

АЛОГЕННИЙ СКРИНІНГ ПУХЛИНОАСОЦІЙОВАНИХ АНТИГЕНІВ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ

О. І. Костянець^{1,2}

М. А. Шиян^{1,2}

С. В. Антонюк³

С. В. Демидов²

В. В. Філоненко¹

Р. Г. Кіямова¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка

³Дніпропетровська міська клінічна лікарня № 4

E-mail: kostjanez@ukr.net

Отримано 16.05.2012

Рак молочної залози є найпоширенішою формою злоякісних новоутворень у жінок. Попри впровадження скринінгових програм з мамографії діагностування цієї патології залишається недостатньо ефективним, тому існує потреба в пошуку нових діагностичних біомаркерів раку молочної залози. Такими біомаркерами можуть слугувати пухлиноасоційовані антигени та автоантитіла до них, що мають низку переваг порівняно з іншими біологічними молекулами, і їх можна використовувати для діагностики та прогнозу ракових захворювань.

У цьому дослідженні ми охарактеризували в алогенному скринінгу за допомогою імуноензимного аналізу рекомбінантні аналоги пухлиноасоційованих SEREX (Serological identification of antigens by recombinant expression cloning)-антигенів із застосуванням сироваток пацієнтів з різними типами пухлин молочної залози та сироваток здорових донорів. Виявлено комбінацію антигенів, яка може бути використана для подальших досліджень в контексті створення тест-систем з метою ідентифікації профілів автоантитіл для діагностики раку молочної залози.

Ключові слова: пухлиноасоційований антиген, автоантитіло, рак молочної залози.

Рак молочної залози — найбільш поширений тип раку серед жінок. Згідно з даними проекту GLOBOCAN Міжнародного центру досліджень ракових захворювань, у 2008 р. у світі було виявлено 1,38 млн. (23% всіх пухлин у жінок) нових випадків цього захворювання [1]. Пухлини молочної залози з високим ступенем злоякісності, швидкою проліферацією і відповідно асоційовані з високою смертністю часто присутні як інтервальні пухлини, що не виявляються поточними скринінговими методами, зокрема мамографією [2]. З огляду на це сьогодні існує необхідність створення і розроблення альтернативних методів для поліпшення діагностики та прогнозу раку молочної залози [3].

Упродовж останніх кількох років дослідження в цій галузі були спрямовані передусім на пошук сироваткових біомаркерів раку, які можна було б використовувати в ранній та диференційній діагностиці злоякісних і доброякісних пухлин та для моніторингу і прогнозування раку молочної за-

лози [4–7]. Було ідентифіковано й досліджено такі біомаркери раку молочної залози, як CA15-3 [5, 8, 9], CA 27.29 [10], HER2/*neu* [4, 9], p53 [6, 7], *c-myc* [4], HSP60 [11], BRCA1 та BRCA2 [12]. Однак біомаркерами онкопатологій можуть також слугувати автоантитіла до пухлиноасоційованих антигенів (ПАА) [13, 14]. Випадки виявлення специфічних автоантитіл при злоякісних новоутвореннях було описано ще в 70-х рр. минулого століття [15]. Вважають, що автоантитіла, як правило, спрямовані проти мутантних, модифікованих, аберантно експресованих протеїнів [16, 17] і їх можна розглядати як імунологічні «репортери», які можуть розкрити молекулярні механізми, що лежать в основі розвитку і/чи прогресування пухлин [13,14].

Автоантитіла мають низку переваг порівняно з іншими сироватковими біомаркерами. Зокрема, вони можуть з'являтися за кілька місяців чи навіть років до того, як вихідну пухлину можна виявити, є надзвичайно

стабільними молекулами, здатні персистувати протягом тривалого періоду часу і їх можна легко виявити існуючими на сьогодні методами [18]. Однак попри це автоантитіла до відповідних ПАА за онкопатологій виявляють у невеликого відсотка хворих [18]. Саме тому було зроблено спробу об'єднати кілька ПАА в єдину панель з метою ідентифікації специфічних профілів (сигнатур) автоантитіл для діагностування різних типів раку: сечового міхура [19], простати [20], яєчників [21], печінки [22], підшлункової залози [21], легень [23] та молочної залози зокрема [24–30]. Слід наголосити, що більшість створених на сьогодні антигенних панелей, як правило, складаються з уже добре відомих ПАА, зокрема до антигенних панелей раку молочної залози входять p53 [24–27], c-мус [24, 27, 28], MUC1 [24, 25, 29], HER2 [24, 25], сурвівін [26, 27, 30] та ін. Однак жодна зі створених на сьогодні панелей антигенів раку молочної залози не має достатньої чутливості та специфічності і не може бути використана для діагностики цього захворювання. Тому важливим напрямом досліджень є пошук нових антигенів раку молочної залози і створення на їх основі чутливіших діагностичних панелей. Більш того, об'єднання декількох різних антигенних панелей для діагностики раку молочної залози в одну чи/ї пошук оптимальних поєднань антигенів, які до них входять, допоможе створити ефективну тест-систему для неінвазивної діагностики раку молочної залози, яка б доповнювала існуючі діагностичні методи.

Метою нашої роботи було охарактеризувати в алогенному скринінгу з використанням сироваток хворих з різними типами пухлин молочної залози антигени, які було ідентифіковано за допомогою методу SEREX (Serological identification of antigens by recombinant expression cloning), та оцінити можливість їх використання у вигляді панелі антигенів для діагностики раку молочної залози. У ході попередніх досліджень, пов'язаних з вивченням антигенного репертуару медулярної карциноми молочної залози методом SEREX, нами було ідентифіковано 41 автоантиген, потенційно асоційований із цим типом раку [31]. У цій роботі ми протестували в гетерологічному скринінгу за допомогою імуноензимного аналізу (ІЕА) 16 афінноочищених рекомбінантних антигенів медулярної карциноми молочної залози та інших типів раку з використанням сироваток пацієнтів з різними типами пухлин молочної залози (n = 132) та сироваток здоро-

вих донорів (n = 35). Це дало змогу виявити нові антигени, асоційовані з раком молочної залози, і запропонувати антигенну панель, яка має високий діагностичний потенціал і може бути застосована для ідентифікації сигнатур автологічних антитіл з метою діагностики раку молочної залози.

