

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

doi: <http://dx.doi.org/10.31089/1026-9428-2019-59-3-174-177>

УДК 616-097.3:616.24-006

© Коллектив авторов, 2019

Глушков А.Н.¹, Поленок Е.Г.¹, Костянко М.В.², Титов В.А.³, Вафин В.А.⁴

Иммуноанализ антител к бензо[а]пирену в определении риска рака легкого у работников угольных шахт

¹ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии» СО РАН, пр. Ленинградский, 10, г. Кемерово, Россия, 650065;

²ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», ул. Красная, 6, г. Кемерово, Россия, 650043;

³ГБУЗ КО «Кемеровский областной онкологический диспансер», ул. Волгоградская, 35, г. Кемерово, Россия, 650056;

⁴ГКУЗ КО «Кемеровский областной центр крови», пр-т Октябрьский, 22а/7, г. Кемерово, Россия, 650066

Обнаружена ассоциация антител класса G, специфичных к химическому канцерогену бензо[а]пирену (IgG-Bp) с раком легкого у здоровых мужчин, не работающих в угольных шахтах.

Цель исследования состояла в выявлении возможности иммуноанализа IgG-Bp при определении риска РЛ у работников угольных шахт.

Исследованы IgG-Bp в сыворотке крови 501 мужчины в возрасте до 60 лет (161 — здоровые, не работающие в шахте; 239 — шахтеры, 101 — больные раком легкого) с помощью неконкурентного ИФА с использованием конъюгатов Bp с бычьим сывороточным альбумином в качестве антигена.

Установлено, что повышенные уровни IgG-Bp у больных раком легкого встречались чаще (50,5%), чем у здоровых мужчин, не работающих в шахте (37,2%, $p=0,047$, OR=1,7) и чем у шахтеров (30,5%, $p=0,0008$, OR=2,3). Стаж работы в шахте не влиял на содержание IgG-Bp в сыворотке крови работников угольной промышленности. У шахтеров с учетом поправки на возраст OR для рака легкого составил 2,0 ($p=0,01$), а с учетом поправки на курение OR=2,3 ($p=0,001$).

Производственные (работа в шахте), бытовые (курение) и эндогенные (возраст) факторы не оказывают существенного влияния на выраженность индивидуальной специфической реакции на Bp у мужчин. Иммуноанализ IgG-Bp рекомендуется для определения риска рака легкого у работников угольных шахт.

Ключевые слова: шахтеры; рак легкого; антитела; бензо[а]пирен

Для цитирования: Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Костянко М.В., Титов В.А., Вафин В.А. Иммуноанализ антител к бензо[а]пирену в определении риска рака легкого у работников угольных шахт. *Мед. труда и пром. экол.* 2019. 59 (3): 174–177. <http://dx.doi.org/10.31089/1026-9428-2019-59-3-174-177>

Для корреспонденции: Поленок Елена Геннадьевна, вед. науч. сотр. лаб. иммунохимии Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», канд. фарм. наук. E-mail: egpolenok@mail.ru.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Andrey N. Glushkov¹, Elena G. Polenok¹, Mikhail V. Kostyanko², Viktor A. Titov³, Ilgiz A. Vafin⁴

Immunoassay of antibodies to benzo[a]pyrene for lung cancer risk diagnosis among coal-mining workers

¹Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, 10, Leningradsky Ave., Kemerovo, Russia, 650065;

²Kemerovo State University, 6, Krasnaya str., Kemerovo, Russia, 650043;

³Regional Clinical Oncology Dispensary, 35, Volgogradskaya str., Kemerovo, Russia, 650056;

⁴Regional Center of Blood, 22a/7, Otyabrsky Ave., Kemerovo, Russia, 650066

The authors detected association of G-class antibodies specific to chemical carcinogen benzo[a]pyrene (IgG-Bp) with lung cancer in healthy men not working at coal mines.

Objective — to reveal possibilities of immunoassay of IgG-Bp in evaluating risk of lung cancer in coal mine workers.

The study covered serum IgG-Bp in 501 miners aged under 60 (161 healthy, not working in mine; 239 miners; 101 patients with lung cancer), by means of non-concurrent immune-enzyme analysis using benzo[a]pyrene conjugates with bovine serum albumin as an antigen.

