

ЭКСПРЕССИЯ ОПУХОЛЕ- АССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ В ТКАНЯХ И В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ

Боброва Т.С., Чуев Ю.В.

ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Резюме. При помощи моноклональных антител [(МКА 1, клон 1F3-2D4, IgG1 класса), МКА 2H6, IgG1 класса] и антисывороток (Ac), полученных к мембранным белкам клеток Нер-2, методом иммуноблоттинга (ИБ) исследованы образцы опухолевых (почечно-клеточные карциномы – ПКК) и условно нормальных тканей почки. Выявлена интенсивная реакция МКА 1 с p34-38 в 13 из 34 образцов и p28-29 в 7 из 34 образцов, а в совокупности – в 20 из 34 образцов. Данные статистически достоверны по сравнению с соответствующими условно нормальными тканями, $p < 0,05$, образцов ПКК. В условно нормальных тканях выявлена умеренная реакция с p34-38 в 8 из 27 образцов. В ультраосадках сывороток 4 онкологических больных p34-38 не обнаружены. Представляет интерес выявление с помощью МКА 2H6 множественных белков в 1 из 17 образцов. Показана разница выявления с помощью МКА 2H6 белков в опухолевых (p28-29) и в условно нормальных тканях (p21-24) почки. p21-24 и p28-29, возможно, являются продуктами посттрансляционных модификаций p34-38. Предполагается, что множественные белки выявляются с помощью МКА 1 и МКА 2H6 за счет наличия в белках гомологичных участков. Выявление p34-38 и p28-29 с помощью МКА 1 может быть использовано как дополнительный иммунологический метод для разграничения опухолевых и условно нормальных тканей почки. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить возможности использования МКА 2H6, выявляющих p28-29 в опухолевых тканях и p21-24 – в условно нормальных тканях.

Ключевые слова: карцинома почки, моноклональные антитела, иммуноблоттинг.

Bobrova T.S., Chuev Yu.V.

EXPRESSION OF CANCER-ASSOCIATED PROTEINS IN TISSUES AND BLOOD SERUM FROM PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA

Abstract. Samples of renal cell carcinoma (RCC) and adjacent normal tissues were studied by means of immunoblotting, using monoclonal antibodies [(MKA 1, 1F3-2D4, IgG1 class), MKA 2H6, IgG1 class] against membrane proteins of Нер-2 cells (larynx cancer). Strong reactivity of MKA 1 was revealed with p34-38 (13/34, 38%) and p28-29 (7/34, 21%), and, generally, for 20 of 34 tumor samples (59%, $p < 0,05$). The differences in antigen expression in renal cell carcinomas are statistically significant, as compared with adjacent (presumably normal) tissues. The p34-38 expression was not revealed in serum pellets obtained from 4 cancer patients by ultracentrifugation. A variety of multiple proteins was revealed in one of seventeen tissue samples surrounding the tumor (normal breast tissue). Interestingly, a difference was found between renal cell carcinoma (p28-29 expression) and adjacent normal tissues (p21-24) that was revealed by means of MKA 2H6. The p21-24 and p28-29 may represent a product of p34-38 posttranslational modifications. It was supposed that a variety

of proteins revealed with MKA 1, 2H6 are interrelated, due to identity of some sites. Detection of p34-38, p28-29 with MKA 1 may be potentially used as a supplementary immunological approach, in order to differentiate renal cell carcinoma tissues of epithelial origin from the adjacent tissues. Further studies are needed to elucidate an opportunity of MKA 2H6 usage, aiming for detection of p28-29 in renal cell carcinoma samples, like as p21-24 for specimens of adjacent normal tissues. (*Med. Immunol., 2008, vol. 10, N 2-3, pp 209-214*)

Адрес для переписки:

Боброва Татьяна Сергеевна
115478, Москва, Каширское ш., 24,
НИИ Канцерогенеза,
Российский Онкологический научный центр
им. Н.Н. Блохина, РАМН.
Тел.: (495) 111-82-18, 324-78-17.
Факс: (495) 324-78-17, 324-12-05.
E-mail: kraun@1979 mail.ru

