

Ю. С. Бакакина

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

АНАЛИЗ ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Проведен сравнительный анализ протеомных карт плазмы крови пациенток с Her2-позитивным и трижды негативным подтипами рака молочной железы (РМЖ), фиброаденомой, а также доноров. С помощью метода двумерного гель-электрофореза показано, что протеомные профили плазмы крови пациенток с РМЖ отличаются в зависимости от молекулярного подтипа опухоли. Выявленные отличия заключались в появлении новых дополнительных белков и изменении экспрессии присутствующих в норме белков на протеомных картах плазмы крови пациенток с РМЖ по сравнению с донорами.

Ключевые слова: рак молочной железы, биомаркеры, протеом, плазма крови, фиброаденома.

Y. S. Bakakina

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

PROTEOME ANALYSIS OF BLOOD PLASMA OF BREAST CANCER PATIENTS

Using two dimensional gel-electrophoresis method it was shown that blood plasma proteomic profiles are different for patients with various subtypes of breast cancer. Identified differences consist in the appearance of additional new proteins and changes in the expression of proteins present in norm on blood plasma proteomic maps of patients with breast cancer as compared to donors.

Keywords: breast cancer, biomarkers, proteome, blood plasma, fibroadenoma.

Введение. Рак является причиной смерти более 7,5 млн людей во всем мире ежегодно [1]. Наиболее распространенными его видами в настоящее время являются рак молочной железы (РМЖ), рак легких и колоректальный рак. Следует отметить, что объем знаний о канцерогенном процессе, биологии опухоли и клиническом течении рака стремительно растет. Выживаемость зависит от типа опухоли, возраста, пола и стадии заболевания при первоначальном диагнозе, а также от этнической принадлежности и региона проживания [1, 2].

Рак является результатом накопления генетических повреждений (индуцированных и/или переданных по наследству). Соответственно, канцерогенез – длительный, многоэтапный процесс, который включает ряд существенных генетических aberrаций, дающих начало развитию инвазивной опухоли. Теоретически длительность процесса канцерогенеза должна обеспечить достаточное время для обнаружения опухоли и ее лечения. Однако в большинстве случаев опухоль развивается бессимптомно и, таким образом, остается незамеченной до последних стадий заболевания. При этом успех лечения и, как следствие, благоприятный исход зависят от своевременной диагностики.

Нарушения исходной генетической информации соматических клеток (соматические мутации) приводят к изменениям в концентрации или структуре целого ряда белковых молекул-регуляторов, что и является первопричиной онкологических заболеваний. Как следствие, нарушается регуляция клеточного деления, наблюдается неконтролируемый рост клеток и формирование злокачественных новообразований. Именно белки отражают функциональный и посттрансляционный статус клетки, поэтому одной из перспективных стратегий для раннего выявления, диагностики, прогнозирования ответа на лечение или мониторинга лечения является поиск и идентификация белковых биомаркеров [3]. Следует отметить, что биомаркеры являются потенциаль-

ными мишенями действия лекарственных средств, что крайне важно как для разработки новых препаратов, так и для индивидуального подхода к терапии. Кроме того, выявление и характеристика динамики содержания биомаркеров позволит углубить знания о биологии опухоли в целом [4].

