

ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-6-28-34

УДК: 616-097.3:618.19-006

АНТИТЕЛА К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ, ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПОСТМЕНОПАУЗЕ

А.Н. Глушков^{1,4}, Е.Г. Поленок¹, Ю.А. Магарилл², Т.П. Аносова¹,
А.В. Антонов³, Н.Е. Вержбицкая⁵ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии» Сибирского отделения РАН,
Институт экологии человека, г. Кемерово¹ГБОУ ВПО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России,
г. Кемерово²ГБУЗ КО «Областной клинический онкологический диспансер», г. Кемерово³ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово⁴ГБУЗ КО ОТ «Кемеровское областное патологоанатомическое бюро», г. Кемерово⁵
650065, г. Кемерово, пр. Ленинградский, 10, e-mail: ihe@list.ru¹

Аннотация

Выявление женщин с высоким риском возникновения рака молочной железы является ключевым звеном в химиопрофилактике этого заболевания селективными модуляторами эстрогеновых рецепторов. **Цель исследования** – изучить специфические иммунные реакции на химические канцерогены и половые стероидные гормоны, ассоциированные с раком молочной железы, у женщин в постменопаузе. **Материал и методы.** С помощью полуколичественного иммуноферментного анализа были изучены сывороточные антитела класса А, специфичные к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону, у 203 здоровых некурящих женщин и 469 некурящих больных раком молочной железы (125 женщин с ER⁻ и 344 с ER⁺ статусом опухоли). **Результаты.** Низкие уровни всех трех антител были обнаружены у 53,2 % здоровых женщин, 47,2 % больных раком молочной железы с ER⁻ статусом опухоли и 40,7 % с ER⁺. Высокие уровни всех трех антител встречались в 12,3 %, 18,4 %, 26,5 % случаев соответственно. Во всех группах уровни антител к эстрадиолу и прогестерону коррелировали с уровнями антител к бензо[а]пирену ($r_s=0,54-0,7$, $p<0,0001$). **Заключение.** Иммуноанализ антител к экзогенным и эндогенным веществам может быть полезным для определения риска возникновения ER⁺ рака молочной железы и превентивного назначения тамоксифена и других селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов. Активная иммунизация против экзогенных химических канцерогенов может увеличивать уровни антител к эндогенным стероидам и таким образом стимулировать рак молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, антитела, бензо[а]пирен, эстрадиол, прогестерон.

Проблема профилактики рака молочной железы (РМЖ) остаётся актуальной в связи с повсеместным ростом заболеваемости [1]. В настоящее время для первичной профилактики РМЖ применяются тамоксифен, ралоксифен и другие селективные модуляторы рецепторов эстрогенов (ER) [2]. Для повышения их эффективности необходимо определить риск возникновения ER⁺ РМЖ у здоровой женщины. В геноме человека обнаружены локусы (12q24, rs1292011 и 21q21, rs2823093), ассоциированные с ER⁺ РМЖ, однако соответствующие белковые продукты не идентифицированы [3]. Анализ полиморфных вариантов генов BRCA [4], ферментов метаболизма ксенобиотиков и стероидных гормонов [5–7], ферментов репарации ДНК [8, 9] не позволяет определить индивидуальный риск возникновения ER⁺ РМЖ.

Ведутся экспериментальные разработки новой стратегии профилактики онкологических заболеваний, основанной на использовании канцероген-специфических антител (АТ). In vitro доказано, что АТ способны тормозить канцерогенез за счёт ограничения проникновения химических канцерогенов из окружающей среды в клетки поверхностного эпителия и угнетения метаболической активации канцерогенов [10, 11]. In vivo иммунизация животных конъюгатами химических канцерогенов с белками или ДНК сопровождается угнетением их проникновения из окружающей среды в организм и торможением возникновения индуцированных опухолей [12–19]. Кроме того, активная иммунизация животных против эстрогенов приводит к изменениям их концентрации в крови и тормозит рост эстроген-чувствительных опухолей [20, 21].

Между тем знания об особенностях образования АТ к химическим канцерогенам окружающей среды и эндогенным стероидным гормонам в естественных условиях у человека крайне ограничены. Ранее АТ против полициклических ароматических углеводородов и их аддуктов с ДНК были обнаружены в сыворотке крови человека [22–25]. АТ к этим канцерогенам и половым стероидам обнаружены у больных РМЖ [26, 27]. Одновременное повышение уровней АТ класса G, специфичных к бензо[а]пирену (БП), эстрадиолу (ЭС) и прогестерону (ПГ), встречалось значительно чаще у больных РМЖ, чем у здоровых женщин [28]. Однако взаимосвязи АТ с ER+ РМЖ не было выявлено. В то же время предполагается, что АТ класса А способны стимулировать трансформацию ER+ клеток за счет связывания канцерогенов и ЭС и усиления их транспорта в эпителиальные клетки [29].

Цель исследования – изучение ассоциации АТ класса А, специфичных к БП, ЭС и ПГ с ER+ РМЖ.

Материал и методы

В исследование включены 672 некурящие женщины в постменопаузе, из них у 469 была диагностирована инвазивная карцинома молочной железы, эти пациентки получали лечение в условиях Областного клинического онкологического диспансера г. Кемерово. Диагноз РМЖ в каждом случае был подтвержден морфологически. Информация о гормон-рецепторном статусе опухолей была взята из протоколов патоморфологического отделения. Средний возраст больных РМЖ составил $62,6 \pm 8,7$ года. В группу сравнения были включены 203 здоровые женщины без патологии молочной железы (средний возраст – $58,9 \pm 5,8$ года).

