

## Изучение изменения содержания раковоэмбрионального антигена на модели клеток CaCo-2 в норме и при полиовирусной инфекции

М.Г. Гаспарян, Л.О.Аброян, Л.А.Акопян, З.А.Каралян, А.С.Аветисян, З.Р.Тер-Погосян

*Отдел физико-химической биологии клетки Института молекулярной биологии НАН РА  
Лаборатория вирусологии и иммунологии НЦО МЗ РА  
0014, Ереван, ул. Асратяна, 7*

Молекула канцероэмбрионального (раковоэмбрионального) антигена (РЭА) – онкофетальный маркер человека – СД 66е (10), подтип группы СД66, к которым принадлежат и молекула РЭА и другие члены семейства РЭА [8]. РЭА представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 175-200 кД. Особенностью этого маркера является высокое содержание углеводов (чуть более 50%). В сыворотке крови у беременных он отсутствует, но вырабатывается в тканях желудочно-кишечного тракта эмбриона. В норме в небольших количествах продуцируется клетками кишечного эпителия. С наибольшей частотой (до 90%) он обнаружен в крови больных раком толстой кишки и поджелудочной железы. РЭА выявляется также у 25-40% больных раком легкого, примерно у 40% – саркомами, 15% – меланомами, 30% – опухолями яичников, 20-30% – РМЖ, 20% больных раком шейки матки. РЭА присутствует в опухолях (гистологических срезах) большинства случаев РМЖ [3,4].

Содержание РЭА в крови онкологических больных обычно не превышает 40-70 мкг/л. Мегастатические очаги РЭА-продуцирующей опухоли также синтезируют этот гликопротеид. В целом РЭА достаточно надежный индикатор эффективности химиотерапии злокачественных новообразований [2,5].

Несмотря на более чем 40-летнюю историю изучения этого онкофетального белка и широкое применение в медицинской практике, для диагностики и мониторинга ряда злокачественных опухолей, есть некоторые недостаточно изученные аспекты его метаболизма, циркуляции во внеклеточной среде, связь его синтеза и уровня с цитоло-

гическими характеристиками клеток продуцентов. Обобщая, надо заметить, что многолетние исследования показывают несколько спорную картину относительно корреляции между данными иммуногистохимии, уровнем РЭА, некоторыми гистологическими типами опухоли, вовлечением в процесс локальных лимфоузлов, и несколько более однозначные результаты между локальными, региональными метастазами. В то же время надежные данные позволяют говорить о существовании выраженной корреляции между иммуногистохимической диагностикой ряда карцином, с одной стороны, и присутствием метастазов в лимфоузлах и отдаленных метастазов, пятилетних сроков выживания [4]. Несмотря на широкое применение в качестве диагностического маркера, вплоть до сегодняшнего дня не определены динамика изменения уровня РЭА во внеклеточной среде и вероятные причины этих колебаний.

Целью работы явилось определение клеточных показателей, сопутствующих изменениям уровня РЭА в среде, и возможных причин изменения уровня РЭА во внеклеточной среде.

### Материал и методы

*Определение канцероэмбрионального антигена (РЭА) в клетках CaCo-2.* Антитела IgG к РЭА в надосадочной жидкости клеток CaCo-2 определяли набором фирмы Вектор-Бест (Россия) методом ELISA, основанным на классической твердофазной иммуоферментной технике. До проведения иммуоферментной реакции надосадочные жидкости хранили при -20°С. На первом этапе образцы с IgG антителами к СЕА вносят в

лунки с нанесенным на дно антигеном СЕА; после получасовой инкубации, в процессе которой происходит связывание комплекса антиген-антитело, несвязавшиеся компоненты удаляются отмыванием. На втором этапе в лунки прибавляют конъюгат, состоящий из кроличьих анти-IgG антител человека с пероксидазой, который образует типичный иммунный комплекс со специфическими антителами IgG человека, отмыванием удаляют остатки конъюгата и вносят в лунки ТМВ/субстрат, который окрашивает образовавшийся иммунный комплекс в голубой, а после добавления стоп-реактива – в желтый цвет. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации IgG антител в исследуемых образцах. Абсорбцию как контрольных сывороток, так и исследуемых, измеряли при длине волны 450 нм с использованием дифференциального фильтра 650 нм на спектрофотометре HUMAREADER, результаты учитывали в сравнении со стандартными контролями.

