

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИОФИБРИЛЛЯРНОГО КИСЛОГО БЕЛКА (GFAP) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ГЛИОМАМИ МОЗГА МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИ-GFAP-АНТИТЕЛ

Н.В.ЯГЛОВА

Кафедра биохимии РУДН. Москва. 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.8.
Медицинский факультет

Р.Г.БИКТИМИРОВ

Нейрохирургическое отделение Московского областного научно-исследовательского клинического института
129110, ул. Щепкина, д.61/2. МОНИКИ.

Полученные результаты в сочетании с данными иммуногистохимических исследований позволяют считать экспрессию антигена GFAP достаточно стабильной для использования его в качестве мишени для направленного транспорта препаратов в клетки глиомы.

Опухоли мозга, особенно злокачественные глиомы, являются самыми агрессивными опухолями человека. Глиому, как агрессивную злокачественную опухоль, характеризуют высокая пролиферативная активность, диффузный рост и инвазия отдаленных участков мозга в сочетании с прогрессирующим отеком мозга и активный ангиогенез. Несмотря на успехи в хирургическом лечении, химиотерапии и лучевой терапии, прогноз для пациентов все-таки остается неблагоприятным. Создание систем направленного транспорта цитостатиков в клетки опухоли позволило бы значительно повысить эффективность химиотерапии злокачественных глиом. Разработка таких систем ведется довольно давно [1]. Инкапсулирование препаратов в различные микроконтейнеры качественно изменило фармакокинетику препаратов, позволило снизить дозировки, уменьшило их токсичность и позволило во многом преодолеть проблему резистентности опухолей к химиотерапевтическим агентам [2]. Но залогом успеха транспортной системы является адресная доставка препарата в конкретные клетки, которая может быть достигнута только путем нацеливания микроконтейнеров на специфические антигены клеток-мишеней. Злокачественные глиомы представляют в этом плане серьезную проблему. Изучение их иммунофенотипа показало отсутствие строго специфичных антигенов, постоянно и стабильно экспрессируемых клеткой. Задачей настоящего эксперимента является изучение содержания нейроспецифического белка GFAP, являющегося маркером зрелой астроглии, в сыворотке крови больных глиомами головного мозга, с целью изучения перспектив использования GFAP в качестве мишени для направленного транспорта препаратов в клетки глиом.

Материалы и методы.

Был исследован 51 образец сыворотки крови больных с глиальными опухолями мозга, поступивших в отделение нейрохирургии МОНИКИ, из них мужчин – 24 (47%), женщин – 27 (53%). С учетом Международной гистологической классификации опухолей центральной нервной системы ВОЗ больные были разделены на две группы: злокачественные глиомы и

ные были разделены на две группы: злокачественные глиомы и глиомы низкой степени злокачественности. В первую группу вошло 26 больных (51%) в возрасте от 10 до 64 лет, во вторую группу – 25 больных (49%) в возрасте от 4 до 57 лет. Гистологические исследования образцов опухоли, полученных после оперативного вмешательства, проводились в патоморфологическом отделе МОНИКИ и патоморфологическом отделе НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко РАМН РФ. Определение размеров опухоли производилось по ее диаметру на компьютерно-томографических срезах. Компьютерная томография производилась на томографах СТ MAX (General Electric, США) в диагностическом отделении МОНИКИ. Для определения содержания GFAP в сыворотке крови у больных до начала терапии производился забор крови из локтевой вены одноразовыми системами в количестве 10 мл без добавления консервантов. Полученные образцы крови центрифугировались при 3000 об/мин в течение 5 мин. для получения сыворотки. Количественное определение GFAP в сыворотке крови производилось методом твердофазного иммуноферментного анализа с моноклональными анти- GFAP антителами [3] в лаборатории иммунохимии ВНЦ судебной и социальной психиатрии им. В.П. Сербского.

Получение антител к GFAP и их анализ. Для активации полистироловых планшетов и для приготовления конъюгата применялись очищенные моноклональные антитела, полученные гибридным методом Kohler и Milstein [4] в модификации В.П. Чехонина с соавт. [5]. Антитела выделяли из асцита с помощью иммуносорбентов, приготовленных на основе очищенного препарата GFAP и цианоброминовой сефарозы 4В. Препараты антител к GFAP исследовали по специфическому взаимодействию с антигенами различных органов и тканей человека и животных.