Забор периферической крови осуществлялся согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003. Все лица, участвовавшие в исследовании, дали на это информированное письменное согласие.

Исследование АТ класса А к БП, ЭС и ПГ проводили с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа в собственной модификации [22]. В качестве антигена на полистирольные иммунологические планшеты были иммобилизованы конъюгаты БП, ЭС и ПГ с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Конъюгат ЭС-БСА был синтезирован путем присоединения БСА к эстрадиолу-нонам, полученным окислением ЭС солью Фреми. Конъюгат ПГ-БСА был получен путем конъюгации гемиглутарата 21-гидроксипрогестерона и БСА карбодимидным способом. Иммунологические планшеты сенсibilизировали в течение ночи при комнатной температуре. Образцы сыворотки крови в разведении 1:20 вносили по 100 мкл в лунки

планшета в дублях, инкубировали 1 ч при 37°C на шейкере. Связавшиеся АТ выявляли с помощью козьих АТ против IgA человека, меченных пероксидазой хрена (Novex, США), разведение конъюгата 1:10000. Регистрацию адсорбированных на планшете АТ проводили с помощью субстратного буфера, содержащего тетраметилбензидин (ТМВ, США), на фотометре (Пикон, Россия) при длине волны 450 нм. Уровни АТ к гаптенам выражали в относительных единицах и вычисляли по отношению связывания АТ с конъюгатом гаптен-БСА (за вычетом фонового связывания с БСА) к БСА.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Ненормальный характер распределения показателей определили с помощью критерия Шапиро–Уилка и в дальнейшем статистически значимые различия между группами выявляли с помощью U-критерия Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$ и непараметрического критерия χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность вариации. При расчете критерия χ^2 исследуемые признаки группировались в четырехпольную таблицу (d.f.=1). За критический уровень значимости принималось значение $p < 0,05$. Ассоциации исследуемых АТ с РМЖ оценивали с помощью величины отношения шансов (OR) с доверительным интервалом (CI) при 95 % уровне значимости. Для выявления пороговых значений уровней АТ (cut-off) был проведен ROC-анализ [30]. Взаимосвязи между уровнями исследуемых АТ были оценены с помощью ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Пограничные значения уровней IgA-БП, IgA-ЭС и IgA-ПГ, по которым здоровые женщины и больные РМЖ имели наиболее значимые различия, были определены с помощью ROC-анализа. Высокие уровни IgA-БП (>3) и IgA-ЭС (>3) в общей группе больных РМЖ (40,3 % и 43,1 %) обнаруживались значительно чаще, чем у здоровых (22,2 % и 29,9 % соответственно). При этом OR возрастал до 2,4 и 1,8 соответственно. Пограничное значение IgA-ПГ оказалось равным 3, однако статистически значимой разницы между сравниваемыми группами по этому показателю выявить не удалось, и OR оставался в пределах 0,7–1,5.

Принимая во внимание то, что в каждом индивидуальном случае образование АТ одной специфичности может происходить при отсутствии АТ другой специфичности, был выполнен анализ 8 возможных сочетаний высоких и низких уровней АТ к БП, ЭС и ПГ у здоровых женщин и больных РМЖ (таблица). Выяснилось, что отсутствие или низкие уровни IgA ко всем трём исследуемым гаптенам (комбинация 1) при РМЖ встречается значимо реже, чем в группе сравнения, – 42,4 % против 53,2 %, OR снижается до 0,6. Далее сопоставляли число случаев с высокими уровнями

Таблица

Частота встречаемости высоких уровней антител к бензо[а]пирену (IgA-БП), эстрадиолу (IgA-ЭС) и прогестерону (IgA-ПГ) у здоровых женщин и больных РМЖ в зависимости от рецепторного статуса

Комбинации антител	Здоровые женщины (n=203)	Больные РМЖ (n=469)	Больные РМЖ ER- (n=125)	Больные РМЖ ER+ (n=344)
1. IgA-БП ≤3 IgA-ЭС ≤3 IgA-ПГ ≤3	108 (53,2 %)	199 (42,4 %) p=0,01 0,6 (0,5–0,9)	59 (47,2 %) p=0,35	140 (40,7 %) p=0,005 0,6 (0,4–0,9)
2. IgA-БП >3 IgA-ЭС ≤3 IgA-ПГ ≤3	7 (3,4 %)	29 (6,2 %) 0,09	9 (7,2 %) p=0,17	20 (5,8 %) p=0,11
3. IgA-БП ≤3 IgA-ЭС >3 IgA-ПГ ≤3	10 (4,9 %)	41 (8,7 %) p=0,04 2,2 (1,1–4,6)	13 (10,4 %) p=0,08	28 (8,1 %) p=0,06
4. IgA-БП ≤3 IgA-ЭС ≤3 IgA-ПГ >3	20 (9,9 %)	21 (4,5 %) 0,13	5 (4,0 %) p=0,19	16 (4,7 %) p=0,24
5. IgA-БП >3 IgA-ЭС >3 IgA-ПГ ≤3	5 (2,5 %)	28 (6,0 %) p=0,03 3,0 (1,1–8,1)	8 (6,4 %) p=0,11	20 (5,8 %) 0,04 3,1 (1,1–8,5)
6. IgA-БП >3 IgA-ЭС ≤3 IgA-ПГ >3	8 (3,9 %)	18 (3,8 %) 0,81	4 (3,2 %) p=0,86	14 (4,1 %) p=0,67
7. IgA-БП ≤3 IgA-ЭС >3 IgA-ПГ >3	20 (9,9 %)	19 (4,1 %) 0,07	4 (3,2 %) p=0,11	15 (4,4 %) p=0,18
8. IgA-БП >3 IgA-ЭС >3 IgA-ПГ >3	25 (12,3 %)	114 (24,3 %) p=0,0004 2,5 (1,5–4,0)	23 (18,4 %) p=0,15	91 (26,5 %) p=0,0001 2,8 (1,7–4,7)