Ежегодно в мире регистрируется 189,1 тыс. новых случаев рака почки и 91,1 тыс. смертей от этого заболевания. В России за 2003 год выявлено 15 тыс. больных, их доля среди всех злокачественных новообразований составила 3,9% у мужчин и 2,7% у женщин. Среди случайно выявленных опухолей 85% составляют локализованные формы, тогда как при наличии клинических симптомов ограниченными капсулой почки оказываются только 40-45% новообразований [5, 6].

В настоящее время принято выделять несколько разновидностей почечно-клеточных карцином (ПКК). Наиболее часто (в 70-80% ПКК) наблюдается светло-клеточный (не папиллярный) тип опухоли (clear-cell RCC). Другой типичной разновидностью ПКК (10-15% случаев) являются папиллярные карциномы почек, отличающиеся благополучным течением. На сегодняшний день не существует специфических и высокочувствительных маркеров, позволяющих диагностировать эту патологию [5, 6].

Целью настоящей работы является исследование распределения опухолеассоциированных белков в образцах тканей рака почки, рака мочевого пузыря и в ультрасадках сывороток крови онкологических больных при помощи МКА и моноспецифических антисывороток (Ас) методом иммуноблоттинга (ИБ) и оценки возможности использования полученных данных для диагностики.

Материалы и методы

Образцы опухолевых тканей и ткани, взятые на расстоянии 5 см от опухоли, получены из отдела патологической анатомии, сыворотки больных и здоровых доноров — из лаборатории биохимии НИИ клинической онкологии ГУ Российского онкологического научного центра РАМН им. Н.Н. Блохина. Данные по гистологическим диагнозам, данные по стадиям опухоли и проведенному лечению больных получены из архива патологоанатомического отдела и из архива НИИ Клинической онкологии, соответственно. Было исследовано 34 образца опухолевых тканей почки: 19 образцов — светлоклеточных почечно-клеточных карцином (свкПКК); 15 образцов других гистологических форм; из которых 14 образцов почечно-клеточного рака (ПКР), 1 образец нейроэктодермальной опухоли почки. Исследованы также 1 образец — ангиолипомы и 27 образцов условно нормальных тканей, прилежащих к ПКК. Из 34 образцов ПКК опухолей I стадии было исследовано 3, II стадией — 15, III стадией — 13, IV стадией — 2. Среди образцов опухолевых тканей 2 образца было от больных после перенесенной химиолучевой терапии и 3 образца — от больных III стадией заболевания с очагами некроза и гиалиноза (по данным гистологии).

Клетки клеточной линии. Клетки клеточной линии Нер-2 (рак гортани, HeLa-подобная) выращивали на среде 199 с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота, пенициллина и стрептомицина. Для получения клеточных лизатов клетки снимали пипетированием (чтобы не повредить поверхностные белки), отмывали забуференным физиологическим раствором с последующим повторным центрифугированием при 300 g в течение 5-7 минут.

Получение лизатов клеток. Для получения лизатов опухолевые клетки, клетки метастазов и нормальные ткани обрабатывали с использованием буфера, содержащего 100 ммоль/л NaCl, 0,1% SDS, 10 ммоль/л трис-HCl (pH 7,5), 1 ммоль/л ЭДТА, 0,5% тритон, 1 ммоль/л PMSE, 0,02% азида натрия. Лизаты центрифугировали при 10 000 g в течение 10 мин [1, 2].

Сыворотки крови онкологических больных. С целью поиска мембранных белков сыворотки крови подвергали ультрацентрифугированию при 125 000 g в течение одного часа. Осадок растворяли в буфере для нанесения образцов с 2% 2-β-меркаптанолом (2-ME) и подвергали электрофорезу в 8% ПААГ по U.K. Laemmli [1, 2].

