



УДК 577.112.853.083.3:616-006

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ IgM-АНТИТЕЛ К ГАПТЕНУ ТОМСЕНА–ФРИДЕНРЕЙХА (TF) В ОНКОДИАГНОСТИКЕ. СРАВНЕНИЕ ДАННЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ЧЕТЫРЕХ TF-ГЛИКОКОНЬЮГАТОВ

© 1997 г. Е. П. Смородин[#], Б. Янссон*, Л. Милюхина,

Г. Пааски, Н. В. Бовин**, Т. В. Овчинникова**, О. Куртенков

*Институт экспериментальной и клинической медицины, Таллин, Эстония,
Hiiu 42, EE0016, Tallinn, Estonia;***BioInvent International AB, Лунд, Швеция;****Институт биоорганической химии им. М.М. Шемлякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

Поступила в редакцию 15.01.97 г. Принята к печати 11.04.97 г.

Определен уровень IgM-антител к гаптену Томсена–Фриденрейха (TF) относительно общего уровня IgM в сыворотке крови онкологических больных с опухолями желудка и молочной железы различного вида, а также здоровых доноров. Анализ проводили в ИФА-тесте с использованием четырех TF-гликоконъюгатов: TF-ПАА (с содержанием TF-гаптана Galβ1-3GalNAcα1-O(CH₂)₃NH-10 мол. % в расчете на число мономерных звеньев в ПАА), TF-ЧСА (Galβ1-3GalNAcα1-O-p-C₆H₄-ЧСА (человеческий сывороточный альбумин), содержащего около 15 углеводных остатков на молекулу ЧСА), асиало-κ-казеингликопептида и асиалогликофорина. Общий уровень IgM определяли с помощью антител к μ-цепи IgM человека. Статистически достоверная разница в результатах для раковых больных и здоровых доноров была выявлена при использовании двух конъюгатов: TF-ПАА и TF-ЧСА. Для конъюгата TF-ПАА чувствительность и специфичность теста составили 75–83 и 77% соответственно. Таким образом, этот антиген является наиболее подходящим для определения уровня сывороточных анти-TF-IgM.

Ключевые слова: TF-антиген – антиген Томсена–Фриденрейха, TF-гликоконъюгаты, анти-TF-IgM, опухолевые маркеры, онкодиагностика, иммуноферментный анализ.

Антиген Томсена–Фриденрейха (TF-антиген, Galβ1-3GalNAcα) известен как опухолевый маркер, экспрессируемый клетками карцином различных локализаций [1, 2]. Обнаружено, что в результате изменений в гликозилировании поверхности клетки этот антиген появляется также в быстро пролиферирующих эпителиальных клетках при псориазе [3]. TF-гаптен – характерный фрагмент многих мембранных и сывороточных гликопротеинов и гликолипидов. В норме этот дисахарид сиалирован или фукозилирован и поэтому не выявляется анти-TF-антителами. Естественные анти-TF-IgM присутствуют в сыворотке крови каждого взрослого человека, и в норме их уровень практически постоянен. Однако у онко-

логических больных наблюдается значительное его снижение, причем такая реакция проявляется уже на ранней стадии заболевания и продолжается в течение всего клинического курса [1, 2, 4, 5]. Причиной снижения уровня анти-TF-IgM в крови у раковых больных может являться секреция иммуносупрессивных TF-муцинов опухолевыми клетками, что приводит к подавлению TF-специфического иммунного ответа [6].

