

МЕДИЦИНА

УДК 618.19–006:576.5.577.3

Н. А. ШУКАНОВА¹, Л. В. ДУБОВСКАЯ¹, Ю. С. БАКАКИНА¹, М. А. МАРТЫНОВА¹,
Н. А. КОЗЛОВСКАЯ², Е. В. ШАПОВАЛ², И. М. БУШМАКИНА¹, М. М. МОЛЧАН¹

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРИ ЛЕЧЕНИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

(Представлено членом-корреспондентом Е. И. Слобожаниной)

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
natashu2006@yandex.ru; dubovsk@mail.ru; bakakinay@mail.ru; martynova@ibp.org.by
²РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, Минск, Беларусь
oncomammolog@tut.by; jaklin60@rambler.ru

Установлено, что активность бутирилхолинэстеразы в цельной крови пациенток с доброкачественными опухолями молочной железы ниже по сравнению с этим показателем при злокачественных образованиях ($P < 0,001$). На гель-электрофореграммах плазмы крови пациенток с раком молочной железы обнаружено изменение белковой экспрессии и появление новых белковых онкомаркеров, которые зависят от молекулярно-генетического подтипа опухоли. Выявленные различия позволят разработать дополнительные методы диагностики и прогнозирования результатов терапии.

Ключевые слова: рак молочной железы, фиброаденома, кровь, протеомное профилирование, холинэстеразы, потенциальные онкомаркеры.

N. A. SHUKANOVA¹, L. V. DUBOVSKAYA¹, Y. S. BAKAKINA¹, M. A. MARTYNOVA¹, N. A. KAZLOUSKAYA²,
E. V. SHAPOVAL², I. M. BUSHMAKINA¹, M. M. MOLCHAN¹

PROGNOSTIC FACTORS IN THE TREATMENT OF BREAST CANCER

¹Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
natashu2006@yandex.ru; dubovsk@mail.ru; bakakinay@mail.ru; martynova@ibp.org.by
²N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Minsk, Belarus
oncomammolog@tut.by; jaklin60@rambler.ru

It was shown that the butyrylcholinesterase activity in the blood of women with non-malignant breast cancer was lower as compared to patients with malignant breast cancer ($P < 0,001$). Using two dimensional gel-electrophoresis method it was found that blood plasma proteomic maps are different for patients with various molecular subtypes of breast cancer. Identified differences consist in the appearance of additional new proteins and changes in the expression of proteins present in norm. Current data provide an advance to develop supplemental methods of breast cancer diagnosis and prognosis of the therapy outcomes.

Keywords: breast cancer, fibroadenoma, blood, proteome profiling, cholinesterases, potential oncomarkers.

Введение. Холинэстеразы принадлежат к классу гидролаз карбоновых кислот. Эти ферменты условно можно разделить на два типа: ацетилхолин-ацетилгидролазу (КФ 3.1.1.7), которая гидролизует преимущественно ацетилхолин и чаще всего называется ацетилхолинэстеразой (АХЭ), и ацилхолин-ацилгидролазу (КФ 3.1.1.8), расщепляющую такие сложные эфиры холина, как бутирилхолин и пропионилхолин [1]. Тривиальным названием последней является холинэстераза с синонимами «сывороточная холинэстераза», «холинэстераза II» и «бутирилхолинэстераза» (БуХЭ). В возбудимых тканях основной функцией АХЭ является участие в холинэргической нейротрансмиссии. Экспрессированная во многих типах невозбудимых тканей АХЭ играет существенную роль в процессах пролиферации, дифференцировки и миграции клеток [2] и проявляет аномальные свойства в злокачественных новообразованиях различной этиологии [3–4].

В раковой опухоли молочной железы ее активность в 2 раза выше, чем в соседней здоровой ткани [3], поэтому исследование этого параметра в первичной культуре из трепан-биоптатов злокачественной ткани молочной железы позволяет прогнозировать ответ опухоли пациентки на полихимиотерапию [5].

Биохимическая роль БуХЭ до конца не выяснена. В экстремальных условиях фермент выполняет недостаток АХЭ. При отравлении организма фосфорорганическими соединениями и карбамидами выполняет защитную функцию, участвует в процессах биотрансформации ксенобиотиков [6].

