



УДК 619:616.006:577.1:636.6

ЕЛЕКТРОФОРЕЗ БІЛКІВ КРОВІ СОБАК З ПУХЛИНАМИ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

О. М. ФЕДЕЦЬ, кандидат сільськогосподарських наук, доцент

І. М. КУРЛЯК, кандидат сільськогосподарських наук, доцент

О. І. ЗАЯЦЬ, кандидат сільськогосподарських наук, старший викладач

Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С.З. Ґжицького

E-mail: fedets@lvet.edu.ua

<https://doi.org/10.31548/bio2018.05.022>

У статті наводяться дані щодо фракційного складу білків плазми крові, які досліджували методом одномірного електрофорезу в поліакриламідному гелі. Для дослідження обрано собак із пухлинами молочної залози і дані порівнювали із здоровими тваринами.

У крові собак із пухлинами молочної залози спостерігали зростання рівня γ -глобулінів та зменшення альбумінів. Підвищення вмісту трансферинів було лише у одній тварині і прийшло до норми після операції. Збільшення концентрації білків гострої фази запалення – гаптоглобіну і церулоплазміну – було у собаки з множинними пухлинами з кістами.

Ключові слова: собаки, білки крові, плазма крові, пухлини молочної залози

Актуальність. Вивченню білків, які пов'язані з виникненням та прогресією пухлин молочної залози, присвячено багато наукових праць. Основна мета цих досліджень – це пошук білків, які мають діагностичне значення для встановлення стадії розвитку пухлини та її типу. Це необхідне для ранньої діагностики та успішного лікування, тому дослідженню цього питання присвячено багато публікацій. Зокрема, в досліджах, які були проведені ще майже 50 років тому [1], було показано, що у миші ріст карциноми молочної залози асоційований зі збільшенням у сироватці крові концентрації β_2 -глобуліну (трансферин), β_2 -глобуліну (гемоглобін зв'язуючий білок) та β_3 -глобуліну (складова компоненти).

На сьогоднішній день успіхи в ранній діагностиці раку молочної залози людини досяг-

нуті з використанням технології візуалізації (мамографія, цифрова мамографія та магнітно-резонансна томографія). Проте для масового щорічного застосування цих методів діагностики є ряд обмежень, зокрема відносна складність та висока вартість. Великий інтерес представляють розробка і перевірка біомаркерів сироватки крові для раннього виявлення, встановлення ризику та прогнозування захворювання. На жаль, в даний час, не визначені біомаркери для раннього виявлення раку молочної залози. Їх, як і раніше, дуже багато у фазі відкриття. Білкові біомаркери, які визначені на сьогоднішній день, не володіють необхідною чутливістю чи специфічністю, щоб бути корисними індивідуально як біомаркери для раннього виявлення раку молочної залози, але в загальному можуть бути корисні в панелі білкових біо-



маркерів. 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 ураженнями, з іншими ураженнями молочної залози та іншими типами (не молочної залози) злоякісних новоутворень. 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 [2].

Для прикладу, серед білків, які пов'язані із прогресуванням раку молочної залози, показник CA15-3 був кращий для передбачення рецидиву раку молочної залози, ніж лужна фосфатаза, але використання обох біомаркерів разом забезпечувало більш ранню діагностику рецидиву [3].

Існують також дані і по тваринах, хоча їх менше через низку причин.

Метою роботи було дослідження білкового спектру плазми крові собак із пухлинами молочної залози та виявлення білкових фракцій, які змінюються у разі захворювання.

Матеріали і методи дослідження. Кров брали від тварин із пухлинами молочної залози. Плазму (антикоагулянт K_3EDTA) відцентрифугували при 2-2,5 тис об/хв. Концентрацію білків визначали з біуретовим реактивом [4]. Електрофорез білків проводили в 7,5 % поліакриламідному гелі [5], в апараті для вертикального гель-електрофорезу Хийу-Каллур. Математичну обробку фореграм здійснювали за допомогою програми TotalLab2.01. Ідентифікацію білків проводили за Холод В. М. [6].