Для количественного определения анти-TF-антител в сыворотке Шпрингером был предложен твердофазный иммунофлуоресцентный анализ с использованием природного TF-антигена, выделенного из эритроцитарных MN-гликопротеинов (группа крови MN) [7, 8]. По результатам определения анти-TF-IgM относительно общего уровня IgM в сыворотке (рассчитывался индекс $Q_m = (\text{анти-TF-IgM})^2 / (\text{IgM общий} \times 100)$) было зафиксировано снижение значений Q_m у пациентов с различными злокачественными опухолями по сравнению со здоровыми донорами и больными с доброкачественными опухолями. Хотя чувствительность и специфичность этого метода, согласно работам [1, 2], достигает 90%, до сих пор он не

Сокращения: БСА – бычий сывороточный альбумин, ИФА – иммуноферментный анализ, ПАА – полиакриламид, ФСБ – фосфатно-солевой буфер, ЧСА – человеческий сывороточный альбумин, АСГР – асиало-κ-казеингликопептид, АГ – асиалогликофорин, СГР – κ-казеингликопептид, СР – κ-казеинпептид, РНА – лектин арахиса, TF – гаптен Томсена–Фриденрейха.

[#] Автор для переписки.

получил широкого распространения в онкодиагностике.

В настоящей работе с использованием нескольких типов ТF-конъюгатов проведено определение уровня анти-ТF-IgM в сыворотке крови больных с гистохимически различными опухолями желудка и молочной железы, а также здоровых доноров по отношению к общему уровню IgM для того, чтобы выяснить, как природа ТF-конъюгата влияет на диагностическую значимость результатов.

Предварительно для того, чтобы оценить количество сорбированных на пластике ТF-гликоконъюгатов, было изучено их связывание с РНА (ИФА с использованием конъюгата РНА-щелочная фосфатаза). Значения A_{405} составили: 0.207 для ТF-ПАА, 0.367 для ТF-ЧСА, 0.466 для АG, 0.173 для АСGР. Не содержащие ТF-эпитопов конъюгаты связывались с РНА слабо (A_{405} 0.108 для Gal β 1-GlcNAc β -БСА) или совсем не связывались (СGР, СР).

Определение анти-ТF-IgM в сыворотках проводили в ИФА-тесте с использованием четырех ТF-гликоконъюгатов: ТF-ПАА (содержание ТF-гаптена Gal β 1-3GalNAc α 1-O(CH $_2$) $_3$ NH- 10 мол. % в расчете на число мономерных звеньев в ПАА), ТF-ЧСА (Gal β 1-3GalNAc α 1-O-*p*-C $_6$ H $_4$ -ЧСА, содержащего около 15 дисахаридных остатков на молекулу ЧСА), асиало-к-казеингликопептида (АСGР), асиалогликофорина (АG). Связавшиеся с ТF-антигеном анти-ТF-IgM выявляли с помощью свиных антител к μ -цепи IgM человека, конъюгированных с щелочной фосфатазой. После определения общего уровня IgM (ИФА с использованием козлиных антител к μ -цепи IgM человека) рассчитывали индекс Q_m [1].

Статистически достоверная разница в значениях Q_m для групп больных раком желудка и здоровых доноров наблюдалась при использовании конъюгатов ТF-ПАА и ТF-ЧСА. Разница выражена более отчетливо для ТF-ПАА: пониженные относительно здоровых лиц значения Q_m можно зафиксировать у больных уже на I стадии. Для пациентов с раком молочной железы также характерны более низкие по сравнению со здоровыми лицами значения индекса Q_m (определение анти-ТF-IgM проведено с использованием ТF-ПАА-конъюгата) (таблица, рисунок).

Связывание сывороточных IgM с АСGР и с не содержащими ТF-эпитопов СGР и СР, используемыми в качестве отрицательного контроля, было сходным (близкие значения A_{405} , данные не представлены). В параллельных тестах не было обнаружено корреляции между связыванием IgM с ТF-ПАА и АСGР. Эти результаты можно объяснить высоким неспецифическим связыванием казеинпептидов с IgM или присутствием в человече-

