

**РЕПЕРТУАР ЦИРКУЛИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ
КАК БИОМАРКЕР РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

© К.Е. Абрамова¹, С.В. Подлесных¹, А.И. Шаповал^{1,2}

¹Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия

*²Центр инноваций в медицине, Институт Биодизайна,
Университет штата Аризона, г. Темпе, США*

Цель – исследовать возможность применения репертуара антител в качестве оптимального и информативного метода диагностики рака на ранней стадии.

Материал и методы. Исследован 81 образец плазмы крови пациентов женского пола, возраст которых составлял от 39 лет до 68. Из них 40 образцов плазмы больных раком молочной железы, и 41 образец здоровых доноров (контроль). Исследование репертуара антител проводилось на микрочипах, содержащих более 330 тысяч пептидов со случайными аминокислотными последовательностями.

Результаты. При анализе циркулирующих антител больных раком молочной железы и здоровых доноров установлено достоверное различие в репертуаре циркулирующих антител ($p < 0,001$). Выявлено 119 пептидов, взаимодействие которых отличается у пациентов и здоровых доноров. Из них 53 пептида показали более высокий уровень взаимодействия с плазмой крови больных раком молочной железы. В тоже время, образцы от больных показали статистически достоверное сниженное взаимодействие с 66 пептидами.

Заключение. Результаты свидетельствуют о том, что репертуар циркулирующих антител может быть потенциальным биомаркером онкологических заболеваний. Выявленные пептиды могут быть использованы при разработке тест-системы для диагностики рака молочной железы.

Ключевые слова: циркулирующие антитела, микрочипы, пептиды, онкологические заболевания, рак молочной железы.

REPERTOIR OF CIRCULATING ANTIBODIES AS A BREAST CANCER BIOMARKER

© K.E. Abramova¹, S.V. Podlesnykh¹, A.I. Chapoval^{1,2}

¹ Altai State University, Barnaul, Russia

*²Center for Innovation in Medicine, Institute of Biodesign,
Arizona State University, Tempe, USA*

Aim – to investigate a possibility of using antibodies repertoire as optimal and informative method for early cancer diagnosis.

Material and methods. 81 samples of blood plasma of female donors were studied, patients age ranged from 39 years to 68. 40 plasma samples were from patients with breast cancer, and 41 samples were from healthy donors (control). The antibody repertoire was analyzed using microarrays containing more than 330 thousand peptides with random amino acid sequences.

Results. The analysis of circulating antibodies showed a significant difference in antibody repertoire in patients with breast cancer and healthy donors ($p < 0.001$). It was found that the interaction with 119 peptides is different in patients and healthy donors samples. 53 peptides showed a higher level of interaction with plasma of patients with breast cancer. At the same time, patient samples showed a statistically significant reduced interaction with 66 peptides.

Conclusion. The results suggest that the repertoire of circulating antibodies may be a potential biomarker of cancer. Identified peptides can be used in the development of a tests for the diagnostic of breast cancer.

Key words: *circulating antibodies, microchips, peptides, oncological diseases, breast cancer.*

Онкологические заболевания – одно из наиболее распространённых видов заболеваний, которое является второй причиной смертности в мире по данным статистики ВОЗ. Вновь диагностированные случаи рака увеличились с 14,1 млн в 2012 году до 18,1 млн в 2018 году, а смертность от рака – с 8,2 млн в 2012 году до 9,6 млн в 2018 году (ASCO/GLOBOCAN, 2018). Наиболее часто выявляемые онкологические заболевания это – рак легких, молочной железы, предстательной железы и колоректальный рак. В России по данным 2018 г. контингент больных со злокачественными новообразованиями составил 3762218. Рак молочной железы (РМЖ) занимает одно из лидирующих положений, в структуре онкологических заболеваний женского пола [1].

Раннее обнаружение рака является важнейшим фактором для успешного лечения пациентов. Сегодня существует множество диагностических технологий обнаружения злокачественных новообразований, но все они имеют некоторые недостатки, касающиеся чувствительности и специфичности, ограничения в определении ранних стадий заболевания и себестоимости. Наша цель исследовать возможность применения репертуара антител в качестве простого и информативного метода диагностики рака на ранней стадии.

По данным современных исследований, особое значение в противоопухолевой защите имеет иммунный ответ [3, 4, 6]. Антитела, которые производит иммунная система против опухолевых антигенов, могут служить индикатором онкологических заболеваний [5]. Наблюдение

и оценка репертуара циркулирующих антител, может быть перспективным методом для раннего обнаружения опухоли.