Findings are that increased levels of IgG-Bp in lung cancer patients are more frequent (50.5%) than in healthy men not working in mine (37.2%, $p=0.047$, OR=1.7) and in miners (30.5%, $p=0.0008$, OR=2.3). Length of service in mines did not influence serum levels of IgG-Bp in coal industry workers. In the miners, with age adjustment consideration, OR for lung cancer equaled 2.0 ($p=0.01$), and with adjustment for smoking OR=2.3 ($p=0.001$).

Occupational (work in mine), lifestyle (smoking) and endogenous (age) factors do not have significant influence on intensity of individual specific reaction to benzo[a]pyrene in males. Immunoassay of IgG-Bp is recommended for lung cancer diagnosis in coal mine workers.

Key words: miners; lung cancer; antibodies; benzo[a]pyrene

For citation: Glushkov A.N., Polenok E.G., Kostyanko M.V., Titov V.A., Vafin I.A. Immunoassay of antibodies to benzo[a]pyrene for lung cancer risk diagnosis among coal-mining workers. *Med. truda i prom. ecol.* 2019. 59 (3): 174–177. <http://dx.doi.org/10.31089/1026-9428-2019-59-3-174-177>

For correspondence: Elena G. Polenok, leading researcher of immunochemistry laboratory in Human Ecology Institute in Federal research center of coal and coal chemistry in Siberian Division of Russian Academy of Sciences, Cand. Pharm. Sci. E-mail: egpolenok@mail.ru

Funding: The study had no funding.

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interests.

Введение. Известные данные о распространенности рака легкого (РЛ) среди работников угольных шахт противоречивы. Одни авторы исключают воздействие производственных факторов на заболеваемость и смертность от РЛ у шахтеров [1,2], другие отмечают повышение риска возникновения РЛ со стажем работы в шахте [3], а также при оценке влияния угольной пыли совместно с радоном, кварцем и выхлопами дизельных двигателей [4–6]. Учитывая вышеизложенное, разработка информативных методов определения индивидуальных рисков РЛ у шахтеров для последующей профилактики представляется актуальной задачей.

Бензо[а]пирен (Вр) является наиболее изученным экзогенным фактором канцерогенеза органов дыхания. Образование аддуктов Вр с ДНК инициирует злокачественную трансформацию клеток и приводит к индукции синтеза специфических антител [7–10].

Ранее были выявлены ассоциации антител к Вр с РЛ у мужчин, проживающих в центре угледобывающей промышленности РФ — Кемеровской области [11]. Однако при этом не учитывалось влияние производственных факторов (работа в угольных шахтах), бытовых факторов (курение) и возраста обследуемых групп.

Цель исследования состояла в выявлении возможности иммуноанализа антител к Вр в определении риска РЛ у работников угольных шахт.

Было обследовано 501 человек. В исследуемую группу были включены 239 мужчин — работников угледобывающей промышленности Кемеровской области, средний возраст мужчин — $46,3 \pm 7,9$ года. Среди них было 125 (52%) курящих и 114 (48%) некурящих. Стаж работы в угольной отрасли — не менее 10 лет (11–40 лет). В первую группу сравнения был включен 101 человек — мужчины с установленным диагнозом немелкоклеточный РЛ, которые поступили на лечение в Областной клинический онкологический диспансер г. Кемерово, средний возраст — $55,5 \pm 5,4$ года. Среди них было 80 (79%) курящих и 21 (21%) некурящих. Во вторую группу сравнения были включены 161 условно здоровых мужчин с Кемеровского центра крови, не работающие в угольной отрасли и не болеющие РЛ или другими заболеваниями дыхательных путей. Среди них было 72 (45%) курящих и 89 (55%) некурящих.

Забор периферической крови осуществлялся согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинской декларацией 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ №266 от 19.06.2003 г. Все лица, участвовавшие в исследовании, дали информированное письменное согласие на участие в нем.