Результати досліджень та їх обговорення. Білки плазми крові розділені на 15 фракцій (табл. 1, рис. 1).

Збільшений рівень γ -глобулінів у хворих тварин був вірогідно вищий ніж у здорових.

У тварин із пухлинами молочної залози № 1 (йоркширський тер'єр, 12 років, аденокарцинома), № 2 (метис німецької вівчарки, 8 років, множинні пухлини з кістами) і № 3 (йоркширський тер'єр, 4 роки) вміст γ -глобулінів підвищений на 37-88 % порівняно із здоровими тваринами (німецькі вівчарки, 7, 5 і 2 роки). За аденокарциноми молочної залози у миші також підвищений рівень γ -глобулінів [7]. Такі ж зміни були і у сироватці крові жінок із злоякісною лімфомою та множинною міеломою [8]. За даними Strobel S.L. [9] при раку молочної залози жінок зростає рівень IgG kappa. Цей показник зростає і при доброякісних новоутвореннях молочної залози жінок [10].

Підвищення рівня γ -глобулінів було виявлено нами і у кішок із пухлинами молочної залози [11].

Зміни у кількості імуноглобулінів характерні і при ураженнях інших органів і тканин. При новоутвореннях кісткового мозку середній рівень IgG склав 1,6 г/100 мл крові (діапазон 0-7,2 г/100 мл), а у здорових пацієнтів цей показник становив 0,6 г/100 мл крові (0-6,1 г/100 мл) [12]. При карциномі у сироватці крові жінок зростає рівень імуноглобулінів [13] та імуноелектрофоретично проявляється позитивна преципітаційна лінія на IgA [14].

У тварини № 4 (ротвейлер, 9 років) кількість γ -глобулінів збільшена лише на 15 % порівняно із здоровими тваринами. Через 10 днів після операції по видаленню пухлини у цієї тварини кількість імуноглобулінів майже не змінилась. Можливо, причиною цього підвищення імуноглобулінів є реакція цілого організму після операції, або інші тканини, у яких можливі метастази.

Рівень гаптоглобінів суттєво збільшився (майже вдвічі) лише у тварини № 2, проте, в середньому між здоровими і хворими тваринами цей показник суттєво не відрізнявся.



1. Фракційний склад (%) білків крові тварин

№ фракції	Білкові фракції	ТВАРИНИ								
		Хворі					Здорові			
		1	2	3	4	середнє	5	6	7	середнє
1.	S-фракція	5,90	6,56	3,54	9,06	6,26±1,13	4,88	4,50	4,00	4,46±0,25
2.	γ-глобуліни 3	10,8	7,47	6,32	4,38	7,24±1,35	3,65	2,60	3,48	3,24±0,32
3.	γ-глобуліни 2	9,1	11,2	12,9	9,74	10,73±0,84*	4,68	3,01	7,95	5,21±1,45
4.	γ-глобуліни 1	0,27	1,83	0,77	2,86	1,43±0,58	2,58	2,35	3,11	2,68±0,22
	γ-глобуліни разом	20,17	20,5	19,99	16,98	19,41±0,82*	10,91	7,96	14,54	11,14±1,90
5.	гаптоглобіни 2	1,50	3,91	1,65	2,20	2,31±0,55	1,74	1,88	2,40	2,01±0,20
6.	гаптоглобіни 1	1,96	5,28	2,57	3,06	3,22±0,72	2,80	3,73	3,12	3,22±0,27
	гаптоглобіни разом	3,46	9,19	4,22	5,26	5,53±1,27	4,54	5,61	5,52	5,22±0,34
7.	трансферини 2	5,09	0,60	2,30	9,96	4,49±2,04	4,31	4,40	3,23	3,98±0,37
8.	трансферини 1	0,07	1,96	0,14	1,76	0,98±0,51	0,18	0,03	0,95	0,39±0,28
	трансферини разом	5,16	2,56	2,44	11,72	5,47±2,17	4,49	4,43	4,18	4,37±0,09
9.	церулоплазмін	0,03	6,11	0,79	0,14	1,77±1,46	1,01	0,73	0,22	0,65±0,23
10.	α2-глобуліни	10,0	1,58	9,85	9,30	7,68±2,04	13,9	13,2	11,2	12,77±0,81
11.	α1-глобуліни 4	1,51	0,22	0,56	0,12	0,60±0,32	0,37	0,32	0,15	0,28±0,07
12.	α1-глобуліни 3	0,13	0,66	0,31	0,84	0,48±0,16	0,75	0,81	0,45	0,67±0,11
13.	α1-глобуліни 2	0,85	1,18	2,68	1,31	1,50±0,40	0,57	0,70	0,61	0,63±0,04
14.	α1-глобуліни 1	1,79	2,34	1,42	2,77	2,08±0,30*	2,98	3,14	2,84	2,99±0,09
	α1-глобуліни разом	4,28	4,40	4,97	5,04	4,47±0,19	4,67	4,97	4,05	4,55±0,28
15.	альбуміни	51,0	49,1	54,2	42,5	49,20±2,47*	55,6	58,6	56,2	56,80±0,92