Материал и методы

В данной работе, для исследования репертуара циркулирующих антител, использовали микрочипы, содержащие 330034 пептидов со случайными аминокислотными последовательностями. Этот метод применяется для изучения «иммуносигнатуры» (репертуар антител) заболеваний, которая количественно отражает динамику профиля циркулирующих антител [3, 7, 8]. Пептиды синтезированы на подложке микрочипа методом фотолитографии. Аминокислотная последовательность и месторасположение каждого пептида на микроматрице известно. Каждая микроматрица имеет площадь 0,5 см², размер точки каждого пептида около 8 мкм в диаметре, расстояние между соседними пептидами приблизительно 1 нм [6]. Объектом исследования служили образцы плазмы крови пациентов с диагнозом рак молочной железы и здоровых доноров (контроль), полученные в Алтайском краевом онкологическом диспансере (г. Барнаул). Всего исследован 81 образец плазмы крови пациентов женского пола, возраст которых составлял от 39 лет до 68. Из них 40 образцов плазмы больных раком молочной железы, контролем служили 41 образец здоровых доноров. Исследование было одобрено этическим комитетом Алтайского краевого онкологического диспансера.

Пробирки с образцами крови центрифугировали для получения образцов плазмы крови и были заморожены для хранения и дальнейшего использования. С помощью микрочипов проводили оценку, взаимодействия сывороточных антител с различными пептидами.

Для экспериментальной работы микрочипы помещали в гибридизационную кассету («Arrait Corporation») с силиконовыми прокладками, разделяющие 24 микроматрицы [2]. В каждую лунку кассеты, соответствующей одной микроматрице, добавляли

инкубационный раствор, содержащий ФСБТ (фосфатно-солевой буфер / 0,25% Твин20) и 3% бычьего сывороточного альбумина (БСА, «Amresco») и инкубировали 2 ч. Далее содержимое лунок кассеты удаляли, и вносили 75 мкл инкубационного раствора. Образцы исследуемой плазмы крови разводили (1:500) в инкубационном растворе, добавляли в лунки гибридизационной кассеты в объёме 75 мкл и инкубировали 2 ч. После инкубации микрочипы промывали свежим раствором ФСБТ. Далее микрочипы инкубировали с «вторичными» антителами против IgG человека с Alexa Flour 647 («Life Technologies») 75 пг/мл, приготовленными в инкубационном растворе. Микрочипы промывали полосканием в трёх свежих растворах ФСБТ, дистиллированной воде и высушивали в центрифуге. Высушенные микрочипы сканировали с использованием двухлазерного сканера «InnoScan 900 AL» («Innopsys») при длине волн 632 и 535 нм [2].

На отсканированный массив пептидов с помощью программного обеспечения Marix v.7.3.1 накладывается GAL-файл (сетка), который является стандартным файлом ATF. GAL-файл содержит аминокислотную последовательность каждого пептида, информацию о положении каждого пептида на микрочипе и диаметр окружности, используемой для получения цифрового значения интенсивности флюоресценцию. Статистический анализ проводили с помощью пакета программ Matlab, EXCEL и BRB Array Tools.

Результаты и обсуждение

Основываясь на результатах статистического анализа осуществлялся отбор пептидов, взаимодействие которых статистически достоверно ($p < 0,001$) отличается у больных и здоровых. Таким образом, было отобрано 119 пептидов, которые показали статистически значимое отличие во взаимодействии с образцами плазмы крови РМЖ пациентов и здоровых доноров. Взаимодействие плазмы крови РМЖ пациентов с 53 пептидами показало более высокие значения интенсивности флюоресценции (рис. 1),

что говорит о наличие циркулирующих антител против этих пептидов/антигенов. В тоже время, взаимодействие плазмы крови РМЖ пациентов с 66 пептидами было снижено (данные не представлены), что может говорить о сниженном иммунном ответе против данных мимотопов.

