

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Валембахов И.С.¹, Слынько Н.М.², Васильева А.Р.², Конончук В.В.^{1,3,4}, Калинина Т.С.¹,
Гуляева Л.Ф.¹, Кушлинский Н.Е.⁵

АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЛЮМИНАЛЬНЫХ ПОДТИПАХ А И В РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ПОМОЩЬЮ ДВУХМЕРНОЙ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ, ОБЪЕДИНЕННОЙ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ

¹ФГБНУ «Федеральный исследовательский Центр фундаментальной и трансляционной медицины», 630117, Новосибирск, Россия;

²ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения РАН, 630090, Новосибирск, Россия;

³ФГБУ НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава РФ, 630055, Новосибирск, Россия;

⁴НИИКЭЛ – филиал ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, 630017, Новосибирск, Россия;

⁵ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115522, Москва, Россия

Метаболическое перепрограммирование является отличительной чертой многих видов рака, включая рак молочной железы (РМЖ), поэтому выявление онкометаболитов позволяет понять не только метаболические пути трансформированных клеток, но и найти новые терапевтические мишени. Так как злокачественным клеткам необходимо большое количество липидов для биогенеза мембран, выработки энергии и модификации белков, для анализа метаболитов нами были выбраны жирные кислоты. С помощью метода двухмерной газовой хроматографии, объединенной с масс-спектрометрией, нами выявлены повышенные концентрации олеиновой и стеариновой кислот в тканях РМЖ люминального подтипа А, а для люминального подтипа В – пальмитиновой и пентадекановой кислот. Определение данных соединений имеет хорошую воспроизводимость, а их концентрация в опухолях значительно (в 5-15 раз) выше по сравнению с непораженной опухолью тканью молочной железы. Полагаем, что в перспективе жирные кислоты можно рассматривать как потенциальные маркеры гормонзависимого РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы; метаболомный анализ; жирные кислоты; газовая хроматография; масс-спектрометрия.

Для цитирования: Валембахов И.С., Слынько Н.М., Васильева А.Р., Конончук В.В., Калинина Т.С., Гуляева Л.Ф., Кушлинский Н.Е. Анализ содержания жирных кислот в люминальных подтипах А и В рака молочной железы с помощью двухмерной газовой хроматографии, объединенной с масс-спектрометрией. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (11): 662-665. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-11-662-665>

Для корреспонденции: Валембахов Илья Сергеевич, аспирант ФИЦ ФТМ; e-mail: valembakhov@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках бюджетного проекта № 122032200240-8 «Изучение молекулярных механизмов канцерогенеза, поиск новых диагностических маркеров и терапевтических мишеней».

Поступила 01.11.2023

Принята к печати 07.11.2023

Опубликовано 21.11.2023

Valembakhov I.S.¹, Slynko N.M.², Vasilyeva A.R.², Kononchuk V.V.^{1,3,4}, Kalinina T.S.¹, Gulyaeva L.F.¹, Kushlinskii N.E.⁵

ANALYSIS OF THE CONTENT OF FATTY ACIDS IN LUMINAL SUBTYPES A AND B OF BREAST CANCER USING TWO-DIMENSIONAL GAS CHROMATOGRAPHY COMBINED WITH MASS SPECTROMETRY

¹Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, 630117, Novosibirsk, Russia;

²Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090, Novosibirsk, Russia;

³FGBU E.N. Meshalkin National Medical Research Center Ministry of Health of Russia, 630055, Novosibirsk, Russia;

⁴NIKEL - branch of the Federal State Budgetary Institution Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630017, Novosibirsk, Russia;

⁵FGBU N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, 115522, Moscow, Russia

Metabolic reprogramming is a hallmark of many types of cancer, including breast cancer (BC), so identifying oncometabolites allows us to understand not only the metabolic pathways of transformed cells, but also to find new therapeutic targets. Since malignant cells require large amounts of lipids for membrane biogenesis, energy production and protein modification, we selected fatty acids for metabolite analysis. Using the method of two-dimensional gas chromatography combined with mass spectrometry, we identified increased concentrations of oleic and stearic acids in breast cancer tissues of luminal subtype A, and for luminal subtype B – palmitic and pentadecanoic acids. The determination of these compounds has good reproducibility, and their concentration in tumors is significantly (5-15 times) higher compared to breast tissue not affected by the tumor. We believe that in the future fatty acids can be considered as potential markers of hormone-dependent breast cancer.