P < 0,05* статистична вірогідність результатів досліджень

Збільшення рівня гаптоглобінів встановлено і у кішок з пухлинами молочної залози [11].

В сироватці крові жінок підвищений рівень гаптоглобіну α1 спостерігали при карциномі молочної залози [15]. За даними Nasim [10] експресія гаптоглобіну у жінок з раком молочної залози не відрізняється від пацієнтів з доброякісними захворюваннями молочної залози.

У плазмі крові жінок із діагнозом рак молочної залози підвищений рівень білків гострої фази, таких як гаптоглобін, сироватковий амліоїд Р, α1-антитрипсин, α1-антихімотрипсин і α1-кислий глікопротеїн [16]. Alaiya A.A. et al. [17] також описали про накопичення цих білків гострої фази на високому рівні та використання цього для розрізнення типу пухлини і прогнозу.

На заключній стадії раку яєчників рівень гаптоглобіну не зростає, оскільки уражується печінка, де вони синтезуються [18].

У тварини № 2 у кілька разів збільшилась концентрація церулоплазміну, який відносять до білків гострої фази запалення. У хворих тварини № 1 і № 3 цей показник був на рівні здорових тварин.

У тварини № 4 на момент операції концентрація церулоплазміну не відрізнялась від здорових тварин, проте через 10 діб після операції даний показник значно зріс (з 0,14 до 5,14), що свідчить про післяопераційний запальний процес. У цієї тварини (№ 4) до операції спостерігалось значне підвищення вмісту трансферинів (11,72), а вже після операції цей показник повернувся до норми (3,4) і не відрізнявся від здорових тварин.

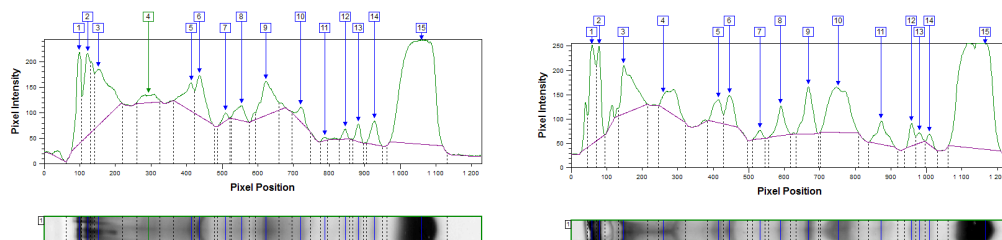


Рис. 1. Електрофереграми білків плазми крові хворої (№ 2) і здорової (№ 5) тварин (номери відповідають табл. 1).