Определение активности холинэстераз в цельной крови, плазме или сыворотке крови пациентов с различными заболеваниями имеет большое диагностическое и прогностическое значение. Например, при заболеваниях печени, бронхиальной астме, инфаркте миокарда, ожогах, травматическом шоке и других стрессовых состояниях активность БуХЭ ($A_{\text{БуХЭ}}$) в крови уменьшается, а при тиреотоксикозе и некоторых заболеваниях почек повышается [7]. В настоящее время интенсивно изучается роль холинэстераз в онкогенезе различной этиологии и возможность использования такого параметра, как активность этих ферментов в крови онкологических пациентов в качестве прогностических биомаркеров при индивидуальной терапии. Показано, что у больных плоскоклеточным раком полости рта $A_{\text{БуХЭ}}$ в сыворотке крови значительно выше, чем у здоровых людей ($P < 0,0001$), и **возрастает с увеличением стадии заболевания. Такие же изменения $A_{\text{БуХЭ}}$ обнаружены в слюне пациентов с распространенным злокачественным новообразованием в полости рта, что позволило авторам считать слюну потенциальным неинвазивным показателем при скрининге этого заболевания [8].**

Есть сведения о возможной роли предоперационного уровня БуХЭ в крови пациентов со светлоклеточным раком почки в качестве независимого предикта общей выживаемости после нефрэктомии [9]. Обнаружено увеличение активности АХЭ ($A_{\text{АХЭ}}$) в цельной крови пациентов с раком легкого [10].

Злокачественная опухоль молочной железы имеет существенные различия в морфологическом строении, рецепторном статусе и молекулярно-генетических признаках. В зависимости от рецепторного статуса эстрогенов (ER) и прогестерона (PR) и наличия гена *HER2*, кодирующего белок – рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 типа (Her-2/neu), в клиниках выделяют 4 основных молекулярно-генетических подтипа рака молочной железы (РМЖ): люминальный А (люмА), люминальный Б (люмБ), Her2-положительный (Her2+) и базально-подобный или трижды негативный (ТН). При малигнизации молочной железы в крови пациенток меняется протеомный профиль: появляются новые белки-онкомаркеры и увеличивается или снижается синтез других. Например, в протеиновом составе плазмы крови женщин со злокачественными новообразованиями в молочной железе отмечается значительная экспрессия таких белков, как гаптоглобин α -1, кластерин, мультимеры транстретина, С-реактивный белок и фетуин А [11].

Сложность поиска новых алгоритмов диагностики, выбора тактики лечения и мониторинга индивидуального состояния пациентки с РМЖ в период лечения и ремиссии определяется высокой гетерогенностью опухоли и остается крайне актуальной задачей в настоящее время.

Цель исследования – сопоставить активность холинэстераз в цельной крови и определить протеомный профиль онкомаркеров в плазме крови пациенток с доброкачественной опухолью молочной железы фиброаденомой (ФА) и РМЖ различных молекулярно-генетических подтипов для разработки дополнительных методов диагностики и персонализированного подхода к лечению РМЖ.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служила кровь пациенток с первично верифицированным диагнозом РМЖ ($n = 37$) или ФА ($n = 27$). Во всех случаях было выполнено стандартное гистологическое исследование и методом иммуногистохимии определен уровень экспрессии гормональных рецепторов ER, PR и показатель Her-2/neu в злокачественно трансформированных клетках.

Забор венозной крови проводили в раствор антикоагулянта этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Плазму крови получали центрифугированием (1500g, 15 мин) аккуратно перемешанных образцов крови. Активность холинэстераз в разведенной в 1000 раз цельной крови

определяли методом с использованием реактива Элмана [5]. При анализе $A_{\text{АХЭ}}$ в качестве субстрата использовали ацетилтиохолин (1 ммоль/л) и ингибитор БУХЭ – tetraisopropyl pyrophosphogamide (iso – OMPA) в конечной концентрации 30 мкмоль/л. Для определения $A_{\text{БУХЭ}}$ субстратом был выбран бутирилтиохолин (1 ммоль/л), а ингибитором АХЭ – 1,5-Bis(4-allyldimethylammoniumphenyl)pentan-3-one (BW284c51) в концентрации 10 мкмоль/л. После добавления ингибитора и субстрата регистрировали оптическую плотность при $\lambda = 436$ нм каждые 5 мин. Активность холинэстераз выражали в относительных единицах увеличения оптической плотности раствора ΔD в минуту, учитывая в каждом образце содержание гемоглобина, измеренного гемихромным методом при $\lambda = 540$ нм. Фотометрические измерения проводили на спектрофотометре SPEKOL 11 (Германия).

Двумерный гель-электрофорез осуществляли по стандартной методике [12]. Образцы для MALDI-TOF масс-спектрометрии готовили с использованием роботизированной станции Xcise фирмы Shimadzu Biotech (Япония) согласно протоколу фирмы-изготовителя.

