

УДК 616-006.66

©Коллектив авторов

МАММАГЛОБИН В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ОПУХОЛИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

*В.К. Боженко¹, Н.В. Харченко², Е.Ф. Васкевич³, Е.А. Кудинова¹,
А.В. Ооржак¹, Н.И. Рожкова⁴, И.Д. Троценко^{2*}*

¹Российский научный центр рентгенорадиологии,
117997, Москва, ул. Профсоюзная, д. 86; тел.: 8(495)120-8190

²Российский университет дружбы народов,
117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6; тел.: 8(495) 434-53-00; эл. почта: trotsenkoivan@mail.ru

³Клинико-диагностический центр №1,
117485, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 29, корп. 2; тел.: 8(495) 195-13-00; эл. почта: evaskevich@mail.ru

⁴Национальный центр онкологии репродуктивных органов,
125284, Москва, 2-й Боткинский пр., д. 3; тел.: 8(495)945-80-20; эл. почта: NVRozhova@mail.ru

В настоящее время не существует молекулярно-биологических маркеров для диагностики раннего рака молочной железы (РМЖ). В качестве возможного маркера рассматривается маммаглобин (hMAM), уровень экспрессии которого максимален при раннем РМЖ. С помощью метода ОТ-ПЦР определен уровень экспрессии мРНК маммаглобина в 57 парных образцах опухолевой и морфологически неизменённой ткани (МНТ) молочной железы, полученных от больных РМЖ. Оценена специфичность и чувствительность анализа мРНК hMAM в периферической крови больных РМЖ методом гнездовой ПЦР. Проанализировано 169 образцов крови (95 от больных РМЖ, 22 от больных с доброкачественными опухолями молочной железы, 28 от больных с опухолями другой локализации и 24 образца здоровых доноров). Экспрессия hMAM была значительно выше в образцах ткани РМЖ по сравнению с МНТ ($p=0,0019$). Максимальный уровень экспрессии отмечен в образцах T1 ($p=0,013$), стадии I ($p=0,037$), G1 ($p=0,0019$). Выявлена положительная корреляция между экспрессией hMAM и рецепторов эстрогена ($p=0,034$) и прогестерона ($p=0,0004$). Чувствительность и специфичность определения экспрессии hMAM в периферической крови составила 60,6 и 92,3% соответственно. Экспрессия hMAM при РМЖ была выше, чем в МНТ и снижалась при высокой распространенности заболевания. мРНК маммаглобина обнаружена в 61% образцов крови больных РМЖ, в 22,7% – при доброкачественных образованиях молочной железы и лишь в одном образце крови при другой локализации опухолевого процесса – у больной раком лёгкого. В образцах крови здоровых доноров мРНК маммаглобина не обнаружена. Таким образом, определение мРНК hMAM в периферической крови, по-видимому, можно рассматривать как дополнительный метод диагностики РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, мРНК маммаглобина, маммаглобин в периферической крови

DOI 10.18097/PBMC20166204453

ВВЕДЕНИЕ

Постоянно повышающиеся возможности диагностики рака молочной железы (РМЖ) позволяют выявлять заболевание на всё более ранних стадиях. Однако методы лучевой диагностики, составляющие основу скрининговых исследований, основаны на обнаружении морфологических изменений структуры или плотности ткани, которые возникают уже после появления злокачественных клеток. В ряде исследований показана высокая эффективность количественного определения мРНК маммаглобина (hMAM) в единичных опухолевых клетках в лимфоузлах [1, 2], костном мозге [3], периферической крови [4].

Уникальной особенностью hMAM как маркера прогрессии РМЖ является обратная корреляция между уровнем его экспрессии, распространенностью заболевания и степенью злокачественности опухоли [5], что может использоваться для диагностики РМЖ [6].

Кроме того, обнаружение hMAM в периферической крови больных РМЖ методом гнездовой ПЦР может быть эффективным при проведении скрининговых исследований [7].

Цель настоящего исследования состояла в определении уровня экспрессии мРНК hMAM в тканях молочной железы (морфологически неизменная ткань (МНТ), фибroadенома и инвазивный РМЖ), а также в изучении закономерностей экспрессии маммаглобина с учётом клинико-морфологических характеристик опухоли. Оценена также чувствительность и специфичность определения мРНК маммаглобина в периферической крови методом гнездовой ПЦР.

