

ПЕРСОНИФИЦИРОВАННЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ ЭКСПРЕССИИ мРНК ГИСТИДИНБОГАТОГО ГЛИКОПРОТЕИНА И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЁРОВ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А. И. Аутеншлюс^{1,2,*}, А. В. Голованова¹, А. А. Студеникина¹,
И. И. Брусенцов³, А. В. Проскура², И. П. Жураковский¹, С. А. Архипов^{1,2},
С. В. Сидоров⁴, В. А. Вавилин², академик РАН В. В. Ляхович²

Поступило 24.09.2018 г.

Исследовали биопсийный материал больных злокачественными и доброкачественными заболеваниями молочной железы. В клетках биоптатов больных инвазивной карциномой неспецифического типа экспрессию мРНК *HRG* обнаружили в 70% случаев, в образцах пациентов с доброкачественными заболеваниями молочной железы мРНК *HRG* — в 66,7% случаев. Иммуногистохимическим методом выявили экспрессию коллагена II, бета-1-интегрина и кадгерина-Е — маркёров эпителиально-мезенхимального перехода. Благодаря применению RT-qPCR в сочетании с иммуногистохимическими исследованиями мы смогли выявить у конкретных пациентов атипические клетки, что можно расценить как предраковые изменения.

Ключевые слова: опухоли молочной железы, мРНК, гистидинбогатый гликопротеин, иммуногистохимические маркёры.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524845624-628>

Одним из потенциальных маркёров рака молочной железы (РМЖ) является гистидинбогатый гликопротеин (*HRG*) [1]. Было решено провести исследование с использованием метода RT-qPCR для обнаружения мРНК *HRG* и иммуногистохимического метода для определения экспрессии маркёров эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), который расценивается как фактор, способствующий опухолевой прогрессии.

Целью настоящей работы явилась оценка результатов молекулярных исследований образцов ткани при злокачественной и доброкачественной патологии молочной железы и роли иммуногистохимических исследований (ИГИ) в качестве доказательной базы клеточной атипии.

Исследовали биопсийный материал молочной железы 35 женщин. Из них 23 были с диагнозом

инвазивная карцинома неспецифического типа (ИКНТ) (по гистологическому типу — аденокарцинома молочной железы) [2], 12 — с доброкачественными заболеваниями молочной железы (ДЗ): фиброаденома, фиброаденоматоз (ФАМ) и фиброзно-кистозная болезнь (ФКБ). Средний возраст пациентов составил $52,5 \pm 2,3$ года (от 18 до 74). Все исследования были проведены в соответствии с Хельсинской декларацией [3]. Достоверность различий результатов, полученных при исследовании лиц указанных групп, определяли с помощью критерия *U* Вилкоксона—Манна—Уитни, используя программу STATISTICA 6.0.

Существуют пять молекулярных подтипов РМЖ [4], по которым распределение образцов опухолей в наших исследованиях было следующим: люминальный А — 11 образцов; люминальный В (*HER2*[−]) — 6 образцов; люминальный В (*HER2*⁺) — один образец; *HER2*⁺ — 3 образца; базальноподобный — 2 образца.

Образцы ткани удалённых опухолей объёмом 8 мм³ замораживали и хранили при −80°C. Перед выделением мРНК ткань в течение 5 мин гомогенизировали с помощью TissueLyser LT (“QIAGEN”, Германия) с частотой встряхивания 40 Гц. Выделение мРНК проводили с использованием набора

¹ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России

² Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики, Новосибирск

³ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской Академии наук, Новосибирск

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет

* E-mail: ipcip@211.ru

Таблица 1. Праймеры для определения экспрессии HRG и TBP

Название	Последовательность 5' → 3'
HRG_F	AGTACAAAGAGGAGAATGATGACTT
HRG_R	CATTTCCCTTCCCCTCCTCTCAC
TBP_F	ACTGTGAGCCACCGATTCCAGACGTCCAT
TBP_R	TAGTCTTAGATGTGCAAGAATCGGA

РеалБест экстракция 1000 (АО "Вектор-Бест", Россия). Для получения кДНК использовали набор реагентов для проведения обратной транскрипции (ООО "СИНТОЛ", Россия) с использованием синтезированных нами специфических праймеров (табл. 1).