Моноклональные антитела. МКА 1 и МКА 2Н6 (мышинные, IgG1 против 3М KCl экстракта клеток Нер-2) получены по стандартной методике [1, 2]. Иммуноглобулиновые фракции, выделенные из асцитной жидкости, очищали с помощью ионообменной хроматографии и использовали в дальнейшей работе [1, 2].

Антисыворотки (Ас). Ас p34, p50 получены к отдельным белкам клеток Нер-2, перенесенным на нитроцеллюлозу после полупрепаративного электрофореза. Полосы нитроцеллюлозы, соответствующие мол. массе (м.м.) 34 и 50 kDa, вырезали, растворяли в 100 мкл диметилсульфоксида и вводили в подколенные лимфоузлы кролика трехкратно с интервалами в один месяц.

Меченные пероксидазой антисыворотки к иммуноглобулинам кролика, мыши получены из института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Для проведения иммуноблоттинга 10-20 мкл образца, содержащего 50-70 мкг белка и 2-10 мкг сыворотки крови из разведения 1 : 100, в буфере, содержащем 2% 2β-ME и 2% ДСН, подвергали электрофорезу в 8% ПААГ по U.K. Laemmli. Белки переносили на нитроцеллюлозный фильтр «Hybond-C-Extra» («Amersham», Великобритания) в электрическом поле напряжением в 2 В/см в течение 20 ч. Фильтры с белками обрабатывали по общепринятой методике. Ас p34, Ас p50 использовали в разведении 1 : 1000, МКА — в разведении 1 : 2000. Выявление реакции МКА с белками и в образцах тканей, и сыворотках крови больных и здоровых доноров проведено с использованием вторых

биотинилированных антител или по методике ECL+ в соответствии с протоколом Amersham Pharmacia Biotech (Швеция) [1, 2].

Статистическая обработка. Сравнение значений проводили между данными по выявлению р34-38 в опухолевых и условно нормальных тканях по t-критерию Стьюдента [3]. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Выявление р34-38, р28-29 в образцах опухолевых и условно нормальных тканей почки с помощью МКА 1

Ранее нами были получены моноклональные антитела (МКА 1, мышинные, клон 1F3-2D4, класса IgG1) к белкам перевиваемой клеточной линии НЕР-2 [1, 2]. Методом ИБ было обнаружено, что МКА 1 выявляют семейство белков – р25-28, р32, р34-38, р55-65, р72-75, р135-155, р170-250, главными из которых по частоте и интенсивности выявления являются белки р34-38 и р55. МКА 1 наиболее часто выявляли экспрессию р34-38 в тканях рака яичника – 6/7 (86%). Позитивная реакция была обнаружена в образцах других опухолевых тканей, но в меньшем проценте случаев. Экспрессия р34-38 была выявлена также при помощи МКА 1 в ~ 50% случаев в опухолевых тканях почки [1, 2]. С помощью МКА 1 исследовано 34 образца опухолевых и 27 образцов нормальных тканей почки (табл. 1). Положитель-

ная реакция р34-38 выявлена в 13 случаях (38%) ПКК, при этом отмечена интенсивная реакция, в то время как в прилежащих тканях положительная реакция выявлена в 8 случаях (30%) и выявлена лишь умеренная реакция (рис. 1).

Положительная реакция выявлена в 7 образцах свкПКК и в 6 образцах ПКК с другой гистологией. Экспрессия белков обнаружена у больных всех стадий. Однако различия экспрессии р34-38 в опухолевых и условно нормальных тканях статистически не достоверны ($p > 0,05$). Одновременно с р34-38 (или без р34-38) в опухолевой и условно нормальной ткани почки выявлено несколько белков (ассоциации или комплексы? – р34-38/р33-36/р55-65-75/р135-150). Наиболее часто в комплексах белков в опухолевой ткани почки выявлялись р50-55-65 – в 38% случаев, по сравнению с прилежащими тканями – в 20% случаев (различия статистически не достоверны, $p > 0,05$). Отмечено уменьшение частоты выявления отдельных белков, входящих в комплекс – р72-75 и р135-150 в опухолевой ткани почки по сравнению с прилежащими тканями. Различия частоты выявления р72-75 в опухолевой ткани почки по сравнению с условно нормальной тканью статистически достоверны ($p < 0,05$). Белки р28-29 в опухолевой ткани выявлены у больных 1, 2, 3 стадий в 21% случаев, а в прилежащих тканях – в 1 из 27 образцов. При наличии р28-29 отсутствовал р34-38. В доброкачественной опухоли почки выявлена слабая реакция

