

УДК 612/902. 622.3147
©Коллектив авторов

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ПРИ ОНКОГИНЕКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Ю. Н. Гусарова¹, Е. В. Степанова², Е. О. Ландесман², О. В. Королева²,
Т. П. Вавилова¹, О. В. Макаров³, В. Н. Косецкий³

¹ Московский государственный стоматологический университет, Москва, 103473,
ул. Делегатская, д.20/1; тел.: (095)3654597; эл. почта: goussarova@yahoo.com

² Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва, 119071, Ленинский пр-т, д. 33

³ Российский государственный медицинский университет,
Москва, 119863, ул. Островитянова, д. 1.

Проанализированы образцы сывороток 86 пациенток с различными опухолями женской репродуктивной системы на содержание церулоплазмина (ЦП) и количество антител (АТ) к нему. Установлено повышение концентрации ЦП при раке эндометрия, доброкачественных и злокачественных опухолях яичников. При миомах матки отмечалась тенденция к увеличению данного показателя. Обнаружено появление АТ к ЦП при всех исследованных патологиях. Корреляционный анализ выявил положительную линейную зависимость между количеством ЦП титром АТ к нему при раке эндометрия и неоплазиях яичников. При миомах матки подобной зависимости не выявлено.

Ключевые слова: церулоплазмин, антитела к церулоплазмину, онкогинекологические заболевания

ВВЕДЕНИЕ. Новообразования органов женской репродуктивной системы являются широко распространенной патологией [1,2]. Поэтому весьма актуальны исследования, направленные на разработку новых методов для ранней диагностики патологии, а также мониторинга эффективности проводимой терапии.

Церулоплазмин (ЦП) (Fe II: кислородоксидоредуктаза, КФ 1.16.3.1) давно привлекает внимание исследователей в качестве онкомаркера [3]. ЦП обладает рядом активностей, имеющих значение в патогенезе опухолевого процесса. К ним относятся транспорт меди и участие в ангиогенезе [4], рецепторные взаимодействия с клетками различных тканей [5], взаимодействие с иммунокомпетентными клетками [6], окисление биогенных аминов [7], ферроксидазная активность [8], регуляция перекисного окисления липидов [9].

Предложено использование ЦП как дополнительного диагностического и прогностического фактора при меланоме [10], множественной миеломе [11], раке молочной железы [12,13]. Показано возрастание его количества у больных со злокачественными опухолями шейки матки [14], карциноме тела матки [15], яичников [16]. Выраженность данных изменений зависит от злокачественности стадии заболевания [17]. Изменения активности ЦП при данных состояниях связывают с его антиоксидантными свойствами [18,19].

Принимая во внимание полифункциональность ЦП, изучение механизма

регуляции активности данного фермента при неопластических состояниях представляет несомненный интерес.

Хотя в литературе представлены многочисленные данные по активности ЦП при данных патологиях, но сведения об изменении количества антител (АТ), вырабатываемых организмом на этот белок, отсутствуют. Это имеет значение для понимания механизмов регуляции различных физиологических и патологических состояний, сопровождающихся изменением ферментативных активностей данного белка.

В данной работе исследовали оксидазную активность ЦП и уровня антител к данному белку в плазме крови женщин с доброкачественными и злокачественными новообразованиями репродуктивной системы.

МЕТОДИКА. Всего обследованы 104 женщины, 18 из которых не имели гинекологической патологии и составили контрольную группу. У 86 больных были различные опухолевые заболевания репродуктивной системы (табл. 1.)

Определение концентрации ЦП.

О количестве ЦП в тестируемых сыворотках судили, измеряя его оксидазную активность с субстратом орто-фенилендиамином (ОФД) при 492 нм [20].

Определение титра антител к ЦП.

Титр антител к ЦП определяли путем постановки неконкурентного ИФА с помощью антиглобулинов [21]. Раствор ЦП в концентрации 10 мкг/мл в 0,01 М фосфатном буфере, рН 8,0, содержащем 0,015 М NaCl (ФСБ), разливали в лунки микропланшета и выдерживали 12 часов при +4 С°. Затем 4 раза промывали ФСБ, содержащем 0,05% тритона X-100 (далее ФСБТ). Исследуемые сыворотки исходно разводили в 100 раз в ФСБТ, добавляли по 5 мкл, раститровывали 1:2, инкубировали 1,5 часа при 37 С°, затем повторно отмывали. В лунки добавляли по 50 мкл антивидовых IgG, конъюгированных с пероксидазой (опытное производство НИИ Эпидемиологии им. Н. Ф. Гамалеи, г. Москва) в рабочем разведении в ФСБ 1:4000 и инкубировали 1 час при 37 С°. После промывки определяли активность пероксидазы.

