

БІЛКОВИЙ СПЕКТР КРОВІ КІШОК З ПУХЛИНАМИ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

О.М. Федець, кандидат сільськогосподарських наук, доцент

Н.Я.Кулай, кандидат ветеринарних наук, старший викладач,

Ю.О. Каркошкіна, магістрантка

***Львівський національний університет ветеринарної
медицини та біотехнологій імені С.З.Гжицького, Львів, Україна***

Досліджено фракційний склад білків плазми крові кішок з пухлинами молочної залози (виявлено 14 основних фракцій). У різних тварин підвищується вміст: γ -глобулінів, трансферинів та білків гострої фази запалення (α 1-антитрипсин, гаптоглобін і церулоплазмін).

Білки, кров, пухлина молочної залози, кішка.

На сьогодні великий інтерес яляють розробка і перевірка біомаркерів сироватки крові для раннього виявлення, встановлення ризику та прогнозування раку молочної залози. На жаль, ще, не визначені біомаркерів для раннього виявлення захворювання. Їх, дуже багато у фазі відкриття. Відомі нині білкові біомаркери, які не володіють необхідною чутливістю, щоб бути корисними індивідуально як біомаркери для раннього виявлення раку молочної залози, але можуть бути корисні в панелі білкових біомаркерів. Щоб визначити корисність будь-якого перспективного білкового біомаркера, необхідна перевірка і підтвердження декількома незалежними дослідженнями зразків сироватки від хворих з дуже ранньою стадією захворювання, з доброякісними новоутвореннями, іншими ураженнями грудей та іншими типами (не молочної залози) злоякісних уражень. Важливим є також виконання досліджень в одній лабораторії та використання одного методу збору проб. Національним інститутом раку (США) розроблена програма досліджень, яка протягом наступних п'яти-десяти років дозволить перевірити відповідні біомаркери і встановити їх корисність для раннього клінічного виявлення раку молочної залози [12]. За допомогою методу двомірного електрофорезу встановлене діагностичне значення ряду білків при раку молочної залози: тромбоспондин 1 і 5 (TSP1 і TSP5), α -1B-глікопротеїн (A1BG), сироватковий амілоїд Р-компонент (SAP) та тенасцин-Х (TN-X) [23], гаптоглобін-залежний білок [10], стресові білки (pHSP60, HSP90 і кальретикулін) та ядерний антиген проліферуючих клітин (PCNA) [9], прекурсори α -2-HS-глікопротеїну, цинк- α -2-HS-глікопротеїну й катепсину D [22] та ін. Тобто в цьому напрямі досліджень опубліковано багато праць, але усі вони стосуються людини.

Метою досліджень було вивчення білкового спектра крові кішок з пухлинами молочної залози.

Матеріал і методика досліджень. Кров об'ємом 2 мл брали з яремної вени від шести тварин з пухлинами молочної залози. Плазму (антикоагулянт гепарин) відцентрифугували при 2-2,5 тис. об/хв. Концентрацію білків визначали з біуретовим реактивом [17]. Електрофорез білків проводили в 7,5%-ному поліакриламідному гелі [2] в апараті для вертикального гел-електрофорезу Хийу-Каллур[3]. Математичну обробку фореграм здійснювали за допомогою програми TotalLab2.01, ідентифікацію білкових фракцій – за В.М. Холод [4].

Результати досліджень. Білки плазми крові розділили на 14 фракцій (табл., рис.). У тварини №2 (8 років, друга операція), №3 (10 років, крім пухлини молочної залози множинні метастази; через 3 дні після операції летальний кінець) і №4 (14 років, раніше оперована; рецидив, множинні пухлини і ураження лімфатичних вузлів) підвищений вміст трансферинів 1, куди входять бета-ліпопротеїни. За даними Н. AlolL. et al. [6] наслідком раку є посилення вільно-радикальних реакцій, які призводять до окиснення ліпопротеїнів низької густини, що супроводжується підвищенням рівня β -глобулінів (транспортують ліпопротеїни низької густини). Внаслідок розвитку карциноми [21] і аденокарциноми [16] молочної залози миші підвищилась концентрація трансферинів. У сироватці крові жінок спостерігали підвищений рівень фракції альфа-2- та бета-глобулінів куди входить глікопротеїн, який синтезується пухлиною молочної залози [18].