**Вирус.** Живая полиомиелитная вакцина (OPV) штамм Sabin (Polio Sabin TM [oral] Poliomyelitis vaccine, live attenuated) Polio virus TCID<sub>50</sub>/dos I-106, II - 105, III - 105,8 (SB BIOLOGICALS Rixensart - BELGIUM). Для получения острой вирусной

инфекции OPV использовался в дозе 0.1 TCD<sub>50</sub> на клетку. Во всех пассажах клеточной культуры в качестве исходной употреблялась 48-часовая инкубация. Инфекция, как и контроль, проводилась при 37°C. Вирусный титр рассчитывался по методу Kärber. Изучение всех параметров проводилось в сроки 1,5, 3, 6, 12, 24, 48 часов после начала инфекции. При получении хронической инфекции на клетках CaCo-2 использовалась доза 0,001 TCD<sub>50</sub> на клетку.

**Клетки.** CaCo-2 – трансформированная перевивная линия аденокарциномы толстого кишечника человека. Клетки культивировались в среде Eagle с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки. Посевная доза 2 x 10<sup>5</sup> клеток/мл. Монослой получали через 48 часов после начала пассирования. Клетки предоставлены Dr Pascale Galea (Trophos), Марсель.

#### Результаты и обсуждение

Для выявления связи между синтезом РЭА и цитологическими показателями в линии CaCo-2 определялся уровень белка в норме при различных сроках инкубации и при вирусной патологии. Данные представлены в таблице.

Таблица

Динамика содержания РЭА в контроле CaCo-2 и под действием острой инфекции OPV<sup>§</sup>

| Время инкубации, ч | Количество клеток/мл x10 <sup>5</sup> |             | РЭА абс. в среде, нг/мл |             | Мертвые клетки, % |             | Митозы, % |             |
|--------------------|---------------------------------------|-------------|-------------------------|-------------|-------------------|-------------|-----------|-------------|
|                    | CaCo-2                                | CaCo-2 +OPV | CaCo-2                  | CaCo-2 +OPV | CaCo-2            | CaCo-2 +OPV | CaCo-2    | CaCo-2 +OPV |
| Посевная доза      | 2.0 ±0.2                              | 2.0±0.2     | -                       | -           | -                 | -           | -         | -           |
| 49.5               | 3.4±0.3                               | 3.5 ±0.3    | 9.1±0.5                 | 4.9±0.3     | 1.9±0.1           | 1.7±0.4     | 0.5±0.02  | 0.9±0.01    |
| 54                 | 3.9±0.3                               | 4.6 ±0.7    | 6.8±0.5                 | 4.1±0.8††   | 0.9±0.1           | 8.5±0.9†††  | 0.8±0.03  | 0.8±0.01    |
| 60***              | 4.8±0.4                               | 5.7 ±0.8    | 8.6±0.6                 | 1.9±0.5†    | 1.3±0.02          | 47.7±4.8††† | 0.9±0.01  | 0.7±0.01    |
| 72                 | 8.1±0.6*                              | 5.4 ±0.6    | 6.8±0.5                 | 5.4±1.2     | 0.6±0.02          | 88.9±5.7††† | 1.4±0.03  | 0.1±0.001   |
| 96                 | 12.9±1.1*                             | 0.3±0.1**   | 13.1±1.1*               | 4.9±1.0     | 2.5±0.02          | 98.2±1.2††† | 0.8±0.02  | -           |

\* достоверно выше по сравнению с предыдущими измерениями p<0.01- p<0.001,

\*\* достоверно ниже по сравнению с предыдущими измерениями p<0.005- p<0.001,

\*\*\* остановка синтеза клеточных белков под действием полиовируса,

† достоверно ниже по сравнению со всеми измерениями и контролями p<0.005- p<0.001,

†† достоверно ниже по сравнению с соответствующим контролем p<0.01,

††† достоверно выше по сравнению с контролем и предыдущими измерениями p<0.001,

§ митозы в популяции практически исчезают к 12 часам после начала инфекции

Согласно данным литературы, полностью синтез белков в чувствительных клетках под действием полиовируса останавливается в течение 1.5-6 часов после заражения (Fields & Knippe, 1991). Следовательно, уменьшение РЭА к 12 часам после начала инфекции в надосадочной жидкости вызвано именно действием вирусной инфекции, а дальнейший рост концентрации в опытных пробах вызван высвобождением внутриклеточного РЭА при разрушении клеток. Также надо учитывать, что РЭА разрушается в культуральной среде при температуре 37°C. Если при 12-часовой инфекции 47.7% мертвых клеток из 460 000 дают 1.9 нг/мл РЭА (живые клетки РЭА продуцировать не могут, так как после 1.5-6-

часовой инфекции пикорнавирусами полностью продуцируют вирусные белки), то 86.5% из 560 000 – 5.4. Период полураспада РЭА в культуральной среде при 37°C – 2.2 нг/мл за 6 ч, т.е. примерно 0.36 нг/мл в час (получено по разнице 4.1 – 1.9 нг/мл за 6 ч). Таким образом на клетку в норме в среднем приходится выделение примерно 0.0016 пкг/час РЭА в среду.