Матеріали і методи

Зразки сироваток крові пацієнтів. У дослідженнях використовували сироватки онкохворих та здорових донорів, які були надані Дніпропетровською міською клінічною лікарнею № 4. Зразки сироваток відбирали шляхом стандартної флеботомії без застосування антикоагулянта. Зразки тримали за кімнатної температури протягом 1 год до утворення згустку, потім їх центрифугували протягом 15 хв при 2 500 об/хв. Сироватки відбирали, розводили гліцеролом у співвідношенні 1:1, розділяли на аліквоти і зберігали при –20 °С. Диференційний діагноз пацієнтам було встановлено після пункційної біопсії на основі гістологічного та імуногістохімічного аналізу пухлин (Міська клінічна лікарня № 4, Дніпропетровськ) (табл. 1).

Клонування, експресія та очищення рекомбінантних антигенів. Специфічні комплементарні ДНК генів ANKRD11, RAD50, FAM50A, LGal3BP, HMGN2, LRRFIP1, PABPC4, PARD3, PDCL, RBPJ, SAP30BP, SPP1, TOP2B, ізольованих із кДНК бібліотеки медулярної карциноми молочної залози, було клоновано у вектори для експресії в клітинах бактерій pGEX4T3, pET28b, pET42b, що містили у своєму складі послідовність глутатіон-S-трансферази (GST), 6His та GST-6His відповідно. Рекомбінантні плазміди pET23d/NY-CO-58, pET23d/NY-BR-62 та pET24d/NY-BR-1 було люб'язно надано проф. Dirk Jager (Національний центр пухлинних захворювань, Гайдельберг, Німеччина) та д-ром Matthew J. Scanlan (Людвігський інститут ракових досліджень, Нью-Йорк, США). Рекомбінантні антигени було синтезовано в клітинах *E. coli* BL21(DE3) pLysE, які вирощували в середовищі Лурія–Бертрані (LB), з відповідним антибіотиком та 0,5 мМ ізопропіл-β-D-1-тіоґалактопіранозиду. Протеїни очищали методом афінної хроматографії з використанням GST-сефарози та Ni-NTA-агарози відповідно до інструкцій виробника. Антигени RAD50, LRRFIP1, RBPJ та SPP1 експресувались і накопичувались у вигляді тілець включення. Для підвищення чистоти цих протеїнів, тільця включення відмивали перед процеду-

Таблиця 1. Відомості про пацієнтів та осіб контрольної групи

Контрольна група	
Кількість осіб	35
Середній вік + СВ (роки)	39,2±12,56
Віковий діапазон	17–60
Пацієнти	
Кількість осіб	132
Середній вік + СВ (роки)	51,49±17,2
Віковий діапазон (роки)	19–82
Тип пухлини:	
– Інвазивна карцинома протоків	80
– Інвазивна карцинома часточок	23
– Медулярна карцинома	9
– Фібroadенома	20
Пухлини з різним ступенем злоякісності (% від загального)	1 ст. — 7,3% 2 ст. — 33,9% 3 ст. — 59,8%
ER статус (%)	52
Позитивні	71,1
Негативні	28,9
PR статус (%)	52
Позитивні	61,5
Негативні	38,5
HER-2/neu статус (%)	52
Позитивні	30,8
Негативні	69,2
Статус лімфатичних вузлів (% позитивних)	28,8

Примітка. СВ — стандартне відхилення, ER — естрогеновий рецептор, PR — прогестероновий рецептор.

рою очищення протеїну за протоколом Yang [32]. Чистоту антигенів було перевірено як із застосуванням натрійдодецилсульфатного поліакриламідного гель-електрофорезу (фарбування Кумассі), так і за допомогою вестерн-блотингу з відповідними мишачими моноклональними антитілами до GST (отримані у відділі сигнальних систем клітини ІМБГ НАНУ) та 6His (Abcam, Великобританія).

Імуноензимний аналіз. Детекцію автоантитіл проводили за допомогою ІЕА з використанням 96-лункових плашок (Sarstedt, США). Рекомбінантні GST, GST-6His-, 6His-злиті антигени вносили в лунки в концентрації 3 мкг/мл у фосфатному буфері, рН 7,4 (3,2 mM Na₂HPO₄; 0,5 mM KH₂PO₄; 1,3 mM KCl; 135 mM NaCl), сорбцію проводили упродовж ночі за +4 °С. Плашки промивали

фосфатним буфером з 0,1% -м Твіном, з наступним блокуванням зв'язувальних сайтів фосфатним буфером з 0,1% -м Твіном та з 5% -м гідролізатом казеїну (USB, США) протягом 2 год при 37 °С. Зразки сироваток (у розведенні 1:100 у фосфатному буфері з 0,5% -м гідролізатом казеїну) вносили в повторах по 100 мкл на лунку та інкубували впродовж 90 хв за 37 °С. Після чотирьох промивань додавали антитіла до Fc-фрагмента IgG людини, кон'юговані з пероксидазою хрому (Jackson Immuno Research, США) у розведенні 1:10⁴ у фосфатному буфері з 1% -м гідролізатом казеїну й інкубували протягом 1 год при 37 °С. Після промивання додавали 100 мкл хромогенного субстрату АБТС (2,2'-азинодіетилбензотіазолінсульфонова кислота) (Sigma, США) та інкубували впродовж 30 хв за 37 °С. Оптичну густину (ОГ) вмісту лунок визначали при А₄₁₀ за допомогою спектрофотометра Мультискан (Labsystems, США).