ТАБЛИЦА 1. ВЫЯВЛЕНИЕ р34-38 С ПОМОЩЬЮ МКА 1 В ОБРАЗЦАХ ТКАНЕЙ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ И В ПРИЛЕЖАЩИХ К ОПУХОЛИ ТКАНЯХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ФОРМЫ, СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Рак почки, гистологические формы, стадии, другие эпителии, сочетания (комплексы) белков	Количество выявленных позитивных случаев (%) в опухолевых тканях	Количество выявленных позитивных случаев (%) в прилежащих тканях
Светлоклеточные ПК (n = 19)	7/19 (37%)	5/14 (35%)
Другие гистологические формы (n = 15)	6/15 (40%)	3/13 (23%)
TNM		
T I (n = 3)	1/3 (33%)	2/2
T II (n = 15)	7/15 (46%)	3/12 (25%)
T III (n = 13)	2/13 (15%)	3/7 (43%)
T IV (n = 2)	1/2 (50%)	н/и
Другие эпителии		
р28-29	7/34 (21%)	–
р50-55-65	13/34 (38%)	6/27 (~20%)
р72-75	3/34 (9%)*	11/27 (40%)
р135-150	5/34 (14%)	8/27 (30%)
Всего выявлено позитивной реактивности с помощью МКА 1 по р34-38	13/34 (38%) ** $p > 0,05$	8/27 (30%)
Выявление позитивной реактивности с помощью МКА 1 по р34-38, р28-29	20/34 (59%) * $p < 0,05$	

Примечание: в таблице приняты следующие сокращения: в числителе представлено число положительно реагирующих образцов; в знаменателе – общее количество образцов;

* – различия в выявлении белков между опухолевыми и условно нормальными тканями статистически достоверны ($p < 0,05$);

** – различия в выявлении белков между опухолевыми и условно нормальными тканями статистически не достоверны ($p > 0,05$).

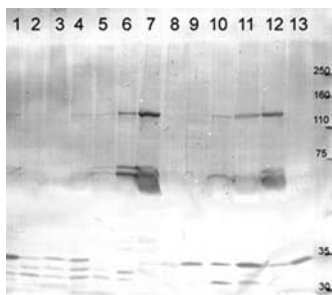


Рисунок 1. Выявление опухолеассоциированных белков в образцах опухолевых и соответствующих прилежащих тканях методом ИБ с помощью МКА 1 с использованием вторых биотинилированных антител

Примечание. Образцы тканей: 1 – рак яичника; 2, 3 – рак легкого и прилежащая ткань, соответственно; 4 – киста щитовидной железы; 5 – метастаз меланомы в регионарные лимфатические узлы; 6 – аденома надпочечника; 7, 8 – прилежащая к опухоли ткань и карцинома почки, соответственно; 9, 10 – саркома мягких тканей и нормальная ткань, соответственно; 11, 12 – рак почки № 2 (I стадия) и прилежащая ткань, соответственно; 13 – карцинома почки.

на р34-38 в опухолевой ткани и интенсивная реакция в прилежащей ткани.

При исследовании 4-х ультраосадков сывороток крови – одного больного раком почки (с метастазом в печень), больного метастазом рака легкого в почку и двух больных раком мочевого пузыря. р34-38 в образцах сывороток крови не был обнаружен.