Определение активности пероксидазы.

Растворы АБТС (0,7 мМ) и H₂O₂ (1,8 мМ) в 30 мМ Na-ацетатном буфере (рН 4,5) вносили в лунки по 100 мкл и инкубировали 10-20 мин. при комнатной температуре. Поглощение продуктов окисления определяли на вертикальном фотометре "MULTISCAN EX" ("Labsystems", Швеция) при 405 нм. Количество исследуемых АТ выражали в процентах относительно количества АТ в контрольных сыворотках.

В работе использовали ЦП производства Киевского фармацевтического завода. ЦП подвергали дополнительной очистке на колонке с носителем DEAE-Toyopearl 650 фирмы "Toyo Soda" (Япония) после дополнительной очистки отношение D610/D280 было равно 0,049, что соответствует 90-95% чистоты препарата. Концентрацию ЦП определяли по методу Лоури. Статистическую обработку результатов проводили согласно критерию Колмогорова-Смирнова и корреляции Спирмена с использованием стандартного пакета программ "Statistica".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В исследованных пробах сывороток 18 женщин контрольной группы, 7 из которых находились в репродуктивном возрасте и 11 в пре- и постменопаузальном (старше 46 лет) концентрация ЦП не различалась и составила в среднем 18,92±3,47 мг/100 мл. Это согласуется с данными, полученными другими исследователями [20].

Исследования сывороток больных с миомой матки разного размера, локализации, скорости роста выявили тенденцию к увеличению концентрации ЦП, но отличия от контрольной группы были недостоверны (табл.1).

В группах, больных раком эндометрия, доброкачественными (цистаденомы), злокачественными (аденокарциномы) опухолями яичников, выявлено увеличение концентрации ЦП (табл.1) Следует отметить, что при данных патологиях определялись значительные колебания исследуемого параметра (рис.1). У больных

АКТИВНОСТЬ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ПРИ ГИНЕКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

с раком эндометрия концентрация ЦП в сыворотке крови колебалась от 8,14 до 39,17 мг/100 мл. При неоплазиях яичников также выявлен значительный разброс исследуемого параметра: от 8,25 до 33,0 мг/100 мл при цистаденомах, от 6,1 до 38,0 мг/100 мл при аденокарциномах.

Таблица 1. Содержание церулоплазмينا в сыворотках крови женщин с онкогинекологическими заболеваниями.

Диагноз	Число обследованных больных	Концентрация церулоплазмينا, мг/100 мл	p
Контрольная группа	15	$22,7 \pm 0,90$	—
Рак эндометрия	35	$23,49 \pm 1,02$	$< 0,05$
Доброкачественные опухоли яичников	16	$24,17 \pm 1,69$	$< 0,01$
Рак яичников	20	$26,46 \pm 1,31$	$< 0,05$
Миома матки	18	$18,92 \pm 0,77$	$> 0,1$