Для нормалізації даних оптичної густини досліджуваних сироваток стосовно GST-та GST-6His-злитих протеїнів вводили коефіцієнт нормалізації k, який визначали, контролюючи кількість адсорбованих GST (GST-6His) та GST-злитих (GST-6His-злитих) протеїнів за допомогою мишачих моноклональних антитіл проти GST (отримані у відділі сигнальних систем клітини ІМБГ НАНУ), з наступним використанням вторинних антитіл до Fc-фрагмента IgG миші, кон'югованих з пероксидазою хрому (Jackson ImmunoResearch, США). Коефіцієнт k обчислювали за формулою:

$$k = \frac{ОГ_{GST(чи GST-6His)}}{ОГ_{GST-злитого протеїну (чи GST-6His-злитого протеїну)}}$$

Реактивність досліджуваних сироваток щодо рекомбінантних антигенів, які містили GST чи GST-6His, визначали за формулою:

$$ОГ \text{ зразка} = [ОГ_{GST-злитий протеїн (чи GST-6His-злитий протеїн)}, \text{ сироватка} \times (k) - ОГ_{GST(чи GST-6His)}, \text{ сироватка}] \cdot$$

Статистична обробка даних. Систематизацію та оброблення первинних даних здійснювали в програмі Excel (Microsoft Office, 2007). Зразки сироваток вважали позитивними, якщо показник їхньої ОГ перевищував порогове значення (cut-off), яке розраховували як середнє значення контрольних сироваток з додаванням трьох стандартних відхилень (СВ). Статистичний аналіз проводили з використанням програмного статистичного пакета для соціальних наук версії 17.0 (SPSS, США). Статистичну перевірку даних на нормальність здійснювали за допомогою критерію Шапіро-

Уїлкса, перевірку гіпотез стосовно достовірності відмінностей в досліджуваних групах — з використанням критерію Пірсона (χ^2). Для визначення діагностичної цінності окремих антигенів та їх панелей застосовували логістичну регресію і ROC-аналіз (Receiver Operating Characteristic). Якість діагностичних маркерів визначали за експертною шкалою значень AUC (Area Under Curve) [33].

Результати та обговорення

Антигени, відібрані для аналізу в серологічному алогенному скринінгу. У цій роботі за допомогою ІЕА було протестовано в гетерологічному скринінгу 16 афінноочищених рекомбінантних антигенів, ідентифікованих раніше в серологічному скринінгу кДНК-бібліотек медулярної карциноми молочної залози, раку молочної залози та колоректального раку. Дванадцять антигенів із 16 (RAD50, FAM50A, LGal3BP, HMG2, PARD3, SAP30BP, ANKRD11, SPP1, PDCL, PABPC4, RBPJ, LRRFIP1) мали пухлиноасоційований серологічний профіль і були відібрані на основі результатів попереднього фагового алогенного скринінгу 41 антигену медулярної карциноми молочної залози, ідентифікованого методом SEREX [31]. Ще один потенційний антиген медулярної карциноми молочної залози — TOP2B — було залучено до подальших досліджень, оскільки він є перспективним потенційним пухлинним маркером, зважаючи на його функціональну роль у клітині й той факт, що він виступає в ролі молекулярної мішені для деяких протипухлинних препаратів [34, 35]. Окрім вищезазначених антигенів ми включили до скринінгу 3 відомі автоантигени, асоційовані з раком молочної залози (NY-BR-1 [36], NY-BR-62 [37]) та колоректальним раком (NY-CO-58 [38]), що були ідентифіковані D. Jager і M. Scanlan у ході серологічного скринінгу кДНК бібліотек із відповідних пухлин.

Далі кДНК всіх 16 зазначених антигенів клонували в плазмідні вектори, експресовані в бактеріях (дані не наведено), а їхні афінноочищені рекомбінантні продукти (повнорозмірні протеїни чи пептидні фрагменти) було використано як антигени в ІЕА (табл. 2). Рекомбінантні протеїни різної молекулярної маси проаналізували в гетерологічному скринінгу з використанням сироваток пацієнтів з інвазивною карциномою протоків (n = 80), інвазивною карциномою часточок (n = 23), медулярною карциномою (n = 9), фіброаденомою молочної залози (n = 20) та здорових донорів (n = 35).

Таблиця 2. Антигени, що їх було включено до серологічного скринінгу

Антиген	NCBI посилення (номер послідовності)	Фрагмент ДНК, п. о.	Вектор
ANKRD11	NM_013275.4	951–1811	pGEX4T3 (GST-tag)
RAD50	NM_005732.2	2552–3374	pET28b (6His-tag)
FAM50A	NM_004699.1	76–1095	pGEX4T3 (GST-tag)
LGal3BP	NM_005567.2	1483–1686	pGEX4T3 (GST-tag)
HMG2	NM_005517.3	191–463	pGEX4T3 (GST-tag)
LRRFIP1	NM_004735.2	417–1804	pET28b (6His-tag)
PABPC4	NM_003819.2	927–3052	pET28b (6His-tag)
PARD3	NM_019619.2	714–1416	pGEX4T3 (GST-tag)
PDCL	NM_005388.3	97–1002	pET28b (6His-tag)
RBPJ	NM_203284.1	492–1850	pET28b (6His-tag)
SAP30BP	NM_013260.6	67–981	pGEX4T3 (GST-tag)
SPP1	NM_000582.2	166–1068	pET42b (GST-6His-tag)
TOP2B	NM_001068.2	2383–4866	pGEX4T3 (GST-tag)
NY-BR-1	NM_052997.2	–	pET24d (6His-tag)
NY-BR-62	NM_020242.2	1–451	pET23d (6His-tag)
NY-CO-58	NM_006845.3	194–648	pET23d (6His-tag)

Дослідження частоти виявлення антитіл у сироватках хворих з різними типами пухлин молочної залози. У табл. 3 подано результати алогенного скринінгу досліджуваних антигенів. Позитивними за відповіддю антитіл вважали сироватки, числове значення ОГ яких за результатами ІЕА перевищувало середнє значення відповіді антитіл у сироватках здорових донорів плюс три стандартних відхилення. Для оцінювання статистично достовірної частоти виявлення позитивної відповіді антитіл у сироватках хворих порівняно із сироватками здорових донорів в ІЕА ми застосували критерій Пірсона (χ^2). Частота виявлення антитіл до будь-якого з досліджуваних пухлиноасоційованих антигенів у сироватках онкохво-

рих варіювала від 0 до 21,7%. Зі 112 сироваток пацієнтів зі злоякісними пухлинами молочної залози, які було проаналізовано, 62,5% мали антитіла щонайменше до одного з 16 антигенів, з-поміж 20 сироваток пацієнтів з доброякісними новоутвореннями цей показник становив 55% порівняно з 28,6% у сироватках контрольної групи.

