

© БЕЛЬСКАЯ Л.В., САРФ Е.А., 2018

УДК 618.19-006.04-07:616.316-008.834.262.23-074

Бельская Л. В.^{1,2}, Сарф Е.А.²

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В СЛЮНЕ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

¹Омский государственный педагогический университет, 644043, Омск;

²ООО «ХимСервис», 143026, Москва

Разработана методика количественного определения низкомолекулярных органических кислот в слюне методом капиллярного электрофореза. Методика апробирована на добровольцах, разделённых на 3 группы: основная (рак молочной железы, n = 21), группа сравнения (фиброаденомы, n = 29) и контрольная (условно здоровые, n = 26). Показано, что концентрация молочной, уксусной и пропионовой кислот равномерно повышается в группе сравнения и в основной группе по сравнению с таковой в контрольной группе. На фоне рака молочной железы концентрация щавелевой и муравьиной кислот снижается по сравнению с таковой в контроле, тогда как при фиброаденомах концентрация щавелевой кислоты снижается, а муравьиной повышается. В целом предложенный метод может быть ценным инструментом при изучении метаболических изменений, связанных с онкологическими заболеваниями.

Ключевые слова: слюна; капиллярный электрофорез; органические кислоты; рак молочной железы.

Для цитирования: Бельская Л.В., Сарф Е.А. Определение содержания органических кислот в слюне больных раком молочной железы методом капиллярного электрофореза. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (7): 419-422. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-419-422>

Bel'skaya L.V.^{1,2}, Sarf E.A.²

DETERMINATION OF THE CONTENT OF ORGANIC ACIDS IN THE SALIVA OF PATIENTS WITH BREAST CANCER BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

¹Omsk State Pedagogical University, Omsk, 644043, Russian Federation;

²LLC "ChemService", Moscow, 143026, Russian Federation

A technique for quantitative determination of low molecular weight organic acids in saliva by the method of capillary electrophoresis has been developed. The method was tested on volunteers, divided into 3 groups: the main one (breast cancer, n=21), the comparison group (fibroadenomas, n=29) and the control group (conditionally healthy, n=26). It is shown that the concentration of lactic, acetic and propionic acids increases uniformly when passing from the control group to the comparison group, and then to the main group. Against the background of breast cancer, the concentration of oxalic and formic acids decreases in comparison with the control, whereas in fibroadenomas the concentration of oxalic acid decreases, and the formic acid grows. In general, the proposed method can be a valuable tool in the study of metabolic changes associated with cancer.

Key words: saliva; capillary electrophoresis; organic acids; breast cancer.

For citation: Bel'skaya L.V., Sarf E.A. Determination of the content of organic acids in the saliva of patients with breast cancer by capillary electrophoresis. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (7): 419-422 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-419-422>

For correspondence: Bel'skaya L.V., PhD in Chemistry, Associate Professor; e-mail: ludab2005@mail.ru

Information about authors:

Bel'skaya L.V., <http://orcid.org/0000-0002-6147-4854>

Sarf E.A., <http://orcid.org/0000-0003-4918-6937>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 09.01. 2018

Accepted 14.03.2018

На сегодняшний день капиллярный электрофорез является перспективным методом анализа, он динамично развивается и всё чаще применяется в различных областях аналитической химии [1–3]. Простота и доступность этого метода, а также неоспоримые преимущества, которые он даёт при выполнении измерений, позволяют использовать его в повседневной лабораторной практике.

В качестве перспективной биологической жидкости, отражающей общее состояние организма, в последнее

время используют слюну [4–8]. Преимущества слюны по сравнению с венозной или капиллярной кровью обуславливаются неинвазивностью сбора и отсутствием риска инфицирования при получении биоматериала [9–11]. При этом слюна адекватно отражает биохимический статус и физиологическое состояние человека [12–14]. Ряд исследований посвящён применению слюны для диагностики онкологических заболеваний, в частности рака молочной железы [15–21]. Однако, несмотря на важную роль органических кислот в метаболизме раковых клеток, определение органических кислот при раке молочной железы не проводилось [22]. Тем не менее возможность их определения в слюне показана в ряде

Для корреспонденции: Бельская Людмила Владимировна, канд. хим. наук; e-mail: ludab2005@mail.ru

Таблица 1

Уравнения градуировочных графиков для определяемых компонентов

Компонент	Уравнение градуировочного графика	Коэффициент корреляции (R^2)
Хлориды	$y=0,4985x$	1,0000
Щавелевая кислота	$y=0,8283x$	0,9980
Муравьиная кислота	$y=0,5914x$	0,9973
Яблочная кислота	$y=1,0229x$	0,9977
Лимонная кислота	$y=1,2009x$	0,9971
Янтарная кислота	$y=0,9089x$	0,9965
Молочная кислота	$y=0,5330x$	0,9974
Фосфаты	$y=0,2934x$	0,9992
Уксусная кислота	$y=1,3578x$	0,9953
Пропионовая кислота	$y=0,5494x$	0,9967

Примечание. y – площадь пика, x – концентрация компонента, мг/л.

