позволяют применять данный метод в условиях любого лечебного учреждения индивидуально или в процессе скрининга в целях определения предварительного диагноза, а также в мониторинге процесса лечения больного и раннем выявлении рецидива заболевания.

Ключевые слова: онкологическое заболевание, ранняя диагностика, сыворотка жеребых кобыл, эмбриоспецифический антиген, сывороточный фактор, первичный скрининг

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-99-103

Erythrocyte diagnosticum as used in revealing malignant process

L.A. Savluchinskaya¹, I.A. Bakulin², A.A. Molodyk¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Company "B-Pharm"; 13 Barklaya St., Moscow 121309, Russia

A method is proposed for the development of an erythrocyte diagnosticum based on the evidence of patent № 2452501 (10.06.2012) via development of sensitine obtained from the serum of mares in foal, the above factor being used for diagnosis of malignant neoplasms. In order to reveal the practical significance of the diagnosticum proposed the findings of the testing of the blood serum of 215 patients with variously located tumors and from 67 individuals without malignant tumors are analyzed. Sensitivity of the method was 88 %, specificity – 89 %, accuracy – 89 %. The accessibility of the method proposed and simplicity of the reaction as well as the rapid response make it possible to use the method under discussion in any medical institution individually or in the course of screening to obtain primary diagnosis or to reveal risk groups.

Key words: cancer, early diagnostic, serum of mares in foal, embryospecific antigen, serum factor, initial screening

Введение

Предложен метод, в основе которого лежат данные о способе получения из сыворотки жеребых кобыл соединения, проявляющего стимулирующую активность в отношении злокачественных клеток, и использования его в качестве маркера для сенсбилизации эритроцитов в диагностическом тесте в целях выявления опухолевого процесса [1]. Авторы исходили из широко известного факта антигенного соответствия между эмбриональными, малигнизированными и регенерирующими тканями: при неопластической трансформации обнаруживаются антигены, характерные для ранних этапов развития зародыша (эмбриональные или стадио-

специфические антигены) [2]. При развитии зародыша и процесса регенерации ткани это лишь кратковременный этап, который сменяется дальнейшими стадиями роста и дифференцировки [3]. Появление же эмбриональных антигенов в опухоли представляет собой процесс блокировки нормальной клеточной дифференцировки, что стабилизирует процессы пролиферации [2]. Выявление эмбриональных антигенов в биологических жидкостях или тканях организма делает их значимыми маркерами опухолевого процесса [4, 5]. Необходимо отметить, что перекрестные реакции эмбриональных антигенов наблюдаются независимо от видовой при-

надлежасти клеток, именно поэтому один из первых опухолеассоциированных антигенов — альфа-фетопро-теин — изначально идентифицирован в сыворотке кро-ви эмбриона мыши и в крысиных и мышинных гепато-мах, затем он был обнаружен при первичном раке печени человека. Выявлено большое количество опу-холеассоциированных антигенов, на основании кото-рых разработаны иммунодиагностические тесты, од-нако разница в содержании этих антигенов в опухолях и нормальных тканях носят не абсолютный, а количе-ственный характер [5]. Кроме того, считается, что один маркер не может обеспечить высокую точность диаг-ностики из-за гетерогенности опухоли и распростра-ненности воспалительных и доброкачественных за-болеваний [6]. В настоящее время используют мультимолекулярные тесты, результаты которых пока-зали значительное увеличение специфичности и прог-ностической ценности по сравнению с использо-ванием одного маркера [7]. Однако такой подход в диагностике не всегда и не везде доступен, поэтому поиск новых маркеров продолжается [8, 9]. Источником искомого нами специфического фактора, указываю-щего на наличие опухолевого процесса, служила сыво-ротка жеребых кобыл на ранних стадиях беременности.