Иммуноанализ антител к Вр (IgG-Bp) проводился с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа, подробная методика описана в работе [12]. В качестве антигена использовался конъюгат Вр с бычьим сывороточным альбумином (BSA), иммобилизованный на полистирольных иммунологических планшетах согласно методике [12]. Образцы сыворотки крови в разведении 1:100 выносились по

100 мкл. в лунки планшета в дублях, инкубировались 1 ч при 37°C на шейкере. Связавшиеся антитела выявляли с помощью козьих антител против IgG человека, меченных пероксидазой хрена (Novex, США), разведение конъюгата 1:20000. Регистрация адсорбированных на планшете АТ проводилась с помощью субстратного буфера, содержащего тетраметиленбензидин (ТМБ, США), на фотометре (Пикон, Россия) при длине волны 450 нм. Уровни антител выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

$$\text{IgG-Bp} = (\text{OD}_{\text{Bp-BSA}} - \text{OD}_{\text{BSA}}) / \text{OD}_{\text{BSA}}, \quad (1)$$

где $\text{OD}_{\text{Bp-BSA}}$ — связывание антител с конъюгатом Вр-BSA, OD_{BSA} — фоновое связывание с BSA.

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью пакета статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Ненормальный характер распределения количественных показателей был определен с помощью критерия Шапиро-Уилка, и в дальнейшем статистически значимые различия между группами выявлялись с помощью U-критерия Манна-Уитни для независимых выборок и непараметрического критерия χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность вариации. При расчете критерия χ^2 исследуемые показатели группировались в четырехпольную таблицу ($d.f.=1$). За критический уровень значимости принималось значение $p < 0,05$. Для выявления пороговых значений уровней антител (cut-off) был проведен ROC-анализ [13]. Сила ассоциации антител с РЛ оценивалась с помощью величины отношения шансов (odds ratio, OR) с доверительным интервалом (CI) при 95% уровне значимости, полученными на основе логистического регрессионного анализа. Для оценки взаимосвязей между уровнями специфичных антител и различными факторами (возраст, стаж работы) использовалась ранговую корреляцию по Спирмену.

Сначала с помощью ROC-анализа рассчиталось пороговое значение уровней IgG-Bp, по которым здоровые доноры Центра крови г. Кемерово имели наиболее выраженные различия с больными РЛ (cut-off). Таковым оказался уровень $\text{IgG-Bp}=7$. Затем определялось количество (n) и удельный вес (%) случаев с низкими (≤ 7) и высокими (> 7) уровнями IgG-Bp в каждой из сравниваемых групп и рассчитывались соответствующие значения OR. Результаты представлены в табл. 1.

Обнаружено, что удельный вес случаев с низкими уровнями IgG-Bp у здоровых доноров и шахтеров статистически значимо превышают таковой у больных РЛ ($p=0,047$ и $p=0,0008$ соответственно). При этом значения OR составили соответственно 0,6 и 0,4. Высокие уровни IgG-Bp в первой и второй группах сравнения встречались значимо реже, чем у больных РЛ со значениями $\text{OR}=1,7$ и $2,3$ соответственно. Статистически значимые различия по уровням IgG-Bp между здоровыми донорами Центра крови и шахтерами отсутствовали ($p=0,19$). Не было выявлено корреляционных взаимосвязей между стажем работы в шахте и уровнями IgG-Bp у рабочих. Это означает, что работа в угольных шахтах не оказывает значимого влияния на специ-

Таблица 1 / Table 1

Количество (n) и удельный вес, % случаев с низкими ($\leq$) и высокими ($>$) уровнями антител против бензо[а]пирена (IgG-Bp) у здоровых доноров (1), у шахтеров (2) и у больных раком легкого (РЛ) (3)

Quantity (n) and share, % of cases with low ($\leq$) and high ($>$) levels of antibodies to benzo[a]pyrene (IgG-Bp) in healthy donors (1), miners (2) and lung cancer patients (3)