МЕТОДИКА

Исследование проведено на базе Российского научного центра рентгенорадиологии (РНЦРР). После одобрения дизайна исследования этическим комитетом РНЦРР и получения информированного согласия больных были отобраны 114 образцов ткани молочной железы, из них 57 – РМЖ I-IV стадии и 57 – МНТ молочной железы в качестве контроля. В группу РМЖ вошли больные в возрасте от 36 до 87 лет (средний возраст $57,1 \pm 11$ лет). В 63,1% (36 из 57) случаев гистологически диагностирован инфильтративный протоковый рак,

* - адресат для переписки

МАММАГЛОБИН ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

в 19,3% (11 из 57) – инфильтративный дольковый, в 17,5% (10 из 57) – муцинозный и другие формы рака. В 75,3% (43 из 57) размер опухоли не превышал 5 см, в 10,5% (11 из 57) наблюдалось распространение опухоли на кожу молочной железы, грудную стенку, инфильтративные отёчные формы (Т4). Регионарные метастазы (N1–N3) обнаружены в 46,6% (26 из 57 случаев), отдаленные (на момент операции) в 7,1% (4 из 57). Экспрессия рецепторов эстрогена по данным иммуногистохимического исследования обнаружена в 66,7% (38 из 57) образцов, прогестерона – в 63,2% (36 из 57), амплификация c-erbB2 выявлена в 14% случаев (8 из 57).

Подготовка и хранение ткани для анализа

Все больные прошли обследование и получили лечение в хирургических отделениях РНЦРР в период с ноября 2009 по июль 2011 года. Забор материала проводили сразу после операции по поводу РМЖ или фиброаденомы. Полученную ткань немедленно помещали в стабилизирующий раствор (EverFresh RNA, “Клоноген”, Россия) и хранили при -70°C . Гистологические заключения давали в соответствии с гистологической классификацией опухолей молочной железы (ВОЗ, 2007 г). Степень злокачественности РМЖ оценивали в соответствии с критериями Elston-Ellis. В каждом случае одновременно производили забор неизменной ткани, морфологическими критериями для которой были присутствие нормального эпителия молочной железы, отсутствие злокачественных клеток и атипической гиперплазии.

РНК выделяли согласно инструкции с помощью наборов реагентов RNeasy Plus Mini Kit (“Qiagen”, США). Реакции обратной транскрипции и ПЦР проводили с использованием наборов и амплификатора DT-96 (“ДНК Технология”, Россия) согласно протоколу производителя. Уровень экспрессии мРНК маммаглобина определяли с помощью количественной ПЦР и нормировали по экспрессии референсного гена HPRT, используя относительные единицы и метод сравнения индикаторных циклов (Cp). В таблице 1 представлены праймеры и зонды, используемые для определения уровня мРНК HPRT и hMAM методом ПЦР в реальном времени.

Использовали зонды hMAM и HPRT, меченные FAM (dT); реакции амплификации проводили в разных пробирках.

Сбор и обработка образцов крови

Образцы крови были получены от 168 человек: 95 больных РМЖ I–III стадии, 22 больных с доброкачественными образованиями молочной железы, 28 больных с опухолями другой этиологии и 24 соматически здоровых доноров. Венозную кровь собирали в пробирки объемом 3 мл с 3,2% раствором цитрата натрия. РНК выделяли из 1,5 мл плазмы с использованием набора QIAmp Blood Mini Kit (“Qiagen”) в соответствии с протоколом производителя с последующей обработкой ДНКазой (“Qiagen”). РНК элюировали в объеме 35 мкл. В реакции обратной транскрипции использовали реагенты QuantiTest Reverse Transcription (“Qiagen”) в соответствии с протоколом производителя. мРНК маммаглобина выявляли методом гнездовой ПЦР с использованием интеркалирующего красителя SYBR-green. На первом и втором этапах ПЦР использовали следующие праймеры.

Первый этап:

MAM (N1) – 5' GAA GTT GCT GAT GGT CCT CAT GCT GGC 3'

MAM (N2) – 5' CTC ACC ATA CCC TGC AGT TCT GTG AGC 3'.

Второй этап:

MAM (N3) – 5' CTC CCA GCA CTG CTA CGC AGG CTC 3'

MAM (N4) – 5' CAC CTC AAC ATT GCT CAG AGT TTC ATC CG 3'.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса и корреляционного анализа Пирсона. Различие групп считали статистически значимым при $p < 0,05$. Результаты обрабатывали с использованием пакета программ StatSoft Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия маммаглобина в образцах РМЖ была значительно и статистически значимо выше, чем в МНТ ($p=0,0019$). Кроме того, наблюдали обратно пропорциональное снижение экспрессии hMAM при увеличении размеров опухоли ($p=0,013$ для образцов T1–T3) (рис. 1), стадии заболевания ($p=0,037$ в образцах I–IV) (рис. 2) и степени злокачественности ($p=0,0019$ для образцов G1–G3) (рис. 3).