Исследование опухолеассоциированных белков с помощью МКА 2Н6 в образцах нормальных и опухолевых тканей различной локализации

С помощью МКА 2Н6 были исследованы методом ИБ 17 образцов нормальных и опухолевых тканей различной локализации: по 3 образца опухолевых и нормальных тканей молочной железы, по 1 образцу рака яичника и кишечника, 3 образца метастазов (меланомы, рака легкого, рака яичника в лимфатические узлы), где присутствовали и образцы тканей рака почки (от больных I и III стадий) с соответствующими прилежащими тканями. Выявлена положительная реакция в районе р28-29 в образцах тканей рака почки только у больной III стадией (у больной I стадией выявлена лишь слабая положительная реакция) и в районе р21-24 – в образце прилежащих к опухоли тканей у той же больной. Реакция с р28-29 была интенсивной, четко различалась положительная реакция в виде одной полосы в образце ткани рака почки, в то время как в образце прилежащей к опухоли ткани выявлена диффузная реакция в районе р21-24. Однако слабая положительная реакция выявлена также с помощью МКА 2Н6 по р21-24 и в образцах других тканей – в метастазе рака легких в лимфатические узлы шеи и в метастазе меланомы. А интенсивная реакция по р28-29 с четкой полосой выявлена, помимо образца рака почки,

в 1 из 3 образцов, прилежащих к опухоли тканей рака молочной железы (РМЖ) (рис. 2).

Представляет интерес и выявление с помощью МКА 2Н6 комплекса белков (р21-25, р28-31, р48-49, р53-56-67, р75, р > 250) с интенсивной реакцией в образце тканей молочной железы, прилежащей к опухоли (в одном из трех образцов), и отсутствие похожей реакции с другими образцами опухолевых и условно нормальных тканей. В отличие от МКА 2Н6, МКА1 с использованием вторых биотинилированных антител выявило положительную реакцию по р28-29 помимо образцов опухолевых тканей почки от больной III стадией в образце тканей и у больной I стадией, но не выявило белков р21-24 в образцах тканей, прилежащих к опухоли.

Сыворотки, полученные к отдельным белкам Нер-2 (Ac р50, Ac р34) и взятые в качестве контроля, реагируют с высокомолекулярными белками, в то время как МКА 1, МКА 2Н6, как правило, не реагируют с белками > 135 kDa за исключением образцов тканей РМЖ № 3.

Обсуждение

Считается, что ПКК представляет собой уникальную модель для изучения естественного развития опухолевой гетерогенности. Одна из наиболее распространенных гипотез объясняет эту гетерогенность генетической нестабильностью опухолевых клеток, часто проявляющуюся в повторных мутационных изменениях [5, 6]. р53 и Vcl-2 являются двумя ключевыми генами, вовлеченными в регуляцию клеточного цикла и клеточной гибели. Измененная экспрессия и мутация этих генов обнаруживается у больных раком

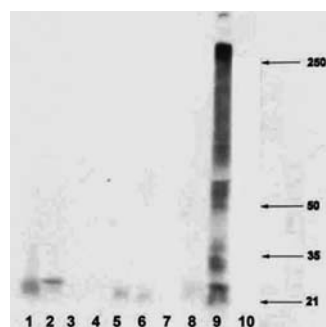


Рисунок 2. Выявление опухолеассоциированных белков в образцах опухолевых и соответствующих нормальных тканях методом ИБ с помощью МКА 2Н6 с использованием методики ECL+

Примечание. Образцы тканей: 1, 2 – прилежащая к опухоли ткань и карцинома почки № 1 (III стадия), соответственно; 3, 4 – прилежащая к опухоли ткань и рак молочной железы № 1, соответственно; 5, 6 – метастаз рака легкого и меланомы в лимфатические узлы, соответственно; 7, 8 – прилежащая к опухоли ткань и карцинома почки № 2 (I стадия), соответственно; 9, 10 – прилежащая к опухоли ткань и рак молочной железы № 2, соответственно. Маркеры молекулярной массы (kDa) указаны справа.