К 24 часам после начала инфекции ОРВ разрушилось 85.5% клеток (примерно 470 000). Из них должно было выделиться 5.4 + 4.32 (это количество РЭА разрушается за 12 часов). Следовательно к 24 часам инфекции ОРВ весь РЭА в культуре образовался за счет разрушенных клеток, в которых содержалось почти 10 нг/мл РЭА (рис. 1).

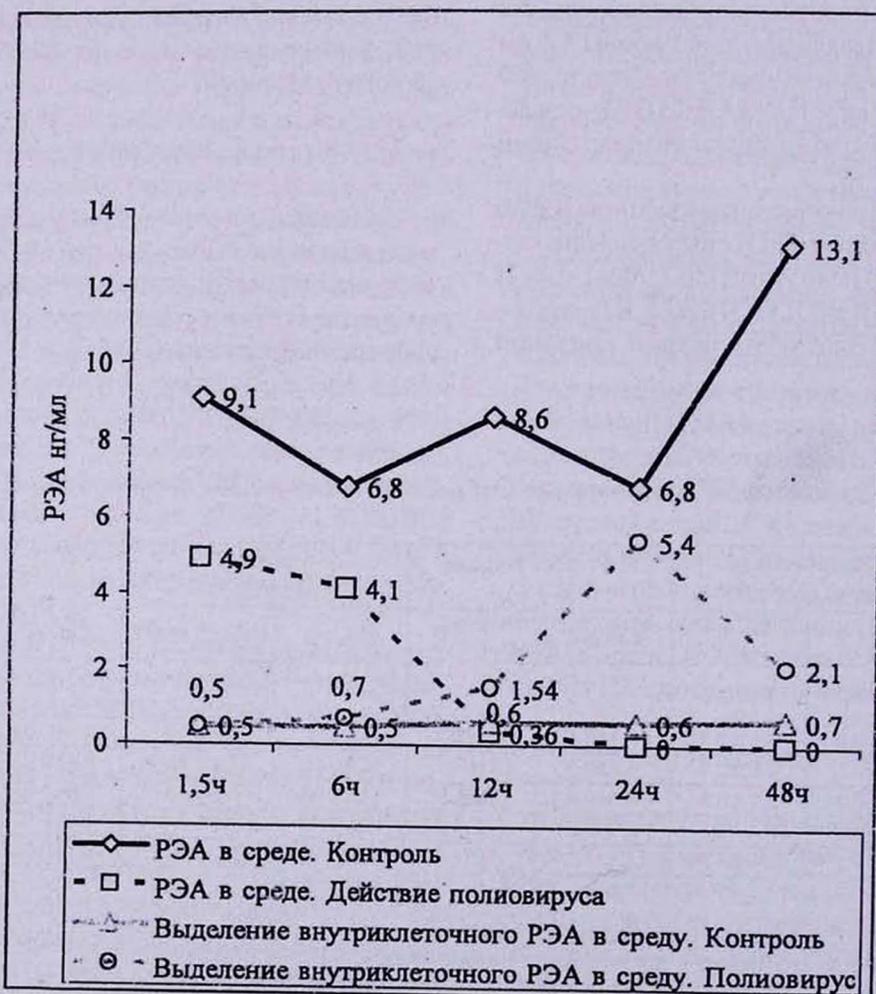


Рис. 1. Динамика выделения РЭА в надосадочную жидкость клетками CaCo-2 в норме и под действием острой инфекции ОРВ

