

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

Поступила 14.01.03

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК [616.24-006.6-092:612.017.1]-078

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

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

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

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

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

Summary

Paraneoplastic (onconeural) antigens involve normal high-specific for the nervous system proteins which could be also expressed by tumor cells outside the nervous system. While entering the blood vessels paraneoplastic antigens initiate an autoimmune process resulted in production of autoantibodies which evoke paraneoplastic neurological syndrome occurrence. One of the paraneoplastic antigens — Ca²⁺-binding protein recoverin — can be expressed by some tumors' cells and induce autoimmune injury of the retina. We compared ELISA and immunoblotting methods to detect autoantibodies against recoverin in sera of lung cancer patients and demonstrated the ELISA to be non-specific whereas the immunoblotting is quite sensitive and specific for serial analysis of sera of lung cancer patients to detect the anti-recoverin autoantibodies.

Резюме

К паранеопластическим (онконевральным) антигенам относят белки, которые в норме высокоспецифичны для нервной системы, но при злокачественной трансформации могут экспрессироваться также клетками раковой опухоли, локализованными вне нервной системы. При попадании в кровяное русло паранеопластические антигены иницируют аутоиммунный процесс, в результате чего генерируются аутоантитела, которые, преодолевая гематотканевый барьер, вызывают развитие паранеопластического неврологического синдрома. Один из паранеопластических антигенов — Ca²⁺-связывающий белок рековерин — может экспрессироваться клетками некоторых опухолей и тем самым индуцировать аутоиммунный процесс, приводя в конечном счете к развитию аутоиммунной дегенерации сетчатки. В этой работе мы провели сравнение применения методов ELISA и иммуноблота для определения аутоантител против рековерина в сыворотке крови больных раком легких и показали, что метод ELISA неспецифичен, в то время как иммуноблот обладает необходимыми специфичностью и чувствительностью, достаточными для серийного анализа сыворотки крови больных раком легких на присутствие в них аутоантител против рековерина.

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

развитие того или иного паранеопластического неврологического синдрома [6].

Одним из паранеопластических антигенов является Ca²⁺-связывающий белок рековерин, который в норме присутствует в сетчатке глаза позвоночных [1] и ингибирует фосфорилирование зрительного пигмента родопсина [4,5,7]. При некоторых злокачественных опухолях, например при мелкоклеточной

(МККЛ) и немелкоклеточной (НМККЛ) карциноме легких, рековерин может экспрессироваться в опухолевой ткани [10], инициируя аутоиммунный процесс и развитие аутоиммунной дегенерации сетчатки [11].

В настоящей работе проведена оценка применения методов ELISA и иммуноблота для выявления аутоантител против рековерина (АПР) в сыворотке крови больных раком легких.

Материалы и методы

Получение рекомбинантного рековерина. Экспрессию рековерина в клетках *E.coli* проводили как описано в [2]. Очистка рековерина включала 3 стадии [2]: экстракцию клеток *E.coli* ЭГТА-содержащим буфером (рН 8,0), высаливание рековерина сульфатом аммония (осаждение при 70% насыщении сульфата аммония) и гидрофобную хроматографию на фенилсефарозе. Полученный препарат был гомогенен по данным электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия в полиакриловом геле SDS-ПААГ [8] с последующей окраской серебром.

Метод ELISA. Иммуноферментный анализ методом ELISA проводили согласно [3] с использованием рековерина в качестве антигена. Исходную сыворотку крови разводили в 20 раз и методом последовательных разведений наносили на планшет, насыщенный рековерином.

Иммуноблот проводили, как описано в [9], следующим образом: после SDS-ПААГ рековерин электрофоретически переносили на нитроцеллюлозные мембраны, неспецифические участки связывания на мембране насыщали иммуноглобулинами молока, далее мембраны инкубировали в присутствии анализируемой сыворотки крови в течение 12 ч, затем — в течение 1,5 ч со вторичными антителами, ковалентно связанными с пероксидазой хрена. Окрашивание белков, связавших меченые иммуноглобулины, проводили 3,3'-диаминобензидином.

Результаты исследования

АПР выявляются методами иммуноблота и ELISA в сыворотке крови больных раком легких.