исследуемых АТ в различных комбинациях (2–8) с комбинацией 1. Не было выявлено значимых различий между здоровыми женщинами и больными РМЖ по частоте встречаемости высоких уровней IgA-БП (комбинация 2) или IgA-ПГ (комбинация 4). Высокие уровни IgA-ЭС (комбинация 3) у больных РМЖ (8,7 %) встречались чаще, чем у здоровых (4,9 %, p=0,04), при этом значение OR возрастало до 2,2. Одновременное повышение уровней IgA-БП и IgA-ЭС (комбинация 5) у больных РМЖ (6,0 %) встречалось значимо чаще, чем у здоровых (2,5 %, p=0,03). По частоте обнаружения IgA-БП или IgA-ЭС совместно с IgA-ПГ (комбинации 6 и 7) сравниваемые группы не отличались. Индивидуальное сочетание высоких уровней всех трех исследуемых АТ (комбинация 8) обнаружено с большей частотой у больных РМЖ (24,3 %), чем у здоровых (12,3 %). В сравнении с комбинацией 1 – p=0,0004, OR=2,5. Сравнение частоты обнаружения указанных комбинаций (1–8) у больных ER- РМЖ со здоровыми женщинами не выявило значимых различий. В то же время отсутствие всех трех исследуемых АТ (комбинация 1) у больных ER+ РМЖ (40,7 %) встречалось значимо реже, чем у здоровых (53,2 %), с p=0,005 и OR=0,6. Одновременное повышение уровней IgA-БП и IgA-ЭС (комбинация 5), а также IgA-БП, IgA-ЭС и IgA-ПГ (комбинация 8) у больных ER+ РМЖ обнаружено с большей частотой, чем у здоровых (5,8 % против

2,5 % и 26,5 % против 12,3 % соответственно). В последнем случае p=0,0001, OR=2,6. Больные ER- и ER+ РМЖ не отличались друг от друга по частоте обнаружения в комбинациях 1–7. В то же время одновременное повышение уровней всех трех исследуемых АТ (комбинация 8) обнаруживали чаще у больных ER+ (26,5 %), чем у ER- РМЖ (18,4 %), с p=0,0001 и OR=2,8.

Таким образом, отсутствие АТ класса А, специфичных к БП, ЭС и ПГ, ассоциировано с пониженным риском ER+ (OR=0,6), но не ER- РМЖ. Одновременное повышение уровней IgA-БП и IgA-ЭС или IgA-БП, IgA-ЭС и IgA-ПГ ассоциировано с высоким риском ER+ (OR=3,1 и 2,8 соответственно), но не ER- РМЖ. Иммуноанализ указанных АТ может оказаться полезным в определении показаний для превентивного использования селективных ингибиторов эстрогеновых рецепторов с целью профилактики РМЖ у женщин в постменопаузе.

Обращает на себя внимание тот факт, что каждое исследуемое АТ по отдельности (комбинации 2–4) встречается в небольшом количестве случаев как у здоровых, так и у больных РМЖ (не более 10 %). Вместе с тем одновременное повышение уровней АТ всех трех специфичностей (комбинация 8) у больных ER+ РМЖ достигает 26,5 %. Это свидетельствует о том, что индукция IgA-БП может быть взаимосвязана с индукцией IgA-ЭС и IgA-ПГ.