Частота позитивної відповіді на окремі антигени значно варіювала в різних групах. У сироватках пацієнтів зі злоякісними пухлинами було виявлено достовірно вищу частоту антитіл до 5 антигенів: RAD50, NY-CO-58, PARD3, SAP30BP та SPP1. При цьому профіль антитіл до зазначених антигенів варіював у сироватках хворих з різними гістотипами пухлин: за інвазивної карциноми протоків виявлено антитіла до RAD50, NY-CO-58, PARD3, SAP30BP, SPP1; за медулярної карциноми молочної залози — до SAP30BP та SPP1; за інвазивної карциноми часточок — до PARD3 та SAP30BP. Окрім того, достовірно вищу частоту антитіл було виявлено проти антигену NY-BR-62, однак лише у хворих з інвазивною карциною часточок. До решти антигенів у цій групі не було встановлено достовірно вищої частоти

антитіл, асоційованої з раком. У групі хворих з фіброаденомою було виявлено достовірно вищу частоту антитіл до антигенів RAD50, NY-BR-62 та RBPJ. Слід зазначити, що до двох із 16 антигенів (RAD50, NY-BR-62) фіксували достовірно вищу частоту антитіл як у хворих з доброякісними пухлинами молочної залози, так і зі злоякісними, а до антигену RBPJ — виключно у хворих з фіброаденомою.

Проти деяких антигенів частота відповідей у сироватках хворих була значно вищою, порівняно з іншими антигенами. Зокрема антитіла до RAD50 було виявлено у 20% сироваток пацієнтів з фіброаденомою та у 18,8% хворих з інвазивною карциною протоків; до SPP1 — у 33,3% пацієнтів з медулярною карциною та у 18,8% пацієнтів з інфільтруючою карциною протоків; антитіла до PARD3 — у 21,7% хворих з інвазивною карциною протоків; до NY-BR-62 — у 20% пацієнтів з фіброаденомою. Реактивність сироваток здорових донорів проти досліджуваних антигенів була низькою і варіювала від 0 до 5,7%.

Ми провели аналіз частоти виявлення антитіл з урахуванням ступеня злоякісності

Таблиця 3. Частота виявлення автоантитіл до 16 пухлиноасоційованих антигенів у пацієнтів з різними типами пухлин молочної залози

Антигени	Кількість позитивних сироваток ^a , n (%)					
	ЗД ^b (n = 35)	К ^b (n = 112)	МК ^b (n = 9)	ІКП ^b (n = 80)	ІКД ^b (n = 23)	ФА ^b (n = 20)
ANKRD11	1 (2,9)	3 (2,7)	0	2 (2,5)	1 (4,3)	0
RAD50	0	18 (16,1)*	1 (11,1)	15 (18,8)*	2 (8,7)	4 (20)*
FAM50A	1 (2,9)	4 (3,6)	0	4 (5)	0	2 (10)
LGal3BP	0	8 (7,1)	0	6 (7,5)	2 (8,7)	2 (10)
HMG2	1 (2,9)	7 (6,3)	0	5 (6,3)	2 (8,7)	2 (10)
LRRFIP1	1 (2,9)	1 (0,9)	0	1 (1,3)	0	0
NY-BR-1	0	5 (4,5)	0	4 (5)	1 (4,3)	1 (5)
NY-BR-62	1 (2,9)	14 (12,5)	0	8 (10)	6 (26,1)*	4 (20)*
NY-CO-58	1 (2,9)	17 (15,2)***	2 (22,2)	13 (16,3)**	2 (8,7)	2 (10)
PABPC4	1 (2,9)	4 (3,6)	0	3 (3,8)	1 (4,3)	0
PARD3	1 (2,9)	17 (15,2)***	0	12 (15)**	5 (21,7)*	1 (5)
PDCL	2 (5,7)	7 (6,3)	1 (11,1)	6 (7,5)	0	0
RBPJ	0	8 (7,1)	0	5 (6,3)	3 (13)	3 (15)*
SAP30BP	0	17 (15,2)**	2 (22,2)*	12 (15)**	3 (13)*	1 (5)
SPP1	1 (2,9)	19 (17,1)***	3 (33,3)*	15 (18,8)**	1 (4,3)	2 (10)
TOP2B	0	2 (1,8)	0	2 (2,5)	0	1 (5)
N	10 (28,6)	70 (62,5)***	6 (66,7)	49 (61,25)**	15 (65,2)**	11 (55)

Примітки: ^a — порогове значення — середнє значення плюс ЗСВ у групі здорових донорів;

^bЗД — здорові донори; К — карцинома; МК — медулярна карцинома; ІКП — інвазивна карцинома протоків; ІКД — інвазивна карцинома часточок; ФА — фіброаденома. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

N — кількість позитивних сироваток, в яких було виявлено антитіла хоча б до одного з досліджуваних антигенів.