При карциномі молочної залози жінок у сироватці крові підвищений рівень гаптоглобіну $\alpha 1$ [1]. Такі самі зміни спостерігали у тварин №4 і №5 (13 років). У плазмі крові пацієнтів з діагнозом рак молочної залози спостерігали підвищений рівень білків гострої фази, таких як гаптоглобін, сироватковий амілоїд Р, $\alpha 1$ -антитрипсин, $\alpha 1$ -антихімотрипсин і $\alpha 1$ -кислий глікопротеїн [7]. Alaiya A.A. et al. [5] також відзначали високій рівень накопичення білків гострої фази та використання цього показника для показника ідентифікації типу пухлини і прогнозу. Проте за даними W.W Pang et al. [15] при раку молочної залози в крові рівень такого білка, гострої фази запалення як $\alpha 1$ -антихімотрипсин зростає, а $\alpha 1$ -антитрипсину зменшується. $\alpha 1$ -антитрипсин входить до складу фракції $\alpha 1$ -глобулінів. Показана залежність між експресією $\alpha 1$ -антихімотрипсину, клустерину, $\alpha 1$ -антитрипсину, гаптоглобіну і глікопротеїну з високим вмістом лейцину та трьома початковими стадіями раку яєчників. На заключній стадії раку рівень цих білків не зростає, оскільки уражується печінка де вони синтезуються [8]. Можливо, це було причиною відсутності змін окремих фракцій білкового спектра крові тварин, зокрема №1 (9 років, пухлина молочної залози та полікістоз матки). У тварин номерів 2, 3, 4 і 5 більша концентрація церулоплазміну, який теж належить до білків гострої фази запалення. У тварини №6 (15 років, стерилізована у 13 років; пухлини молочної залози та лімфатичних вузлів; не оперували, через поганий прогноз) дуже низька концентрація альбуміну сироватки крові. Таке зменшення альбуміну може бути пов'язане з високим рівнем катаболізму у клітинах пухлини [6]. Одночасно спостерігали зростання γ -глобулінів (більше ніж у 2 рази порівняно з іншими тваринами). Такі ж

зміни відзначали у сироватці крові жінок із злоякісною лімфомою та множинною мієломою [20]. За даними Strobel S.L. [19] при раку молочної залози, зростає рівень IgG kappa. При новоутвореннях кісткового мозку середній рівень IgG становив 1,6 г/100 мл крові (діапазон 0-7,2 г/100 мл), а у здорових пацієнтів 0,6 г/100 мл крові (0-6,1 г/100 мл) [14]. При карциномі у сироватці крові жінок зростає рівень імуноглобулінів [11] та імуноелектрофоретично проявляється позитивна преципітаційна лінія на IgA [13]. При аденокарциномі молочної залози миші також підвищений рівень γ -глобулінів [16].