Приготовление конъюгатов антител с ферментами. Для приготовления вторых антител, меченных ферментами, использовался коммерческий препарат пероксидазы хрена (тип VI фирмы "Sigma"). Для конъюгирования применяли хорошо зарекомендовавший себя периодатный метод конъюгирования, описанный Р. Nakane и А. Kawaoi [6].

Процедура постановки твердофазного иммуноферментного анализа. В качестве твердой матрицы мы применяли 96-луночные полистирольные планшеты фирмы «Costar» (USA). Процедуру инкубирования антител проводили в течение 12 ч при 4°C. За это время происходит адсорбция антител на поверхности полистирольной твердой фазы дна и стенок ячеек (так называемая активация твердой фазы). Затем активирующий раствор сливали и ячейки промывали отмывающим буфером. После промывки в ячейки внесли по 100 мкл исследуемой сыворотки; в отдельные ряды ячеек внесли стандартные пробы с известной концентрацией антигена. Эти растворы оставлялись в ячейках на 2 часа при комнатной температуре. За это время происходит связывание антигена с адсорбированными антителами. Не связавшиеся белки отмывали тем же промывочным буфером. Ячейки заполнили разведенным конъюгатом фермента с антителами к GFAP. Инкубация с конъюгатом продолжалась 3 ч. при комнатной температуре, после чего не связавшийся

конъюгат тщательно отмыли тем же буфером. Проявление ферментативной активности пероксидазы в связанном конъюгате проводили с использованием субстратного буфера. В качестве хромогена в субстратной смеси применяли раствор ортофенилендиамина (ОФД) в концентрации 0,4 мг/мл. В субстратную смесь, непосредственно перед внесением в лунки, добавляли 10 мкл 30 % перекиси водорода. Субстратную смесь вносили в лунку в количестве 100 мкл и инкубировали в течение 10-20 минут при комнатной температуре. По истечении времени инкубации ферментативную реакцию останавливали внесением в лунки планшетов 100 мкл стоп-реагента (4 М H_2SO_4). Считывание результатов проводили с помощью многоканального спектрофотометра «Elx 800» («Bio-Tek Instruments Inc.», USA) при длине волны 490 нм. По результатам определения оптической плотности и известным концентрациям антигенов в стандартных пробах строили калибровочные кривые. Рабочим промежутком считали наиболее близкий к линейному участок кривой. Этот участок был определен в диапазоне концентраций от 1,0 до 128 нг/мл. Чувствительность тест-системы (минимальное количество антигена, которое возможно определить с ее помощью) составила 1,0 нг/мл.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы «Statistica 6.0».

Результаты.

Злокачественные глиомы.

В данную группу вошло 26 пациентов со злокачественными глиомами головного мозга в возрасте от 10 до 63 лет. Причем в группе преобладали пациенты старше 40 лет (46% пациентов), что соответствует данным о наибольшей распространенности злокачественных глиом у лиц 41-55 лет [7]. Распределение по полу было примерно равным. Гистологически опухоли представляли собой изоморфноклеточную глиобластому (n=17), мультиформную глиобластому (n=1), анапластическую астроцитому III-IV степени злокачественности (n=6), глиосаркому (n=2).

Результаты иммуноферментного определения GFAP в сыворотке крови пациентов со злокачественными глиомами представлены в табл.1.

Концентрация GFAP в сыворотке крови у больных со злокачественными глиомами составляла 32-256 нг/мл, медиана – 128 нг/мл, интерквартильный размах – от 64 до 256 нг/мл. За норму принят «донорский» уровень – 4 нг/мл. Из полученных данных видно, что у пациентов со злокачественными глиомами концентрация GFAP в сыворотке крови значительно превышала норму.

Анализ содержания GFAP в сыворотке крови в зависимости от размера опухоли проводилось на основе данных, полученных с помощью компьютерной томографии. На томографических срезах размер опухолей варьировал от 2 до 8 см. Соотношение размеров опухолей и концентраций GFAP в сыворотке крови представлено в табл.2.

По полученным данным был произведен корреляционный анализ зависимости содержания GFAP в сыворотке крови от размера опухоли. Коэффициент корреляции r составил 0,223, коэффициент Стьюдента $t=1,122$, $p<0,05$.