пухлин пацієнтів, сироватки яких використовували в дослідженні. Зі 112 пацієнтів з карциномою молочної залози, сироватки яких було взято для дослідження, лише для 82 був відомий ступінь злоякісності пухлин. В аналіз було залучено лише 6 антигенів, частота виявлення антитіл до яких була достовірно вищою в сироватках пацієнтів зі злоякісними пухлинами молочної залози порівняно зі здоровими донорами ($P < 0,05$): RAD50, NY-BR-62, NY-CO-58, PARD3, SAP30BP, SPP1 (табл. 4). Для антигенів RAD50 та SPP1 спостерігалась тенденція зменшення частоти антитіл за збільшення ступеня злоякісності пухлини. До антигенів NY-CO-58, SAP30BP антитіла виявлено лише у пацієнтів з пухлиною 2- та 3-го ступеня злоякісності, до антигену NY-BR-62 — у всіх пацієнтів незалежно від ступеня злоякісності пухлин, а до антигену PARD3 — лише у пацієнтів з пухлинами 3-го ступеня злоякісності. Попри те, що нами було виявлено достовірно вищу частоту антитіл порівняно з контрольною групою у хворих з пухлинами різного ступеня злоякісності до деяких антигенів, зокрема RAD50, SPP1 та SAP30BP, порівнюючи частоту виявлення антитіл у хворих з різними ступенями злоякісності, ми, однак, не встановили достовірної різниці. Також, не було виявлено кореляції між наявністю метастазів, статусом ER, PR, HER-2/neu пухлин хворих та присутністю автоантитіл для жодного з досліджуваних пухлиноасоційованих антигенів (дані не наведено).

Аналіз даних літератури стосовно шести відібраних у результаті алогенного скринінгу антигенів показав, що достовірно вищу частоту виявлення автоантитіл у онкохворих до антигенів PARD3, RAD50 та SAP30BP нами було показано вперше. Серед них асоціацію з раком було описано в літературі лише для антигенів PARD3 та RAD50. PARD3 бере участь у встановленні апікально-базальної полярності клітин і спрямованій передньо-задній міграції клітин уздовж колагену. Експресія цього протеїну значно нижча в первинних пухлинах стравоходу порівняно з нормальною тканиною [39]. RAD50 бере участь у репарації дволан-

цюгових розривів ДНК [40]. Було показано, що мутації, які призводять до інактивації гена RAD50, підвищують схильність до розвитку пухлин підшлункової та молочної залоз [41].

Функції та профіль експресії антигену SAP30BP на сьогодні лишаються невідомими. Отримані нами дані можуть опосередковано свідчити про потенційну асоціацію цих трьох протеїнів з раком, що робить їх перспективними об'єктами для подальших досліджень.

За даними літератури, імуногенність антигенів NY-BR-62, NY-CO-58 та SPP1 вже було досліджено в сироватках онкохворих з різними типами раку. Одержані нами результати щодо підвищеної частоти автоантитіл проти цих антигенів частково узгоджуються з даними інших дослідників. Зокрема до антигену NY-BR-62, за даними M. Scanlan і співвавт., автоантитіла було виявлено у 2 з 25 (8%) пацієнтів з раком молочної залози [37], а до NY-CO-58 — у 3 із 74 (4%) сироваток пацієнтів з колоректальним раком [38]. Натомість, за нашими даними ці антигени є більш імуногенними і реагували з 14 зі 112 (12,5%) та із 17 зі 112 (15%) сироваток хворих з карциномою молочної залози відповідно. Крім того, антигени NY-BR-62 та NY-CO-58 реагували і з сироватками пацієнтів з доброякісними пухлинами молочної залози. Для антигену SPP1, який є секреторним протеїном і асоційований з багатьма типами раку [42–44], було показано підвищення сироваткового рівня автоантитіл у 19 із 29 (66%) хворих на рак простати [45].

Таким чином, у результаті проведеного гетерологічного скринінгу 16 рекомбінантних пухлиноасоційованих антигенів сироватками хворих на рак молочної залози та здорових донорів нами було знайдено 6 антигенів, частота виявлення автоантитіл до яких була достовірно вищою в сироватках хворих порівняно зі здоровими донорами. Більш того, імунореактивність цих антигенів відрізнялась у пацієнтів з пухлинами різного ступеня злоякісності. Це спостереження може бути важливим для диференціальної діагностики і оцінки прогнозу захворювання.

Таблиця 4. Імунореактивність антигенів із сироватками пацієнтів, що мали пухлини різного ступеня злоякісності^c

Ступінь злоякісності пухлини	RAD50	NY-BR-62	NY-CO-58	PARD3	SAP30BP	SPP1
1 (n = 6)	33,3(2)*	22,2(2)	0	0	0	50(3)*
2 (n = 27)	14,8(4)*	7,4(2)	18,5(5)	0	11,1(3)	14,8(4)
3 (n = 49)	12,2(6)*	14,3(7)	14,3(7)	14,3(7)	14,3(7)*	14,3(7)
ЗД (n = 35)	0	2,9(1)	2,9(1)	2,9(1)	0	2,9(1)

Примітка. ^c — Відсоток позитивних сироваток (n); * $P < 0,05$.

Аналіз діагностичної значущості 6 антигенів. За результатами статистичного аналізу даних алогенного скринінгу 16 рекомбінантних антигенів сироватками хворих з карциномами молочної залози та здорових донорів нами було відібрано 6 (RAD50, NY-BR-62, NY-CO-58, PARD3, SAP30BP, SPP1) антигенів із 16 ($P < 0,05$), що можуть бути потенційними діагностичними маркерами раку молочної залози.

Для оцінки діагностичного потенціалу 6 антигенів нами було використано й обчислено такі параметри, як чутливість та специфічність (табл. 5). Ми застосували логістичну регресію та ROC-аналіз для моделювання ймовірності того, що зразок сироватки, який було взято для дослідження імунореактивності проти одного антигену чи набору антигенів, належав особі, хворій на рак молочної залози. Спочатку кожен із шести маркерів було включено в модель окремо. Частина антигенів (RAD50, NY-BR-62, NY-CO-58) мали високу специфічність (понад 97%), але поряд із цим — досить низьку чутливість (від 9,29 до 13,39 %) (табл.5). Натомість антигени SAP30BP, SPP1 та PARD3 мали вищу порівняно з першою групою чутливість (від 32,14 до 41,01%), з дещо нижчою специфічністю (від 85,71 до 91,43%). Методом ROC-аналізу визначали діагностичний потенціал кожного з відібраних антигенів — відповідно до експертної шкали AUC, він оцінюється як середній ($AUC > 0,6$) і хороший ($AUC > 0,7$).