Таблица 1. Праймеры и зонды для определения уровня экспрессии мРНК HPRT и hMAM

мРНК	Праймер/зонд	Нуклеотидная последовательность
hMAM	Прямой праймер	GAACACCGACAGCAGCA
	Обратный праймер	TCTCCAATAAGGGGCAGCC
	Зонд	FAMTGGTCCTCATGCTGGCGGCC
HPRT	Прямой праймер	AAGCCAGACTTTGTTGGATTTGA
	Обратный праймер	AACTTGAACTCTCATCTTAGGCTT
	Зонд	FAMAGCAGGAGATTGCCACCTACCGCA

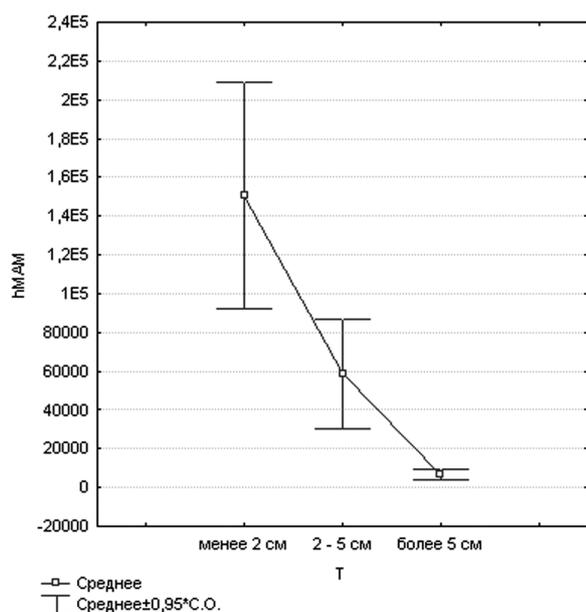


Рисунок 1. Уровень экспрессии маммаглобина в ткани РМЖ в зависимости от категории Т.

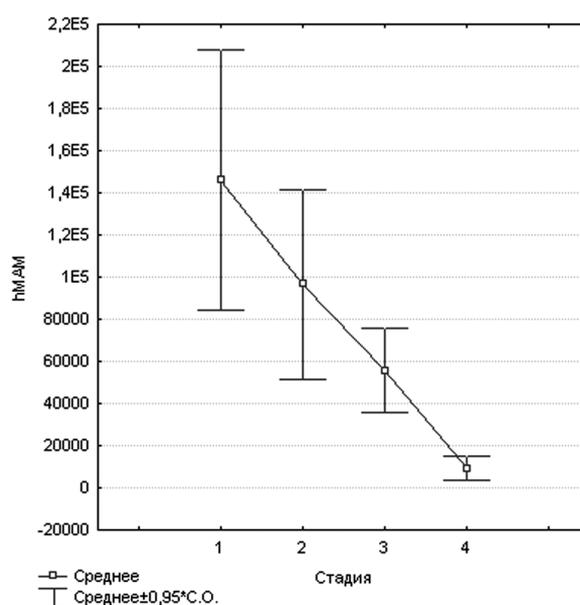


Рисунок 2. Уровень экспрессии маммаглобина в ткани первичной опухоли в зависимости от стадии заболевания.

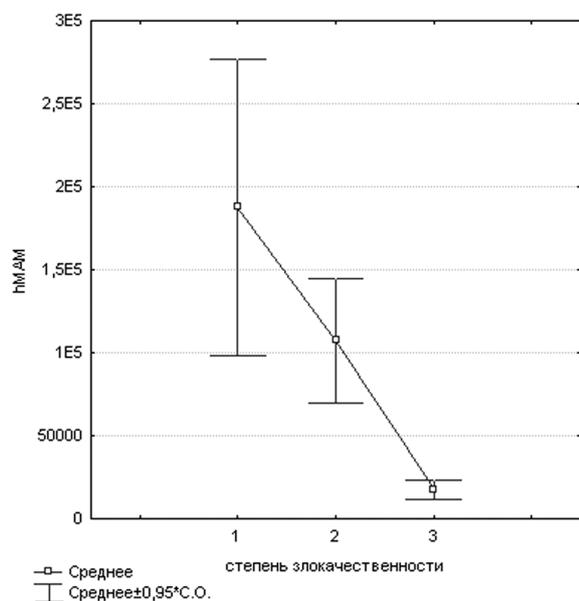


Рисунок 3. Динамика экспрессии мРНК маммаглобина в ткани РМЖ в зависимости от степени злокачественности (G).