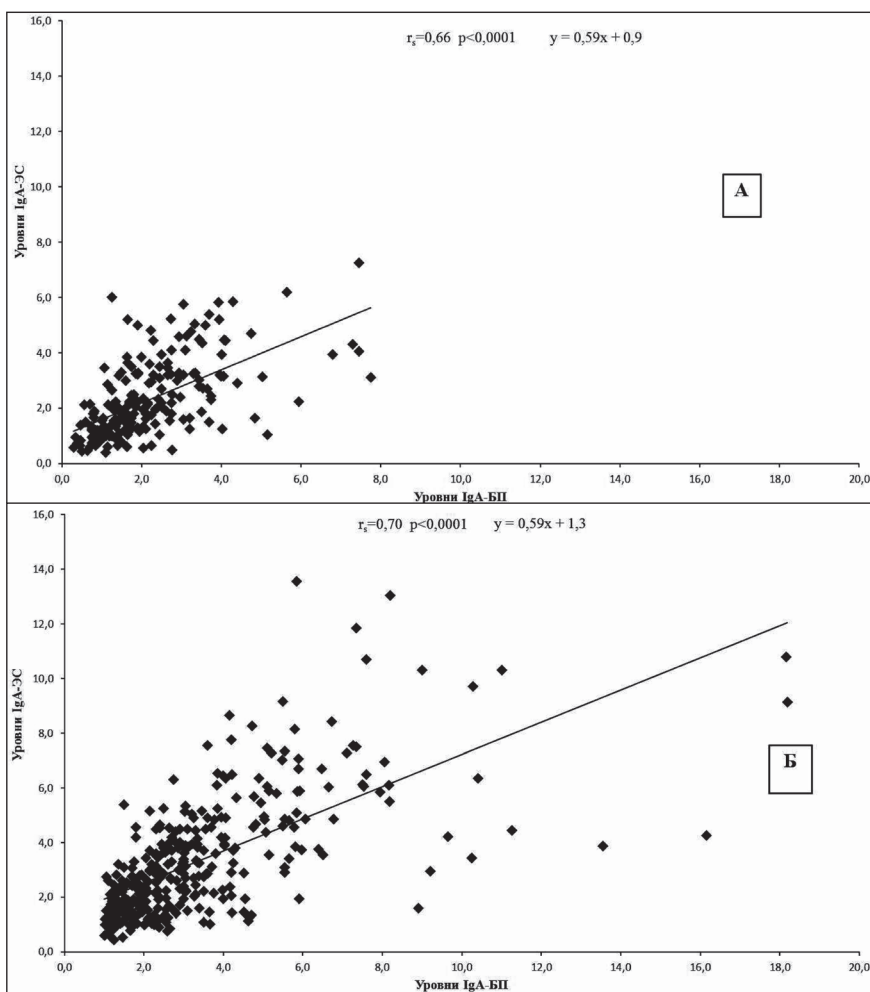


Рис. 1. Взаимосвязи уровней IgA-ЭС (y) и IgA-БП (x) у здоровых женщин (А) и больных ER+ РМЖ (Б)

И действительно, между уровнями IgA-БП, с одной стороны, и IgA-ЭС и IgA-ПГ, с другой стороны, обнаружены прямые линейные корреляционные связи средней силы как у здоровых женщин, так и у больных РМЖ (и ER+ и ER-) с коэффициентами корреляции $r_s = 0,54-0,7$ с $p < 0,0001$. На рис. 1 приведен пример обнаруженных корреляций между IgA-ЭС (y) и IgA-БП (x) у здоровых женщин (А) и больных ER+ РМЖ (Б).

Таким образом, при стимуляции синтеза секреторных IgA против БП с профилактической целью вполне вероятно может повышаться уровень сывороточных IgA-БП. В свою очередь, это может повлечь за собой индукцию IgA-ЭС и IgA-ПГ, которые в комбинации с IgA-БП могут не тормозить, а стимулировать возникновение ER+ РМЖ. Поэтому стратегия активной иммунопрофилактики рака человека за счет стимуляции антиканцерогенного иммунитета, предлагаемая некоторыми авторами [15–17, 19, 31], нуждается в дополнительной проверке. В частности, при иммунизации животных конъюгатами химических канцерогенов с макромолекулярными носителями необходимо контролировать синтез АТ, специфичных не только к канцерогенам, но и к эндогенным стероидам.

Заключение

В канцерогенезе рака молочной железы принимают участие две основные группы факторов: внешние – химические канцерогены (в том числе полициклические ароматические углеводороды, БП) и внутренние – стероидные гормоны. Поэтому в разработке информативных методов определения риска РМЖ необходимо учитывать их совместное воздействие на клетки-мишени. Этому условию соответствует исследование специфических иммунных реакций на указанные химические соединения.

В работе показано, что образование АТ, специфичных к БП, ЭС и ПГ, – взаимосвязанные процессы. Уровни IgA-ЭС и IgA-ПГ коррелируют с уровнями IgA-БП с высокой статистической значимостью ($p < 0,0001$). Одновременное повышение уровней указанных АТ ассоциировано с ER+ РМЖ ($p < 0,0001$; OR=2,8), но не с ER- РМЖ. Таким образом, комплексный иммуноанализ АТ против химических канцерогенов окружающей среды и половых стероидных гормонов можно рассматривать как перспективный метод в определении показаний для превентивного назначения тамоксифена и других селективных модуляторов эстрогеновых