Ці результати узгоджуються з опублікованими даними індивідуальних тестів на автоантитіла до ПАА і підтверджують припущення, що вимірювання сироваткових автоантитіл проти одиничних ПАА не має діагностичної цінності для скринінгу з огляду на їхню низьку чутливість. Беручи до уваги цей факт, ми вирішили знайти оптимальну комбінацію з-поміж шести антигенів для підвищення їх діагностичного потенціалу, зокрема чутливості.

У тестові моделі входило від двох до шести антигенів у різних комбінаціях. З викорис-

танням ROC-аналізу ми показали, що в разі поєднання всіх шести антигенів (RAD50, NY-BR-62, NY-CO-58, PARD3, SAP30BP, SPP1) у єдину панель діагностична чутливість підвищувалась до 70%, специфічність становила 91% (ДІ 0,736-0,879), а показник $AUC = 0,808$. Слід зазначити, що два антигени із шести — RAD50 та NY-BR-62 — реагували із сироватками пацієнтів з доброякісними пухлинами. Однак ми включили ці антигени в запропоновану нами панель, оскільки вони з достовірно вищою частотою реагували із сироватками пацієнтів зі злоякісними пухлинами молочної залози і, відповідно, мали діагностичний потенціал. У подальших дослідженнях ми плануємо оцінити діагностичну значущість запропонованої нами панелі для диференціації доброякісних і злоякісних пухлин молочної залози з використанням більшої кількості сироваток пацієнтів з фіброаденомами молочної залози.

Порівнюючи отримані нами результати з раніше запропонованими і описаними антигенними системами, можна зробити висновки, що запропонована нами панель із шести антигенів для детекції сигнатур автоантитіл раку молочної залози має співвідносно високі, або навіть вищі, чутливість, специфічність і показник AUC. Наприклад, С. Charman зі співавт. досліджували наявність антитіл до шести ПАА (p53, c-тус, HER2, NY-ESO-1, BRCA2 та MUC1) у хворих з первинними карциномами молочної залози і карциною протоків *in situ* і показали, що ця антигенна панель мала чутливість 64% і 45% відповідно і загальну специфічність 85% [24]. Ще одна панель із п'яти антигенів (PPIA, PRDX2, FKBP52, HSP 60 та MUC1) виявляла інвазивну карциному молочної залози з чутливістю 55,2% та специфічністю 87,9%, $AUC=0,73$ [29]. Спільний аналіз антитіл до p16, p53 та c-тус у пацієнтів з раком молочної залози показав, що ця панель мала діагностичну чутливість і специфічність 43,9% і 97,6% відповідно, $AUC = 0,63$ [28].

Таблиця 5. ROC-аналіз шести потенційних ПАА раку молочної залози

Антиген	AUC ^d	P-значення	Чутливість (%)	Специфічність (%)
RAD50	0,624	0,02666	9,29	100
NY-BR-62	0,647	0,00871	13,39	97,14
NY-CO-58	0,709	0,00019	12,50	97,14
PARD3	0,689	0,00076	32,14	88,57
SAP30BP	0,647	0,00871	33,04	91,43
SPP1	0,744	<0,0001	41,07	85,71

Примітка. ^d — Площа під кривою показує діагностичну точність біомаркерів, найвища $AUC = 1$.

Більшість досліджуваних на сьогодні антигенних панелей складаються з добре вивчених і відомих антигенів, ми ж у своїй роботі дослідили профілі автоантитіл в сироватках хворих на рак молочної залози не лише проти відомих, але й нових ідентифікованих нами ПАА та показали, що комбінація із шести антигенів має потенціал для діагностики раку молочної залози. Однак для оцінки її клінічної релевантності (обґрунтованості) і діагностичної сили потрібно провести дослідження на більших мультицентрових когортах пацієнтів. Концептуальний аналіз, проведений у цьому дослідженні, дає критичну інформацію, яка може бути використана не тільки для ідентифікації кандидатних біомаркерів раку молочної залози, але й для подальшої характеристики молекулярних механізмів, залучених у розвиток і прогресування раку молочної залози.

Таким чином, ми оцінили дискримінаційні можливості 16 SEREX-антигенів медулярної карциноми молочної залози та інших

пухлин, дослідивши їх серологічну реактивність у сироватках пацієнтів з різними типами пухлин молочної залози та здорових донорів, і виявили достовірну вищу частоту автоантитіл до шести антигенів (RAD50, NY-BR-62, NY-CO-58, PARD3, SAP30BP та SPP1) у пацієнтів з раком молочної залози різного ступеня злоякісності, що не залежала від ER-, PR-, HER2-статусу пацієнтів та наявності пухлинних метастазів. Об'єднання зазначених антигенів у єдину панель дало змогу підвищити їх потенціал у діагностуванні раку молочної залози. Ці антигени можуть бути використані для подальших досліджень з метою створення нових тест-систем для виявлення профілів автоантитіл у хворих на рак молочної залози. Однак для цього отримані дані мають бути верифіковані на більших когортах пацієнтів, у тому числі з доброякісними пухлинами молочної залози.

Роботу виконано за підтримки НАН України та Державного фонду фундаментальних досліджень (№Ф40.69-2011).