Фракційний склад білків плазми крові тварин, %

Номер фракції	Білкова фракція	Номер тварини					
		1	2	3	4	5	6
1	S-фракція	3,93	3,67	5,16	3,92	5,05	4,55
2	γ -глобуліни 4	3,45	4,56	4,99	3,07	3,41	6,23
3	γ -глобуліни 3	2,54	1,68	3,11	2,50	3,44	3,25
4	γ -глобуліни 2	10,94	8,49	3,80	4,17	7,59	24,8
5	γ -глобуліни 1	2,04	2,18	2,96	5,06	2,83	4,63
	γ -глобуліни разом	18,97	16,91	14,86	14,8	17,27	38,91
6	Гаптоглобіни	1,96	2,09	2,63	3,56	3,93	1,61
7	Трансферини 4	2,45	4,71	4,38	3,36	2,01	3,35
8	Трансферини 3	8,59	2,69	1,33	3,75	6,38	4,07
9	Трансферини 2	4,50	4,23	5,17	5,43	5,63	3,40
10	Трансферини 1	5,67	9,06	12,0	10,7	6,76	2,69
	Трансферини разом	21,21	20,69	22,88	23,24	20,78	13,51
11	Церулоплазмін	3,56	4,76	5,68	5,06	5,20	3,30
12	α 2-глобуліни	8,02	7,45	6,87	7,84	7,27	5,78
13	α 1-глобуліни	6,20	7,14	7,47	7,99	7,22	3,59
14	Альбуміни	36,1	37,3	34,5	33,6	33,3	28,8

Висновки

1. У кішок з пухлинами молочної залози спостерігаються такі зміни білкового спектра крові: зростає рівень γ -глобулінів; підвищується вміст трансферинів 1 куди входять β -глобуліни, які транспортують ліпопротеїни низької густини; збільшується концентрація білків гострої фази запалення що призводить до зростання фракцій α 1-глобулінів (включає α 1-антитрипсин), гаптоглобінів і церулоплазміну.

2. У білковому спектрі крові кожної тварини спостерігається значна зміна однієї-двох фракцій, які перекривають інші можливі зміни.

3.