У миші також підвищувалась концентрація трансферинів унаслідок розвитку карциноми [1] і аденокарциноми [7] молочної залози.

У кішок із пухлинами молочної залози підвищена концентрація церулоплазміну і трансферинів [11].

Рівень альбуминів у хворих тварин був вірогідно нижчим ніж у здорових.

Середусіх хворих тварин лише у № 4 вміст альбуминів був суттєво менший порівняно із здоровими тваринами. Через 10 дб після операції зміни були не суттєві. Зменшення альбуміну може бути також пов'язане з високим рівнем катаболізму у клітинах пухлини [19].

При доброякісних ураженнях молочної залози жінок виявляли вищий рівень

альбуміну [10]. Таке підвищення у людини було виявлено і при раку яєчників, що може бути використане в якості додаткового біомаркера для діагностики [20].

Висновки і перспективи. У крові собак із пухлинами молочної залози спостерігаються наступні зміни білкового спектру: 1) γ -глобуліни зростають у всіх тварин, а альбуміни зменшуються; 2) трансферини підвищуються лише у одній тварині і приходять до норми після операції; 3) білки гострої фази запалення – гаптоглобіни і церулоплазміни – збільшуються у собаки з множинними пухлинами з кістами.

Подяка. Ця робота була профінансована Міністерством освіти і науки України (0118U003495).

Література

1. Witz I., Hermann G., Pikovski M., Gross J. The antigenic composition of tumours, sera and urines of tumour-bearing mice and the partial purification of two antigens present in increased amounts. Br.J.Cancer. 1964. V.18. P.397-406.
2. Misek D.E., Kim E.H. Protein biomarkers for the early detection of breast cancer. International Journal of Proteomics. 2011. V.2011, N.8. P.1-9.
3. Keshaviah A., Dellapasqua S., Rotmensz N. et al. CA15-3 and alkaline phosphatase as predictors for breast cancer recurrence: a combined analysis of seven International Breast Cancer Study Group trials. Ann. Oncol. 2007. V.18, I.4. P. 701-708.
4. Robinson H.W., Hodgen G.G. Biuret reaction for proteins. J.Biol.Chem. 1940. V.135. P.707-717.
5. Maurer H.R. Disk electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. Berlin - New York: Walter De Gruyter, 1971. 228 p.
6. Холод В. М. Белки сыворотки крови в клинической и экспериментальной ветеринарии. Минск: Ураджай, 1983. 78 с.
7. Rabinovichdepirosky R., Oisgold S.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. Br.J.Cancer. 1964. V.3. P.165-172.