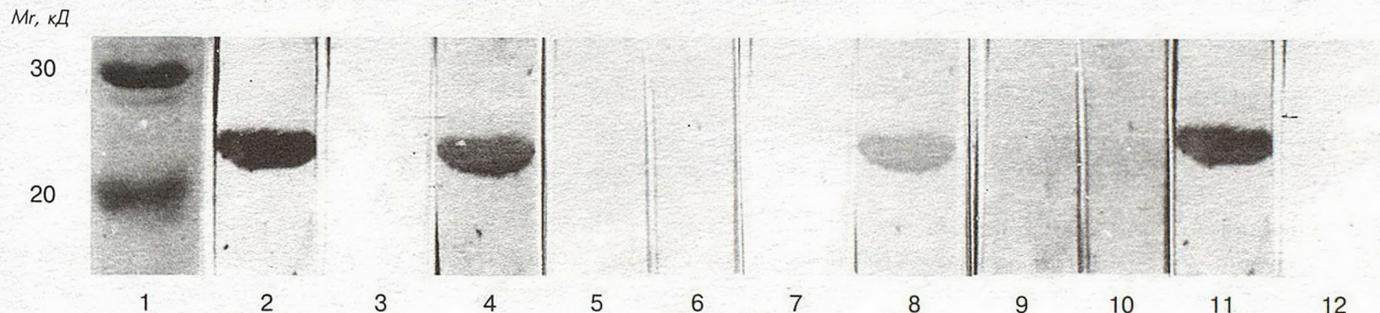


Рис. Иммуноблот образцов сыворотки крови пациентов с диагнозом рака легких.

Дорожки: 1 — белковые маркеры; 2–12 — экзогенный бычий рекомбинантный рековерин (2 мкг на дорожку), окрашенный: кроличьими поликлональными моноспецифическими антителами против рековерина в концентрации 2 мкг/мл (2); суммарной контрольной сывороткой, полученной от 20 здоровых индивидов, в разведении 1:20 (3); сывороткой крови пациентов с диагнозом рака легких в разведении 1:20: МККЛ-9 (дорожка 4); МККЛ-10 (дорожка 5); МККЛ-11 (дорожка 6); МККЛ-12 (дорожка 7); МККЛ-13 (дорожка 8); МККЛ-14 (дорожка 9); МККЛ-15 (дорожка 10); НМККЛ-4 (дорожка 11); НМККЛ-5 (дорожка 12).

Мы проанализировали методами ELISA и иммуноблота 20 образцов сыворотки крови больных МККЛ и НМККЛ для ответа на вопрос, присутствуют ли в них АПР. В качестве контроля использовали суммарную сыворотку, полученную от 20 здоровых индивидов. Результаты анализа образцов сыворотки крови обоими методами суммированы в таблице. Иммунограммы образцов, которые давали положительную реакцию, по данным метода ELISA и (или) иммуноблота, представлены на рисунке.

Положительная реакция на АПР в сыворотке крови пациентов с диагнозом рака легких была получена при использовании методов ELISA и иммуноблота соответственно в 6 и 3 случаях. Только в двух случаях (МККЛ-9 и НМККЛ-4) положительная реакция была получена обоими методами: и ELISA, и иммуноблота (см. таблицу, рисунок, дорожки 4 и 11). В четырех случаях (МККЛ-10, МККЛ-14, НМККЛ-5 и НМККЛ-6) АПР-положительная реакция детектировалась при анализе методом ELISA, но не при анализе методом иммуноблота (см. таблицу, рисунок, дорожки 5, 9 и 12). В то же время одна сыворотка (МККЛ-13) с отрицательной на АПР реакцией по методу ELISA давала положительную реакцию при иммуноблоте (см. таблицу, рисунок, дорожка 8). Возникает вопрос, почему результаты, полученные методами ELISA и иммуноблота, не совпадают, хотя в обоих случаях для выявления АПР в сыворотке крови используется один и тот же препарат рековерина.

АПР-положительные сыворотки по данным метода ELISA дают отрицательную реакцию при иммуноблоте с использованием нативного электрофореза

Из литературы известно, что при раке легких, сопровождающемся ретинопатией, АПР по большей части являются конформационными, поэтому они не всегда детектируются методом иммуноблота после проведения SDS-ПААГ, поскольку додецилсульфат натрия, будучи детергентом, нарушает конформацию иммуногенных эпитопов рековерина [3]. Мы предположили, что у пациентов, АПР-позитивных по методу ELISA и негативных по методу иммуноблота (МККЛ-10, МККЛ-14, НМККЛ-5 и НМККЛ-6, см.