Определяли корреляции между уровнями экспрессии hMAM и мРНК рецепторов эстрогена (ESR1) и прогестерона (PGR), поскольку опубликованы данные, согласно которым рецепторы стероидных гормонов участвуют в регуляции экспрессии маммаглобина. Для анализа использовали коэффициент корреляции Спирмена. Выявлена статистически значимая корреляция экспрессии мРНК ESR1 ($r=0,29$, $p=0,02$), PGR ($r=0,43$, $p=0,0004$) и hMAM в МНТ. В образцах РМЖ корреляция отсутствовала, но обнаружена положительная корреляция с экспрессией Her2/neu ($r=0,33$, $p=0,01$).

С целью определения чувствительности и специфичности выявления мРНК маммаглобина в периферической крови методом гнёздной ПЦР

проанализировали образцы периферической крови здоровых доноров, больных с РМЖ, фибroadеномой молочной железы и опухолями другой локализации (табл. 2).

мРНК маммаглобина обнаружена в 61% образцов крови больных РМЖ, в 22,7% – при доброкачественных образованиях молочной железы и лишь в одном образце крови при другой локализации опухолевого процесса – у больной раком лёгкого. В образцах крови здоровых доноров мРНК маммаглобина не обнаружена.

Стоит отметить, что вероятность обнаружения мРНК маммаглобина в крови уменьшается с увеличением размера опухолевого узла (рис. 4). Чувствительность метода составила 61%, специфичность – 93%. Прогностическая ценность положительного результата равна 85%.

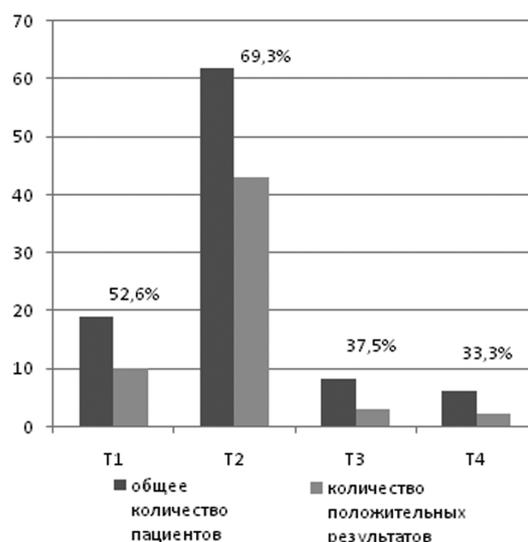


Рисунок 4. Распределение больных РМЖ по показателю Т (по классификации TNM) и число больных, в периферической крови которых выявлена мРНК маммаглобина.

МАММАГЛОБИН ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Таблица 2. Частота обнаружения мРНК маммаглобина методом гнёздной ПЦР в цельной крови у различных групп пациентов

Этиология опухоли		Число наблюдений	Положительный результат, число/%
Рак молочной железы		95	58/61
Доброкачественные образования молочной железы	Фиброзно-кистозная мастопатия	4	1/25
	Фиброаденома А	16	4/25
	Фибросклероз	2	0/0
Опухоль другой локализации	Опухоли желудочно-кишечного тракта	8	0/0
	Опухоли органов дыхания	5	1/20
	Рак почки и предстательной железы	3	0/0
	Рак матки, эндометрия	12	0/0
Здоровые доноры		24	0/0

ОБСУЖДЕНИЕ

мРНК маммаглобина считается привлекательной диагностической мишенью по нескольким причинам. Во-первых, установленные в нашей работе и описанные рядом авторов закономерности экспрессии выгодно отличают его от других маркеров РМЖ. Во-вторых, определение экспрессии именно на уровне мРНК имеет ряд преимуществ по сравнению с анализом ДНК и экспрессии белка, что обусловлено присутствием достаточного количества копий мРНК в клетке и высокой чувствительностью метода. В частности, число молекул специфических мРНК в клетке колеблется от 10 до 1000 и более копий. Опухоль объёмом 1 мм³, содержащая 10⁶ клеток, при минимальном уровне апоптоза 10% поставляет в системный кровоток порядка 10³-10⁷ молекул мРНК в зависимости от активности транскрипции гена. При максимальном теоретическом объёме циркулирующей крови, равном 10000 мл, 1 мл периферической крови содержит в среднем 1000 молекул мРНК, что в несколько раз превышает порог чувствительности ПЦР. Согласно этим расчетам концентрации других возможных маркеров, таких как ДНК и белки, не достигают нижней границы чувствительности методов при аналогичном объёме первичной опухоли (табл. 3).