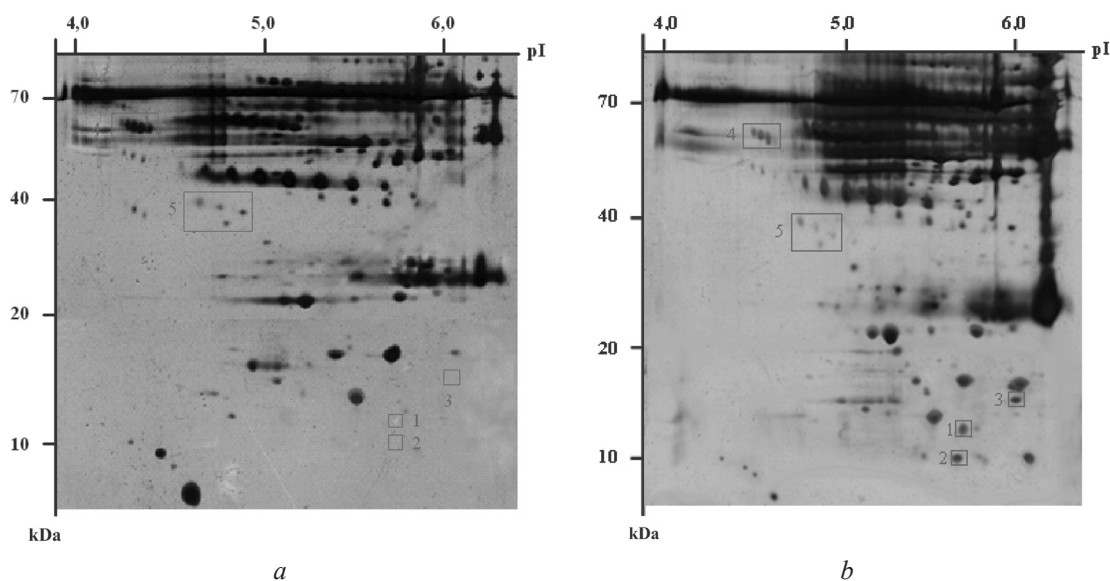
Цель данной работы – анализ протеомного профиля плазмы крови пациентов с различными молекулярными подтипами рака молочной железы.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служила плазма крови, полученная от доноров, пациенток с верифицированным диагнозом фиброаденома (доброкачественное новообразование) или РМЖ. Образцы крови получены из РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова.

Плазму крови получали из цельной крови путем центрифугирования при 1500 g в течение 15 мин. Для получения протеомных карт плазмы крови применяли метод двумерного гель-электрофореза, используя стандартную методику [5]. Разделение белков в первом направлении двумерного гель-электрофореза осуществляли с помощью прибора для изоэлектрофокусирования (ИЭФ) белков Protean IEF Cell (Bio-Rad Laboratories, США). Для ИЭФ были использованы 7-сантиметровые стрипы с иммобилизованным линейным градиентом pH 4–7 (Bio-Rad Laboratories, США). Разделение во втором направлении проводили в электрофоретической камере Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием 10 %-ных и 15 %-ных вертикальных полиакриламидных гелей толщиной 1 мм, на каждый из которых воздействовали силой тока 25 мА. Визуализацию белковых пятен в гелях после завершения второго направления двумерного гель-электрофореза осуществляли методом окрашивания нитратом серебра с тиосульфатом натрия [5]. Окрашенные нитратом серебра гели изучали с помощью сканирования калибровочным денситометром GS-800 (Bio-Rad Laboratories, США). Для статистического анализа протеомных карт использовали программное обеспечение PDQuest (Bio-Rad Laboratories, США).

Результаты и их обсуждение. Для изучения протеома плазмы крови пациенток с Her2-положительным подтипом (5 образцов), трижды негативным подтипом (13 образцов), фиброаденомой (15 образцов) и доноров (10 образцов) были получены соответствующие протеомные карты. Для выявления потенциальных маркеров развития опухоли проводили сравнительный анализ этих карт для каждой группы.

Результаты исследования показали, что протеомные профили белков плазмы крови отличаются в зависимости от молекулярно-генетического подтипа опухоли. Типичные протеомные карты с указанием областей, в которых обнаружены наиболее значимые различия, представлены на рисунке.