8. Tsompani V, Partalidou A. Serum protein electrophoresis: an immunological blood test in the planning of the homeopathic treatment. URL: http://www.homeomedi.com/files/article_byTsompani-Partalidou.pdf.
9. Strobel S.L. Transient paraproteinemia: an intriguing immunological anomaly. *Ann.Clin.Lab.Sc.* 2003. V.33, N.3. P.265-270.
10. Nasim F.U., Ejaz S., Ashraf M. et al. Potential biomarkers in the sera of breast cancer patients from Bahawalpur, Pakistan. *Biomark. Cancer.* 2012. V.4. Dec 10. P. 19-34.
11. Федець О. М., Кулай Н. Я., Каркошкіна Ю. О. Білковий спектр крові кішок з пухлинами молочної залози. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. 2013. Вип. 188 (4). С. 224-229.
12. Nystrom L.M., Buckwalter J.A., Syrbu S., Miller B.J. Serum protein electrophoresis in the evaluation of lytic bone lesions. *Iowa Orthod.J.* 2013. V.33. P.114-118.
13. Lynch W.J., Joske R.A. The occurrence of abnormal serum proteins in patients with epithelial neoplasms. *J.Clin.Path.* 1966. V.19, N.5. P.461-463.
14. Munzarova N., Kubicek R., Trnka A. Immunoelectrophoretic abnormality in sera from patients with different malignant diseases. *Br.J.Cancer.* 1975. V.32. P.737-740.
15. Goufman E.I., Moshkovskii S.A., Tikhonova O.V. et al. Two-dimensional electrophoretic proteome study of serum thermostable fraction from patients with various tumor conditions. *Biochemistry (Mosc).* 2006. V.71, N.4. P.354-360.
16. 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. *Gene Ther.Mol.Biol.* 2004. V.8. P.539-546.
17. Alaiya A.A., Franzen B., Hagman A. et al. Classification of human ovarian tumors using multivariate data analysis of polypeptide expression patterns. *Int.J.Cancer.* 2000. V.86. P.731-736.
18. Chen Y., Lim B.-K., Hashim O.H. Different altered stage correlative expression of high abundance acute-phase proteins in sera of patients with epithelial ovarian carcinoma. *J.Hematol.Oncol.* 2009. V.2, N.1. P.37-43.
19. Alol L.H., Al-Mzaïen K.A., Hussein S.M. The promising anticancer efficacy of parsley seeds flavonoid (apigenin) in induced mammary adenocarcinoma (AMN3) mice. *J.Physiol.Biomed.Sci.* 2012. V.25, N.1. P.5-12.
20. Abdullah-Soheimi S.S., Lim B.K., Hashim O.H., Shuib A.S. Patients with ovarian carcinoma excrete different altered levels of urine CD59, kininogen-1 and fragments of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 and albumin. *Proteome Sci.* 2010. V.17. N.8. P. 58.

References

1. Witz I., Hermann G., Pиковski M., Gross J. (1964). The antigenic composition of tumours, sera and urines of tumour-bearing mice and the partial purification of two antigens present in increased amounts. *Br.J.Cancer*, 18 : 397-406.
2. Misek D.E., Kim E.H. (2011). Protein biomarkers for the early detection of breast cancer. *International Journal of Proteomics*, 2011 (8) : 1-9.
3. Keshaviah A., Dellapasqua S., Rotmensz N. et al. (2007). CA15-3 and alkaline phosphatase as predictors for breast cancer recurrence: a combined analysis of seven International Breast Cancer Study Group trials. *Ann. Oncol.*, 18(4) : 701-708.
4. Robinson H.W., Hodgen G.G. (1940). Biuret reaction for proteins. *J.Biol.Chem.*, 135 : 707-717.
5. Maurer H.R. (1971). Disk electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. Berlin - New York: Walter De Gruyter, 228.
6. Kholod V.M. (1983). Belki syvorotki krvi v klinicheskoi i eksperimentalnoi veterinarii. Minsk: Uradzai, 78.
7. Rabinovichdepirosky R., Oisgold S.R. (1964). 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. *Br.J.Cancer.*, 3 : 165-172.
8. Tsompani V, Partalidou A. Serum protein electrophoresis: an immunological blood test in the planning of the homeopathic treatment. Available at: http://www.homeomedi.com/files/article_byTsompani-Partalidou.pdf.
9. Strobel S.L. (2003). Transient paraproteinemia: an intriguing immunological anomaly. *Ann.Clin. Lab.Sc.*, 33(3) : 265-270.