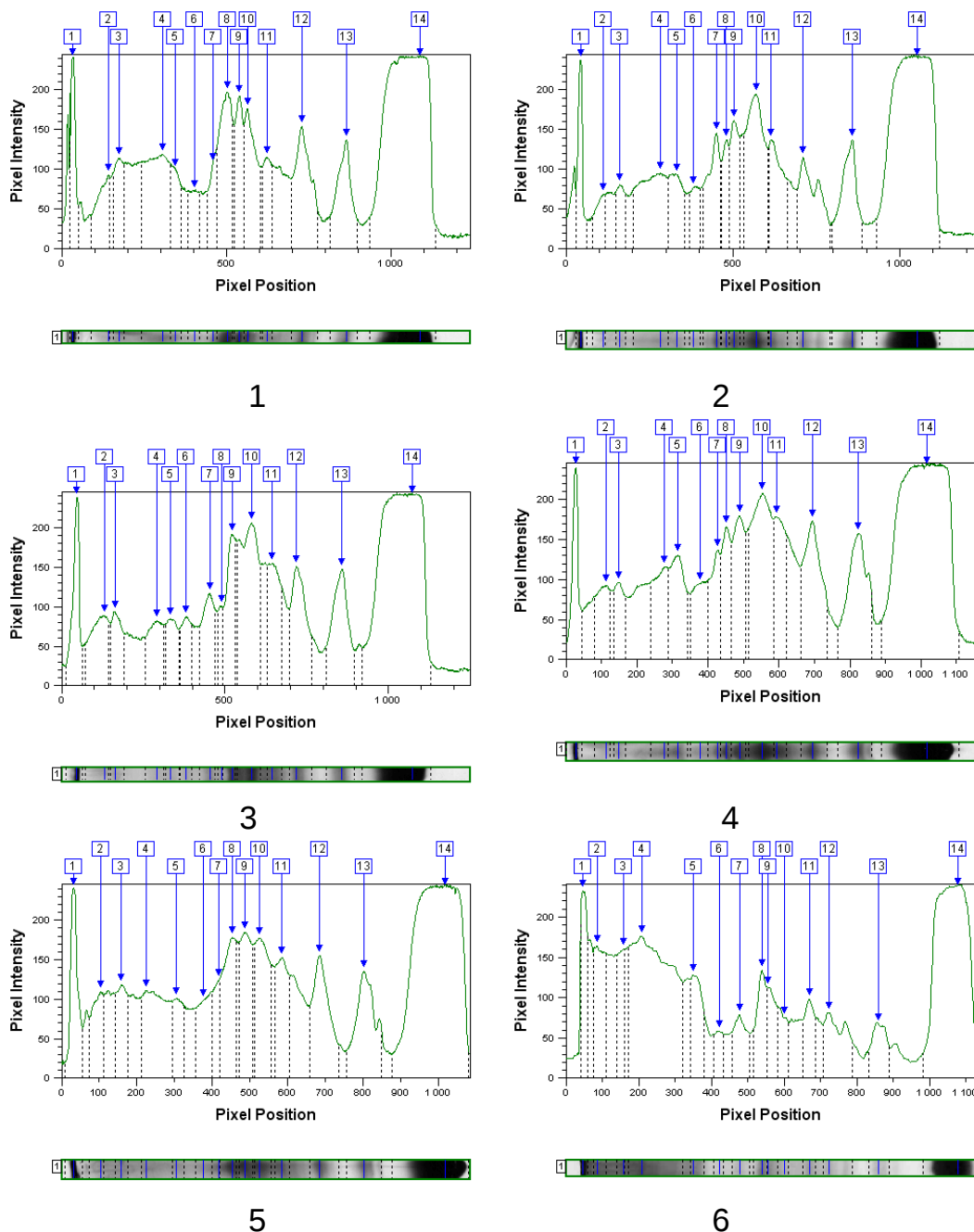


Рис. Денситограми білків плазми крові (див.табл.) досліджуваних тварин

Список літератури

1. Гоуфман Е.И. Протеомное исследование термостабильной фракции сыворотки пациентов с различными опухолями с применением двумерного электрофореза /Е.И Гоуфман, С.А. Мошковский, О.В. Тихонова // Биохимия. – 2006. – Т.71. вып.4. – С.445-453.
2. Маурер Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле, [Перевод с немецкого]. / Г. Маурер – М.: Мир, 1971. – 247 с.
3. Паспорт-инструкция к использованию аппарата для ветрикального гель-электрофореза «Хийу-Каллур». – 1984.
4. Холод В.М. Белки сыворотки крови в клинической и экспериментальной ветеринарии. /м. Колос– Минск: Ураджай, 1983. – 78 с.