и также идентифицирована у больных ПМК. Однако полагают, что их роль в прогрессии ПМК все еще не ясна. Показано, что экспрессия p53 коррелировала с недостатком экспрессии Bcl-2 белка, анеуплоидностью и высоким пролиферативным индексом, в то время как экспрессия Bcl-2 ассоциируется с нормальным содержанием ДНК и низким пролиферативным индексом [7, 10, 15]. Таким образом, на основании сходства м.м. и частого выявления другими авторами p53 и белков Bcl-2 в клетках тканей ПМК [5, 10], можно было бы предположить, что выявленные нами белки имеют к ним отношение. Однако p28-29, выявленные нами, скорее всего не являются Bcl-2 белками, поскольку обнаружена лишь слабая реакция в одном из 27 образцов тканей, прилежащих к опухоли почки. p28-29, возможно, является продуктом посттрансляционных модификаций p34-38. p21-24 также, возможно, является продуктом посттрансляционных модификаций p34-38, но в опухолевой ткани почки этот процесс, возможно, идет до белков с м.м. 28-29 kDa, в прилежащих тканях – до 21-24 kDa.

По м.м., источникам получения и способам частичной очистки (преципитация белков из лизатов клеток Нер-2 50-60% или 70% раствором сульфата аммония [1, 2] p34-38 похожи и на белки человеческих факторов сплайсинга – SF2/ASF (p32, 33, p55), SC35 (p34, p35) [10, 13]. Возможно, p34-38 так же, как и белки факторов сплайсинга, имеют истинную м.м. – 28-29 kDa без посттрансляционных модификаций. Однако МКА 1 и МКА 2Н6 не выявили высокомолекулярных белков в образцах тканей ПМК, прилежащих тканях и тканях с другой локализацией опухоли. А для белков альтернативного фактора сплайсинга показана ассоциация с клеточной РНК [10]. Когда мы взяли в качестве контроля некоторые антисыворотки, полученные к отдельным белкам Нер-2 клеток, то на тех же 17 образцах тканей мы выявили положительную реакцию антисывороток с высокомолекулярными белками. Однако это не исключает возможности получения МКА к белками факторов сплайсинга, поскольку МКА, возможно, получены к другому эпитопу этих белков, не имеющему отношения к RNP узнающему мотиву.

Показано, что ранний этап деградации ядерной ДНК начинается, после индукции апоптоза, с образования высокомолекулярных фрагментов длиной 50-300 т.п.н., что считается близким по размеру к длине ДНК в петлях хромосом. Затем эти фрагменты распадаются до нуклеосом и их олигомеров. Показано, что во многих клетках расщеплению ДНК предшествует пермеаблизация наружной мембраны и предполагается, что межнуклеосомная фрагментация ДНК является первой необратимой стадией апоптоза [7]. Возможно, высокомолекулярные фрагменты,

выявленные Ас и частично МКА, – это фрагменты ДНК или/и РНК, которые ассоциированы с какими-то из выявленных нами белков.

Предполагают, что в клетках присутствуют два класса белков, участвующих в апоптозе: первый необходим для нормального протекания процесса, в то время как второй ингибирует апоптоз [7]. Среди систем защиты клетки от апоптоза выделяется шаперонный механизм, основанный на белке теплового шока с м.м. 70 kDa – Hsp70 [8, 12]. Выявленные нами белки могут быть Hsp 70-p53 комплексом, который, как считают, формируется при мутациях p53.

Возможно, МКА 1 выявляют белки факторов альтернативного сплайсинга [(p32-34, p35, p55), (p23, p28 – посттрансляционная модификация предыдущих белков)], но белки альтернативного сплайсинга являются гомологами белков Hsp70, и к тому же показано, что Hsp70 может образовывать стабильные комплексы с другими белками. Таким образом, получается, что МКА 1 могут выявлять комплекс(ы) белков – p21-24-p28-29-p34-38-p53-p55-p63-p73/Hsp70.