работ [23, 24], но применение для этих целей капиллярного электрофореза в литературе также не обсуждается.

Цель данного исследования – разработка методики количественного определения органических кислот в слюне методом капиллярного электрофореза для оценки потенциальной возможности их применения в диагностике рака молочной железы.

Материал и методы. В исследовании случай – контроль приняли участие добровольцы, которые были разделены на 3 группы: основную (рак молочной железы, $n = 21$), группу сравнения (фиброаденомы, $n = 29$) и контрольную (условно здоровые, $n = 26$). Включение в группы происходило параллельно. В качестве критериев включения рассматривались: возраст пациентов 30–60 лет, отсутствие какого-либо лечения на момент проведения исследования, в том числе хирургического, химиотерапевтического или лучевого, отсутствие признаков активной инфекции (включая гнойные процессы), проведение санации полости рта. Критерии исключения: отсутствие гистологической верификации диагноза. Исследования одобрены на заседании комитета по этике БУЗ Омской области «Клинический онкологический диспансер» от 21 июля 2016 г., протокол № 15.

У всех участников до начала лечения проводили забор слюны в количестве 1 мл. Образцы слюны собирали утром натощак путём сплевывания в стерильные пробирки, центрифугировали при 7000 об/мин. Эксперимент проводили с использованием системы капиллярного электрофореза КАПЕЛЬ-105М («Люмэкс», Санкт-Петербург). Метод измерений основан на фильтрации, разбавлении и отобранной пробы, дальнейшем разделении и количественном определении компонентов с косвенным детектированием при длине волны 254 нм [25]. Объём аликвоты исследуемого образца 100 мкл, предварительно проведено осаждение белков слюны 10% раствором трихлоруксусной кислоты, разбавление в 20 раз бидистиллированной водой. Ведущий электролит – 10 мМ бензойная кислота, 9 мМ диэтаноламин,

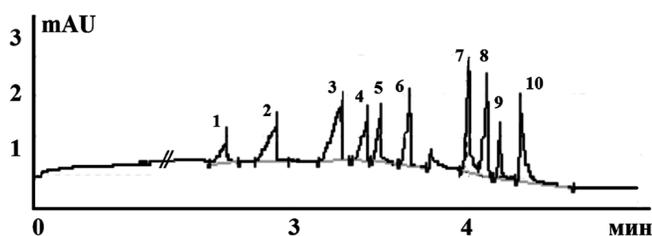


Рис.1. Электрофореграмма градуировочной смеси.

1 – хлориды 12,0 мг/л; 2 – щавелевая кислота 24,4 мг/л; 3 – муравьиная кислота 31,6 мг/л; 4 – яблочная кислота 24,6 мг/л; 5 – лимонная кислота 23,7 мг/л; 6 – янтарная кислота 25,0 мг/л; 7 – молочная кислота 24,9 мг/л; 8 – фосфаты 11,5 мг/л; 9 – уксусная кислота 24,0 мг/л; 10 – пропионовая кислота 23,7 мг/л.

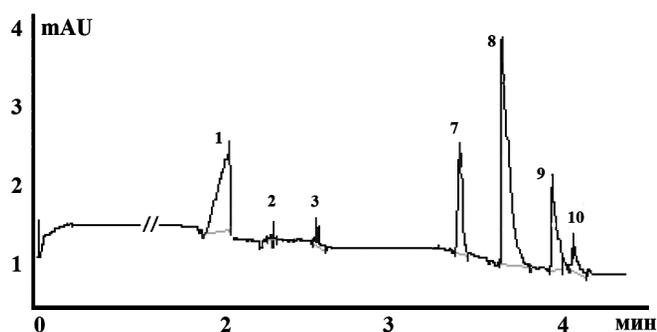


Рис.2. Электрофореграмма образца слюны.

0,5 мМ цетилтриметиламмония бромид, 0,1 мМЭДТА («Флука», Швейцария). Для проведения исследований использован кварцевый капилляр $L_{эф}/L_{общ} = 50/60$ см, внутренний диаметр 75 мкм. Ввод пробы в капилляр пневматический (30 мбар, 10 с), постоянное напряжение 20 кВ, температура 20°C, время анализа 4–5 мин.