рецепторов. В то же время активная стимуляция антиканцерогенного иммунного ответа с целью профилактики РМЖ может сопровождаться повышением уровня АТ, специфичных к стероидным гормонам, и возрастанием риска возникновения РМЖ. Очевидно, для защиты человека от воздействия химических канцерогенов потребуются иные методические подходы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Писарева Л.Ф., Чойнзонов Е.Л., Гурина Л.И., Одинцова И.Н., Шойхет Я.Н., Лазарев А.Ф., Юдин С.В., Косых Н.Э. Онкоэпидемиологические исследования в регионе Сибири и Дальнего Востока. Дальневосточный медицинский журнал. 2005; 1: 51–55.
2. Sestak I. Preventative therapies for healthy women at high risk of breast cancer. *Cancer Manag Res.* 2014 Oct 17; 6: 423–30. doi: 10.2147/CMAR.S55219.
3. Ghousaini M., Fletcher O., Michailidou K., Turnbull C., Schmidt M.K., Dicks E., Dennis J., Wang Q., Humphreys M.K., Luccarini C., Baynes C., Conroy D., Maranian M., Ahmed S., Driver K., Johnson N., Orr N., dos Santos Silva I., Waisfisz Q., Meijers-Heijboer H., Uitterlinden A.G., Rivadeneira F. Genome-wide association analysis identifies three new breast cancer susceptibility loci. *Nat Genet.* 2012 Jan 22; 44 (3): 312–8. doi: 10.1038/ng.1049.
4. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы. *Практическая онкология.* 2010; 11 (4): 258–266.
5. Бурденный А.М., Казубская Т.П., Брага Э.А., Носиков В.В., Логинов В.И. Ассоциация полиморфных маркеров генов биотрансформации ксенобиотиков с раком молочной железы у женщин Московского региона. *Молекулярная медицина.* 2012; 5: 30–34.
6. Economopoulos K.P., Sergentanis T.N. Three polymorphisms in cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) gene and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Jul; 122(2): 545–51. doi: 10.1007/s10549-009-0728-z.
7. Go R.E., Hwang K.A., Choi K.C. Cytochrome P450 1 family and cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015 Mar; 147: 24–30. doi: 10.1016/j.jsmb.2014.11.003.
8. Brewster A.M., Jorgensen T.J., Ruczinski I., Huang H.Y., Hoffman S., Thuita L., Newschaffer C., Lunn R.M., Bell D., Helzlsouer K.J. Polymorphisms of the DNA repair genes XPD (Lys751Gln) and XRCC1 (Arg399Gln and Arg194Trp): relationship to breast cancer risk and familial predisposition to breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Jan; 95 (1): 73–80. doi: 10.1007/s10549-005-9045-3.
9. Duell E.J., Millikan R.C., Pittman G.S., Winkel S., Lunn R.M., Tse C.K., Eaton A., Mohrenweiser H.W., Newman B., Bell D.A. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 Mar; 10 (3): 217–22.
10. De Buck S.S., Augustijns P., Muller C.P. Specific antibody modulates absorptive transport and metabolic activation of benzo[a]pyrene across Caco-2 monolayers. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 May; 313 (2): 640–6. doi:10.1124/jpet.104.081034.
11. De Buck S.S., Schellenberger M.T., Ensch C., Muller C.P. Effects of antibodies induced by a conjugate vaccine on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone absorptive transport, metabolism, and proliferation of human lung cells. *Int J Cancer.* 2010 Aug 1; 127 (3): 513–20. doi: 10.1002/ijc.25073.
12. Cernohorska H., Klimesova S., Lepsa L., Jinoch P., Milcova A., Schmutzerova J., Topinka J., Labaj J. Influence of immunization with non-genotoxic PAH-KLH conjugates on the resistance of organisms exposed to benzo[a]pyrene. *Mutat Res.* 2012 Feb 18; 742 (1–2): 2–10. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.10.016.
13. Кондакова И.В., Спирина Л.В., Коваль В.Д., Шашова Е.Е., Чойнзонов Е.Л., Иванова Э.В., Коломиец Л.А., Чернышова А.Л., Слонимская Е.М., Усынин Е.А., Афанасьев С.Г. Химотрипсинподобная активность и субъединичный состав протеасом в злокачественных опухолях человека. *Молекулярная биология.* 2014; 48 (3): 444–451.
14. Grova N., Prodhomme E.J., Schellenberger M.T., Farinelle S., Muller C.P. Modulation of carcinogen bioavailability by immunization with benzo[a]pyrene – conjugate vaccine. *Vaccine.* 2009 Jun 24; 27 (31): 4142–51. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.052.
15. Moolten F.L., Capparel N., Boger E. Reduction of respiratory tract binding of benzo(a)pyrene in mice by immunization. *J Natl Cancer Inst.* 1978 Nov; 61 (5): 1347–9.