Материалы и методы

В нашей работе для получения сенситина исполь-зовали сыворотку жеребых кобыл на 50–70-е дни бе-ременности. Фракционирование данной сыворотки проводили методом жидкостной хроматографии. Пос-ле пробных хроматографий с сефадексами G-50 и G-100 для дальнейшей работы выбран сефадекс G-50 с фосфатно-солевым буфером. Низкомолекулярные фракции в диапазоне 3000–15000 КД лиофилизиро-ваны для проверки пролиферативной активности в МТТ-тесте с культурами опухолевых клеток (кишеч-ника, яичников, молочной железы). Для пригото-вления эритроцитарного диагностикума фракциониро-вание проводили несколько раз в целях получения достаточного количества вещества.

Методика приготовления диагностикума. Формали-низированные эритроциты барана были отмыты физ-раствором и буфером, обработаны таннином, затем 4 % суспензия эритроцитов сенсibilизирована полученны-ми белковыми фракциями. Приготовлено несколько партий сенсibilизированных эритроцитов для отбора наиболее информативных в реакции с сыворотками больных и пациентов без онкологических заболеваний. Предварительный отбор и дальнейшее исследование по выявлению опухолевого процесса выполнялись на CELLSTAR 96 well cell Culture Plate V bottom.

Постановка реакции. Каждый ряд плашки (8 лунок) занимает одна тестируемая сыворотка, фактор разведе-ния, начиная со 2-й лунки — 1:2. Последовательные тестовые образцы имеют уменьшающуюся в 2 раза концентрацию сыворотки крови (от 1/20 до 1/2560). Затем в каждую лунку добавляют суспензию сенсibil-

лизированных эритроцитов и оставляют на 3–4 ч для проявления реакции агглютинации. Сенситин, сенсibilизированный на эритроцитах, реагирует с фактором, являющимся посредником или самим белком, вызывающим реакцию пролиферации. Если его количество велико, то реакция агглютинации про-исходит при высоких разведениях сыворотки, если нет — эритроциты оседают в первых лунках, так как их ничто не связывает. Чтобы определить «шкалу», т. е. разведения сыворотки, вызывающие реакцию аг-глютинации, мы провели предварительное тестирова-ние сыворотки 10 здоровых лиц и 10 больных с опухо-лями (рак толстой кишки, яичников, легкого). Наличие опухолевого процесса определяется при ре-акции агглютинации, соответствующей разведению сыворотки не менее 1:320 (разведение 1:160 можно считать пограничным).

Специфичность, чувствительность и точность ме-тода определяли по общепринятым формулам. Чувст-вительность рассчитывается как

$$a / (a + b) \times 100,$$

где a — положительный ответ в группе больных, b — отрицательный ответ в этой группе. Специфичность

$$c / (c + d) \times 100,$$

где c — отрицательный ответ в группе здоровых лиц, d — положительный ответ в этой группе. Точность

$$(a + c) / (a + b + c + d) \times 100.$$

Результаты

В целях подтверждения возможности использова-ния диагностикума для обнаружения опухолевого про-цесса нами протестированы сыворотки крови 215 пер-вичных больных с подозрением на наличие злокачественного процесса. В дальнейшем при клини-ческом обследовании этих пациентов диагноз был подтвержден. В качестве контроля протестированы образцы сыворотки крови пациентов без выявленных злокачественных новообразований. Полученные дан-ные представлены в табл. 1.

Таким образом, с учетом положительных и отри-цательных ответов точность метода составила 89 %.

Данные клинически установленных гистологиче-ских типов опухолей у тестируемых больных и наличие отрицательного ответа в сыворотке крови у этой груп-пы приведены в табл. 2.

Мы проанализировали полученные результаты в зависимости от гистологического типа опухолей. Интересно, что в группе больных раком яичников при гистологическом диагнозе эндометриозной аденокарциномы положительный ответ отмечен у всех 18 пациентов, в то время как при серозном раке у 2 из 8 больных реакция оказалась отрицатель-ной (75 % выявлений). Из 9 больных с диагнозом пигментной эпителиоциточной меланомы отрица-тельный ответ получен у 1 пациента (89 % выявле-ний), из 6 больных беспигментной меланомой — у 2 (67 % выявлений).