Возможно, эти комплексы, выявленные нами, являются проявлением своего рода защиты организма от чужеродных воздействий (мутаций, вирусов, радиации, химических веществ) [7]. Неизвестна их функциональная и прогностическая роль – являются ли они предвестником ухудшения состояния здоровья больного или свидетельствуют о стабилизации опухолевого процесса; на каких стадиях болезни они появляются; как часто выявляются они у здоровых доноров и больных с терапевтическими заболеваниями.

Клеточные белковые компоненты способны формировать комплексы. Так, регуляторный фактор X является мультимерным фосфопротеиновым комплексом. Комплексы способны формировать snRNP и src-подобные протеинтирозин киназы p53/56 lyn [10, 11, 14, 17].

Помимо Hsp-70, который может образовывать стабильные комплексы с другими белками, показано, что весь опухолевый Hsp-90 находится в мультишаперонных комплексах с высокой АТФазной активностью, в то время как Hsp-90 из нормальной ткани находится в латентном состоянии вне комплексов [8, 12].

Фактор 3 инициации трансляции млекопитающих (eIF3) является мультипротеиновым комплексом с м.м. 600 kDa [9]. кДНК кодирует 5 из 10 субъединиц, названных eIF3 – p170, p116, p110, p48 и p35. Охарактеризована кДНК, кодирующая главную РНК-связывающую субъединицу – eIF3 – p66 и две дополнительных eIF3 – p47 и p40. Каждый из этих белков присутствует в иммунопреципитатах, формируемых афинноочищенными анти-eIF3-p170 антителами.

N-терминальные области человеческого eIF3 – p40 и p47 – родственны друг другу и 17 другим

эукариотическим белкам, включая и мышинные. Возможно, и в нашем случае множество белков преципитируется с помощью МКА 1 и МКА 2Н6, потому что у них имеется какая-то область, гомологичная всем белкам, и они, так же как и eIF3 белки, преципитируются МКА.

Представляет интерес выявление с помощью МКА 2Н6 множественных белков в 1 из 17 образцов опухолевых и условно нормальных тканей молочной железы. Представляет также интерес разница в частоте выявления с помощью МКА 2Н6 белков в опухолевых (р28-29) и в условно нормальных тканях (р21-24) почки.

Выявление комплексов белков (р34-38/р33-36/р55-65-75/р135-150) имеет лишь теоретическое значение, поскольку различие в их выявлении в опухолевой и условно нормальной тканях почки статистически не достоверно ($p > 0,05$). Напротив, выявление нами р72-75, преимущественно в условно нормальной ткани почки, возможно, может служить дополнительным признаком отсутствия опухоли ($p < 0,05$).

Результаты по выявлению с помощью МКА 1 р34-38 (в 13 из 34) и р28-29 (7 из 34) в образцах ПКК в совокупности дают позитивную реакцию в 20 из 34 образцов. Различия в выявлении по сравнению с соответствующими условно нормальными тканями статистически достоверны, $p < 0,05$). Следует учитывать и наличие отрицательных реакций у 2-х больных после химиолучевой терапии и 3-х больных III стадией с очагами некроза и гиалиноза, 1-го больного с неэпителиальной опухолью почки. На положительную реакцию с МКА 1 можно рассчитывать в 20 из 28 образцов рака почки ($p < 0,05$).

Предполагается, что выявление р34-38 и р28-29 с помощью МКА 1 может быть использовано как дополнительный иммунологический метод, для дифференциального разграничения опухолевых и условно нормальных тканей почки. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить возможности использования МКА 2Н6.

Список литературы

1. Боброва Т.С., Чуев Ю.В., Морозов В.А. Мышинные моноклональные антитела к HeLa ассоциированному антигену: распределение антигена в лизатах нормальных и опухолевых тканей // Эксп. Онкол. — 2000. — Т. 22. — С. 118-125.
2. Боброва Т.С., Чуев Ю.В., Морозов В.А. Иммунологические и биохимические характеристики семейства белков ассоциированных с некоторыми карциномами человека: Пер. с нем. / Под ред. Ю.П. Адлера, В.Г. Горского // Вестник РОНЦ. — 2001. — Т. 3. — С. 25-31.
3. Закс Л. Статистическое оценивание. — М.: Статистика, 1976. — С. 129-153.
4. Иванов Д.Б., Филиппова М.П., Ткачук В.А. Структура и функции классических кадгеринов // Биохимия. — 2001. — Т. 66, № 10. — С. 1450-1464.