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

16. Moolten F.L., Schreiber B., Rizzone A. Protection of mice against 7.12 – dimethylbenz(a)anthracene – induced skin tumors by immunization with fluorinated analog of carcinogen. *Cancer Res.* 1981 Feb; 41 (2): 425–9.
17. Peck R.M., Peck E.B. Inhibition of chemically induced neoplasia by immunization with an antigenic carcinogen-protein conjugate. *Cancer Res.* 1971 Nov; 31 (11): 1550–4.
18. Schellenberger M.T., Farinelle S., Willièmi S., Muller C.P. Evaluation of adjuvants for a candidate conjugates vaccine against benzo[a]pyrene. *Human Vaccines.* 2011; 7: 166–173.
19. Silbart L.K., Keren D.F. Reduction of intestinal carcinogen absorption by carcinogen-specific immunity. *Science.* 1989 Mar 17; 243 (4897): 1462–4.
20. Caldwell B.V., Tillson S.A., Esber H., Thorneycroft I.H. Survival of tumors after immunization against oestrogens. *Nature.* 1971 May 14; 231 (5298): 118–119.
21. Rosenberg M., Amir D., Folman Y. The effects of active immunization against progesterone on plasma concentrations of total and free progesterone, estradiol-17beta and LH in the cyclic ewe. *Theriogenology.* 1987; 28: 417–426.
22. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Савченко Я.А., Баканова М.Л., Минаева В.И., Мун С.А., Ларин С.А., Костяно М.В. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия. *Российский иммунологический журнал.* 2011; 5 (1): 39–44.
23. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Вержбицкая Н.Е., Тутов В.А., Вафин И.А., Рагожина С.Е. Антитела к химическим канцерогенам и стероидным гормонам у больных раком легкого. *Российский иммунологический журнал.* 2014; 8 (2): 219–227.
24. Galati R., Zijno A., Crebelli R., Falasca G., Tomei F., Iecher F., Carta R., Verdina A. Detection of antibodies to the benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in sera from individuals exposed to low doses of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Exp Clin Cancer Res.* 2001 Sep; 20 (3): 359–64.
25. Ustinov V.A., Matveeva V.A., Kostyanko M.V., Glushkov A.N. Antibodies against benzo[a]pyrene in immunized mouse and lung cancer patients. *Exp Oncol.* 2013 Sep; 35 (3): 207–10.
26. Аносова Т.П., Поленок Е.Г., Аносов М.П., Красильникова К.С., Костяно М.В., Вержбицкая Н.Е., Гурова Е.А., Вафин И.А., Рагожина С.Е., Глушков А.Н. Антитела к ксено- и эндобиотикам у больных раком молочной железы. *Известия Самарского научного центра РАН.* 2012; 5 (2): 440–443.
27. Глушков А.Н., Аносова Т.П., Небесная Н.Г., Железнова Л.Я. Изотипические особенности антител к полициклическим ароматическим углеводородам у больных раком молочной железы, желудка, толстой и прямой кишки. *Экспериментальная онкология.* 1996; 18: 426–428.
28. Glushkov A., Polenok E., Kostyanko M., Antonov A., Verzhbitskaya N., Vafin I., Ragozhina S. Postmenopausal breast cancer risk in relation to antibodies specific to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone. *Iran J Cancer Prev.* 2016 Apr 24; 9 (2): e4212. doi: 10.17795/ijcp-4212.
29. Glushkov A.N. Immunological disbalance in carcinogenesis. *Med Hypotheses.* 2014 Aug; 83 (2): 166–71. doi: 10.1016/j.mehy.2014.05.003.
30. Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J Intern Med.* 2013 Spring; 4 (2): 627–35.
31. Verdina A. Carcinogen-modified DNA and specific humoral immunity toward carcinogen-DNA adducts. *Ann Ist Super Sanita.* 2006; 42 (2): 189–94.

Поступила 24.06.16
Принята в печать 30.10.16

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Глушков Андрей Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, директор Института экологии человека СО РАН, Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук; профессор кафедры генетики, Кемеровский государственный университет (г. Кемерово, Российская Федерация). E-mail: ihe@list.ru. SPIN-код: 9536-8530.

Поленок Елена Геннадьевна, кандидат фармацевтических наук, заведующая лабораторией иммунохимии Института экологии человека СО РАН, Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук (г. Кемерово, Российская Федерация). E-mail: egpolenok@mail.ru. SPIN-код: 3925-0185.

Магарилл Юрий Абрамович, кандидат медицинских наук, заведующий общим курсом онкологии, Кемеровский государственный медицинский университет (г. Кемерово, Российская Федерация). E-mail: attik1@mail.ru. AuthorID в РИНЦ: 522768

Аносова Татьяна Петровна, ведущий инженер-биолог лаборатории иммунохимии Института экологии человека СО РАН, Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук (г. Кемерово, Российская Федерация). E-mail: tm-petrovichi@mail.ru. SPIN-код: 9969-4392.

Антонов Александр Викторович, заведующий маммологическим отделением, Областной клинической онкологической диспансер (г. Кемерово, Российская Федерация). E-mail: 05-guz-okod@kuzdrav.ru.

Вержбицкая Наталья Евгеньевна, кандидат медицинских наук, заведующая патологоанатомическим отделением, Кемеровское областное патологоанатомическое бюро (г. Кемерово, Российская Федерация). E-mail: keu-73@mail.ru.

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о котором необходимо сообщить

ANTIBODIES TO BENZO[A]PYRENE, ESTRADIOL AND PROGESTERONE IN THE POSTMENOPAUSAL BREAST CANCER WOMEN

A.N. Glushkov^{1,4}, E.G. Polenok¹, Y.A. Magarill², T.P. Anosova¹, A.V. Antonov³, N.E. Verzhbickaja⁵

The Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Institute of Human Ecology, Kemerovo¹
Kemerovo State Medical Academy, Kemerovo²
Regional clinical oncology hospital, Kemerovo³
Kemerovo State University, Kemerovo⁴
Pathologoanatomic bureaus, Kemerovo⁵
10, Leningradsky avenue, 650065-Kemerovo, Russia, e-mail: ihe@list.ru¹

Abstract

The identification of women who are at high risk of developing breast cancer plays a key role in chemoprevention of breast cancer selective estrogen receptor modulators. **Purpose:** To study specific immune responses to chemical carcinogens and sex steroid hormones associated with breast cancer in postmenopausal women. **Material and methods.** Serum IgA-antibodies specific to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone were studied in 203 non-smoking healthy women and 469 non-smoking breast cancer patients (125 with ER– and 344 with ER+) using semi-quantitative enzyme immunoassay. **Results.** The low levels of all three antibodies were revealed in 53.2 % of healthy donors, in 47.2 % of breast cancer patients with ER– and in 40.7 % of patients with ER+. The high levels of all three antibodies were found in 12.3 %, 18.4 % and 26.5 % of cases, respectively. In the studied groups, the levels of antibodies to estradiol and progesterone were correlated with the levels of antibodies to benzo[a]pyrene ($r_s=0.54-0.7$, $p<0.0001$). **Conclusion.** Immunoassay of antibodies to exogenous and endogenous antigens could be useful for determining risk of developing ER+ breast cancer and preventing administration of tamoxifen and others selective modulators of estrogen receptors. Active immunization against exogenous chemical carcinogens could increase the levels of antibodies to endogenous steroids, thus stimulating breast cancer.