Key words: breast cancer; metabolomic analysis; fatty acid; mass spectrometry; gas chromatography.

For citation: Valembakhov I.S., Slynko N.M., Vasilyeva A.R., Kononchuk V.V., Kalinina T.S., Gulyaeva L.F., Kushlinskii N.E. Analysis of fatty acid content in luminal A and B subtypes of breast cancer using two-dimensional gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (11): 662-665 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-11-662-665>

For correspondence: Valembakhov I.S.; e-mail: valembakhov@mail.ru

Information about authors:

Valembakhov I.S., <https://orcid.org/0009-0001-7727-7847>;
Slynko N.M., <https://orcid.org/0009-0002-2512-4862>;
Vasilyeva A.R., <https://orcid.org/0000-0003-3529-3176>;
Kononchuk V.V., <https://orcid.org/0000-0003-4070-2421>;
Kalinina T.S., <https://orcid.org/0000-0002-2698-0866>;
Gulyaeva L.F., <https://orcid.org/0000-0001-5820-0513>;
Kushlinskii N.E., <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>.

Conflict of interests. *The authors declare no conflict of interests.*

Acknowledgment. *This study was supported by the budget project No. 122032200240-8 «Study of molecular mechanisms of carcinogenesis, search for new diagnostic markers and therapeutic targets».*

Received 01.11.2023
Accepted 07.11.2023
Published 21.11.2023

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) является основной причиной смертности от онкологических заболеваний среди женщин из-за повышенного риска метастазирования, а также из-за высокой частоты рецидивов в сравнении с другими злокачественными новообразованиями. Для РМЖ разработана молекулярная классификация, которую приняли в результате Санкт-Галленского консенсуса [1]. Данная классификация представлена четырьмя основными молекулярными подтипами: две группы с положительным статусом рецепторов эстрогенов (РЭ) – люминальный А и В подтипы РМЖ (гормонзависимые опухоли) и две группы с отрицательным статусом РЭ – HER2-позитивный и трижды негативный (гормоннезависимые опухоли). Наиболее распространенными являются люминальный А и В подтипы, на которые приходится до 80% всех случаев РМЖ, при этом люминальный А составляет до 70% [2]. Для люминального А подтипа РМЖ характерно наличие в опухолевых клетках РЭ и рецепторов прогестерона, которые являются терапевтическими мишенями с невысоким индексом пролиферации Ki67 (меньше 20%). Опухоли с молекулярным профилем люминального В подтипа составляют от 10% до 20% всех случаев РМЖ [3]. По сравнению с люминальным А подтипом РМЖ эти опухоли имеют более агрессивный фенотип, высокий пролиферативный индекс (Ki67 больше 20%) и худший прогноз.

Исследования многих авторов показали, что в опухоли трансформированных клетках, в том числе молочной железы, происходят глубокие изменения метаболизма, направленные на выживаемость. В связи с этими

наблюдениями выявление онкометаболитов в настоящее время считается одной из важных проблем современной онкологии, так как позволяет понять метаболические пути в опухолевой клетке, что важно для диагностики и поиска новых терапевтических мишеней.

Установлено, что помимо эффекта Варбурга, цитратного цикла, метаболизма лактата, существует множество других метаболических превращений, характерных для опухоли. Метаболизм жирных кислот также является важным процессом, который может значительно изменяться при злокачественной трансформации клетки. Большой интерес к ним связан прежде всего с тем, что злокачественные клетки нуждаются в постоянном поступлении липидов для биогенеза мембран, модификации белков и энергетических процессов. В некоторых типах злокачественных опухолей наблюдали усиленный синтез жирных кислот (например, в клетках РМЖ и рака простаты), тогда как рост и пролиферация нормальных клеток в большей степени зависят от экзогенного липогенеза [4]. Таким образом, ферменты синтеза жирных кислот *de novo*, активность которых повышается при трансформации клеток, могут быть новыми метаболическими мишенями для терапии злокачественных опухолей человека. Однако содержание различных жирных кислот, синтезированных *de novo* в трансформированных клетках, остается в значительной степени не изученным [5].