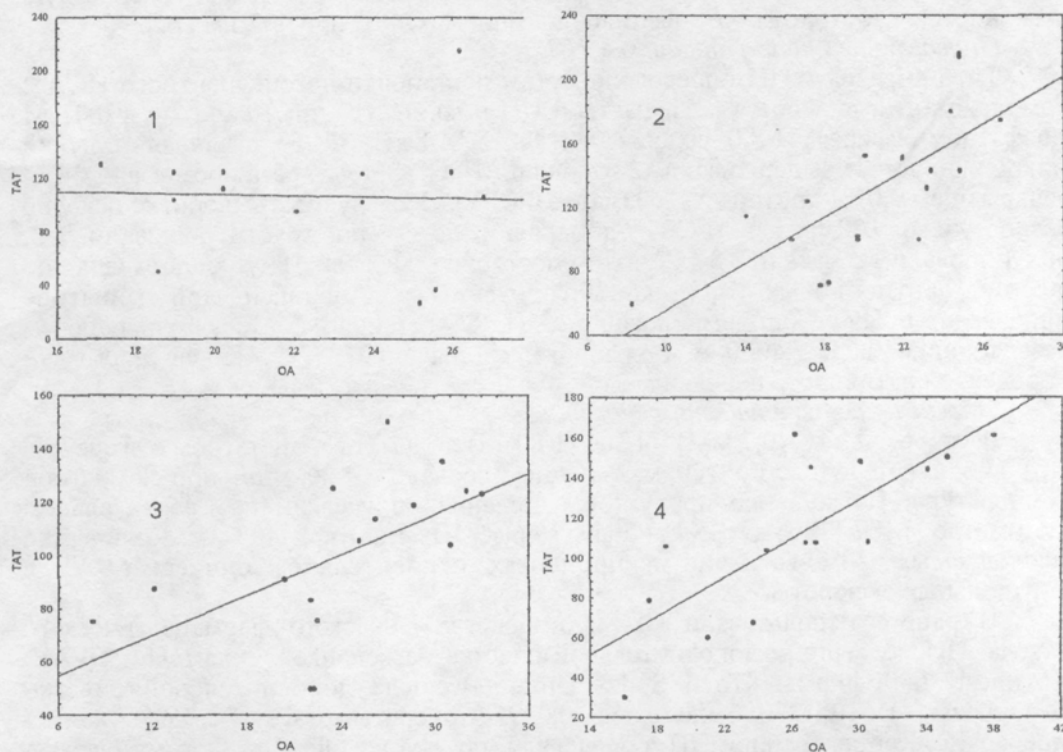


Рисунок 1.

Корреляционная зависимость содержания церулоплазмينا и титра антител к нему в сыворотках крови при доброкачественных и злокачественных опухолях репродуктивной системы: 1. Миома матки. 2. Рак тела матки 1А стадии. 3. Доброкачественные опухоли яичников. 4. Злокачественные опухоли яичников 1 стадии. ТАТ - титр антител к церулоплазмину, %.

ОА - концентрация церулоплазмينا, мг/100мл.

Исследования титров антител к ЦП выявило их присутствие во всех сыворотках здоровых женщин. По сравнению с контрольной группой, все виды патологии сопровождалась некоторым увеличением титров антител к ЦП (рис. 2). Наиболее часто встречаемые значения находились при миоме матки в интервале от 100 до 120%, раке эндометрия - в интервале от 100 до 160%, доброкачественных опухолях яичников - от 80 до 120%, раке яичников - от 80 до 150%. Сравнение этих значений выявило, что наибольший титр антител наблюдается при раке эндометрия ($134 \pm 10,1\%$). При доброкачественных новообразованиях уровень антител к ЦП увеличивался незначительно (табл.2). Во всех группах (за

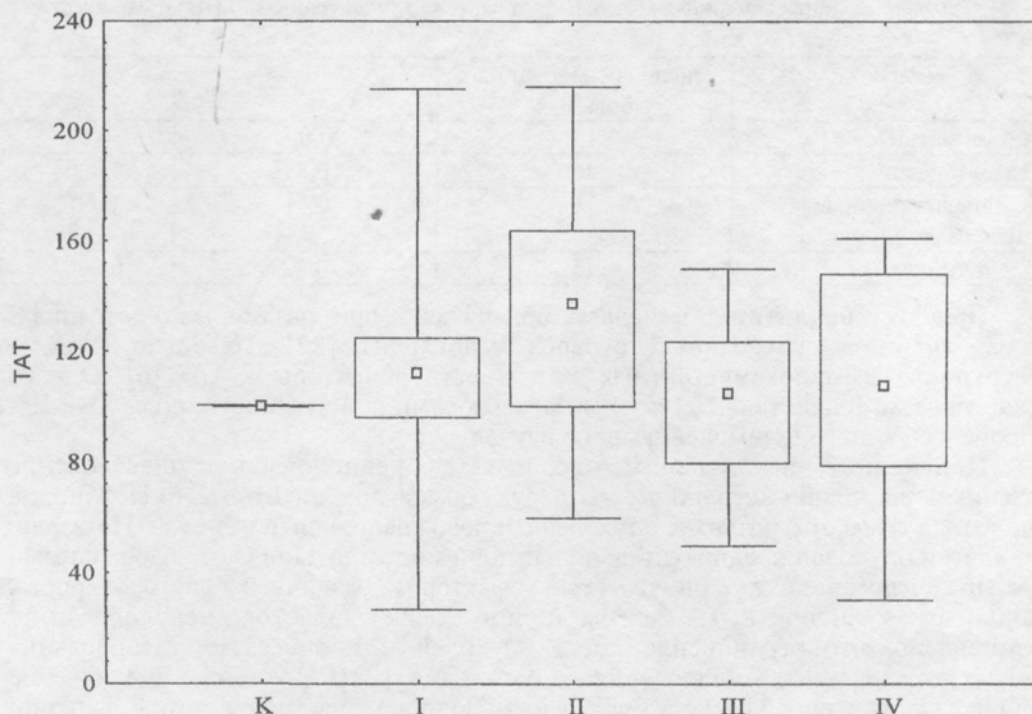
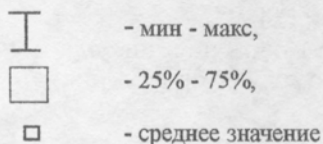