ЛІТЕРАТУРА

1. Ferlay J., Shin H.-R., Bray F. et al. Estimates of world wide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 // *Int. J. Cancer*. — 2010. — V. 127, N 12. — P. 2893–2917.
2. Kirsh V. A., Chiarelli A. M., Edwards S. A. et al. Tumor characteristics associated with mammographic detection of breast cancer in the Ontario breast screening program // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2011. — V. 103, N 12. — P. 942–950.
3. Vainio B. F. IACR Handbooks of cancer prevention. — V. 7. Breast cancer screening. — Lyon, France: IACR Press, 2002.
4. Molina R., Barak V., van Dalen A. et al. Tumour Markers in Breast Cancer. European Group on Tumour Markers Recommendations // *Tumour Biol.* — 2005. — V. 26. — P. 281–293.
5. Molina R., Jo J., Filella X. et al. C-erbB-2, CEA and CA15.3 serum levels in the early diagnosis of recurrence in breast cancer patients // *Anticancer Res.* — 1999. — V. 19. — P. 2551–2556.
6. Angelopoulou K., Yu H., Bharaj B. et al. p53 Gene mutation, tumor p53 protein overexpression, and serum p53 autoantibody generation in patients with breast cancer // *Clin. Biochemistry*. — 2000. — V. 33, N 1. — P. 53–62.
7. Kulic A., Sirotkovic-Skerlev M., Jelisavac-Cosic S. et al. Anti-p53 antibodies in serum: relationship to tumor biology and prognosis of breast cancer patients // *Med. Oncol.* — 2010. — V. 27, N 3. — P. 887–893.
8. Duffy M J., Evoy D., McDermott E. W. CA 15-3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer // *Clin. Chim. Acta.* — 2010. — V. 411, N 23–24. — P. 1869–1874.
9. Molina R., Auge J. M., Escudero J. M. et al. Evaluation of tumor markers (HER-2/neu oncoprotein, CEA, and CA 15.3) in patients with locoregional breast cancer: prognostic value // *Tumour Biol.* — 2010. — V. 31, N 3. — P. 171–180.
10. Rack B., Schindlbeck C., Juckstock J. et al. Prevalence of CA 27.29 in primary breast cancer patients before the start of systemic treatment // *Anticancer Res.* — 2010. — V. 30, N 5. — P. 1837–1841.
11. Desmetz C., Bibeau F., Boissiere F. et al. Proteomics-based identification of HSP60 as a tumor-associated antigen in early stage breast cancer and ductal carcinoma in situ // *J. Proteome Res.* — 2008. — V. 7, N 9. — P. 3830–3837.
12. Peshkin B. N., Alabek M. L., Isaacs C. BRCA1/2 mutations and triple negative breast cancers // *Breast Dis.* — 2010. — V. 32, N 1–2. — P. 25–33.
13. Tan E. M. Autoantibodies as reporters identifying aberrant cellular mechanisms in tumorigenesis // *J. Clin. Invest.* — 2001. — V. 108, N 10. — P. 1411–1415.
14. Tan E. M., Zhang J. Autoantibodies to tumor-associated antigens: reporters from the immune system // *Immunol. Rev.* — 2008. — V. 222. — P. 328–340.
15. Shiku H., Takahashi T., Resnick L. et al. Cell surface antigens of human malignant melanoma. III. Recognition of autoantibodies with unusual characteristics // *J. Exp. Med.* — 1977. — V. 145, N 3. — P. 784–789.
16. Anderson K. S., LaBaer J. The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers // *J. Proteome Res.* — 2005. — V. 4, N 4. — P. 1123–1133.

17. *Casiano C. A., Mediavilla-Varela M., Tan E. M.* Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer // *Mol. Cell. Proteomics.* — 2006. — V. 5, N 10. — P. 1745–1759.
18. *Desmetz C., Mange A., Maudelonde T. et al.* Autoantibody signatures: progress and perspectives for early cancer detection // *J. Cell. Mol. Med.* — 2011. — V. 15, N 10. — P. 2013–2024.
19. *Schwamborn K., Krieg R. C., Grosse J. et al.* Serum proteomic profiling in patients with bladder cancer // *Eur. Urol.* — 2009. — V. 56, N 6. — P. 989–996.
20. *Wang X., Yu J., Sreekumar A., Varambally S. et al.* Autoantibody signatures in prostate cancer // *N. Engl. J. Med.* — 2005. — V. 353, N 12. — P. 1224–1235.
21. *Gnjatic S., Ritter E., Buchler M. W. et al.* Seromic profiling of ovarian and pancreatic cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2010. — V. 107, N 11. — P. 5088–5093.
22. *Zhang J. Y., Megliorino R., Peng X. X. et al.* Antibody detection using tumor-associated antigen mini-array in immunodiagnosing human hepatocellular carcinoma // *J. Hepatol.* — 2007. — V. 46, N 1. — P. 107–114.
23. *Wu L., Chang W., Zhao J. et al.* Development of autoantibody signatures as novel diagnostic biomarkers of non-small cell lung cancer // *Clin. Cancer Res.* — 2010. — V. 16, N 14. — P. 3760–3768.
24. *Chapman C., Murray A., Chakrabarti et al.* Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis // *Ann. Oncol.* — 2007. — V. 18, N 5. — P. 868–873.
25. *Lu H., Goodell V., Disis M. L.* Humoral immunity directed against tumor-associated antigens as potential biomarkers for the early diagnosis of cancer // *J. Proteome Res.* — 2008. — V. 7, N 4. — P. 1388–1394.
26. *Zhang J. Y., Casiano C. A., Peng X. X. et al.* Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens // *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* — 2003. — V. 12, N 2. — P. 136–143.
27. *Kozioł J. A., Zhang J. Y., Casiano et al. C. A. et al.* Recursive partitioning as an approach to selection of immune markers for tumor diagnosis // *Clin. Cancer Res.* — 2003. — V. 9, N 14. — P. 5120–5126.
28. *Looi K., Megliorino R., Shi F. D. et al.* Humoral immune response to p16, acyclin-dependent kinase inhibitor in human malignancies // *Oncol. Rep.* — 2006. — V. 16, N 5. — P. 1105–1110.
29. *Desmetz C., Bascoul-Mollevi C., Rochaix et al. P. et al.* Identification of a new panel of serum autoantibodies associated with the presence of in situ carcinoma of the breast in younger women // *Clin. Cancer Res.* — 2009. — V. 15, N 14. — P. 4733–4741.
30. *Yagihashi A., Ohmura T., Asanuma et al. K. et al.* Detection of autoantibodies to survivin and livin in sera from patients with breast cancer // *Clin. Chim. Acta.* — 2005. — V. 362, N 1–2. — P. 125–130.
31. *Kiyamova R., Kostianets O., Malyuchik S. et al.* Identification of tumor-associated antigens from medullary breast carcinoma by a modified SEREX approach // *Mol. Biotech.* — 2010. — V. 46, N 2. — P. 105–112.
32. *Yang X. A., Dong X. Y., Li Y. et al.* Purification and refolding of a novel cancer/testis antigen BJ-HCC-2 expressed in the inclusion bodies of *Escherichia coli* // *Protein Expr. Purif.* — 2004. — V. 33, N 2. — P. 332–338.
33. *Zweig M. H., Campbell G.* ROC Plots: A Fundamental Evaluation Tool in Clinical Medicine // *Clin. Chem.* — 1993. — V. 39, N 4. — P. 561–577.
34. *Cowell I. G., Okorokov A. L., Cutts S. A. et al.* Human topoisomerase II alpha and II beta interact with the C-terminal region of p53 // *Exp. Cell Res.* — 2000. — V. 255, N 1. — P. 86–94.
35. *Wang J. C.* DNA topoisomerases // *Annu. Rev. Biochem.* — 1996. — V. 65. — P. 635–692.
36. *Jager D., Stockert E., Gure A. O. et al.* Identification of a tissue-specific putative transcription factor in breast tissue by serological screening of a breast cancer library // *Cancer Res.* — 2001. — V. 61, N 5. — P. 2055–2061.
37. *Scanlan M. J., Gout I., Gordon C. M. et al.* Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression // *Cancer Immun.* — 2001. — V. 28, N 32. — P. 2910–2918.
38. *Scanlan M. J., Welt S., Gordon C. M. et al.* Cancer-related serological recognition of human colon cancer: identification of potential diagnostic and immunotherapeutic targets // *Cancer Res.* — 2002. — V. 62, N 14. — P. 4041–4047.
39. *Zen K., Yasui K., Gen Y. et al.* Defective expression of polarity protein PAR-3 gene (PARD3) in esophageal squamous cell carcinoma // *Oncogene.* — 2009. — V. 28, N 32. — P. 2910–2918.
40. *Dolganov G. M., Maser R. S., Novikov A. et al.* Human Rad50 is physically associated with human Mre11: identification of a conserved multiprotein complex implicated in recombinational DNA repair // *Mol. Cell. Biol.* — 1996. — V. 16, N 9. — P. 4832–4841.
41. *Wang X., Szabo C., Qian C. et al.* Mutational analysis of thirty-two double-strand DNA break repair genes in breast and pancreatic cancers // *Cancer Res.* — 2008. — V. 68, N 4. — P. 971–975.
42. *Thalmann G. N., Sikes R. A., Devoll R. E. et al.* Osteopontin: possible role in prostate cancer progression // *Clin. Cancer Res.* — 1999. — V. 5, N 8. — P. 2271–2277.
43. *Agrawal D., Chen T., Irby R. et al.* Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling // *J. Natl Cancer Inst.* — 2002. — V. 94, N 7. — P. 513–521.