Таблица 1
Результаты иммуноферментного определения GFAP в сыворотке крови
больных злокачественными глиомами

Концентрация GFAP в сыворотке крови, нг/мл	4	8	16	32	64	128	256	Всего
Число проб	0	0	0	2	6	8	10	26
%	0	0	0	7,7	23	30,8	38,5	100

Таблица 2
Изменения концентраций GFAP в сыворотке крови пациентов со
злокачественными глиомами в зависимости от размера опухоли

Диаметр опухоли, см	Концентрация GFAP, нг/мл				Всего
	32	64	128	256	
2,0		1	1		2
2,5	1			1	2
3,0				1	1
4,0			1	1	2
4,5	1		1	1	3
5,0		1	4	2	7
5,2		1	1	2	2
5,5		2			2
6,0					2
6,3		1			1
7,8				1	1
8,0				1	1
Итого:	2	6	8	10	26

Следовательно, между размером опухоли и содержанием GFAP в сыворотке крови существует достоверная зависимость.

Глиомы низкой степени злокачественности.

Группа состояла из 25 пациентов в возрасте от 4 до 57 лет, из них 18 мужчин (72%) и 7 женщин (28%). Преобладающая возрастная группа – 31-50 лет (48% пациентов). Гистологически опухоли представляли собой полиморфноклеточную анапластическую астроцитому (n=7), фибриллярную астроцитому (n=5), анапластическую астроцитому II степени злокачественности (n=10) и анапластическую олигоастроцитому (n=3).

Результаты иммуноферментного определения GFAP в сыворотке крови больных глиомами низкой степени злокачественности представлены в табл. 3. Концентрация GFAP в сыворотке крови больных данной группы находилась в пределах 64-128 нг/мл, медиана – 64 нг/мл, интерквартильный размах от – 64 до 128 нг/мл. Полученные значения превышают норму, но в целом, они ниже, чем у предыдущей группы. Определение зависимости концентраций GFAP в сыворотке крови от размера опухоли проводилось также, с учетом данных компьютерной томографии. Размеры опухоли варьировали от 2,0

до 8,0 см. Изменения концентрации GFAP в сыворотке крови в зависимости от размера опухоли представлены в табл.4.

Таблица 3

Результаты иммуноферментного определения GFAP в сыворотке крови больных глиомами низкой степени злокачественности

Концентрация GFAP в сыворотке крови, нг/мл	4	8	16	32	64	128	256	Всего
Число проб	0	0	1	5	9	10	0	25
%	0	0	4	20	36	40	0	100

Таблица 4

Изменения концентраций GFAP в сыворотке крови пациентов с глиомами низкой степени злокачественности в зависимости от размера опухоли

Размер Опухоли, см	Концентрация GFAP, нг/мл				Всего
	16	32	64	128	
2,0		1		1	2
2,5				1	1
3,0				2	2
3,8		1			1
4,0		1		1	2
4,3			1		1
5,0			3	1	4
5,2	1			1	2
5,5			1		1
6,0			3	2	5
7,0			1	1	2
8,0		2			2
Итого:	1	5	9	10	26

Результаты корреляционного анализа: коэффициент корреляции r составил $-0,261$, коэффициент Стьюдента $t = -1,299$, $p > 0,05$. Данные результаты свидетельствуют, что между размером опухоли и содержанием GFAP в сыворотке крови пациентов с глиомами низкой степени злокачественности достоверной зависимости нет.

Обсуждение.

Иммуноферментное определение GFAP в сыворотке крови 51 пациента с глиомами головного мозга установило, что наиболее высокие показатели содержания GFAP в сыворотке отмечались у пациентов со злокачественными глиомами - 32-256 нг/мл (при норме в 4 нг/мл). Полученные данные свидетельствуют, что при злокачественных глиомах содержание GFAP в сыворотке крови достоверно отличается от нормы. В группе больных с глиомами низкой степени злокачественности концентрации этого нейроспецифическо-