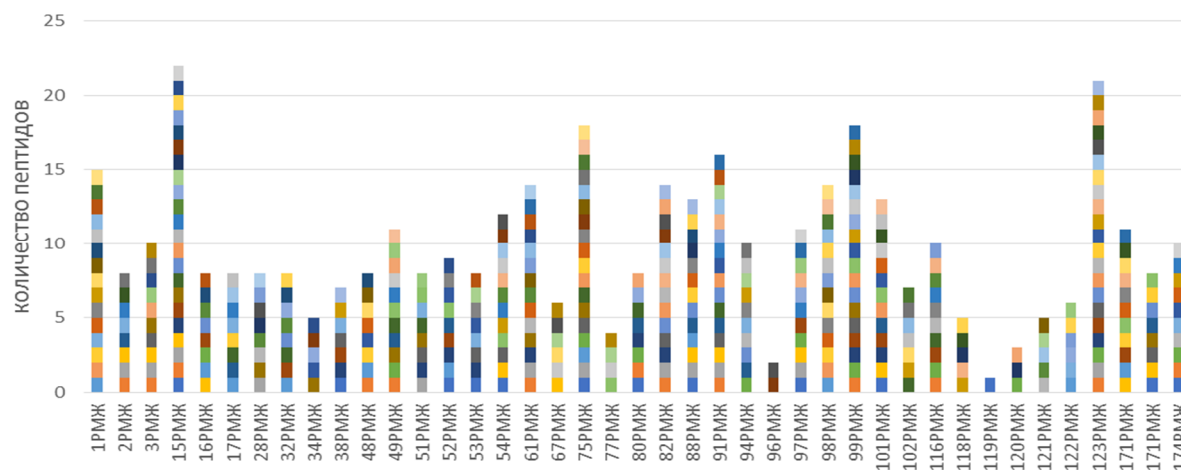


Рис. 1. Взаимодействие сывороток больных РМЖ с 53 пептидами на микрочипе. Количество пептидов, показавших статистически значимое взаимодействие с сыворотками больных с диагнозом рак молочной железы. Каждое положительное взаимодействие пептидов с плазмой больных РМЖ взято за единицу (1 пептид=1 цвет/сегмент).

Для дальнейшего анализа были выбраны 6 пептидов, которые показали более высокие уровни флуоресценции при взаимодействии с образцами плазмы крови РМЖ пациентов. Данные представленные на рис. 2 показывают количество образцов плазмы крови здоровых (рис. 2А) и РМЖ пациентов (рис. 2Б) взаимодействующих 6-ю пептидами (рис. 2). Из представленных данных следует, что пептид р333 взаимодействует с 11 сыворотками больных, и с 2 сыворотками – здоровых доноров, пептид р336 – с 9 сыворотками больных и 1 сывороткой здоровых.

Таким образом, при анализе циркулирующих антител больных РМЖ и здоровых доноров с помощью пептидных микрочипов с использованием Т-теста ($p < 0,001$) было выявлено 119 пептидов, взаимодействие которых отличается у больных и здоровых.