Цель настоящего исследования – определить содержание жирных кислот в тканях молекулярных подтипов люминального А и В РМЖ с применением современного метода газовой хроматографии, совмещенной

с масс-спектрометрией (ГХ/МС).

Материал и методы. Образцы тканей молекулярных подтипов РМЖ. В исследование включили образцы тканей РМЖ: люминального А ($n=20$) и люминального В ($n=20$), а также образцы непораженных опухолью тканей молочной железы. Образцы помещали в реагент для стабилизации тканей RNAlater (“Invitrogen”, США) и хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ до использования.

Соблюдение этических стандартов. Все экспериментальные процедуры были одобрены Биоэтическим комитетом ФИЦ ФТМ и соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников получено информированное добровольное согласие.

Пробоподготовка для проведения ГХ/МС анализа. Образцы опухоли и условно нормальной ткани (массой около 100 мг) растирали в стеклянном гомогенизаторе с 1 мл метанола при температуре $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 10 минут. Гомогенизат обезвоживали сульфатом натрия, смесь центрифугировали при 2400xg в течение 8 минут, супернатант упаривали досуха на роторном испарителе. Для дериватизации к сухому остатку добавляли 0,6 мл нитрометана, 0,10 мл ГМДС, 0,20 мл ХТМС и 40 мкл пиридина в качестве катализатора. Для полного протекания реакции смесь оставляли на 48 часов при температуре $23\text{ }^{\circ}\text{C}$, затем упаривали досуха на роторном испарителе, растворяли остаток в 150 мкл дихлорметана и переносили раствор в микровставку для хроматографического виала.

ГХ/МС анализ. Пробы анализировали с помощью газового хроматографа Regasus BT 4D GCxGC-TOF MS с времяпролетным масс-спектрометрическим детектором в следующих условиях: хроматографическая ко-

лонка № 1 - Rxi-5MS, 30 м x 0,25 мм x 0,25 μm (Restek); хроматографическая колонка № 2 - Rxi-17Sil MS, 2 м x 0,25 мм x 0,25 μm (Restek); скорость газа носителя (гелий) – 1,4 мл/мин; температура нагревателя ввода пробы $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. Температурная программа: в первой колонке: $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $150\text{ }^{\circ}\text{C}$; $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $250\text{ }^{\circ}\text{C}$; $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ мин до $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ (20 минут); температура во второй колонке поддерживается $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ относительно первой колонки; температура трансферной линии $280\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ввод пробы 1 мкл, деление потока 1:100. Энергия ионизации 70 eV. Диапазон масс 40-650 m/z.

Обработку полученных хроматограмм и идентификацию пиков осуществляли с помощью программного обеспечения LECO ChromaTOF, которое по выделенным масс-спектрам выполняет автоматический поиск и сравнение с электронными базами данных NIST.

Хроматографический анализ выполнен в Центре коллективного пользования «Протеомики и метаболомики» ИЦиГ СО РАН (на базе ЦГИМУ «Курчатовский геномный центр», № 075-15-2019-1662).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы GraphPad Prism 9.5.0. Результаты представлены в виде «ящичков с усами», где сплошная линия – медиана, границы «ящичков» - 25 и 75 перцентиль, а «усы» построены по методу Тюки. Для оценки достоверности различий между двумя выборками использовали U-критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. Жирные кислоты, обнаруженные в молекулярном люминальном А подтипе РМЖ. Результаты анализа содержания жирных кислот в тканях люминального А подтипа РМЖ выявили стеариновую и олеиновую жирные кислоты, при этом их содержание увеличено по сравнению с непораженной опухолью тканью молочной железы в 10 и 15 раз соответственно (рис. 1).