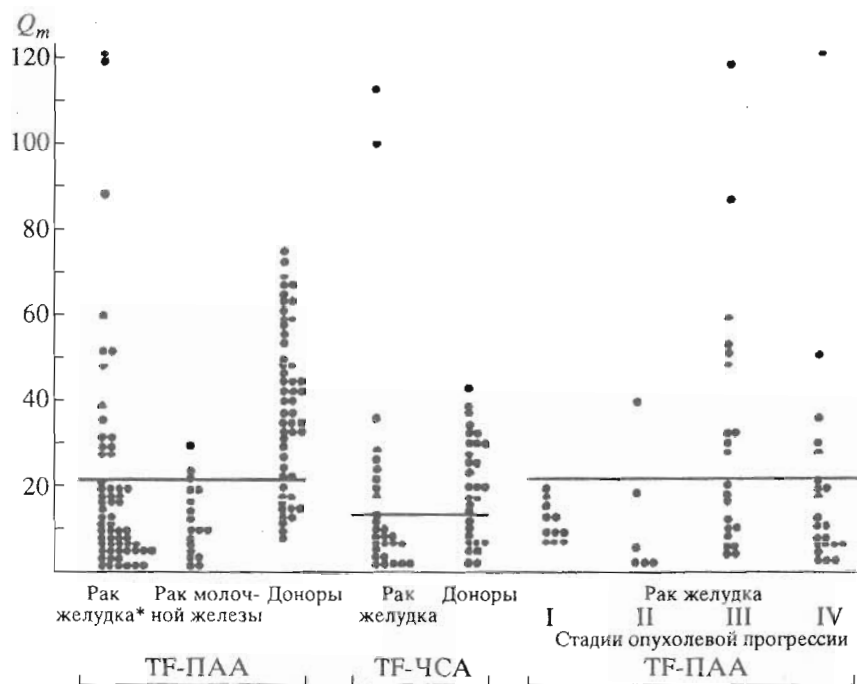
ской сыворотке антител к ним. Так или иначе, АСGР как ТF-антиген для диагностических целей не подходит.

Использование АG для определения анти-ТF-IgM не выявило достоверного различия значений Q_m в группах больных и здоровых лиц.

Таким образом, из четырех исследованных ТF-гликоконъюгатов синтетический полиакриламидный конъюгат является наиболее подходящим для онкодиагностики, поскольку при использовании именно этого антигена достигается наиболее выраженная разница в значениях Q_m между группами раковых больных и здоровых лиц и наиболее высокая чувствительность и специфичность определения (таблица, рисунок). Эти результаты находятся в соответствии с полученными ранее [9] в сравнительном анализе ПАА- и БСА-гликоконъюгатов при определении специфических IgM в сыворотке крови у больных лепрой и контрольной группой здоровых лиц. Чувствительность и специфичность определения для ПАА- и БСА-конъюгатов с одинаковым содержанием углеводных гаптенных была значительно выше для первых. Полученные в данной работе результаты также свидетельствуют о том, что для определения анти-ТF-IgM в сыворотке крови полиакриламидные конъюгаты предпочтительны перед аналогичными БСА-конъюгатами.

Связывание анти-ТF-IgM с различными ТF-антигенами (синтетическими или полученными в результате ферментативной обработки природных гликопротеинов) зависит от различных факторов; по-видимому, важными моментами являются доступность ТF-эпитопов, а также их плотность (расстояние между соседними олигосахаридами). Возможно, что благодаря своей гибкости молекула ПАА обеспечивает оптимальное взаимное расположение ТF-гаптена и антитела. Чтобы избежать стерических затруднений, плотность ТF-эпитопов на носителе не должна быть слишком высокой. Так, при определении сывороточных IgM против *Mycobacterium leprae* лучшие результаты были получены для гликоконъюгата с низким содержанием углеводных гаптенных [9]. По-видимому, именно высокая плотность ТF-эпитопов в АG (где гликозилированы несколько расположенных подряд остатков серина или треонина) является причиной его непригодности для диагностики. Другое объяснение – неспецифическое связывание IgM с носителем или присутствие в сыворотке IgM другой специфичности – то же, что предполагалось для интерпретации близких по значению величин, полученных при связывании IgM с АСGР, СGР и СР (см. выше).