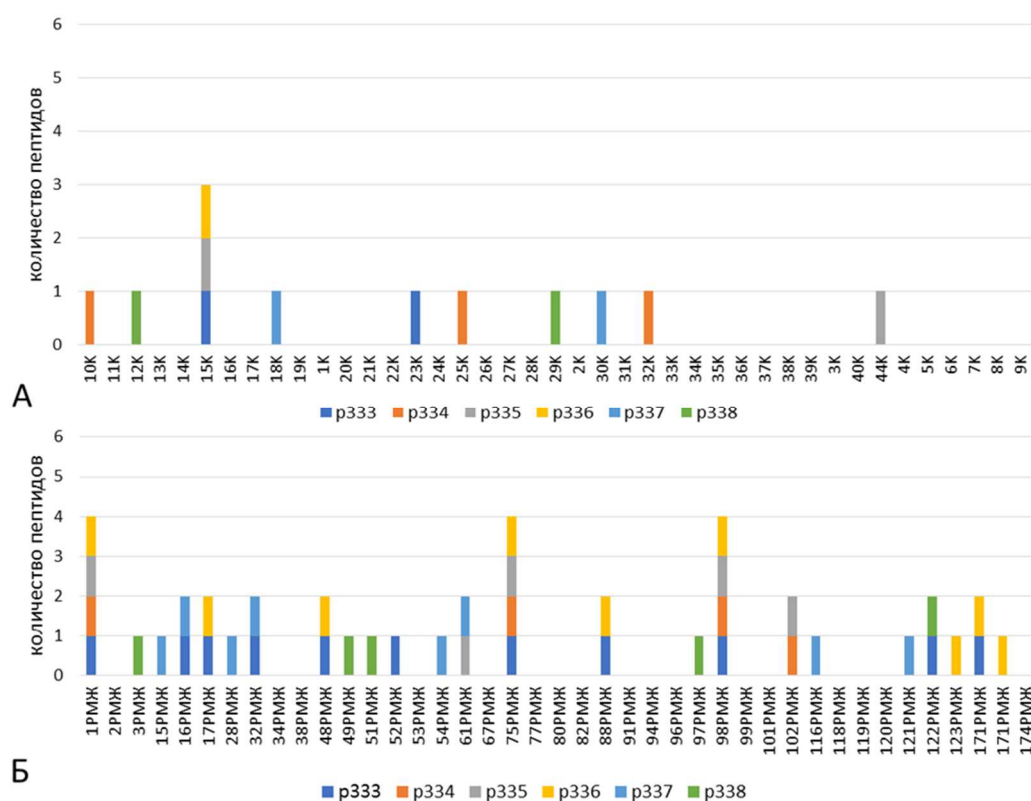


Рис. 2. Взаимодействие сывороток здоровых (А) и больных (Б) РМЖ с пептидами на микрочипе. Количество пептидов, показавших статистически значимое взаимодействие с сыворотками больных с диагнозом рак молочной железы. Каждое положительное взаимодействие пептидов с сывороткой больных РМЖ взято за единицу (1 пептид=1 цвет/сегмент).

Из 119 пептидов 53 пептида показали более высокий уровень взаимодействия с плазмой крови РМЖ. В тоже время, образцы плазмы крови больных РМЖ показали статистически достоверное сниженное взаимодействие с 66 пептидами.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что репертуар циркулирующих антител может быть потенциальным биомаркером онкологических заболеваний, в частности рака молочной железы. Выявленные пептиды могут быть использованы при разработке тест-системы для диагностики рака молочной железы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 17-54-33003).

ЛИТЕРАТУРА

1. Каприн А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова - М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России – 2019. – С. 236.
2. The highly specific and sensitive analysis of repertoire of serum antibodies using peptide microchips in patients with diagnosis of breast cancer / S.V. Podlesnykh et al. // *Klinicheskaiia laboratornaia diagnostika* – 2017. – Vol. 62. – №. 9. – P. 557-563. (In Russ).
3. Immunosignature–peptide microarray for diagnostic of cancer and other diseases / A.I. Chapoval et al. // *Russ. Oncol. J.* – 2014. – Vol. 19. – № 4. – P. 6-11. (In Russ).
4. Immunosignature screening for multiple cancer subtypes based on expression rule / L. Chen et al. // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* – 2019. – Vol. 7. – P. 370.
5. Development of autoantibody signatures for common cancers / M. Kobayashi et al. // *Seminars in Immunology* – Academic Press, - 2020. – P. 101388.
6. Scalable high-density peptide arrays for comprehensive health monitoring / J.B. Legutki et al. // *Nature communications* – 2014. – Vol. 5. – № 1. – P. 1-7.
7. Immunosignature system for diagnosis of cancer / P. Stafford et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences,* - 2014. – Vol. 111. – № 30. – P. 3072-3080.
8. Sykes K.F. Immunosignaturing: a critical review / K.F. Sykes, J.B. Legutki, P. Stafford // *Trends in biotechnology* – 2013. – Vol. 31. – № 1. – P. 45-51.

REFERENCES

1. Kaprin A.D. Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2018 godu / A.D. Kaprin, V.V. Starinskij, G.V. Petrova - M.: FGBU «MNIIOI im. P.A. Gercena» filial FGBU «NMIC radiologii» Minzdrava Rossii – 2019. – P. 236. (In Russ).
2. The highly specific and sensitive analysis of repertoire of serum antibodies using peptide microchips in patients with diagnosis of breast cancer / S.V. Podlesnykh et al. // Klinicheskaja laboratornaia diagnostika. – 2017. – Vol. 62. – №. 9. – P. 557-563. (In Russ).
3. Immunosignature–peptide microarray for diagnostic of cancer and other diseases / A.I. Chapoval et al. // Russ. Oncol. J. – 2014. – Vol. 19. – № 4. – P. 6-11. (In Russ).
4. Immunosignature screening for multiple cancer subtypes based on expression rule / L. Chen et al. // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2019. – Vol. 7. – P. 370.
5. Development of autoantibody signatures for common cancers / M. Kobayashi et al. // Seminars in Immunology – Academic Press, - 2020. – P. 101388.
6. Scalable high-density peptide arrays for comprehensive health monitoring / J.B. Legutki et al. // Nature communications – 2014. – Vol. 5. – №1. – P. 1-7.
7. Immunosignature system for diagnosis of cancer / P. Stafford et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences, - 2014. – Vol. 111. – № 30. – P. 3072-3080.
8. Sykes K.F. Immunosignaturing: a critical review / K.F. Sykes, J.B. Legutki, P. Stafford // Trends in biotechnology – 2013. – Vol. 31. – № 1. – P. 45-51.