Статистический анализ полученных данных выполнен при помощи программ Statistica 10.0 (StatSoft) непараметрическим методом с использованием в зависимых группах – U-критерия Манна–Уитни. Для описания выборки проводили подсчёт медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей [LQ; UQ]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Количественное опреде-

Таблица 2

Концентрация (в ммоль/л) определяемых параметров в слюне

Параметр	Контрольная группа	Группа сравнения	Основная группа
Хлориды	8,49 [6,94; 9,54]	10,74 [9,28; 14,11]	12,21 [8,55; 14,85]
Щавелевая кислота	0,477 [0,275; 0,552]	0,383 [0,315; 0,552]	0,398 [0,270; 0,821]
Муравьиная кислота	0,561 [0,248; 0,772]	0,613 [0,441; 1,146]	0,383 [0,303; 0,626]
Молочная кислота	0,95 [0,81; 1,05]	2,03 [1,19; 3,12]	3,16 [2,00; 3,85]
p	-	0,0225	0,0089
Фосфаты	1,31 [1,11; 1,50]	2,41 [0,92; 3,12]	4,06 [1,17; 8,10]
p	-	0,0310	0,0253
Уксусная кислота	10,20 [8,89; 13,51]	14,16 [10,11; 19,70]	16,05 [14,61; 18,82]
Пропионовая кислота	0,89 [0,64; 1,14]	1,80 [1,07; 2,19]	2,30 [1,54; 2,97]

Примечание. p – статистически значимые различия показателей по сравнению с таковыми в контрольной группе.

ление органических кислот проводили по предварительно построенному градуировочному графику, используя линейную зависимость между концентрацией аналитов и площадью хроматографического пика (рис. 1).

Поскольку в слюне в достаточно высоких концентрациях присутствуют хлорид- и фосфат-ионы, которые в условиях определения также фиксируются на электрофореграммах [26], данные компоненты были введены в градуировочные смеси. Уравнения градуировочных графиков для каждого компонента найдены методом линейного регрессионного анализа (табл. 1). Правильность и воспроизводимость результатов определения органических кислот подтверждены методом «введено-найден».

Типичная электрофореграмма слюны приведена на рис. 2. Показано, что в составе слюны не определяются яблочная, лимонная и янтарная кислоты.

Результаты определения остальных компонентов в изучаемых группах пациентов показаны в табл. 2. Видно, что концентрация хлорид- и фосфат-ионов, молочной, уксусной и пропионовой кислот равномерно повышается в группе сравнения и в основной группе по сравнению таковой в контрольной группе. При этом увеличение концентрации фосфат-ионов и молочной кислоты статистически достоверно. На фоне рака молочной железы концентрация щавелевой и муравьиной кислот снижается по сравнению с контролем, тогда как при фиброаденомах концентрация щавелевой кислоты снижается, а муравьиной повышается.

Известно, что накопление органических кислот может являться результатом более высокого метаболизма раковых клеток [27, 28]. Ранее показано, что концентрации в сыворотке крови свободных жирных кислот у больных раком молочной железы были значительно снижены по сравнению с показателями в контрольной группе [29]. Панель C16:1, C18:3, C18:2, C20:4 и C22:6 показала отличную диагностическую способность дифференцировать пациентов с ранней стадией рака молочной железы с чувствительностью 83,3% и специфичностью 87,1%. По сравнению с другими классами метаболитов определение органических кислот с низкой молекулярной массой при онкологических заболеваниях является недостаточно изученным, и до сих пор не было адекватной аналитической процедуры для определения уровня органических кислот, потенциально связанных с развитием рака, как в сыворотке крови, так и в других биологических жидкостях. Циркулирующие в крови органические кислоты с низкой молекулярной массой обеспечивают кумулятивную картину метаболизма [30]. Так, установлено, что среди низкомолекулярных органических кислот пироглутаминовая кислота имеет лучший дискриминационный потенциал для немелкоклеточного рака лёгкого и позволяет точно идентифицировать пациентов и контрольных субъектов независимо от стадии рака [30].

Дальнейшие измерения содержания органических кислот в биологических жидкостях, в частности в слюне, могут позволить лучше понять основные механизмы канцерогенеза и разработать новые способы диагностики онкологических заболеваний. Предложенный метод может быть ценным инструментом при изучении метаболических изменений, связанных с онкологическими заболеваниями.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп.1-3, 6-24, 27-30
см. REFERENCES)

4. Носков В.Б. Слюна в клинической лабораторной диагностике. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 6: 14–7.
5. Каминская Л.А. Перспективы изучения биохимических показателей ротовой жидкости в лабораторной диагностике. *Российская стоматология*. 2010; 3: 36–42.
25. Комарова Н. В., Каменцев Я. С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ». СПб.: ООО «Веда»; 2006.
26. Бельская Л.В. Применение капиллярного электрофореза для определения минерального состава слюны человека. *Бюллетень науки и практики. Электронный журнал*. 2017; 2(15): 132–40.