Заслуживает внимания тот факт, что низкие значения Q_m зафиксированы у пациентов с раком желудка уже на I и II стадии (рисунок). Это подтверждает возможность использования ТF-анти-



Распределение индекса Q_m для больных раком желудка, молочной железы и здоровых доноров. Определение анти-TF-IgM проведено с использованием конъюгатов TF-ПАА и TF-ЧСА. Число исследованных (n) для различных групп приведено в таблице. Предел исключения ("cut-off") (горизонтальная линия) для TF-ПАА и TF-ЧСА составляет 21.4 и 12.9 соответственно. * – без дифференцировки по стадиям I–IV.

гена для ранней онкодиагностики, предполагаемую для рака молочной железы и легкого [10]. В работах [1, 2] сообщалось, что у нескольких пациентов с раком молочной железы снижение уровня анти-TF-IgM при заболевании опережало клиническую регистрацию опухоли. Можно предполагать, что для ранней онкодиагностики определение титра антител к опухолевым маркерам имеет преимущество по сравнению с прямым выявлением последних, поскольку заметное изменение титра специфических антител может быть зафиксировано в ситуации, когда уровень экспрессируемого клетками и/или циркулирующего в крови опухолевого маркера еще слишком низок для определения.

Количественный анализ анти-TF-IgM в сыворотке – сложная задача, поскольку TF-антитела представляют гетерогенную популяцию с широким спектром эпитопной специфичности [11]. Антитела класса IgM низкоаффинны; кроме того, в сыворотке также присутствуют анти-TF-IgG и IgA [1], которые могут конкурировать с анти-TF-IgM в связывании с TF-антигеном. Следовательно, хотя пониженный уровень анти-TF-IgM в сыворотке онкологических больных регистрируется часто, в действительности он не всегда может отражать уменьшение синтеза анти-TF-IgM. Несомненно, что для выяснения этого важного вопроса требуются дальнейшие исследования.

Чувствительность и специфичность иммуноферментного выявления анти-TF-IgM в сыворотке крови больных раком и здоровых доноров

Антиген	Чувствительность, %*		Специфичность, %**	P^{***}/χ^2	
	Рак желудка	Рак молочной железы		Рак желудка	Рак мол. железы
TF-ПАА	75 ($n = 60$)	83 ($n = 18$)	77 ($n = 52$)	$10^{-6}/28.00$	$2 \times 10^{-5}/18.02$
TF-ЧСА	68 ($n = 28$)		63 ($n = 30$)	0.034/5.59	

* Чувствительность – отношение числа пациентов с позитивной реакцией ($Q_m < \text{"cut-off"}$) к общему числу обследованных пациентов (рак желудка или рак молочной железы соответственно).

** Специфичность – отношение числа здоровых лиц с негативной реакцией ($Q_m > \text{"cut-off"}$) к общему числу обследованных здоровых доноров; величины "cut-off" см. рисунок.

*** Значения P (уровень значимости) и χ^2 (критерий различий частот распределения) вычисляли согласно [13].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сыворотки. Для исследования взяты сыворотки онкологических больных с опухолями желудка и молочной железы гистологически различного вида (возраст больных 61.9 ± 12.0 и 49.9 ± 16.7 лет соответственно), а также здоровых доноров (возраст 54.2 ± 16.1 лет). Образцы сывороток хранили при 4°C не более 2 нед. Определение стадии опухолевой прогрессии проводилось по pTNM-системе [12].