Антитела	1. Здоровые (n=161)	2. Шахтеры (n=239)	3. Больные РЛ (n=101)	OR 1-2 (95% CI) (p)	OR 1-3 (95% CI) (p)	OR 2-3 (95% CI) (p)
	n/%	n/%	n/%			
IgG-Bp $\leq$ 7	101/62,7	166/69,5	50/49,5	(0,19)	0,6 (0,4–1,0)	0,4 (0,3–0,7)
IgG-Bp $>$ 7	60/37,2	73/30,5	51/50,5		(0,047) 1,7 (1,0–2,8)	(0,0008) 2,3 (1,4–3,7)

Таблица 2 / Table 2

Сравнение шахтеров и больных раком легкого (РЛ) по величине отношения шансов (OR) с помощью метода лог-регрессии с учетом возраста и курения

Comparison of miners and lung cancer patients by value of odds ratio (OR), via log-regression method with consideration of age and smoking

Антитела	OR (95%CI) (p)			
	без поправки	с учетом возраста	с учетом фактора курения	с учетом возраста и курения
IgG-Bp $\leq$ 7	0,4 (0,3–0,7) (0,0006)	0,5 (0,3–0,9) (0,01)	0,4 (0,3–0,7) (0,001)	0,5 (0,3–0,9) (0,02)
IgG-Bp $>$ 7	2,3 (1,4–3,7)	2,0 (1,2–3,6)	2,3 (1,4–3,7)	1,9 (1,1–3,6)

и фический иммунный ответ на Bp. Полученный результат соответствует данным эпидемиологических исследований о незначительном влиянии угольной пыли на заболеваемость РЛ у шахтеров. В то же время повышенные уровни IgG-Bp можно считать достаточно информативным маркером высокого риска РЛ у шахтеров.

Далее с помощью метода лог-регрессии исследовались различия между шахтерами и больными РЛ с поправками на возраст и курение (табл. 2). При высоких уровнях IgG-Bp ($>$ 7) значения OR составили соответственно 2,0 ($p=0,01$) и 2,3 ($p=0,001$). При совместном учете двух этих поправок (возраст + курение) OR=1,9 ($p=0,02$). Таким образом, возраст, как эндогенный фактор, оказывает большее влияние на выработку антител к Bp, чем курение, как бытовой фактор. Однако даже при совместном учете этих двух факторов риск возникновения РЛ при высоких уровнях IgG-Bp остается достаточно значимым.

Выводы:

1. Работа в угольных шахтах, курение и возраст не оказывают существенного влияния на индивидуальные специфические иммунные реакции, а также на химический канцероген Bp.

2. Высокие уровни антител, специфичных к Bp, как у здоровых мужчин, не работающих в угольных шахтах, так и у шахтеров ассоциированы с повышенным риском возникновения РЛ;

3. Иммуноанализ IgG-Bp рекомендуется использовать при профосмотрах у шахтеров в комплексе лабораторных методов определения рисков РЛ для последующей профилактики этого заболевания.

4. Работа выполнена при поддержке гранта РФ №16-15-00034.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Attfield M.D., Kuempel E.D. Mortality among U.S. underground coal miners: a 23-year follow-up. *Am. J. Ind. Med.* 2008; 51 (4): 231–45.

2. Laney A.S., Weissman D.N. Respiratory diseases caused by coal mine dust. *J. Occup. Environ. Med.* 2014. 56 (10): S18–22.

3. Hosgood H.D. 3rd, Chapman R.S., Wei H. et al. Coal mining is associated with lung cancer risk in Xuanwei, China. *Am. J. Ind. Med.* 2012; 55 (1): 5–10.

4. Hoffmann B., Jöckel K.H. Diesel exhaust and coal mine dust: lung cancer risk in occupational settings. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1076: 253–65.

5. Miller B.G., MacCalman L. Cause-specific mortality in British coal workers and exposure to respirable dust and quartz. *Occup. Environ. Med.* 2010; 67 (4): 270–6.

6. Skowronek J., Zemla B. Epidemiology of lung and larynx cancers in coal mines in Upper Silesia—preliminary results. *Health Phys.* 2003; 85 (3): 365–70.

7. Lee M.S., Liu C.Y., Su L., Christiani D.C. Polymorphisms in ERCC1 and ERCC2/XPD genes and carcinogen DNA adducts in human lung. *Lung Cancer.* 2015; 89 (1): 8–12.