Рисунок 2.

Титры антител к церулоплазмину в группах обследованных.

K - контроль, I - миома матки, II - рак эндометрия, III - доброкачественные опухоли яичников, IV - рак яичников, TAT - титр антител к церулоплазмину, %.



исключением больных с миомой матки) определялись значительные колебания исследуемого параметра. У больных раком эндометрия титр антител изменялся от 60 до 216%, при цистаденомах - от 50 до 150%, аденокарциномах - от 30,1 до 161,25%. Корреляционный анализ в этих группах выявил положительные линейные зависимости между концентрацией ЦП и количеством антител к нему (табл. 3, рис. 1). При миоме матки не выявлено зависимости между концентрацией ЦП и титром антител к нему (табл. 2). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что при неоплазиях, связанных с железистой тканью (раке эндометрия, доброкачественных и злокачественных опухолях яичников) возрастание концентрации ЦП сопровождается увеличением титра АТ к нему.

Таблица 2. Содержание титров антител к церулоплазмину в сыворотках крови женщин с онкогинекологическими заболеваниями.

Диагноз	Число обследованных больных	Титры антител, %	p
Миома матки	15	107,2 ± 11,7	> 0,5
Рак эндометрия	20	134 ± 10,1	< 0,003
Доброкачественные опухоли яичников	16	101,2 ± 7,2	> 0,5
Рак яичников	15	112,2 ± 10,3	> 0,5

Примечание. Титр антител контрольной группы принят за 100%.

АКТИВНОСТЬ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ПРИ ГИНЕКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Таблица 3. Корреляционные зависимости между концентрациями ЦП и количеством антител к нему

Диагноз	Число обследованных больных	r	p
Миома матки	15	-0,004	0,98
Рак эндометрия	20	0,81	0,0004
Доброкачественные опухоли яичников	16	0,71	0,002
Рак яичников	15	0,82	0,0004

Присутствие антител к белкам обнаружено при различных состояниях: астма, тиреоидит, рассеянный склероз, миокардит [22]. Известно, что на поверхности иммунокомпетентных клеток есть рецепторы к ЦП [6]. Однако механизм взаимодействия ЦП с этими рецепторами и, в частности, роль АТ к ЦП в процессе данного взаимодействия не изучены.

Полученные нами данные позволяют предположить существование механизма регуляции активности ЦП через образование антител. Это связано, на наш взгляд с тем, что развитие опухолей сопровождается ангиогенезом. Показано, что клетки опухолей предпочтительно накапливают медь. Ион Cu^{2+} - необходимый элемент ангиогенеза, т.к. он является кофактором различных факторов роста. Основным транспортным белком ионов меди является церулоплазмин. Установлено, что ограничение роста опухолей и процесс метастазирования зависят от дефицита ионов меди в организме [23]. Возможно, увеличение количества антител к ЦП необходимо для блокирования транспортной функции этого белка.

Наше предположение о существовании антителозависимого механизма регуляции активности ЦП согласуется с данными, что при болезни Альцгеймера и преэклампсии увеличение концентрации ЦП не сопровождается увеличением его ферроксидазной активности [24, 25].