Гликоконъюгаты. Конъюгат TF-ПАА с содержанием TF-гаптена Gal β 1-3GalNAc α 1-O(CH $_2$) $_3$ NH- 10 мол. %, а также аналогичный конъюгат Glc β -ПАА (использовавшийся в ИФА как отрицательный контроль) синтезированы как описано в работе [9]. Используются конъюгаты TF-ЧСА (Gal β 1-3GalNAc α 1-O-*p*-C $_6$ H $_4$ -ЧСА), содержащий около 15 углеводных остатков на молекулу ЧСА, фирмы BioCarb AB (Лунд, Швеция), асиалогликофорин (AG) и конъюгат Gal-GlcNAc-БСА (Gal β 1-3GlcNAc β 1-O-2-(2-карбометоксиэтилтио)этил)-БСА фирмы Carbohydrates Int. (Arloev, Швеция). АСРР получен из к-казеингликопептида (СРР) (Технический университет, Таллин [4]) десалированием трифторуксусной кислотой (ТФА): раствор СРР (3 мг/мл) в 0.1 М ТФА выдерживали 1 ч при 80°C , ТФА удаляли в вакууме, полученный продукт нейтрализовали и диализовали против буфера А (0.01 М фосфат натрия, 0.2 М NaCl, pH 7.2), содержащего 0.02% азида натрия. к-Казеинпептид (СР) получен из СРР периодатным окислением с последующим восстановлением NaBH $_4$. Содержание пептидов определяли спектрофотометрически на приборе Beckman 25 при 215 нм.

Связывание TF-антигенов с РНА-конъюгатом. В планшеты (Linbro, Flow) вносили раствор TF-антигена (1–10 мкг/мл) в 0.1 мл карбонатного буфера Б (0.05 М, pH 9.2), выдерживали 16 ч при 4°C , затем добавляли 0.01% БСА в буфере А (БСА предварительно последовательно обрабатывали NaIO $_4$ и NaBH $_4$ для удаления возможных примесей углеводов). Планшеты промывали буфером В (0.05 М трис-HCl, 0.2 М NaCl, 0.05% твин-20, pH 7.4), вносили конъюгат РНА-щелочная фосфатаза (Kemotex Bio A/S, Таллин) в том же буфере, выдерживали 17 ч при 4°C . Планшеты промывали холодным буфером В, вносили субстрат – *n*-нитрофенилфосфат (1 мг/мл) в глициновом буфере (pH 10.3) и измеряли величину оптического поглощения (А) на фотометре Lab-system Multiscan МСС/340 (Финляндия) при 405 нм. Анализ проводили в триплетах.

Определение анти-TF-IgM в сыворотке. В планшеты вносили 0.1 мл раствора TF-конъюгата (1–5 мкг/мл) в карбонатном буфере Б, выдерживали 16 ч при 4°C , добавляли 0.01% раствор казеина в буфере А и выдерживали 2 ч при 22°C .

Планшеты промывали буфером А, содержащим 0.05% твин-20, и затем вносили сыворотки в разведении 1 : 1000 в том же буфере с 0.05% твином-20, и 0.01% БСА. Планшеты выдерживали 22 ч при 22°C и промывали буфером В. Затем вносили в лунки свиные антитела к IgM человека (специфичные к μ -цепи), конъюгированные с щелочной фосфатазой (Orion Diagnostica, Финляндия), выдерживали 1.5 ч при 22°C и промывали буфером В. Далее добавляли *n*-нитрофенилфосфат и поступали так, как описано выше. В каждый планшет вносили контрольные сыворотки с заранее определенным содержанием анти-TF-IgM. Сыворотки хранили при -20°C и размораживали только один раз. Коэффициент вариации составил 7%.