Реакцию RT-qPCR проводили в присутствии красителя EvaGreen® (ООО "СИНТОЛ"). Для контроля качества выделения РНК использовали систему выявления мРНК TBP (TATA-box binding protein).

В биоптатах молочной железы определяли экспрессию коллагена типа II (CII), бета-1-интегрин (CD29) и кадгерина-E (CDH1). Коллаген типа II обычно выявляется в клетках мезенхимальной природы. При ЭМП клетки утрачивают способность секретировать белки, характерные для эпителиальных клеток, и становятся способными секретировать коллагены [5]. Интегрин CD29 участвует в адгезии клеток к экстраклеточному матриксу. Данный гликопротеин может экспрессироваться в злокачественных опухолях молочной железы [6]. В норме CDH1 присутствует в эпителиальных клетках, но при наличии ЭМП эпителиальные клетки могут утрачивать способность к его синтезу [7].

Иммуногистохимическое исследование экспрессии CII, CD29 и CDH1 проводили на парафиновых срезах опухолей с использованием набора Vectastain Universal Elite ABC Kit ("Vector Laboratories", США) [8].

Для характеристики уровня экспрессии маркёров, определяемых ИГИ, мы использовали его оценку в баллах (табл. 2).

По результатам RT-qPCR мРНК *HRG* была обнаружена в 68,6% от всех исследуемых образцов. В клетках биоптатов больных ИКНТ экспрессию мРНК *HRG* регистрировали в 70% случаев. В образцах, по молекулярным подтипам классифицируемых как HER2⁺, мРНК *HRG* мы не обнаружили ни в одном случае из трёх. В образцах ткани пациентов с ДЗ молочной железы мРНК *HRG* выявили в 66,7% случаев (8 образцов). При этом все образцы, в которых мРНК *HRG* отсутствовала, были получены от пациентов с диагнозом фиброаденома.

Полученные результаты не давали окончательного ответа на вопрос, действительно ли метод RT-qPCR обладает высокой чувствительностью и недостаточной специфичностью. Для этого были проведены дополнительные ИГИ биоптатов, полученных от 17 пациентов с ИКНТ и 11 пациентов с ДЗ молочной железы (табл. 3).

По показателям экспрессии CII больные ИКНТ от пациентов с ДЗ достоверно не различались ($p = 0,3232$), так как в образцах пациентов с ДЗ молочной железы методом ИГХ мы выявили способность эпителиальных клеток выстилать протоки молочной железы экспрессировать CII, и, следовательно, они были атипичными клетками.

Уровень экспрессии CD29 в группе больных ИКНТ был высоким (4–5 баллов), и лишь у одного пациента — 1 балл (табл. 4). В группе пациентов с ДЗ показатели были достоверно ниже ($p = 0,0001$) по сравнению с таковыми больных ИКНТ, но, тем не менее, экспрессию CD29 мы также наблюдали. Известно, что экспрессия CD29

Таблица 2. Балльная оценка экспрессии маркёров эпителиально-мезенхимального перехода

Баллы Маркёр	1	2	3	4	5	6
CII (экспрессия)	до 5 клеток	≤ 50% ЖТС	≥ 51% ЖТС			
CD29 (экспрессия)	в 1–3 клетках	в 4–10 клетках	от 11 клеток до 25% ЖТС	≤ 25 % ЖТС	26–75% ЖТС	≥ 76 % ЖТС
CDH1 (отсутствие экспрессии)	в 1–3 клетках	в 4–10 клетках	от 11 клеток до 25% ЖТС	≤ 25 % ЖТС	26–75% ЖТС	≥ 76 % ЖТС

Примечание. ЖТС — железисто-тубулярные структуры.