REFERENCES

1. Vitali L., Favere V.T., Micke G.A. A new method to determine biological sample volume by short and multiple injection capillary electrophoresis: Application in determination of nitrate and thiocyanate in human saliva. *Journal of Chromatography A*. 2011; 1218: 2327–33.
2. Mori M., Ishikawara F., Tomoda T., Yamada S., Okamoto M., Itabashi H., Seki Y., Matsumoto R., Shoho Y., Martha L., Sumino H., Murakami M. Use of capillary electrophoresis with dual-opposite end injection for simultaneous analysis of small ions in saliva samples from wrestlers undergoing a weight training program. *Journal of Chromatography B*. 2016; 1012: 178–85.
3. Guo L., Wang Y., Zheng Y., Huang Z., Cheng Y., Ye J., Chu Q., Huang D. Study on the potential application of salivary inorganic anions in clinical diagnosis by capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detection. *Journal of Chromatography B*. 2016; 1014: 70–4.
4. Носков В.Б. Слюна в клинической лабораторной диагностике. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 6: 14–7. (in Russian)
5. Kaminskaya L.A. Prospects for studying the biochemical parameters of oral fluid in laboratory diagnostics. *Rossiyskaya stomatologiya*. 2010; 3: 36–42. (in Russian)
6. Chiappin S., Antonelli G., Gatti R., DePalo E.F. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*. 2007; 383: 30–40.
7. Martí-Álamo S., Mancheño-Franch A., Marzal-Gamarrá C., Carlos-Fabuel L. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. *J Clin Exp Dent*. 2012; 4(4): 237–43.
8. Chojnowska S., Baran T., Wilińska I., Sienicka P., Cabaj-Wiater I., Knaś M. Human saliva as a diagnostic material. *Advances in Medical Sciences*. 2018; 63: 185–91.
9. Malathi N., Mythili S., Vasanthi H.R. Salivary Diagnostics: A Brief Review. *ISRN Dentistry*. 2014; 2014: 158786.
10. Miller C.S., Foley J.D., Bailey A.L., Campell C.L., Humphries R.L., Christodoulides N., Floriano P.N. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark. Med*. 2010; 4(1): 171–89.
11. Nunes L.A., Mussavira S., Bindhu O.S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015; 25(2): 177–92.
12. Arunkumar S., Arunkumar J.S., Krishna N.B., Shakunthala G.K. Developments in diagnostic applications of saliva in oral and systemic diseases - A comprehensive review. *Journal of Scientific and Innovative Research*. 2014; 3(3): 372–87.
13. Liu J., Duan Y. Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncology*. 2012; 48: 569–77.
14. Shipper R.G., Silletti E., Vingerhoeds M.H. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of oral biology*. 2007; 52: 1114–35.
15. Mockus M., Prebil L.A., Eremab R., Dollbaum C., Powell M., Yaud C., Benz C.C. First pregnancy characteristics, postmenopausal breast density, and salivary sex hormone levels