го белка варьировали от 16 до 128 нг/мл. Данные значения говорят о том, что при глиомах низкой степени злокачественности уровень GFAP в сыворотке крови достоверно превышает норму, но при этом он меньше, чем при злокачественных глиомах. Уровень GFAP в сыворотке определяется, в первую очередь, степенью злокачественности глиомы. Высокие концентрации могут обнаруживаться и при небольших размерах опухоли, так как увеличение содержания нейроспецифических антигенов в крови при опухолях происходит, видимо, не из-за увеличения их синтеза опухолевыми клетками, а за счет нарушения целостности ГЭБ. Помимо этого, необходимо принимать во внимание тот факт, что для опухолевых тканей характерно явление антигенной дивергенции. Проведенное нами изучение содержания GFAP в сыворотке в зависимости от размера опухоли показало, что даже при небольших размерах опухоли значение GFAP может достигать больших значений. При этом у злокачественных глиом была обнаружена слабая корреляция между ростом размера опухоли и концентрацией GFAP в сыворотке (коэффициент корреляции $r=0,223$, $t=1,122$ при $p<0,05$). У глиом низкой степени злокачественности такой корреляции не прослеживалось. Обобщая полученные данные, можно предположить, что экспрессия GFAP опухолевыми клетками как низко, так и высоко злокачественных глиом сохраняется на определенном уровне и не претерпевает критических изменений с ростом опухоли. Эти данные подтверждают результаты иммуногистохимических исследований глиальных опухолей разной степени злокачественности [8]. Исследование экспрессии GFAP в глиомах разной степени злокачественности выявило наличие GFAP-позитивных клеток, соотношение которых варьирует в пределах различных гистологических форм опухолей. Все вышесказанное позволяет рассматривать GFAP как молекулярную мишень для направленного транспорта в клетки глиом с использованием моноклональных анти-GFAP антител в качестве вектора.

Литература

1. Gregoriadis G., Ed., *Liposomes as drug carriers: Recent trend and progress*. — John Wiley & Sons. — New York. — 1988. — P. 10.
2. Aoki H., Kakimura K., Morita K. et al. Therapeutic efficacy of targeting chemotherapy using local hyperthermia and thermosensitive liposomes: evaluation of drug distribution in a rat glioma model. // *Int. J. Hyperthermia*. — 2004. — 20, N 6. — P. 595-605.
3. Гурина О.И. Моноклональные антитела к нейроспецифическим антигенам (получение, иммунохимический анализ, исследование проницаемости гематоэнцефалического барьера): Дис. ... д-ра мед. наук. — М., 2005, 319с.
4. Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. // *Nature*. — 1975. — 256. — P. 495-497.
5. Чехонин В.П., Гурина О.И. и др. Моноклональные анти-GFAP-антитела: получение, характеристика, иммуноферментный анализ. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2001. — №8. — С.188-191.
6. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation // *J. Histochem. Cytochem.* — 1974. — 22. — P. 1084-1091.
7. Руководство по патологоанатомической диагностике опухолей человека // Под ред. Н.А. Краевского, А.В. Смольяникова, Д.С. Саркисова. — 3-е изд. — М.: Медицина, 1982, 512с.

8. Tascos N.A., Parr J., Gonatas N.K. Immunocytochemical study of the glial fibrillary acidic protein in human neoplasms of the central nervous system. // Hum. Pathol. – 13. N 5. – P. 454-458.

**QUANTIFICATION OF GFAP IN SERUM OF PATIENTS WITH BRAIN GLIOMAS
BY MEANS OF ELYSA EMPLOYING MONOCLONAL ANTI-GFAP ANTIBODIES**

N.V. YAGLOVA

Department of Biochemistry RPFU. *Moscow. 117198. M-Maklaya st. 8.*

Medical faculty

R.G. BIKTIMIROV

Moscow region scientific research and clinic institute. *Moscow. 129110.*

Shepkina st. 61/2

51 patients with brain gliomas were studied. 26 patients aged 10-63 years, had high grade gliomas. 25 patients aged 4-57 years, had low grade gliomas. Quantification of GFAP in serum was performed by ELYSA employing monoclonal anti-GFAP-antibodies. The aim of the research was to evaluate expression of GFAP by different types of glioma. 100% patients showed an increased GFAP level. High grade gliomas group showed the highest GFAP concentration in blood (32-256 ng/ml). GFAP concentrations in blood of patients with low grade gliomas were 16-128 ng/ml. We found a mild correlation between GFAP concentration in blood and size of high grade gliomas. The data obtained indicated that GFAP expression by glioma cells was quite stable. It is confirmed by immunohistochemical studies of GFAP presence in glial tumor tissues. So we can conclude that GFAP may be used for target delivery of antineoplastic drugs to glioma cells.