Именно сочетание высокого уровня экспрессии мРНК hMAM на начальных стадиях заболевания с достаточной для анализа концентрацией молекул в периферической крови вызывает повышенный интерес клиницистов. Экспрессия мРНК hMAM выявлена во всех проанализированных образцах ткани РМЖ. Эти результаты отличаются от данных [8] об отсутствии экспрессии hMAM в ряде случаев РМЖ, в основном, в ткани инфильтративного протокового рака высокой степени злокачественности (G3). Однако в целом нами отмечена тенденция к уменьшению уровня экспрессии hMAM в низкодифференцированных опухолях, что не противоречит опубликованным данным. Причины низкого уровня экспрессии маммаглобина в низкодифференцированных опухолях не установлены [6, 9]. При анализе МНТ нами отмечена положительная корреляция между уровнем экспрессии hMAM и наличием рецепторов стероидных гормонов (эстрогенов и прогестерона). В ткани опухоли положительная корреляция между экспрессией hMAM и мРНК рецепторов эстрогена исчезла, при сохранении корреляции с мРНК рецепторов прогестерона. Нарушение процессов дифференцировки эпителиальной клетки при развитии РМЖ сочетается с ремоделированием механизмов контроля этого процесса, маркером чего может служить hMAM.

Таблица 3. Относительная чувствительность специфического определения нуклеиновых кислот и белков в периферической крови с учётом их концентрации. Во втором столбце указано среднее количество копий в одной клетке (от 2 для ДНК до 10000 для белка). При опухоли объёмом 1 мм³ (в среднем 10⁶ клеток) и минимальном уровне апоптоза 10% в кровеносном русле циркулирует $n \times 10^6 \times 0,1 \times 0,1$ молекул. Максимальный объём циркулирующей крови равен 10000 мл, составляя в среднем $(4-8) \times 10^3$ мл. Соответственно в 1 мл периферической крови теоретически циркулирует: $(n \times 10^6 \times 0,1 \times 0,1) / 10000$, где n - количество молекул в одной клетке. Среднее теоретическое количество циркулирующих молекул в периферической крови выделено жирным в третьем столбце. Только для РНК это значение превышает порог чувствительности метода

Относительная чувствительность метода в зависимости от типа мишени		
Маркер	Количество копий в клетке (n)	В 1 мл периферической крови*/чувствительность метода
ДНК	2	2/~100
РНК (мРНК)	10-1000 и более	1000/~500
Белок	10-10000 и более	10⁴/10⁷

Примечание. Порядок параметров для расчёта концентрации в периферической крови при объёме опухоли 1 мм³ (количество клеток ~ 10⁶): минимальный уровень апоптоза 10% и более; транспорт в периферическую кровь ~10% (для нуклеиновых кислот и внутриклеточных белков); объём циркулирующей крови ~10000 мл; */% в 1 мл = $(n \times 10^6 \times 0,1 \times 0,1) / 10000$; чувствительность определения мРНК ~ 500 /мл.