Таблица

Антитела против рековерина в сыворотке крови пациентов с диагнозом рака легких

Код	Диагноз	Титр АПР по данным методов	
		ELISA	иммуноблота
МККЛ-1	Мелкоклеточная карцинома легких	0	0
МККЛ-2	То же	0	0
МККЛ-3	" "		
МККЛ-4	" "	0	0
МККЛ-5	" "	0	0
МККЛ-6	" "	0	0
МККЛ-7	" "	0	0
МККЛ-8	" "	0	0
МККЛ-9	" "	1:1280	1:320
МККЛ-10	" "	1:1280	0
МККЛ-11	" "	0	0
МККЛ-12	" "	0	0
МККЛ-13	" "	0	1:320
МККЛ-14	" "	1:1280	0
НМККЛ-1	Плоскоклеточный рак	0	0
НМККЛ-2	То же	0	0
НМККЛ-3	Крупноклеточный рак	0	0
НМККЛ-4	То же	1:160	1:320
НМККЛ-5	Плоскоклеточный рак	1:320	0
НМККЛ-6	Крупноклеточный рак	1:80	0
Контроль		0	0

Примечание. В качестве контроля использовали суммарную сыворотку, полученную от 20 здоровых индивидов.

таблицу) аутоантитела могут иметь конформационную природу. Если это действительно так, то после SDS-ПААГ конформация иммуногенных эпитопов окажется нарушенной, и в результате при анализе сыворотки крови методом иммуноблота будет получен отрицательный результат. В то время как при более мягких условиях метода ELISA, т.е. в отсутствие додецилсульфата натрия, можно ожидать положительной реакции на АПР.

Для проверки этого предположения мы проанализировали образцы сыворотки крови, АПР-положительные по методу ELISA и отрицательные при иммуноблоте с помощью электрофореза в ПААГ в отсутствие додецилсульфата натрия. Оказалось, однако, что и в этих условиях образцы МККЛ-10, МККЛ-14, НМККЛ-5 и НМККЛ-6 дают АПР-отрицательную реакцию (данные не представлены).

Таким образом, различие результатов при анализе образцов сыворотки крови МККЛ-10, МККЛ-14, НМККЛ-5 и НМККЛ-6 на присутствие в них АПР (отрицательная реакция при иммуноблоте и положительная при использовании метода ELISA) нельзя объяснить конформационной природой аутоантител.

Сыворотка крови больных раком крови неспецифически связывает сывороточный альбумин и сухое молоко

Еще одной причиной вышеуказанного различия между методами ELISA и иммуноблота может быть неспецифическая реакция сыворотки крови с бычьим сывороточным альбумином, используемым для насыщения мест неспецифической сорбции на планшете при использовании метода ELISA. Для проверки этого предположения мы вновь проанализировали образцы сыворотки крови пациентов МККЛ-10, МККЛ-14, НМККЛ-5 и НМККЛ-6, с которыми была получена АПР-положительная реакция по методу ELISA и отрицательная при иммуноблоте (см. таблицу, рисунок), заменив, однако, рековерин на бычий сывороточный альбумин или сухое обезжиренное человеческое молоко в качестве антигена. Оказалось, что и в этом случае метод ELISA дает положительную реакцию, подобную той, что была получена с очищенным рековерином как антигеном.

Следовательно, выявленное нами различие в результатах анализа образцов сыворотки крови пациентов с диагнозом рака легких на содержание в них АПР (положительная реакция по методу ELISA и отрицательная по иммуноблоте) может быть объяснено взаимодействием анализируемой сыворотки с альбумином или сухим молоком, используемых в методе ELISA в качестве вспомогательного препарата, т.е. реакцией, не имеющей к АПР никакого отношения.

В заключение следует заметить, что в одном случае (пациент МККЛ-13) АПР-положительная реакция, наблюдавшаяся при иммуноблоте, отсутствовала при анализе методом ELISA. Учитывая высокую специфичность и надежность метода иммуноблота, можно объяснить это различие следующим образом. Известно, что после обработки денатурирующими агентами, например додецилсульфатом натрия, молекулы белка приобретают вид статистической глобулы, что способствует экспонированию имеющихся в них иммуногенных эпитопов и соответственно увеличивает доступность этих эпитопов для антител, тогда как при использовании метода ELISA молекулы белка-антигена находятся в нативном состоянии и какая-то часть присутствующих в них эпитопов может быть замаскирована и неспособна взаимодействовать с антителами.

На основании результатов настоящей работы можно рекомендовать метод иммуноблота для выявления АПР в сыворотке крови пациентов с диагнозом рака легких, как метод более специфичный, чем метод ELISA, и не уступающий последнему по чувствительности (при условии применения современных высокочувствительных конъюгатов). Очевидно, что

описанная нами неспецифическая реакция между анализируемой сывороткой крови и альбумином, используемым при методе ELISA в качестве вспомогательного препарата, может иметь место и при анализе сыворотки крови на присутствие в ней антител против антигенов, отличных от реCOVERина. При достаточно высоких титрах, определяемых в сыворотке специфических антител, ошибка, вносимая этой неспецифической реакцией (ее "титр" при определении АПР, как видно из таблицы, не превышает 1:1280), может не сказываться на результатах анализа. Однако при низких титрах, как, например, в описанных нами случаях определения АПР, использование метода ELISA может дать ошибочные результаты.