10. Nasim F.U., Ejaz S., Ashraf M. et al. (2012). Potential biomarkers in the sera of breast cancer patients from Bahawalpur, Pakistan. *Biomark. Cancer.*, 4(10) : 19-34.
11. Fedets O.M., Kulai N.Ya., Karkoshkina Yu.O. (2013). Bilkoviy spektr krovi kishok z puhlynamy molochnoi zalozy. *Naukovi visnyk Nationalnoho universytetu bioresyrsiv I pryrodokorystuvannya Ukrainy. Seriya: Vetrynarna medytsyna, yakist i bezpeka produkciyi tvarynnystva*, 188 (4) : 224-229.
12. Nystrom L.M., Buckwalter J.A., Syrbu S., Miller B.J. (2013). Serum protein electrophoresis in the evaluation of lytic bone lesions. *Iowa Orthod.J.*, 33 : 114-118.
13. Lynch W.J., Joske R.A. (1966). The occurrence of abnormal serum proteins in patients with epithelial neoplasms. *J.Clin.Path.*, 19(5) : 461-463.
14. Munzarova N., Kubicek R., Trnka A. (1975). Immunelectrophoretic abnormality in sera from patients with different malignant diseases. *Br.J.Cancer.*, 32 : 737-740.
15. Goufman E.I., Moshkovskii S.A., Tikhonova O.V. et al. (2006). Two-dimensional electrophoretic proteome study of serum thermostable fraction from patients with various tumor conditions. *Biochemistry (Mosc.)*, 71(4) : 354-360.
16. Chahed K., Hamrita B., Mejdoub H. et al. (2004). Two dimensional gel electrophoresis analyses of human plasma proteins. Association of retinol binding protein and transthyretin expression with breast cancer. *Gene Ther.Mol.Biol.*, 8 : 539-546.
17. Alaiya A.A., Franzen B., Hagman A. et al. (2000). Classification of human ovarian tumors using multivariate data analysis of polypeptide expression patterns. *Int.J.Cancer.*, 86 : 731-736.
18. Chen Y., Lim B.-K., Hashim O.H. (2009). Different altered stage correlative expression of high abundance acute-phase proteins in sera of patients with epithelial ovarian carcinoma. *J.Hematol.Oncol.*, 2(1) : 37-43.
19. Alol L.H., Al-Mzaeni K.A., Hussein S.M. (2012). The promising anticancer efficacy of parsley seeds flavonoid (apigenin) in induced mammary adenocarcinoma (AMN3) mice. *J.Physiol.Biomed.Sci.*, 25(1) : 5-12.
20. Abdullah-Soheimi S.S., Lim B.K., Hashim O.H., Shuib A.S. (2010). Patients with ovarian carcinoma excrete different altered levels of urine CD59, kininogen-1 and fragments of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 and albumin. *Proteome Sci.*, 17(8) : 58.

SUMMARY

O. Fedets, I. Kurlyak, O. Zayats. *Electrophoresis of blood proteins of dogs With mammary tumours. Biological Resources and Nature Management. 2018. 10, № 5–6. P. 176–181. <https://doi.org/10.31548/bio2018.05.022>*

In the article data of the fractional composition of blood plasma proteins are presented, which were studied by the method of one-dimensional electrophoresis in a polyacrylamide gel. For the study, dogs with mammary tumours and data were compared with healthy animals.

The level γ -globulins and a decrease in albumins in the blood of dogs with mammary tumours. An increase

in the content of transferrin was found in only one animal and returned to normal after the operation. An increase in the concentration of proteins of the acute phase of inflammation – haptoglobin and ceruloplasmin – was in a dog with multiple tumors with cysts.

Keywords: *dogs, blood proteins, blood plasma, mammary tumors*

АННОТАЦІЯ

О. М. Федець, І. Н. Курляк, О. І. Заяць. *Електрофорез білків крові собак с опухольми молочної залози. Біоресурси і природокористування. 2018. 10, № 5–6. P. 176–181. <https://doi.org/10.31548/bio2018.05.022>*

В статті приводяться данні фракціонного складу білків плазми крові, котрі дослідвали методом одномерного електрофореза в поліакриламідному гелі. Для дослідвання були вибрані собаки с опухольми молочної залози і данні по порівнянню со здоровими животними.

В крові собак с опухольми молочної залози спостерігали ріст рівня γ -глобулінів і зменшення

альбумінів. Підвищення вмісту трансферину було тільки у одного тваринного і прийшло в норму після операції. Збільшення концентрації білків гострої фази запалення – гаптоглобіна і церулоплазміна – було у собаки с множественними опухольми с кістами.

Ключевые слова: *собаки, білки крові, плазма крові, опухоль молочної залози*