Key words: breast cancer, antibodies, benzo[a]pyrene, estradiol, progesterone.

REFERENCES

1. Pisareva L.F., Choinzonov E.L., Gurina L.I., Odintsova I.N., Shoikhet Ya.N., Lazarev A.F., Yudin S.V., Kosykh N.E. Epidemiological research of cancer in the region of Siberia and Far East. Dal'nevostochnyi meditsinskii zhurnal. 2005; 1: 51–55. [in Russian]
2. Sestak I. Preventative therapies for healthy women at high risk of breast cancer. Cancer Manag Res. 2014 Oct 17; 6: 423-30. doi: 10.2147/CMAR.S55219.

3. Ghousaini M., Fletcher O., Michailidou K., Turnbull C., Schmidt M.K., Dicks E., Dennis J., Wang Q., Humphreys M.K., Luccarini C., Baynes C., Conroy D., Maranian M., Ahmed S., Driver K., Johnson N., Orr N., dos Santos Silva I., Waisfisz Q., Meijers-Heijboer H., Uitterlinden A.G., Rivadeneira F. Genome-wide association analysis identifies three new breast cancer susceptibility loci. Nat Genet. 2012 Jan 22; 44 (3): 312–8. doi: 10.1038/ng.1049.

4. *Imjanitov E.N.* Hereditary breast cancer. *Prakticheskaja onkologija*. 2010; 11 (4): 258–266 [in Russian]
5. *Burdennyj A.M., Kazubskaja T.P., Braga Je.A., Nosikov V.V., Loginov V.I.* Association of polymorphic markers of xenobiotic biotransformation genes with breast cancer in females residing in Moscow. *Molekuljarnaja medicina*. 2012; 5: 30–34 [in Russian]
6. *Economopoulos K.P., Sergentanis T.N.* Three polymorphisms in cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) gene and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jul; 122(2): 545–51. doi: 10.1007/s10549-009-0728-z.
7. *Go R.E., Hwang K.A., Choi K.C.* Cytochrome P450 1 family and cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015 Mar; 147: 24–30. doi: 10.1016/j.jsmb.2014.11.003.
8. *Brewster A.M., Jorgensen T.J., Ruczinski I., Huang H.Y., Hoffman S., Thuita L., Newschaffer C., Lunn R.M., Bell D., Helzlsouer K.J.* Polymorphisms of the DNA repair genes XPD (Lys751Gln) and XRCC1 (Arg399Gln and Arg194Trp): relationship to breast cancer risk and familial predisposition to breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2006 Jan; 95 (1): 73–80. doi: 10.1007/s10549-005-9045-3.
9. *Duell E.J., Millikan R.C., Pittman G.S., Winkel S., Lunn R.M., Tse C.K., Eaton A., Mohrenweiser H.W., Newman B., Bell D.A.* Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 Mar; 10 (3): 217–22.
10. *De Buck S.S., Augustijns P., Muller C.P.* Specific antibody modulates absorptive transport and metabolic activation of benzo[a]pyrene across Caco-2 monolayers. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 May; 313 (2): 640–6. doi:10.1124/jpet.104.081034.
11. *De Buck S.S., Schellenberger M.T., Ensch C., Muller C.P.* Effects of antibodies induced by a conjugate vaccine on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone absorptive transport, metabolism, and proliferation of human lung cells. *Int J Cancer*. 2010 Aug 1; 127 (3): 513–20. doi: 10.1002/ijc.25073.
12. *Cernohorska H., Klimesova S., Lepsa L., Jinoch P., Milcova A., Schmuczerova J., Topinca J., Labaj J.* Influence of immunization with non-genotoxic PAH-KLH conjugates on the resistance of organisms exposed to benzo[a]pyrene. *Mutat Res*. 2012 Feb 18; 742 (1–2): 2–10. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.10.016.
13. *Kondakova I.V., Spirina L.V., Koval V.D., Shashova E.E., Choinzonov E.L., Ivanova E.V., Kolomiets L.A., Chernyshova A.L., Slonimskaya E.M., Usynin E.A., Afanas'ev S.G.* Chymotrypsin-like activity and subunit composition of proteasomes in human cancers. *Mol. Biol.* 2014; 48 (3): 444–451. [in Russian]
14. *Grova N., Prodhomme E.J., Schellenberger M.T., Farinelle S., Muller C.P.* Modulation of carcinogen bioavailability by immunization with benzo[a]pyrene-conjugate vaccine. *Vaccine*. 2009 Jun 24; 27 (31): 4142–51. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.052.
15. *Moolten F.L., Capparel N., Boger E.* Reduction of respiratory tract binding of benzo(a)pyrene in mice by immunization. *J Natl Cancer Inst*. 1978 Nov; 61 (5): 1347–9.
16. *Moolten F.L., Schreiber B., Rizzone A.* Protection of mice against 7,12 – dimethylbenz(a)anthracene – induced skin tumors by immunization with fluorinated analog of carcinogen. *Cancer Res*. 1981 Feb; 41 (2): 425–9.
17. *Peck R.M., Peck E.B.* Inhibition of chemically induced neoplasia by immunization with an antigenic carcinogen-protein conjugate. *Cancer Res*. 1971 Nov; 31 (11): 1550–4.