8. Pauk N., Klimesova S., Kara J. et al. The relevance of monitoring of antibodies against polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and PAH-DNA adducts in serum in relation to lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Neoplasma.* 2013; 60 (2): 182–7.

9. Petruzzelli S., Celi A., Pulera N. et al. Serum antibodies to benzo(a) pyrene diol epoxide DNA adducts in the general population: effects of air pollution, tobacco smoking and family history of lung diseases. *Cancer Res.* 1998; 58 (8): 4122–6.

10. Reid M.E., Santella R., Ambrosone C.B. Molecular epidemiology to better predict lung cancer risk// *Clin. Lung Cancer.* 2008; 9 (3): 149–53.

11. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Костянко М.В. и др. Взаимное влияние антител к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону на риски возникновения рака легкого. *Российский иммунологический журнал.* 2015. 9(18 (3)): 343–9.

12. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Аносова Т.П. и др. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные аберрации в лимфоцитах периферической крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия. *Российский иммунологический журнал.* 2011; 5(14 (1)): 39–44.

13. Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J. Intern. Med.* 2013; 4 (2): 627–35.

REFERENCES

1. Attfield M.D., Kuempel E.D. Mortality among U.S. underground coal miners: a 23-year follow-up. *Am. J. Ind. Med.* 2008; 51 (4): 231–45.
2. Laney A.S., Weissman D.N. Respiratory diseases caused by coal mine dust. *J. Occup. Environ. Med.* 2014. 56 (10): S18–22.
3. Hosgood H.D. 3rd, Chapman R.S., Wei H. et al. Coal mining is associated with lung cancer risk in Xuanwei, China. *Am. J. Ind. Med.* 2012; 55 (1): 5–10.
4. Hoffmann B., Jöckel K.H. Diesel exhaust and coal mine dust: lung cancer risk in occupational settings. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1076: 253–65.
5. Miller B.G., MacCalman L. Cause-specific mortality in British coal workers and exposure to respirable dust and quartz. *Occup. Environ. Med.* 2010; 67 (4): 270–6.
6. Skowronek J., Zemla B. Epidemiology of lung and larynx cancers in coal mines in Upper Silesia—preliminary results. *Health Phys.* 2003; 85 (3): 365–70.
7. Lee M.S., Liu C.Y., Su L., Christiani D.C. Polymorphisms in ERCC1 and ERCC2/XPD genes and carcinogen DNA adducts in human lung. *Lung Cancer.* 2015; 89 (1): 8–12.
8. Pauk N., Klimesova S., Kara J. et al. The relevance of monitoring of antibodies against polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and PAH-DNA adducts in serum in relation to lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Neoplasma.* 2013; 60 (2): 182–7.
9. Petruzzelli S., Celi A., Pulera N. et al. Serum antibodies to benzo(a) pyrene diol epoxide DNA adducts in the general population: effects of air pollution, tobacco smoking and family history of lung diseases. *Cancer Res.* 1998; 58 (8): 4122–6.
10. Reid M.E., Santella R., Ambrosone C.B. Molecular epidemiology to better predict lung cancer risk. *Clin. Lung Cancer.* 2008; 9 (3): 149–53.
11. Glushkov A.N., Polenok E.G., Kostyanko M.V., Titov V.A., Vafin I.A., Ragozhina S.E. Mutual effects of antibodies to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone on the lung cancer risks. *Rossiiskij immunologicheskij zhurnal.* 2015; 9(18 (3)): 343–9 (in Russian).
12. Glushkov A.N., Polenok E.G., Anosova T.P., Savchenko Ya.A., Bakanova M.L., Minina V.I., Mun S.A., Larin S.A., Kost'anko M.V. Serum antibodies to benzo[a]pyrene and chromosomal aberrations in lymphocytes peripheral blood at the workers of coal processing enterprise. *Rossiiskij immunologicheskij zhurnal.* 2011. 5(14 (1)): 39–44 (in Russian).
13. Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J. Intern. Med.* 2013; 4 (2): 627–35.

Дата поступления / Received: 04.12.2017

Дата принятия к печати / Accepted: 07.02.2018

Дата публикации / Published: 18.03.2019