44. *Shijubo N., Uede T., Kon S. et al.* Vascular endothelial growth factor and osteopontin in stage I lung adenocarcinoma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1999. — V. 160, N 4. — P. 1269–1273.

45. *Tilli T. M., Silva E. A., Matos L. C.* Osteopontin is a tumor autoantigen in prostate cancer patients // *Oncol. Lett.* — 2011. — V. 2. — P. 109–114.

АЛЛОГЕННЫЙ СКРИНИНГ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ АНТИГЕНОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

О. И. Костянец^{1,2}
М. А. Шиян^{1,2}
*С. В. Антонюк*³
*С. В. Демидов*²
*В. В. Филоненко*¹
*Р. Г. Киямова*¹

¹Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

²Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко

³Днепропетровская городская клиническая
больница № 4

E-mail: kostjanez@ukr.net

Рак молочной железы является наиболее распространенной формой злокачественных новообразований у женщин. Несмотря на внедрение скрининговых программ по маммографии, диагностирование этой патологии остается недостаточно эффективным, поэтому существует потребность поиска новых диагностических биомаркеров рака молочной железы.

В качестве таких биомаркеров могут выступать опухолеассоциированные антигены и аутоантитела к ним, которые имеют ряд преимуществ по сравнению с другими биологическими молекулами и могут быть использованы для диагностики и прогноза раковых заболеваний.

В данном исследовании мы охарактеризовали в аллогенном скрининге с помощью иммуоэнзимного анализа рекомбинантные аналоги опухолеассоциированных SEREX (Serological identification of antigens by recombinant expression cloning)-антигенов с использованием сывороток пациентов с разными типами опухолей молочной железы и сывороток здоровых доноров. Выявлена комбинация антигенов, которая может быть использована для дальнейших исследований в контексте создания тест-систем с целью идентификации профилей аутоантител для диагностики рака молочной железы.

Ключевые слова: опухолеассоциированный антиген, аутоантитело, рак молочной железы.

ALLOGENEIC SCREENING OF TUMOR-ASSOCIATED ANTIGENS OF HUMAN BREAST CANCER

O. I. Kostianets^{1,2}
M. A. Shyian^{1,2}
*S. V. Antoniuk*³
*S. V. Demidov*²
*V. V. Filonenko*¹
*R. G. Kiyamova*¹

¹Institute of Molecular Biology and Genetics
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

²Taras Shevchenko National University of Kyiv

³Dnipropetrovs'k Municipal Clinical
Hospital No. 4

E-mail: kostjanez@ukr.net

Breast cancer is the most common type of malignancy among women. Despite the using of mammography screening programs, diagnostics of this pathology is still not effective enough, so there is a need to search for new diagnostic markers of breast cancer. Tumor-associated antigens and their cognate autoantibodies, which have several advantages compared to other biological molecules can be considered as cancer biomarkers and used for cancer diagnostics and prognosis.

In current study we characterized in allogeneic screening recombinant analogues of tumor-associated SEREX (Serological identification of antigens by recombinant expression cloning)-antigens with sera from patients with different types of breast cancer and sera of healthy donors using enzyme-linked immunoenzyme assay. We identified combination of antigens, which could be used for further research in context of test-systems development for autoantibodies profile identification for breast cancer diagnostics.

Key words: tumor-associated antigen, autoantibody, breast cancer.