18. *Schellenberger M.T., Farinelle S., Willème S., Muller C.P.* Evaluation of adjuvants for a candidate conjugates vaccine against benzo[a]pyrene. *Human Vaccines*. 2011; 7: 166–173.
19. *Silbart L.K., Keren D.F.* Reduction of intestinal carcinogen absorption by carcinogen-specific immunity. *Science*. 1989 Mar 17; 243 (4897): 1462–4.
20. *Caldwell B.V., Tillson S.A., Esber H., Thorncroft I.H.* Survival of tumors after immunization against oestrogens. *Nature*. 1971; 231 (5298): 118–9.
21. *Rosenberg M., Amir D., Folman Y.* The effects of active immunization against progesterone on plasma concentrations of total and free progesterone, estradiol-17beta and LH in the cyclic ewe. *Theriogenology*. 1987; 28: 417–426.
22. *Glushkov A.N., Polenok E.G., Anosova T.P., Savchenko Ja.A., Bakanova M.L., Minina V.I., Mun S.A., Larin S.A., Kostjanko M.V.* Serum antibodies to benzo[a]pyrene and chromosomal aberrations in lymphocytes of peripheral blood in the workers of coal processing enterprise. *Rossijskij immunologicheskij zhurnal*. 2011; 5 (14): 39–44 [in Russian]
23. *Glushkov A.N., Polenok E.G., Verzhbickaja N.E., Titov V.A., Vafin I.A., Ragozhina S.E.* Antibodies to chemical carcinogenes and steroid hormones in lung cancer patients. *Rossijskij immunologicheskij zhurnal*. 2014; 8 (2): 219–227 [in Russian].
24. *Galati R., Zijno A., Crebelli R., Falasca G., Tomei F., Iecher F., Carta R., Verdina A.* Detection of antibodies to the benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in sera from individuals exposed to low doses of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Exp Clin Cancer Res*. 2001 Sep; 20 (3): 359–64.
25. *Ustinov V.A., Matveeva V.A., Kostyanko M.V., Glushkov A.N.* Antibodies against benzo[a]pyrene in immunized mouse and lung cancer patients. *Exp Oncol*. 2013 Sep; 35 (3): 207–10.
26. *Anosova T.P., Polenok E.G., Anosov M.P., Krasil'nikova K.S., Kostjanko M.V., Verzhbickaja N.E., Gurov E.A., Vafin I.A., Ragozhina S.E., Glushkov A.N.* Antibodies to xeno- and endobiotics in patients with breast cancer. *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra RAN*. 2012; 5 (2): 440–443 [in Russian]
27. *Glushkov A.N., Anosova T.P., Nebesnaja N.G., Zheleznova L.Ja.* Isotypic features of antibodies to polycyclic aromatic hydrocarbons in patients with cancer of breast, stomach, colon and rectum. *Jeksperimental'naja Onkologija*. 1996; 18: 426–428 [in Russian]
28. *Glushkov A., Polenok E., Kostyanko M., Antonov A., Verzhbitskaya N., Vafin I., Ragozhina S.* Postmenopausal breast cancer risk in relation to antibodies specific to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone. *Iran J Cancer Prev*. 2016 Apr 24; 9 (2): e4212. doi: 10.17795/ijcp-4212.
29. *Glushkov A.N.* Immunological disbalance in carcinogenesis. *Med Hypotheses*. 2014 Aug; 83 (2): 166–71. doi: 10.1016/j.mehy.2014.05.003.
30. *Hajian-Tilaki K.* Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J Intern Med*. 2013; 4 (2): 627–35.
31. *Verdina A.* Carcinogen-modified DNA and specific humoral immunity toward carcinogen-DNA adducts. *Ann Ist Super Sanita*. 2006; 42 (2): 189–94.

Received 24.06.16
Accepted 30.10.16

ABOUT THE AUTHORS

Glushkov Andrey N., MD, DSc, Professor, Director of Institute of Human Ecology of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Professor of the Department of Genetics, Kemerovo State University (Kemerovo, Russian Federation). E-mail: ihe@list.ru. SPIN-code: 9536-8530.

Polenok Elena G., PhD, Head of Immunochemistry Department, Institute of Human Ecology of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Kemerovo, Russian Federation). E-mail: egpolenok@mail.ru. SPIN-code: 3925-0185.

Magarill Yury A., MD, PhD, Head of Oncology Department, Kemerovo State Medical University (Kemerovo, Russian Federation). E-mail: attik1@mail.ru. AuthorID: 522768.

Anosova Tatiana P., Principal Engineer, Biologist, Immunochemistry Department, Institute of Human Ecology of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, (Kemerovo, Russian Federation). E-mail: tm-petrovichi@mail.ru. SPIN-code: 9969-4392.

Antonov Alexandr V., MD, Head of the Department of Breast Diseases, Regional Clinical Cancer Center (Kemerovo, Russian Federation). E-mail: 05-guz-okod@kuzdrav.ru.

Verzhbitskaya Natalia E., MD, PhD, Head of Anatomic Pathology Department, Kemerovo Regional Anatomic Pathology Bureau (Kemerovo, Russian Federation). E-mail: keu-73@mail.ru.

Authors declare lack of the possible conflicts of interests