Типичные протеомные карты плазмы крови пациенток с фиброаденомой (*a*) и Her2-положительным подтипом РМЖ (*b*). Цифрами обозначены белки, по относительному объему и наличию которых наблюдались отличия между исследуемыми группами

Typical blood plasma proteomic maps of patients with fibroadenoma (*a*) and Her2-positive breast cancer (*b*). Proteins, the relative volume and the presence of which were different between the studied groups, are marked by numbers

На протеомных картах плазмы крови пациенток с Her2-позитивным и трижды негативным подтипами РМЖ наблюдались значительные изменения по сравнению с картами белков плазмы крови пациенток с фибroadеномой (см. рисунок). Полученные результаты сопоставимы с данными о том, что злокачественные опухоли молочной железы трижды негативного и Her2-позитивного подтипов характеризуются наихудшим прогнозом и наименьшей выживаемостью вследствие их высокой пролиферативной активности и степени злокачественности [1].

Полученные данные указывают на возможность использования динамики концентраций выявленных белков для мониторинга течения РМЖ.

Заключение. Получены протеомные карты плазмы крови пациенток с Her2-позитивным и трижды негативным подтипами РМЖ, фибroadеномой, а также доноров. Для выявления потенциальных маркеров развития опухоли проведен сравнительный анализ этих карт для каждой исследуемой группы. Обнаружено, что в группах пациенток с РМЖ по сравнению с группой пациенток с фибroadеномой, а также с группой доноров наблюдались отличия в белковом составе плазмы крови.

Выявленные отличия заключались в появлении новых дополнительных белков и изменении экспрессии присутствующих в норме белков на протеомных картах плазмы крови пациенток с РМЖ по сравнению с группой пациенток с фибroadеномой и группой доноров. Наиболее значимые различия между протеомными картами плазмы крови пациенток с фибroadеномой и доноров и протеомными картами белков плазмы крови пациенток с РМЖ обнаружены в пяти областях электрофоретической карты.

Протеомные профили белков плазмы крови отличались в зависимости от молекулярного подтипа опухоли. Так, протеомные профили плазмы крови пациенток с фибroadеномой обладали максимальным сходством с протеомным профилем плазмы крови доноров.

Автор выражает благодарность научному руководителю канд. биол. наук, доценту Л. В. Дубовской за помощь в планировании работы и обсуждении результатов.

Список использованных источников

1. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 / J. Ferlay [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2010. – N 127. – P. 2893–2917.
2. Global cancer statistics / A. Jemal [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* – 2011. – Vol. 61, N 2. – P. 69–90.
3. Ludwig, J. A. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection / J. A. Ludwig, J. N. Weinstein // *Nat. Rev. Cancer*. – 2005. – Vol. 5. – P. 845–856.
4. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility / N. Rifai [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 971–983.
5. Протеомный анализ плазмы крови больных хроническим бронхитом / Л. В. Дубовская [и др.] // *Пульмонология*. – 2009. – № 2. – С. 47–50.

References

1. Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D. M. (2008) “Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008”, *International Journal of Cancer*, vol. 127, pp. 2893-2917.
2. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D. (2011) “Global cancer statistics”, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 61, no. 2, pp. 69-90.
3. Ludwig, J. A. and Weinstein, J. N. (2005) “Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection”, *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, pp. 845-856.
4. Rifai, N., Gillette, M. A. and Carr, S. A. (2006) “Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility”, *Nature Biotechnology*, vol. 24, pp. 971-983.
5. Dubovskaya, L. V., Kolesneva, E. V., Fedorovich, S. V., Denesevich, N. P. and Volotovskii I D. (2009) “Analysis of plasma proteome for diagnosis of chronic bronchitis”, *Pul'monologiya [Pulmonology]*, no. 2, pp. 47-50.

Информация об авторах

Бакакина Юлия Сергеевна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: bakakinay@mail.ru

Information about the authors

Bakakina Yulia S. – Ph. D. (Biophys.), Scientific Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (Academicheskaya str., 27, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bakakinay@mail.ru

Для цитирования

Бакакина, Ю. С. Анализ протеомного профиля плазмы крови при раке молочной железы / Ю. С. Бакакина // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук*. – 2016. – № 4. – С. 59–61.

For citation

Bakakina Y. S. Proteome analysis of blood plasma of breast cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 59–61.