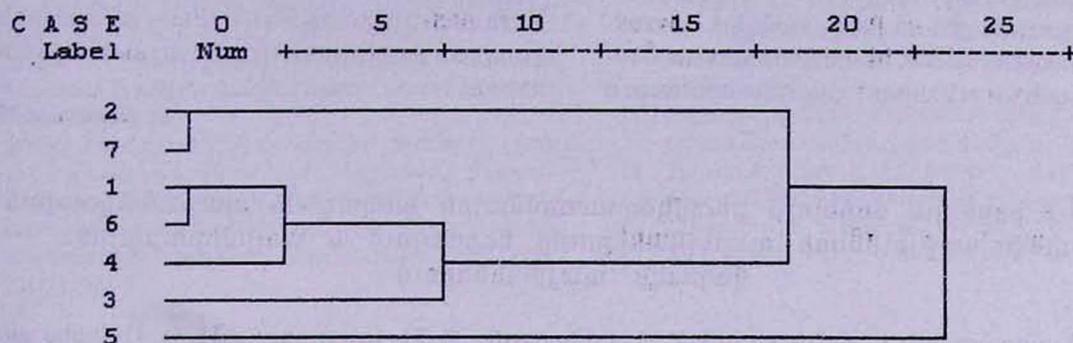


Рис. 2. Дендрограмма корреляционного анализа основных цитологических и биохимических параметров, влияющих на уровень РЭА

На графике (рис. 2) отображена корреляция основных цитологических и биохимических параметров: 1 – количество клеток на  $0.01\text{мм}^2$ , 2 – процент мертвых клеток (апоптоз+некроз), 3 – процент митозов, 4 – процент эуплоидных клеток в популяции, 5 – количество ДНК «с», 6 – среднее число ядрышек, 7 – количество РЭА в надосадочной жидкости. Как следует из дендрограммы, изменения уровня РЭА в надосадочной жидкости имеют весьма значительную положительную корреляцию с уровнем мертвых клеток.

Помимо синтеза РЭА клетки злокачественных опухолей выделяют белок и при своем разрушении [4]. Имеются данные и о связи между плоидностью ДНК и содержанием РЭА в плазме онкологических больных. У больных с анеуплоидией предоперационный уровень РЭА был достоверно выше, чем у больных с почти диплоидным набором хромосом [9,10], и комбинированное исследование степени анеуплоидии и уровня РЭА может оказаться полезным в онкологической практике, особенно при кишечных формах рака [11]. Однако в целом, согласно данным многочисленных исследователей, нет выраженной зависимости от степени анеуплоидии и уровня РЭА у больных. Например, прямо противоположное вышеперечисленным работам мнение высказано в работе Turoldo et al. [12].

Для исследования метаболизма РЭА нами была выбрана максимально упрощенная модель в системе *in vitro*. Несомненно, такая модель не учитывает воздействия ряда факторов, присут-

вующих в организме (например, действие иммунной системы), однако позволяет оценить механизмы, изменяющие содержание РЭА в среде. Клетки СаСо-2 являются удачной моделью клеток слизистой кишечника человека, обладающих способностью к синтезу РЭА [1,6,7]. Моделирование в условиях *in vitro* позволило изучить динамику изменений уровня антигена во внеклеточной среде без воздействия ряда факторов, действующих в условиях организма (например, влияние иммунной системы или воздействие других не продуцирующих антиген клеток). Полученные результаты позволили выявить некоторые важные особенности метаболизма РЭА.

На наш взгляд, основное противоречие в вышеперечисленных и ряде других работ возникает вследствие недооценки влияния периода полураспада РЭА, а также возможности его выделения из разрушенных клеток-продуцентов. Полученные нами данные выявили весьма интересную закономерность: уровень РЭА в надосадочной жидкости не демонстрирует выраженной корреляции даже с количеством клеток-продуцентов. Нет значимой корреляции и с другим важным показателем физиологического состояния клетки – количеством ядрышек, напрямую связанным с транскрипционной и трансляционной активностью клетки. В то же время оказалось, что выраженная положительная корреляция наблюдается с количеством мертвых клеток. Несомненно, это связано с выделением РЭА из разрушенных клеток в среду.

Таким образом, наши исследования выявили

еще одну важную характеристику метаболизма РЭА – выделение его из разрушенных клеток. Вероятно, в клинических исследованиях необходимо учитывать и эту характеристику процесса и

связь уровня РЭА в сыворотке не только с типом и стадией опухоли, но и степенью ее распада и с количеством (процентом) мертвых опухолевых клеток.