Статистическую обработку результатов проводили методами вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Нами проведен сравнительный анализ уровня $A_{\text{АХЭ}}$ и $A_{\text{БУХЭ}}$ в крови пациенток с диагнозом РМЖ и ФА. Пациентки с диагнозом РМЖ были отнесены к одному из 4 молекулярно-генетических подтипов, описанных выше. Их численность в каждой группе и возрастные интервалы представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Общая характеристика обследованных пациенток

Тип опухоли	Количество пациенток	Возрастные пределы (лет)	Средний возраст
ФА	27	14–75	39,2 ± 3,2
ЛюмА	12	45–68	56,1 ± 2,5
ЛюмБ	11	31–69	53,8 ± 3,2
HER2 +	7	43–67	51,8 ± 4,3
ТН	7	31–75	52,6 ± 5,8

Достоверных различий в $A_{\text{АХЭ}}$ в крови пациенток с доброкачественной и злокачественной опухолями нами не обнаружено (табл. 2), хотя при других онкологических заболеваниях изменение активности этого фермента является крайне информативным. Например, оценка $A_{\text{АХЭ}}$ в крови детей с острым лимфобластным лейкозом на разной стадии химиотерапии и в отдаленные сроки после лечения позволила сделать вывод о прогностических свойствах этого показателя [13].

Т а б л и ц а 2. Активность ХЭ в крови пациенток с доброкачественной и злокачественными опухолями молочной железы

Тип	ФА	ЛюмА	ЛюмБ	HER2+	ТН
$A_{\text{АХЭ}}$, отн. ед.	0,082 ± 0,002	0,084 ± 0,004	0,086 ± 0,005	0,080 ± 0,004	0,078 ± 0,006
$A_{\text{БУХЭ}}$, отн. ед.	0,026 ± 0,001	0,033 ± 0,002	0,032 ± 0,003	0,035 ± 0,003	0,033 ± 0,003

П р и м е ч а н и е. Активность ферментов выражали в отн. ед., так как измерения проводили в линейной области гидролиза субстратов.

Как правило, в биологических и медицинских исследованиях различия считаются достоверными при уровне значимости $P < 0,05$. В наших результатах $A_{\text{БУХЭ}}$ крови пациенток с ФА достоверно отличалась от этого параметра в крови пациенток с РМЖ всех четырех подтипов, причем для люмА, HER2+ и ТН подтипов уровень значимости составлял $P < 0,001$, для люмБ – $P < 0,05$. Следует отметить, что, несмотря на ограниченное количество пациенток в группах, величины $A_{\text{АХЭ}}$ и $A_{\text{БУХЭ}}$ были адекватно гомогенны.

ФА, которая является третьим по частоте заболеванием в группе опухолей и опухолеподобных поражений молочной железы после рака и фиброзно-кистозной болезни [14], как правило,

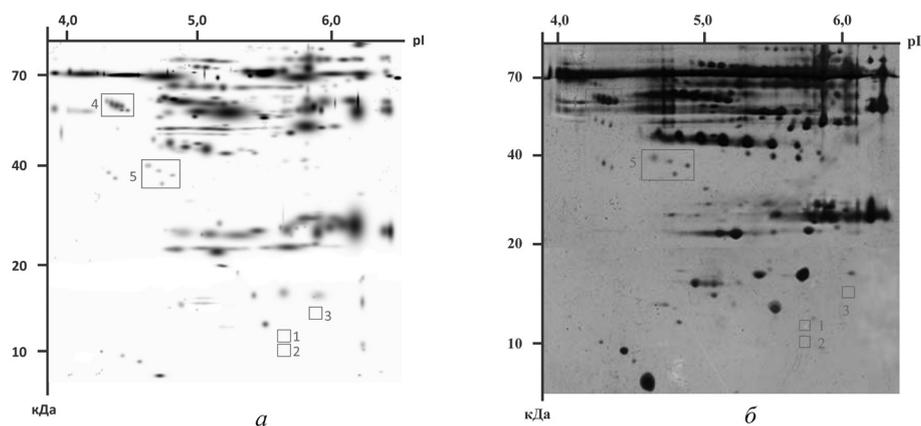


Рис. 1. *а* – Синтетическая протеомная карта плазмы крови доноров, полученная путем статистической обработки всех биологических и аналитических повторов для группы доноров; *б* – типичная гель-электрофореграмма плазмы крови пациентки с фиброаденомой молочной железы

перерождается в раковую опухоль относительно редко (3 %). Однако сходство некоторых форм РМЖ с доброкачественными заболеваниями требует тщательной дифференциальной диагностики, и оценка $A_{\text{БyxЭ}}$ в крови пациенток может послужить дополнительным диагностическим фактором.