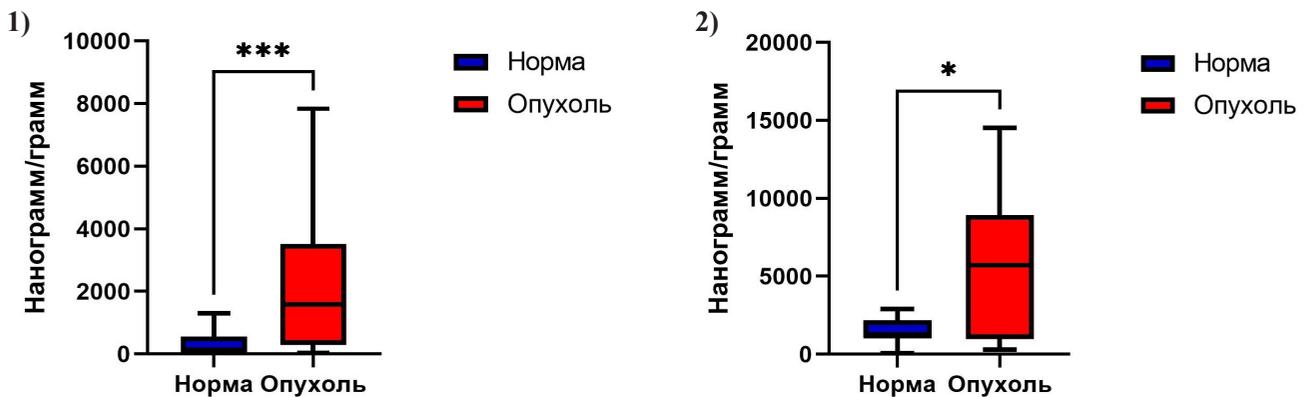


Рис. 1. Относительно нормированный уровень площадей пиков, соответствующих стеариновой (1) и олеиновой (2) кислотам в хроматограммах экстрактов нормальных ($n=20$) и опухолевых ($n=20$) тканей. * - $p<0,05$; *** - $p<0,005$ - статистически значимые различия между двумя выборками по критерию Манна-Уитни.

Такое значительное увеличение их концентрации может указывать на активный синтез и накопление жирных кислот в опухолевых тканях, что может сопровождаться мобилизацией липидов и окислением жирных кислот [6, 7]. В пользу этого утверждения свидетельствуют данные о том, что экспрессия синтазы жирных кислот (FASN) и элонгазы жирных кислот (Elovl6) выше в ткани РМЖ, чем в непораженной опухолью ткани молочной железы [8].

Жирные кислоты, обнаруженные в люминальном

В подтипе РМЖ. Аналогичные результаты получены для пальмитиновой и пентадекановой кислот, содержание которых было увеличено в ткани РМЖ в 15 и 10 раз соответственно по сравнению с непораженной тканью молочной железы (рис. 2).

В современной литературе имеются данные о том, что раковой клетке для поддержания метаболизма и выработки энергии необходимо высокое содержание энергоемких субстратов, таких как жирные кислоты. Аберрантный метаболизм липидов является отличии-