Полученные данные могут быть полезны для изучения процесса онкогенеза и механизмов действия иммуномодуляторов.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Look K. Y., Blessing J.A., Adelson M.D. et al. (1996) Am J Clin Oncol., **19**, 7-9
2. Partridge E. E., Phillips J. L., Menck H.R. (1996) Cancer, **78**, 2236-46
3. Senra Valera A., Lopez Saez J.J., Quintela Senra D. (1997) Cancer Lett., **121**, 139-45
4. Gullino P.M. (1985) Biol Responses Cancer, **4**, 1-20.
5. Пучкова Л.В., Сасина Л. К., Алейникова Т. Д., Захарова Е. Т., Гайнцхоки В. С. (1997) Биохимия, **62**, 817-825
6. Kataoka M., Tavasoli M. (1985) Exp. Hematol., **13**, 806-810.
7. Floris G, Medda R, Padiglia A, Musci G. (2000) Biochem Pharmacol., **60**, 1735-41
8. Okamoto N., Wada S., Oga T., Kawabata Y., Baba Y., Habu D., Takeda Z., Wada Y. (1996). Human Genetics, **97**, 755-758.
9. Yoshida K, Kaneko K, Miyajima H, Tokuda T, Nakamura A, Kato M, Ikeda S. (2000) J. Neurol. Sci. **175**, 91-5
10. Ros-Bullon M.R., Sanchez-Pedreno P., Martinez-Liarte J. H. (2001) Anticancer Res., **21**(1B), 629-32
11. Бессмельцев С.С., Рыбакова Л. П., Грицкевич Н.Л., Голота Г.Б., Блинов М.Н., Абдулкадиров К.М. (1999) Вопр. онкологии., **45**, 398-404.
12. Vaidya S.M., Kamalakar P.L. (1998) Ind. J. Med. Sci., **52**, 184-7.

13. Dabek J.T., Hyvonen-Dabek M., Kupilina-Rantala T., Harkonen M., Adlercreutz H. (1996) *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **26**, 215-26.
14. Agroyannis B., Dardouras C., Vitoratos N., Tzanatos H., Kouvaris J., Damatopoulou A., Kouticos D., Dalamangas A., Papavasiliou C. (1994) *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.*, **21**, 24-27.
15. Schultek T., Tode B., Wood W.G. (1986) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **24**(3), 179-184.
16. Pulay T., Csomor S., Kovacs I., Szarka G., Somos P. (1988) *Acta Chir. Hung.*, **29**(4), 305-14.
17. Getinkaya N., Getinkaya D., Yuce M. (1998) *Biol. Trace. Elem. Res.*, **18**, 28-38.
18. Gajewska J., Szczypka M., Laskowka-Klita T., Petek D. (1995) *Pediatr. Pol.*, **70**, 907-910.
19. Balcerka A., Stachowicz-Stencel T., Lysiak-Szydlowska W. (2000) *Wiad Lek.*, **53**(3-4), 128-33.
20. Сиверина О. Б., Басевич В.В., Басова Р. В., Гаврилин И. Н., Ярополов А. Н. (1986) *Лаб. дело*, **10**, 612-618.
21. Engvall E., Perlmann P. (1972) *J. Immunol.* **109**, 129-135.
22. Габибов А. Г. (2002) в кн.: *Химия протеолитических ферментов*, 5 симпозиум, Москва, 15
23. Brewer G., Dick R., Grover D., LeClaire V., et al. (2000) *Clin. Cancer Res.* **6**, 1-10
24. Greatsas G., Vitoratos N., Salamalekis E., Dalamaga N., Kassanos D. (1999) *Eur. J. of Obstetrics Gin. and Reproductive Biol.* **84**, 63-67
25. Smith M., Harris P.L.Y., Perry G., Castellani R.J., Nunomura A. (1999) *Free Rad. Biol. Med.* **16**, 1508-1512

Поступила 04.03.02.

REGULATION OF SERUM CERULOPLASMIN ACTIVITY IN WOMEN WITH GYNECOLOGICAL TUMORS.

Yu.N. Goussarova¹, E. V. Stepanova², E.O.Landesman², O.V.Koroleva², T.P.Vavilova¹, O.V.Makarov³, V.N.Kosetsky³

¹Moscow State Stomatological University, Moscow, tel.:(095)365-4597;
e-mail: goussarova@yahoo.com.

²Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow.

³Russian State Medical University, Moscow.

Serum ceruloplasmih (CP) and anti-CP antibody levels were studied by the oxidase method in 18 healthy women and in 86 women with gynecological tumors. The results demonstrate that: 1) Serum CP concentrations increased in endometrial and ovarian cancer, in benign ovarian tumors and to a lesser extent in mioma of uterus. 2) Serum CP antibodies were found out in both benign tumors and cancer cases. 3) There was positive linear correlation between serum levels of CP and anti-CP-antibodies in endometrial and ovarian cancers, and in benign ovarian tumors.

Key words: ceruloplasmin, anti-ceruloplasmin antibodies, oncogynecological diseases.