Таблица 3. Диагноз пациентов, образцы ткани которых были взяты для дальнейшего исследования

Номер образца	Диагноз
1–7	ИКНТ, люминальный тип А
8–13	ИКНТ, люминальный тип В HER2 ⁻
14	ИКНТ, люминальный тип В HER2 ⁺
15	ИКНТ, базальноподобный
16, 17	ИКНТ, HER2 ⁺
18	ФКБ с очагами протоковой гиперплазии
19	Пролиферативная форма ФКБ с перидуктальным воспалением
20	Внутрипротоковый папилломатоз на фоне ФАМ
21	ФКБ с участками склерозирующего аденоза (очаговый ФАМ)
22	Протоковая гиперплазия с участками склерозирующего аденоза (очаговый ФАМ)
23	Фиброаденома, смешанный тип с участками протоковой гиперплазии
24	Фиброаденома с выраженной протоковой гиперплазией
25, 26	Фиброаденома
27	Фиброаденома периканаликулярная
28	Фиброаденома смешанного типа

Таблица 4. Оценка в баллах результатов ИГИ при ИКНТ и ДЗ молочной железы

Номер образца	Экспрессия СП (в баллах)	Экспрессия CD29 (в баллах)	Экспрессия CDH1 (в баллах)	Наличие мРНК HRG(+), отсутствие (-)
1	2	4	4	+
2	2	5	5	+
3	2	5	1	+
4	2	4	1	+
5	2	5	5	+
6	3	5	6	+
7	1	4	6	+
8	1	4	1	+
9	2	1	2	+
10	2	4	6	+
11	2	4	5	+
12	2	5	6	+
13	3	4	2	—
14	1	4	2	+
15	2	4	3	+
16	2	4	1	—
17	1	4	1	—
18	2	3	4	+
19	2	3	1	+
20	1	1	3	+
21	1	2	3	+
22	1	1	2	+
23	3	3	4	+
24	1	1	4	+
25	1	2	1	—
26	1	3	1	—
27	2	1	1	—
28	3	1	2	—

была обнаружена в раковых стволовых клетках, формирующихся при ЭМП [9], а также в стволовых клетках РМЖ [10]. Поэтому показатели экспрессии CD29 могут служить одним из ранних маркёров злокачественной трансформации эпителиальных клеток при ДЗ молочной железы.

Количество баллов, отражающее снижение экспрессии CDH1, в группе больных ИКНТ значительно колебалось (от 1 до 6). В группе пациентов с ДЗ молочной железы высоких показателей (5 и 6 баллов) мы не зафиксировали. Однако достоверных различий между указанными группами мы не выявили ($p = 0,2396$), так как и при ДЗ можно наблюдать снижение экспрессии CDH1 в эпителиальной ткани, что является универсальной особенностью ЭМП [11].