Определение общего уровня IgM в сыворотке. В планшеты вносили раствор козлиных антител к μ -цепи IgM человека (Lab AS Ltd, Immunochemicals, Тарту) в буфере Б (1 мкг/мл), выдерживали 16 ч при 4°C , добавляли 0.01% раствор казеина в буфере А. После отмывки буфером В в лунки вносили сыворотки в разведении 1 : 20000 и далее поступали так, как описано выше для определения анти-TF-IgM. Общий уровень IgM рассчитывали относительно контроля (0.01% раствор казеина в буфере А). Отрицательный контроль (сыворотки, не содержащие IgM) показал низкое неспецифическое связывание с антителами к IgM человека, которое было сравнимо с уровнем фона в контроле с казеином. По результатам определений рассчитывали индекс $Q_m = (\text{анти-TF-IgM})^2 / (\text{общий уровень IgM} \times 100)$ [1]. Q_m является условной единицей, характерной для данного типа тест-системы. Статистический анализ выполнен методом наименьших квадратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Springer G.F. // Surv. Synth. Path. Res. 1983. V. 2. P. 141–164.
2. Springer G.F. // Science. 1984. V. 224. P. 1198–1206.
3. Dabelsteen E., Urs B.-J., Dorte J.-J., Mandel U. // Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 1990. V. 98. P. 221–228.
4. Kurtenkov O., Klaamas K., Miljukhina L. // Int. J. Cancer. 1995. V. 60. P. 781–785.
5. Kurtenkov O., Smorodin E., Bovin N., Klaamas K., Paaksi T., Zemlyanukhina T. // International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. XXII Meeting / Ed. A.M. Neville. Groningen, 1994. P. 102.
6. Fung P.Y.S., Longenecker B.M. // Cancer Res. 1991. V. 51. P. 1170–1176.
7. Springer G.F., Desai P.R. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 2744–2746.
8. Springer G.F., Desai P.R., Scanoin E.F. // Cancer. 1976. V. 37. P. 169–176.
9. Bövin N.V., Korchagina E.Yu., Zemlyanukhina T.V., Byramova N.E., Galanina O.E., Zemlyakov A.E.,

- Ivanov A.E., Zubov V.P., Mochalova L.V. // *Glycoconj. J.* 1993. V. 10. P. 142–151.
10. Desai P.R., Bluestein B., Springer G.F. // *Proceedings 77 Ann. Meeting of the American Association for Cancer Research.* Los Angeles, 1986. V. 27. P. 651.
11. Hoeffner W., Fischer K., Poschman A., Paulsen H. // *Vox Sang.* 1985. V. 48. P. 246–253.
12. Hermanek P., Sobin L.H. // *International Union Against Cancer. TNM Classification of the Malignant Tumours.* 4th ed. B.: Springer-Verlag, 1987.
13. Кудрин А.Н., Пономарев Г.Т. *Применение математики в экспериментальной и клинической медицине.* М.: Медицина, 1967. С. 133–138.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of IgM antibodies to Thomsen–Friedenreich (TF) Hapten in Oncodiagnosics: Comparison of Data Obtained with Four TF-glycoconjugates

E. P. Smorodin*, B. Jansson**, L. Milyukhina*, G. Paaski*,
N. V. Bovin***, T. V. Ovchinnikova***, and O. Kurtenkov*

* *Institute of Experimental and Clinical Medicine, Tallinn, Estonia*

** *BioInvent International AB, Lund, Sweden*

*** *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

Abstract—The level of IgM antibodies to the Thomsen–Friedenreich hapten (TF) relative to the total IgM level in the blood sera of gastric and breast carcinoma patients and healthy persons was determined using enzyme-linked immunosorbent assay. The following TF glycoconjugates were tested: TF–polyacrylamide (PAA) (with 10 mol. % of TF hapten Gal β 1-3GalNAc α 1-O(CH₂)₃NH per number of monomeric units in the polyacrylamide), TF–human serum albumin (HSA) (Gal β 1-3GalNAc α 1-O-*p*-C₆H₄-HSA containing approximately 15 carbohydrate residues per HSA molecule), asialo- κ -caseinoglycopeptide, and asialoglycophorin. The total IgM level was determined using antibodies to the μ -chain of human IgM. The statistically significant difference between cancer patients and healthy donors was revealed with two conjugates: TF–PAA and TF–HSA. In the case of TF–PPA, the sensitivity of the assay was 75–83%, and the specificity was 77%. Thus, TF–PAA is the most suitable conjugate for measuring the level of serum anti-TF-IgM antibodies.

Key words: TF-antigen, TF-glycoconjugates, ELISA, oncodiagnosics, tumor markers, anti-TF-IgM.