Таблица 1. Результаты тестирования сыворотки крови онкологических больных и здоровых лиц

Диагноз	Число пациентов	Положительный ответ	Отрицательный ответ	Процент выявления опухолей
<i>Онкологические больные</i>				
Рак мочевого пузыря	15	12	3	80
Рак матки	28	26	2	90
Рак молочной железы	30	27	3	90
Меланома	15	12	3	80
Рак желудка	18	17	1	94
Рак толстой кишки	34	31	3	81
Рак легкого	30	26	4	85
Рак яичников	26	24	2	90
Рак поджелудочной железы	19	16	3	84
<i>Всего</i>	<i>215</i>	<i>191</i>	<i>24</i>	<i>88</i>
<i>Здоровые лица (специфичность – 89 %)</i>				
Онкологические заболевания не выявлены	67	7 (у 2 из них пограничный процесс)	60	–

Таблица 2. Клинически установленные гистологические типы опухолей у больных и наличие отрицательного ответа в сыворотке крови у этой группы пациентов

Диагноз	Гистологический тип опухоли	Число пациентов	Отрицательный ответ
Рак мочевого пузыря	Переходно-клеточный рак	12	3
	Аденокарцинома	3	0
Рак матки	Железистосолитарный рак	16	0
	Высокодифференцированный железистый рак	12	2
Рак молочной железы	Инфильтративный протоковый рак	10	0
	Инфильтративный дольковый рак	20	3
Меланома	Пигментная эпителиоклеточная	9	1
	Беспигментная	6	2
Рак желудка	Высокодифференцированная аденокарцинома	11	1
	Умеренно-дифференцированная аденокарцинома	7	0
Рак толстой кишки	Высокодифференцированная аденокарцинома	27	3
	Низкодифференцированная аденокарцинома	7	0
Рак легкого	Плоскоклеточный рак	17	2
	Аденокарцинома	11	2
	Мелкоклеточный рак	2	0
Рак яичников	Эндометриозная аденокарцинома	18	0
	Серозный рак	8	2
Рак поджелудочной железы	Высокодифференцированная аденокарцинома	14	2
	Нейроэндокринный рак	5	1

Следует отметить, что при раке легкого, молочной железы и толстой кишки четкой зависимости между выявлением и гистологическим типом опухоли не зафиксировано. Также мы не обнаружили зависимости в отношении опухолей различной степени дифференцировки. Так, при раке толстой кишки высокодифференцированная аденокарцинома диагностирована у 27 больных (отрицательных — 3; 89 % выявлений), низкодифференцированная аденокарцинома — у 7 (отрицательных — 0). Ввиду небольших выборок эти факты требуют дальнейшего исследования, особенно в отношении рака яичников и меланомы.

Заключение

В последние годы внимание исследователей привлечено к изучению ауто-/паракринных факторов роста, их рецепторов и некоторых нижележащих сигнальных белков, а также к выявлению их роли в качестве ауто-/паракринного регулятора в развитии и течении злокачественных опухолей [10, 11]. Считается, что в основе способности опухоли к неограниченному автономному росту лежат эффекты факторов роста, продуцируемых различными компонентами тканей, взаимодействующих со специфическими трансмембранными рецепторами и связывающие эти факторы белками крови (так называемая сигнальная система), стимулируя в результате последующей сложной цепи событий клеточное деление. К настоящему времени выявлено несколько десятков различных факторов роста. Система реализации эффектов факторов роста включает рецепторы и связывающие белки, которые образуют сложно регулируемую сеть взаимодействия как между собой, так и с другими биологическими регуляторами роста и выживания клеток. Противоречивость и неоднозначность результатов

исследования роли компонентов сигнальных систем в патогенезе опухолей человека отражают сложность взаимоотношений между механизмами регуляции нормального роста клеток и канцерогенеза.

Наиболее изученными и клинически реализованными являются сигнальная система с участием рецептора эпидермального фактора роста и родственных ему рецепторов, а также сигнальная система инсулиноподобных факторов роста 1 и 2 их трансмембранные рецепторы и связывающие факторы роста белки. В целом анализ экспрессии рецепторов факторов роста, их лигандов, а также активности нижележащих сигнальных путей становится в настоящее время неотъемлемой составляющей комплексного обследования онкологического больного, необходимого для разработки и тактики лечения.