Известно, что в крови онкологических больных меняется профиль острофазных белков [15]. Нами были получены протеомные карты плазмы крови пациенток с диагнозом ФА и РМЖ четырех молекулярно-генетических подтипов, а также доноров. На рис. 1 представлена синтетиче-

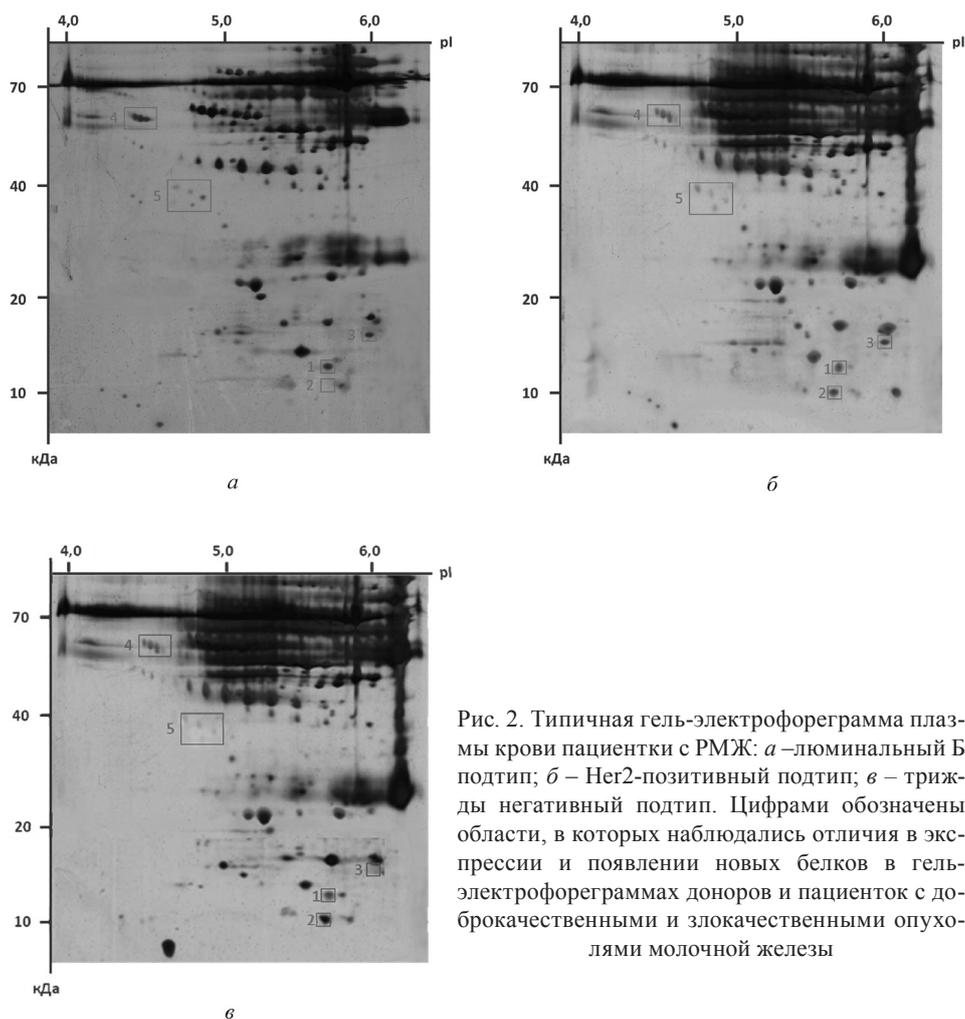


Рис. 2. Типичная гель-электрофореграмма плазмы крови пациентки с РМЖ: *а* – люминальный В подтип; *б* – Her2-позитивный подтип; *в* – трижды негативный подтип. Цифрами обозначены области, в которых наблюдались отличия в экспрессии и появлении новых белков в гель-электрофореграммах доноров и пациенток с доброкачественными и злокачественными опухолями молочной железы

ская протеомная карта плазмы крови доноров (рис. 1, а) и типичная гель-электрофореграмма плазмы крови пациентки с диагнозом ФА (рис. 1, б). При небольших различиях в экспрессии визуализированных белков протеомные карты плазмы крови доноров и пациенток с ФА обладали максимальным сходством. Анализ протеома пациентки с РМЖ люминального Б подтипа позволил обнаружить появление белков в областях гель-электрофореграммы, обозначенных цифрами 1 и 3 (рис. 2, а). С использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии было установлено, что область 1 соответствует острофазному белку гаптоглобину. Белок пятна 3 пока установить не удалось. На гель-электрофореграмме плазмы крови пациентки с более агрессивным Нер-позитивным подтипом РМЖ дополнительно появляется белок пятна 2 – сывороточный амилоидный белок А (рис. 2, б). Таким образом, нами показаны различия в протеомных профилях плазмы крови здоровых женщин, пациенток с ФА и РМЖ, причем меняется не только экспрессия некоторых белков, но и появляются новые белковые онкомаркеры в крови пациенток с более агрессивными подтипами РМЖ.