5. Имянитов Е.Н. Эпидемиология и биология опухолей почки // Практическая онкология. — 2005. — Т. 6, № 3. — С. 137-140.

6. Носов А.К. Клинические проявления, диагностика и стадирование рака паренхимы почки // Практическая онкология. — 2005. — Т. 6, № 3. — С. 148-155.

7. Уманский С.Р. Апоптоз: молекулярные и клеточные механизмы // Молекуляр. биология. — 2001. — Т. 30, № 3. — С. 487-502.

8. Яшин Д.В., Сашенко Л.П., Духанина Е.А. Лак-клетки убивают Fas⁻-раковые клетки с помощью комплекса белков Tag7/Hsp70, секретируемого из аппарата Гольджи // Докл. АН/РАН. — 2004. — Т. 395, № 1. — С. 132-134.

9. Asano K., Vornlocher H.P., Richter-Cook N.J., Merrick W.C., Hinnebusch A.G., Hershey J.W. Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits / Possible roles in DNA binding and macromolecular assembly // J. Biol. Chem. — 1997. — Vol. 272, N 43. — P. 27042-27052.

10. Golas M.M., Sander B., Will C.L., Luhrmann R., Stark H. Molecular architecture of the multiprotein splicing factor Sf3b // Science. — 2003. — Vol. 300, N 5621. — P. 980-984.

11. Hakak Y., Martin G.S. Ubiquitin-dependent degradation of active Src // Curr. Biol. — 1999. — Vol. 9, N 18. — P. 1039-1042.

12. Kamal A., Thao L., Sensintaffar J., Zhang L., Boehm M.F., Fritz L.G., Burrows F.J. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumor selectivity on Hsp90 inhibitors // Nature (Gr. Brit.). — 2003. — Vol. 425, N 6956. — P. 407-410.

13. Kwek K.Y., Murphy S., Furger A., Thomas B., O'Gorman, Kimura H., Proudfoot N.J., Akoulitchev A. U1 snRNA associates with TFIIF and regulates transcriptional initiation // Nat. Struct. Biol. — 2002. — Vol. 9, N 11. — P. 800-805.

14. Moreno C.E., Rogers E.M., Brown J.A., Ross J.M. Regulatory factor X, a bare lymphocyte syndrome transcription factor is a multimeric phosphoprotein complex // J. Immunol. — 1997. — Vol. 158, N 12. — P. 5841-5848.

15. Pepe S., Ruggiero A., D'Acquisto M., De Laurentiis M., De Placido S., Sandomenico C., Staibano S., De Rosa G., Lucariello A., D'Armiento M., Bianco A.R. Nuclear DNA content-derived parameters correlated with heterogeneous expression of p53 and bcl-2 proteins in clear cell renal carcinomas // Cancer. — 2000. — Vol. 89. — P. 1065-1075.

16. Strano S., Fontemaggi G., Constanzo A., Rizzo M.G., Monti O., Baccarini A., Del Sal Giannini, Lovrero M., Sacchi A., Oern M. Physical interaction with human tumor-derived p53 mutants inhibits p63 activities // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 26, N 21. — P. 18817-18826.

17. Wiener J.R., Nakano K., Kruzelock R.P., Bucana C.D., Bast R.C., Gallick G.E. Decreased Src tyrosine kinase activity inhibits malignant human ovarian cancer tumor growth in a nude model // Clin. Cancer Res. — 1999. — Vol. 5, N 8. — P. 2164-2170.

*поступила в редакцию 20.09.2007
отправлена на доработку 16.10.2007
принята к печати 18.01.2008*