Исследование мРНК секретируемого белка маммаглобина может быть полезным для диагностики РМЖ [10, 11]. мРНК маммаглобина выявлена в крови больных на различных стадиях РМЖ [12]. Однако циркулирующие в крови опухолевые клетки обнаружены лишь у 40% больных с метастазами и не найдены у больных без метастазов [13]. Подобные различия могут быть связаны с чувствительностью использованных методов: в первом случае [12] использовали гнездную ПЦР, во втором [13] – менее чувствительную одношаговую ПЦР. Нами также оценена диагностическая информативность определения мРНК в крови женщин с заболеваниями молочной железы. Установлено, что чувствительность метода детекции мРНК маммаглобина в крови составляет 60,6%, а специфичность – 93,2%. Таким образом, определение уровня мРНК маммаглобина в крови может быть использовано как для первичной диагностики, так и для мониторинга РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schneider J., Pollán M., Jiménez E., Ruibal A., Lucas A.R., Núñez M.I. (1999) *Tumour Biol.*, **20**, 319-330.
2. Schneider J., Rubio M.P., Rodríguez-Escudero F.J., Seizinger B.S. (1994) *Eur. J. Cancer*, **30A**, 504-508.
3. Leone F., Perissinotto E., Viale A. et al. (2001) *Bone Marrow Transplant.*, **27**, 517-523.
4. Silva J.M., Dominguez G., Silva J. (2001) *Clin. Cancer Res.*, **7**, 2821-2825.
5. Paul N., Waanders E., Manders P., Joop J.T.M. Heuvel, Foekens J.A., Watson M.A. (2004) *J. Clin. Oncol.*, **22**(4), 691-698.
6. Ni J., Kalf-Suske M., Gentz R., Schageman J., Beato M., Klug J. (2000) *Ann. N-Y. Acad. Sci.*, **923**, 25-42.
7. Bernstein J.L., Godbold J.H., Raptis G. et al. (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**, 528-535.
8. O'Brien N., Maguire T.M., O'Donovan N. (2002) *Clin. Chem.*, **48**, 1362-1364.
9. Colpitts T.L., Billing-Medel P., Friedman P., Granados E.N., Hayden M., Hodges S., Menhart N., Roberts L., Russell J., Stroupe S.D. (2001) *Biochemistry*, **40**, 11048-11059.
10. Kataoka A., Mori M., Sadanaga N., Ueo H., Tsuji K., Rai Y. (2000) *Int. J. Oncol.*, **16**, 1147-1152.
11. Anker P., Mulcahy H., Stroun M. (2003) *Int. J. Cancer*, **103**, 149-152.
12. El-Sharkawy, Labib B.S. (2007) *Turkish J. Cancer*, **37**(3), 89-97.
13. Watson M., Fleming T. (1996) *Cancer Res.*, **56**, 860-865.

Поступила: 09. 10. 2014.
Принята к печати: 28. 02. 2015.

MAMMAGLOBIN IN PERIPHERAL BLOOD AND TUMOR IN BREAST CANCER PATIENTS

V.K. Bozhenko¹, N.V. Kharchenko², E.F. Vaskevich¹, E.A. Kudinova¹, A.V. Oorzhak¹, N.I. Rozhkova⁴, I.D. Trotsenko²

¹Russian Scientific Center of Roentgenoradiology,
86 Profsoyuznaya str., Moscow, 117997 Russia; tel.: +7(495)120-8190

²People Friendship University of Russia,
6 Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198 Russia; tel.: +7(495)434-5300; e-mail: trotsenkoivan@mail.ru

³Clinical diagnostic centre No.1,
29, bld. 2, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117485 Russia; tel.: 8(495)195-13-00; e-mail: evaskevich@mail.ru

⁴National center of Oncology of the reproductive organs,
3 2-nd Botkinsky pr., Moscow, 125284 Russia; tel.: 8(495)945-80-20; e-mail: NVRozhova@mail.ru

Currently, no molecular biological markers do exist for early diagnosis of breast cancer. One of the possible candidates for the marker of early breast cancer is mammaglobin (MGB1) or SCGB2A2 (secretoglobin, family 2A, member 2), characterized by the maximal expression level in early breast cancer. Using the RT-PCR method MGB1 mRNA expression was examined in 57 tumor tissue samples and 57 samples of morphologically non-malignant tissue (MNT) of breast cancer (BC) patients. Specificity and sensitivity of the MGB1 mRNA assay in peripheral blood of BC patients was evaluated by nested PCR. 169 blood samples (from 95 BC patients, 22 from patients with benign breast tumors, 28 from patients with tumors of other localizations, and 24 samples from healthy donors) have been analyzed. MGB1 expression was significantly higher in BC tissue samples compared to MNT (p=0.0019). The maximal expression level was in the samples T1 (p=0.013), stage I BC (p=0.037), GI (p=0.0019). The MGB1 expression positively correlated with expression of estrogen (p = 0,034) and progesterone (p=0.0004) receptors. Sensitivity and specificity of the MGB1 mRNA assay in peripheral blood were 60.6% and 92.3%, respectively. Expression of MGB1 was higher in BC than MNT and it decreased during BC progression. The sensitivity and specificity of the MGB1 mRNA assay may be used as an additional diagnostic method.

Key words: breast cancer, mRNA mammaglobin expression, mammaglobin in peripheral blood