Заключение. При сравнительном анализе величин $A_{\text{буХЭ}}$ в крови пациенток с диагнозом ФА и РМЖ всех четырех молекулярно-генетических подтипов опухоли выявлено более низкое значение ферментативной активности при доброкачественных опухолях молочной железы ($P < 0,001$), что может служить дополнительным дифференциальным диагностическим фактором для оценки злокачественности опухоли. На гель-электрофореграммах плазмы крови пациенток с РМЖ обнаружено изменение белковой экспрессии и появление новых белков, которые зависят от молекулярно-генетического подтипа опухоли.

Определение активности холинэстераз в крови и профиля белковых онкомаркеров в плазме крови пациенток с ФА и РМЖ различных молекулярно-генетических подтипов позволит разработать дополнительные методы диагностики и прогнозирования результатов терапии.

Список использованной литературы

1. Enzyme Nomenclature. Recommendations (1972 of the Commission on biochemical Nomenclature of the Nomenclature and Classification of Enzymes. – Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1973.
2. Overexpression of acetylcholinesterase inhibited cell proliferation and promoted apoptosis in NRK cells / Q. H. Jin [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2004. – Vol. 25, N 8. – P. 1013–1021.
3. Cholinesterase activity and acetylcholinesterase glycosylation are altered in human breast cancer / F. Ruiz-Espejo [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2002. – Vol. 72, N 1. – P. 11–22.
4. Cholinesterase activity of human lung tumours varies according to their histological classification / P. Martinez-Moreno [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2006. – Vol. 27, N 3. – P. 429–436.
5. Активность ацетилхолинэстеразы в опухолевых клетках железистой ткани при раке молочной железы / Н. А. Шуканова [и др.] // *Весті НАН Беларусі. Сер. мед. навук.* – 2013. – № 3. – С. 28–31.
6. Mason, H. J. The recovery of plasma cholinesterase and erythrocyte acetylcholinesterase activity in workers after overexposure to dichlorvos / H. J. Mason // *Occup. Med.* – 2000. – Vol. 50, N 5. – P. 343–347.
7. Старостина, В. К. Холинэстераза: методы анализа и биагностическое значение: информационно-методическое пособие / В. К. Старостина, С. А. Дегтева. – Новосибирск, 2008.
8. Protein thiols and butyrylcholinestrerase in saliva of oral cancer patients / Y. R. Chianeh [et al.] // *Indian J. Clin. Biochem.* – 2014. – Vol. 29, N 2. – P. 238–241.
9. Preoperative butyrylcholinesterase level as an independent predictor of overall survival in clear cell renal cell carcinoma patients treated with nephrectomy / T. Koie [et al.] // *The Scientific World J.* – 2014. [Electronic resource]. – Mode of access: www.hindawi.com/journals/tswj/2014/948305/. – Date of access: 23.12.2015.
10. Ectoenzymes and cholinesterase activity and biomarkers of oxidative stress in patients with lung cancer / D. Zanini [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* – 2013. – Vol. 374, N 1–2. – P. 137–148.
11. Rivenbark, A. G. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine / A. G. Rivenbark, S. M. O'Connor, W. B. Coleman // *Am. J. Pathol.* – 2013. – Vol. 183, N 4. – P. 1113–1124.
12. Goerg, A. 2-D proteome analysis protocols / A. Goerg, W. Weiss // *Meth. Mol. Biol.* – 1999. – Vol. 112. – P. 235–244.
13. Changes in acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes and whole blood in acute lymphoblastic leukemia patients / V. Battisti [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2009. – Vol. 402, N 1–2. – P. 114–118.
14. Umekita, Y. Immunohistochemical study of hormone receptor and hormone-regulated protein expression in phylloides tumour: comparison with fibroadenoma / Y. Umekita, H. Yoshida // *Virchows Arch.* – 1998. – Vol. 433. – P. 311–314.
15. Can the acute-phase reactant proteins be used as cancer / W. W. Pang [et al.] // *Int. J. of Biological Markers.* – 2010. – Vol. 25, N 1. – P. 1–11.

Поступило в редакцию 19.05.2016