5. Alaiya A.A. Classification of human ovarian tumors using multivariate data analysis of polypeptide expression patterns / A.A. Alaiya, B. Franzen, A.Hagman et al. / *Int.J.Cancer.* – 2000. – Vol.86. – P.731-736.
6. Alol L.H. The promising anticancer efficacy of parsley seeds flavonoid (apigenin) in induced mammary adenocarcinoma (AMN3) mice / L.H Alol, K.A Al-Mzaïen, S.M Hussein / *J.Physiol.Biomed.Sci.* – 2012. – Vol.25, N.1. – P.5-12.
7. Chahed K., Hamrita B., Mejdoub H. et al. Two dimensional gel electrophoresis analyses of human plasma proteins. Association of retinol binding protein and transthyretin expression with breast cancer / Chahed K., Hamrita B., Mejdoub H. et al. / *Gene Ther.Mol.Biol.* – 2004. – Vol.8. – P.539-546.
8. Chen Y. Different altered stage correlative expression of high abundance acute-phase proteins in sera of patients with epithelial ovarian carcinoma / Y. Chen, B.K. Lim, O.H. Hashim / *J.Hematol.Oncol.* – 2009. – V.2, N.1. – P.37-43.
9. Two dimensional gel electrophoresis in cancer proteomics / Kannan S., Sujitha M.V., Sundarraj S., / *Gel Electrophoresis - Advanced Techniques* /Ed. S.Magdeldin –InTech, 2012. –P.359-390.
- 10.Kuhajda F.P. Expression of haptoglobin-related protein and its potential role as a tumor antigen / Kuhajda F.P., Katumulowa A.I., Pasternack G.R / *PNAS.* – 1989. – V.86. – P.1188-1192.
- 11.Lynch W.J. The occurrence of abnormal serum proteins in patients with epithelial neoplasms / W.J. Lynch, R.A. Joske / *J.Clin.Path.* – 1966. – Vol.19, N.5. – P.461-463.
12. Misek D.E. Protein biomarkers for the early detection of breast cancer / D.E Misek, E.H. Kim / *International Journal of Proteomics.* – 2011. – Vol.2011, N.8. – P.1-9.
- 13.Munzarova N. Immunoelectrophoretic abnormality in sera from patients with different malignant diseases / N. Munzarova, R. Kubicek, A. Trnka / *Br.J.Cancer.* – 1975. – Vol.32. – P.737-740.
- 14.Miller B.J. Serum protein electrophoresis in the evaluation of lytic bone lesions / Nystrom L.M., Buckwalter J.A., Syrbu S., [et al] / *Iowa Orthod.J.* – 2013. – Vol.33. – P.114-118.
- 15.Can the acute-phase reactant proteins be used as Pang W.W., Abdul-Rahman P.S., Wan-Ibrahim W.I., Hashim O.H. [et al] cancer biomarkers? // *Int.J.Biol.Markers.* – 2010. – Vol.25, N.1. – P.1-11.
- 16.Rabinovichdepirosky R. The sequence of mouse serum protein changes during the progressing growth of a spontaneous mammary tumour and of the same tumour grafted in isologous system / R. Rabinovichdepirosky, S.R.Oisgold / *Br.J.Cancer.* – 1964. – Vol.3. – P.165-172.
- 17.Robinson H.W., Hodgen G.G. Biuret reaction for proteins / H.W Robinson, G.G. Hodgen // *J.Biol.Chem.* – 1940. – Vol.135. – P.707-717.
- 18.Silverman L.M. Electrophoretic patterns for serum glycoproteins reflect the presence of human breast cancer / L.M Silverman, G.B Dermer, Z.A Tokes / *Clin.Chem.* – 1977. – V.23, N.11. – P.2055-2058.
- 19.Strobel S.L. Transient paraproteinemia: an intriguing immunological anomaly S.L Strobel // *Ann.Clin.Lab.Sc.* – 2003. – V.33, N.3. – P.265-270.
- 20.http://www.homeomedi.com/files/article_byTsompani-Partalidou.pdf.
- 21.Witz I., Hermann G., Pikovski M., [et al]. The antigenic composition of tumours, sera and urines of tumou-bearing mice and the partial purification of two antigens present in increased amountws / I. Witz, G. Hermann, M.Pikovski [et al]. / *Br.J.Cancer.* – 1964. – V.18. – P.397-406.

22. Autoantibody to tumor antigen, alpha 2-HS glycoprotein: a novel biomarker of breast cancer screening and diagnosis / J.K. Yi , J.W. Chang, W. Han [et al]. / Cancer Epid.Biomark.Prev. – 2009. – Vol.18, N.5. – P.1357-1364.

23. Zeng Z., Hincapie M., Pitteri S.J. et al. A proteomics platform combining depletion, multi-lectin affinity chromatography (M-LAC) and isoelectric focusing to study the breast cancer proteome / Z. Zeng, M.Hincapie, S.J.Pitteri et al. / Anal.Chem. – 2011. – Vol.83, N.12. – P.4845-4854.

Исследован фракционный состав белков плазмы крови кошек с опухолями молочной железы (выявлено 14 основных фракций). У разных животных повышается содержание отдельных фракций: γ -глобулинов, трансферринов и белков острой фазы воспаления (α 1-антитрипсин, гаптоглобин и церулоплазмин).

Белки, кровь, опухоль молочной железы, кошка.

Fractional composition of plasma proteins from cats with mammary tumors has been investigated (14 main fractions have been identified). The level of individual fractions (γ -globulins, transferrins and acute phase proteins α 1-antitrypsin, haptoglobin and ceruloplasmin) increased in different animals.

Proteins, blood, mammary tumor, cat.