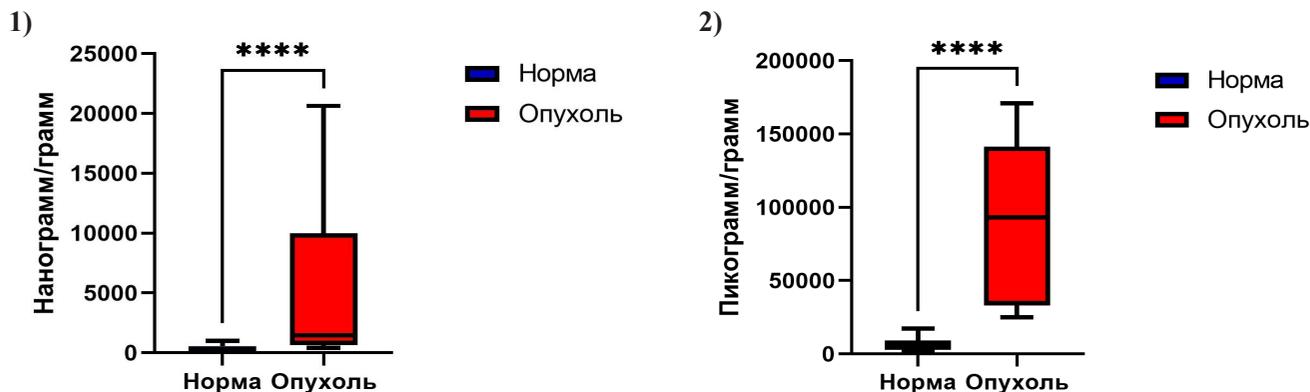


Рис. 2. Относительно нормированный уровень площадей пиков, соответствующих пальмитиновой (1) и пентадекановой (2) кислотам в хроматограммах экстрактов тканей непораженной опухолью молочной железы ($n=20$) и опухоли ($n=20$). **** - $p < 0,001$ - статистически значимые различия между двумя выборками по критерию Манна-Уитни.

тельной чертой нерегулируемого метаболизма трансформированной клетки. Известно, что раковые клетки увеличивают свой биосинтез липидов *de novo* для производства энергии, синтеза новых мембран, для регулирования мембранных структур, которые координируют передачу сигнала [9]. Полученные нами результаты подтверждают этот факт.

Заключение. Общеизвестным фактом является нарушение метаболизма в раковой клетке. Сформулировано представление о наличии онкометаболитов, характерных для трансформированных клеток. Настоящее исследование дополнило этот список. По результатам ГХ-ГХ/МС для люминального А подтипа РМЖ характерны высокие концентрации олеиновой и стеариновой кислот, а для люминального В подтипа РМЖ – пальмитиновой и пентадекановой кислот. Определение данных соединений имеет хорошую воспроизводимость, а их концентрация в РМЖ значительно (в 5-15 раз) выше по сравнению с непораженной опухолью тканью молочной железы. В перспективе жирные кислоты можно рассматривать как потенциальные маркеры гормонзависимого РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Goldhirsch A., Wood W.C., Coates A.S., Gelber R.D., Thürlimann B.,

Senn H.J. Panel members. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann. Oncol.* 2011; 22 (8): 1736-47.

2. Guarneri V., Conte P. Metastatic breast cancer: therapeutic options according to molecular subtypes and prior adjuvant therapy. *Oncologist.* 2009; 14 (7): 645-56.
3. Eroles P., Bosch A., Pérez-Fidalgo J.A., Lluch A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.* 2012; 38 (6): 698-707.
4. Yu X.H., Ren X.H., Liang X.H., Tang Y.L. Roles of fatty acid metabolism in tumorigenesis: Beyond providing nutrition (Review). *Mol. Med. Rep.* 2018; 18 (6): 5307-16.
5. Jin Z., Chai Y.D., Hu S. Fatty acid metabolism and cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2021; 1280: 231-41.
6. Case K.C., Schmidtke M.W., Greenberg M.L. The paradoxical role of inositol in cancer: a consequence of the metabolic state of a tumor. *Cancer Metastasis Rev.* 2022; 41 (2): 249-54.
7. Tan B., Zhang Y., Zhang T., He J., Luo X., Bian X., Wu J., Zou C., Wang Y., Fu L. Identifying potential serum biomarkers of breast cancer through targeted free fatty acid profiles screening based on a GC-MS platform. *Biomed. Chromatogr.* 2020; 34 (10): e4922.
8. Menendez J.A., Lupu R. Fatty acid synthase (FASN) as a therapeutic target in breast cancer. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2017; 21 (11): 1001-16.
9. Wang S.C., Wang S.C., Sun H.L., Hsu Y.H., Liu S.H., Lii C.K., Tsai C.H., Liu K.L., Huang C.S., Li C.C. α -Linolenic acid inhibits the migration of human triple-negative breast cancer cells by attenuating Twist1 expression and suppressing Twist1-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Biochem. Pharmacol.* 2020; 180: 114152.