Поступила 23.02.07

### CaCo-2 բջջային մոդելում քաղցկեղասաղմնային հակագենի պարունակության փոփոխությունների ուսումնասիրումը նորմայում և պոլիվիրուսային վարակի պայմաններում

Մ. Հ. Գասպարյան, Լ. Օ. Աբրոյան, Լ. Հ. Հակոբյան, Ջ. Ա. Կարալյան, Ա. Ս. Ավետիսյան, Ջ. Ռ. Տեր-Պողոսյան

Ուսումնասիրվել են գործոններ, որոնք ազդում են քաղցկեղասաղմնային հակագենի (ՔՄՀ) մակարդակի վրա արտաբջջային միջավայրում: Հետազոտվել է ՔՄՀ-ի մակարդակի կախվածությունը բջիջների քանակից, բջիջների ֆիզիոլոգիական վիճակից, ՔՄՀ-ի տարա-

լուծումից, էուպլոիդիայից, տրանսկրիպցիոն և տրանսլյացիոն ակտիվություններից: Յուրյ է տրվել ՔՄՀ-ի նյութափոխանակության կարևոր գործոնը՝ քայքայված բջիջներից ՔՄՀ-ի արտազատումը, որն ազդում է միջավայրում ՔՄՀ-ի մակարդակի վրա:

### Carcinoembryonic antigene levels changes on CaCo-2 model in norm and at polyviral infection

M. H. Gasparyan, L.O. Abroyan, L. H. Hakobyan, Z. A. Karalyan, A. S. Avetisyan, Z. R. Ter-Pogossyan

There have been investigated the factors influencing carcinoembryonic antigene (CEA) level in the extracellular environment. The dependence of the CEA level on cells amount, CEA decay, the physiological condition of cells, cellular euploidy, transcriptional and

translational activities has been studied. The important peculiarity of CEA metabolism, influencing its level in the environment, the allocation from the destroyed cells has been demonstrated.

### Լիտերատուրա

1. *Կարալյան Յ. Ա., Մագակյան Յ. Ա., Աբրոյան Լ. Օ., Այոպյան Լ. Ա., Տեմերձյան Յ. Բ., Մելիքսեյան Ա. Յ., Կարալովա Ե. Մ.* Морфометрические изменения ядер клеток CaCo-2 под воздействием хронической инфекции вирусом полиомиелита (Sabin). Мед. наука Армении НАН РА, 2006, т. XLVI, 3, с. 72-76.
2. *Alvarez J.A., Marin J., Jover J.M. et al.* Sensitivity of monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen, tissue polypeptide antigen, alpha-fetoprotein, carbohydrate antigen 50, and carbohydrate antigen 19-9 in the diagnosis of colorectal adenocarcinoma, *Diseases of the Colon & Rectum*, 1995, 38(5): 535-542.
3. *Cooper M.J., Mackie C.R., Skinner D.B.* A reappraisal of the

- value of carcinoembryonic antigen in the management of patients with various neoplasms, *British Journal of Surgery*, 1979, 66(2): 120-123.
4. *Gold P., Goldenberg N. A.* The carcinoembryonic antigen (CEA): past, present, and future, perspectives, *Colon and Rectal Surgery*, 1996, 9(2).
5. *Holyoke E.D., Chu T.M., Murphy G.P.* CEA as a monitor of gastrointestinal malignancy, *Cancer*, 1975, 35(3): 830-836.
6. *Ilantzis C., DeMarte L., Sreanion R.A., Stanners C.P.* Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation, *Neoplasia*, 2002 Mar-Apr; 4(2): 151-63.

7. *Junarie C. and Malo C.* CaCo-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro, *J. Cell. Physiol.*, 1991, 149: 24-33.
8. *Madjic O.* Cluster report: CD66. In: Knapp W. et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. Oxford, England: Oxford University Press; 1989, p. 838.
9. *Meling G.I., Rognum T.O., Clausen O.P., Borner O., Lunde O.C., Schlichting E., Gruner O.P., Hognestad J., Trondsen E., Havig O.* Serum carcinoembryonic antigen in relation to survival, DNA ploidy pattern, and recurrent disease in 406 colorectal carcinoma patients, *Scand J. Gastroenterol.*, 1992; 27(12):1061-8.
10. *Rognum T.O., Heier H.E., Orjasaeter H., Thorud E., Brandtzaeg P.* Comparison of two CEA assays in primary and recurrent large bowel carcinoma with different DNA ploidy pattern., *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1986 Oct; 22(10):1165-9.
11. *Rognum T.O.* CEA, tumor differentiation and DNA ploidy pattern, *Scand. J. Gastroenterol., Suppl.* 1988;149:166-78.
12. *Turoldo A., Balani A., Scaramucci M., Babic F., Guidolin D., Liguori G.* Prognostic importance of preoperative CEA in patients with colorectal cancer, *Chir. Ital.*, 2002, 54(4):469-76.