- in a population at high risk for breast cancer. *BBA Clinical*. 2015; 3:189–95.
16. Porto-Mascarenhas E.C., Assad D.X., Chardin H., Gozal D., De Luca Canto G., Acevedo A.C., Guerra E.N.S. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: a review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017; 110: 62–73.
 17. Zhong L., Cheng F., Lu X., Duan Y., Wang X. Untargeted saliva metabolomics study of breast cancer based on ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with HILIC and RPLC separations. *Talanta*. 2016; 158: 351–60.
 18. Takayama T., Tsutsui H., Shimizu I., Toyama T., Yoshimoto N., Endo Y., Inoue K., Todoroki K., Min J.Z., Mizuno H., Toyooka T. Diagnostic approach to breast cancer patients based on target metabolomics in saliva by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2016; 452: 18–26.
 19. Cheng F., Wang Z., Huang Y., Duan Y., Wang X. Investigation of salivary free amino acid profile for early diagnosis of breast cancer with ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2015; 447: 23–31.
 20. Jinno H., Murata T., Sunamura M., Sugimoto M., Kitagawa Y. Breast cancer-specific signatures in saliva metabolites for early diagnosis. *The Breast*. 2015; 24S1: S26–S86.
 21. Schapher M., Wendler O., Gröschl M. Salivary cytokines in cell proliferation and cancer. *Clinica Chimica Acta*. 2011; 412: 1740–8.
 22. Lubes G., Goodarzi M. GC-MS based metabolomics used for the identification of cancer volatile organic compounds biomarkers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018; 147: 312–22.
 23. Park Y-D., Jang J-H., Oh Y-J., Kwon H-J. Analyses of organic acids, inorganic anions, and their relationship in human saliva before and after glucose intake. *Archives of oral biology*. 2014; 59: 1–11.
 24. Chen Z., Feng S., Pow E.H.N., Lam O.L.T., Mai S., Wang H. Organic anion composition of human whole saliva as determined by ion chromatography. *Clinica Chimica Acta*. 2015; 438: 231–5.
 25. Komarova N.V., Kamentsev Ya.S. Practical guidance on the use of capillary electrophoresis systems “Kapel” [Prakticheskoe rukovodstvo po ispol'zovaniyu sistem kapillyarnogo elektroforeza “Kapel”]. St.Peterburg: OOO «Veda»; 2006. (in Russian)
 26. Bel'skaya L.V. The use of capillary electrophoresis to determine the mineral composition of human saliva. *Byulleten' nauki i praktiki. Elektronnyi zhurnal*. 2017; 2(15): 132–40. (in Russian)
 27. Comerford S.A., Huang Z., Du X., Wang Y., Cai L., Witkiewicz A.K., Walters H., Tantawy M.N., Fu A., Manning H.C., Horton J.D., Hammer R.E., McKnight S.L., Tu B.P. Acetate Dependence of Tumors. *Cell*. 2014; 159: 1591–602.
 28. Tekade R.K., Sun X. The Warburg effect and glucose-derived cancer theranostics. *Drug Discovery Today*. 2017; 22(11): 1637–53.
 29. Zhang Y., Song L., Liu N., He C., Li Z. Decreased serum levels of free fatty acids are associated with breast cancer. *Clinica Chimica Acta*. 2014; 437: 31–7.
 30. Klupczynska A., Plewa S., Dyszkiewicz W., Kasprzyk M., Sytek N., Kokot Z.J. Determination of low-molecular-weight organic acids in non-small cell lung cancer with a new liquid chromatography–tandem mass-spectrometry method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016; 129: 299–309.

Поступила 09.01.18

Принята к печати 14.03.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.276.2/4.015.4

Яковлев А.К.¹, Алешкин А.В.², Меркулов В.А.¹, Бондарев В.П.¹

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭРИТРОПОЭТИНА

¹ФГБУ НЦЭСМП «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава РФ, 127051, Москва, Россия;

²ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия

Отсутствие в РФ единых регламентирующих требований к оценке качества препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека и необходимость гармонизации отечественных требований с международными обуславливает актуальность стандартизации методики определения специфической активности. Исследования прецизионности проводили в шести экспериментах на мышах линии Balb/c. В ходе экспериментов варьировали факторы, которые могут оказывать влияние на точность методики. Каждый эксперимент включал три уровня: 20, 40 и 80 МЕ/мл, по восемь повторов стандартного и испытуемого образца. Правильность оценивали по смещению относительно опорного значения на пяти уровнях: 10, 20, 40, 80 и 160 МЕ/мл, в каждом – по четыре повтора стандартного и испытуемого образца. Испытуемые образцы получали путём серии независимых разведений стандартного образца. Подсчёт ретикулоцитов проводили на проточном цитофлуориметре. В качестве красителя использовали 5 мкМ раствор акридинового оранжевого. На основании экспериментального исследования точности и оптимизации методики определения специфической активности эритропоэтина получены две её валидационные характеристики (правильность и прецизионность). Доказана обоснованность использования логарифмов зарегистрированных величин эритропоэза при статистических расчётах специфической активности эритропоэтина и исследовании валидационных параметров методики. Теоретически и экспериментально обоснованная схема методики включает три уровня доз: 20, 40 и 80 МЕ/мл по 8 животных на каждом и соответствует международным требованиям точности. По результатам экспериментальных исследований правильность характеризуется смещением не более 9% и не превышает диапазон рассчитанной активности (80–125%). Статистическая обработка результатов испытания методом параллельных линий, позволяет про-вернуть предположение об эквивалентности испытуемого образца стандартному препарату и рассчитать его активность. Доверительный интервал рассчитанной активности при величине внутрилабораторной прецизионности 5,6% составляет от 76 до 131%, что соответствует предложенному диапазону (64–156%, при P = 0,95).

Для корреспонденции: Яковлев Алексей Константинович, вед. микробиолог лаб. иммунологии ; e-mail: yak.Aleksey@gmail.com