В нашей работе представлен эритроцитарный диагностикум, для приготовления которого использован сывороточный фактор (сенситин), выделенный из сыворотки жеребых кобыл на ранних стадиях беременности. Используемый нами сенситин, очевидно, можно отнести к ауто-/паракринным факторам роста. Положительный ответ, полученный у пациентов с наличием злокачественных опухолей, указывает на присутствие у этих больных компонентов сигнальной системы, стимулирующей развитие опухолевого процесса, но идентификация данного фактора роста и выявление компонентов сигнальной системы требуют дальнейших углубленных исследований.

Тестирование сыворотки крови 215 онкологических больных и 67 лиц с отсутствием злокачественных заболеваний, показавшее высокую точность (89 %) эритроцитарного диагностикума, а также доступность и простота метода позволяют рекомендовать его для использования в лечебных учреждениях в целях раннего обнаружения опухолевого процесса.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Патент РФ № 2452501 (дата публикации 10.06.2012). Патентообладатели: Балюра А.В., Молодык А.А., Савлучинская Л.А., Тарасов С.Г. [Patent of Russian Federation No. 2452501 (publication date 10.06.2012). Patentees: Balyura A.V., Molodyk A.A., Savluchinskaya L.A., Tarasov S.G. (In Russ.)].
2. Косяков П.Н., Косякова Н.П. Антигены опухолей человека. М.: Медицина, 1985. 270 с. [Kosyakov P.N., Kosyakova N.P. Antigens of human tumors. Moscow: Meditsina, 1985. 270 p. (In Russ.)].
3. Fiher B., Gunduz N., Coyle J. et al. Presence of growth stimulating factor in serum-following primary tumor removal in mice. *Cancer Res* 1989;49(8):1996–2001.
4. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Любимов Н.В. Биологические маркеры опухолей: методические аспекты и клиническое применение. Вестник Московского онкологического общества 2007;1. [Kushlinskiy N.E., Gershteyn E.S., Lyubimov N.V. Biological markers of tumors: methodical aspects and clinical application. *Vestnik Moskovskogo onkologicheskogo obshchestva = Bulletin of the Moscow Cancer Society* 2007;1. (In Russ.)].
5. Сергеева Н.С., Маршутина Н.В. Серологические маркеры опухолей. В кн.: Онкология. Национальное руководство. Под ред. В.И. Чисова, М.И. Давыдова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. С. 8–26. [Sergeeva N.S., Marshutina N.V. Serological tumor markers. In book: *Oncology. National leadership*. Eds.: V.I. Chisov, M.I. Davydov. Moscow: GEOTAR-Media, 2008. Pp. 8–26. (In Russ.)].
6. Marusyk A., Almendro V., Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 2012;12(5):323–34.
7. Prior C.C., Guillen Grima F., Robles J.E. et al. Use of a combination of biomarkers in serum and urine to improve detection of prostatic cancer. *World Urol* 2010;28(6):681–6.
8. Mäbert K., Cojoc M., Peitzsch C. et al. Cancer biomarker discovery: current status and future perspectives. *Int J Radiat Biol* 2014;90(8):659–77.
9. Teng P.N., Bateman N.W., Hood B.L., Comads T.P. Advances in proximal fluid proteomics for disease biomarker discovery. *J Proteome Res* 2010;9(12):6091–100.
10. Доненко Ф.В., Кабиева А.О., Эфферт Т.Ф. Сывороточные опухолевые специфические факторы — необходимое условие роста опухоли в организме. Клиническая лабораторная диагностика 2013;(10):13–5. [Donenko F.V.,

Kabieva A.O., Effert T.F. Serum tumor-specific factors are a necessary condition for tumor growth in the body. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics* 2013;(10):13–5. (In Russ.).

11. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Факторы роста, их рецепторы и нижележащие сигнальные белки: от эксперимента к клинике. *Успехи молекулярной онкологии* 2014;(1):27–35. [Gershteyn E.S., Kushlinskiy N.E.

Growth factors, their receptors and downstream signaling proteins in human tumors: from experiment to clinical practice. *Uspexhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2014;(1):27–35. (In Russ.).