Авторы выражают глубокую благодарность проф. П.П.Филиппову за серьезное обсуждение и интерпретацию результатов работы и оказание неоценимой помощи в ее написании. Работа поддержана грантами *Ludwig Institute for Cancer Research*, РФФИ (№ 00-0448332) и Федеральной программы "Интеграция".

ЛИТЕРАТУРА

1. Дижур А.М., Некрасова Э.Н., Филиппов П.П. Новый специфичный для фоторецепторных клеток белок с молекулярной массой 26 кДа, способный связываться с иммобилизованным делипидизированным родопсином. *Биохимия* 1991; 56 (9): 225–229.
2. Adamus G., Amundson D. Epitope recognition of recoverin in cancer associated retinopathy: evidence for calcium-dependent

- conformational epitopes. *J. Neurosci. Res.* 1996; 45 (6): 863–872.
3. Gorodovikova E.N., Philippov P.P. The presence of a calcium-sensitive p26-containing complex in bovine retina rod cells. *FEBS Lett.* 1993; 335 (2): 277–279.
4. Gorodovikova E.N., Senin I.I., Philippov P.P. Calcium-sensitive control of rhodopsin phosphorylation in the reconstituted system consisting of photoreceptor membranes, rhodopsin kinase and recoverin. *Ibid.* 1994; 353 (2): 171–172.
5. Gure A.O., Stockert E., Scanlan M.J. et al. Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97 (8): 4198–4203.
6. Kawamura S., Hisatomi O., Kayada S. et al. Recoverin has S-modulin activity in frog rods. *J. Biol. Chem.* 1993; 268 (20): 14579–14582.
7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–688.
8. Maeda A., Ohguro H., Maeda T. et al. Aberrant expression of photoreceptor-specific calcium-binding protein (recoverin) in cancer cell lines. *Cancer Res.* 2000; 60 (7): 1914–1920.
9. Polans A.S., Buczylo J., Crabb J., Palczewski K. A photoreceptor calcium binding protein is recognized by autoantibodies obtained from patients with cancer-associated retinopathy. *J. Cell Biol.* 1991; 112 (5): 981–989.
10. Polans A.S., Witkowska D., Haley T.L. et al. Recoverin, a photoreceptor-specific calcium-binding protein, is expressed by the tumor of a patient with cancer-associated retinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92 (20): 9176–9180.
11. Senin I.I., Zargarov A.A., Alekseev A.M. et al. N-Myristoylation of recoverin enhances its efficiency as an inhibitor of rhodopsin kinase. *FEBS Lett.* 1995; 376 (1–2): 87–90.

Поступила 03.12.01

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК [616.24–036.12–06:616.127–005.4]–085.217

Ю.Н.Краснова, Б.А.Черняк, А.А.Дзизинский

БЕЗОПАСНОСТЬ β_2 -АГОНИСТОВ И АТРОВЕНТА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ОБСТРУКТИВНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ ЛЕГКИХ В СОЧЕТАНИИ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Институт усовершенствования врачей, Иркутск

SAFETY OF β_2 -AGONISTS AND ATROVENT IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASES ASSOCIATED WITH ISCHAEMIC HEART DISEASE

Yu.N.Krasnova, B.A.Cherniak, A.A.Dzizinsky

Summary

The aim of this study was to evaluate safety and efficacy of salbutamol, fenoterol and ipratropium bromide in patients with bronchial asthma (BA) associated with ischaemic heart disease (IHD). One hundred and twenty five patients with exacerbation of moderate to severe BA entered the study. Sixty four of them were diagnosed associated IHD (angina pectoris of II to III functional class and postinfarct cardiosclerosis). All the patients were divided into 4 group, receiving fenoterol, salbutamol, ipratropium bromide and Berodual correspondingly as via dosing aerosol and nebulizer. The bronchodilating effect of the drugs was assessed using peakflowmeter. Moreover, oxygen saturation, arterial blood pressure were measured and 24-hour ECG Holter monitoring was performed. As a result, nebulized therapy with short-acting β_2 -agonists gave a significant bronchodilating effect and did not cause considerable hemodynamic disorders and myocardial ischaemia. When using high