Таким образом, благодаря применению RT-qPCR в сочетании с ИГИ мы смогли выявить у конкретных пациентов атипические клетки, что можно расценить как предраковые изменения. Поэтому метод RT-qPCR обладает достаточной специфичностью, и его целесообразно использовать для обнаружения мРНК *HRG* в сочетании с ИГИ при ДЗ молочной железы, так как это позволяет обнаружить самые ранние признаки клеточной атипии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eissa S., Matboli M., Shehata H. H. Breast Tissue-Based MicroRNA Panel Highlights MicroRNA-23a and Selected Target Genes as Putative Biomarkers for Breast Cancer // *Transl. Res.* 2015. V. 165. № 3. P. 417–427.
2. Lakhani S.R., Ellis I.O., Schnitt S.J., Tan P.H., van de Vijver M.J. // *WHO Classification of Tumours of the Breast.* Lyon: IARC, 2012.
3. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects // *J. Amer. Med. Associat.* 2013. V. 310. № 20. P. 2191–2194.
4. Senkus E., Kyriakides S., Ohno S., Penault-Llorca F., Poortmans P., Rutgers E., Zackrisson S., Cardoso F. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up // *Ann. Oncol.* 2015. V. 26. P. 8–30.
5. Taube J.H., Herschkowitz J.I., Komurov K., Zhou A.Y., Gupta S., Yang J., Hartwell K., Onder T.T., Gupta P.B., Evans K.W., Hollier B.G., Ram P.T., Lander E.S., Rosen J.M., Weinberg R.A., Mani S.A. Core Epithelial-to-Mesenchymal Transition Interactome Gene-Expression Signature Is Associated with Claudin-Low and Metaplastic Breast Cancer Subtypes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 35. P. 15449–15454.
6. Dos Santos P.B., Zanetti J.S., Ribeiro-Silva A., Beltrão E.I. Beta 1 Integrin Predicts Survival in Breast Cancer: A Clinicopathological and Immunohistochemical Study // *Diagn. Pathol.* 2012. V. 7. № 104. P. 1–9.
7. Le Bras G.F., Taubenslag K.J., Andl C.D. The Regulation of Cell-Cell Adhesion During Epithelial-Mesenchymal Transition, Motility and Tumor Progression // *Cell Adhesion & Migration.* 2012. V. 6. № 4. P. 365–373.
8. Tang X.B., Dong P.L., Wang J., Zhou H.Y., Zhang H.X., Wang S.Z. Effect of Autologous Platelet-Rich Plasma on the Chondrogenic Differentiation of Rabbit Adipose-Derived Stem Cells *in vitro* // *Exp. Ther. Med.* 2015. V. 10. № 2. P. 477–483.
9. Geng S., Guo Y., Wang Q., Li L., Wang J. Effect of Autologous Platelet-Rich Plasma on the Chondrogenic Differentiation of Rabbit Adipose-Derived Stem Cells *in vitro* // *Arch. Dermatol. Res.* 2013. V. 305. № 1. P. 35–47.
10. Martin T.A., Jiang W.G. Evaluation of the Expression of Stem Cell Markers in Human Breast Cancer Reveals a Correlation with Clinical Progression and Metastatic Disease in Ductal Carcinoma // *Oncol. Rept.* 2014. V. 31. № 1. P. 262–272.
11. Tian X., Liu Z., Niu B., Zhang J., Tan T.K., Lee S.R., Zhao Y., Harris D.C., Zheng G. E-Cadherin/ β -Catenin Complex and the Epithelial Barrier // *J. Biomed. Biotechnol.* 2011. V. 2011. P. 1–6.

PERSONALIZED APPROACH TO ASSESSING mRNA EXPRESSION OF HISTIDINE-RICH GLYCOPROTEIN AND IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS IN DISEASES OF THE BREAST

**A. I. Autenshlyus^{1,2}, A. V. Golovanova, A. A. Studenikina¹, I. I. Brusentsov³,
A. V. Proskura², I. P. Zhurakovskiy¹, S. A. Arkhipov^{1,2}, S. V. Sidorov⁴,
V. A. Vavilin², Academician of the RAS V. V. Lyakhovich²**

¹Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

²Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Experimental and Clinical Medicine,
Novosibirsk, Russian Federation

³Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

⁴Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Received September 24, 2018

Biopsy material of patients with malignant and benign breast diseases was examined. *HRG* mRNA expression was detected in 70% of cases in biopsy material obtained from patients with nonspecific invasive carcinoma and in 66.7% of cases in biopsy material of patients with benign breast diseases. Immunohistochemical analysis revealed expression of collagen II, the beta-1 integrin, and E-cadherin — markers of epithelial—mesenchymal transition. The use of RT-qPCR combined with immunohistochemical study made it possible to identify atypical cells, which can be regarded as precancerous changes, in individual patients.

Keywords: breast tumors, mRNA, histidine-rich glycoprotein, immunohistochemical markers.