

---

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ мРНК МАММАГЛОБИНА КАК МАРКЕРА РАННЕГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ\*

**В.К. Боженко**

Клинико-диагностическая лаборатория  
ФГБУ РНЦРР Минздрава РФ  
*ул. Профсоюзная, 86, Москва, Россия, 117997*

**В.А. Солодкий**

ФГБУ РНЦРР Минздрава РФ  
*ул. Профсоюзная, 86, Москва, Россия, 117997*

**Н.В. Харченко, И.Д. Троценко**

Кафедра онкологии и рентгенорадиологии  
Российский университет дружбы народов  
*ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, Россия, 117198*

**Д.Ю. Трофимов**

ОАО «ДНК-технология»  
*Варшавское шоссе, 125Ж, корп. 6, эт. 5, Москва, Россия*

**Е.А. Кудинова, Е.Ф. Васкевич**

Клинико-диагностическая лаборатория  
ФГБУ РНЦРР Минздрава РФ  
*ул. Профсоюзная, 86, Москва, Россия, 117997*

**О.В. Бурменская**

Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН  
*ул. Опарина, 4, Москва, Россия, 117997*

Было исследовано 114 образцов ткани молочной железы, из них 57 образцов рака молочной железы (РМЖ) I—IV стадии и 57 образцов неизменной ткани молочной железы. Экспрессия мРНК hMAM оценивалась методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией.

Экспрессия hMAM в образцах РМЖ значительно превышала значения для неизменной ткани ( $p = 0,0019$ ). Также экспрессия hMAM снижалась при увеличении размеров опухоли ( $p = 0,013$ ), стадии заболевания ( $p = 0,037$ ) и степени злокачественности ( $p = 0,0019$ ). По результатам корреляционного анализа экспрессия генов рецепторов стероидных гормонов и hMAM статистически значимо коррелировала в морфологически неизменной ткани ( $p < 0,05$ ), но не в РМЖ.

Таким образом, экспрессия hMAM снижается при прогрессировании РМЖ, а также коррелирует с экспрессией рецепторов стероидных гормонов в морфологически неизменной ткани. Определение экспрессии мРНК hMAM может быть использовано в качестве дополнительного маркера при диагностике РМЖ.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, опухолевая прогрессия, экспрессия мРНК, маммаглобин, утероглобин.

Значение маммаглобина как маркера прогрессирования рака молочной железы во многом является противоречивым до настоящего времени. С одной стороны, наличие значительных и статистически достоверных отличий экспрессии в клетках РМЖ и уникальный характер изменения экспрессии гена при прогрессировании заболевания представляются крайне привлекательными для клинического использования, с другой стороны, за 16 лет с момента клонирования гена достаточной информации о клинической и прогностической его ценности так и не на-

---

\* Работа выполнена при поддержке гранта Минобрнауки.

коплено, не говоря уже о том, что его функции также остались неизвестными. Впервые кДНК маммаглобина была клонирована Вотсоном в 1996 году [1]. Выделенный им ген расположен на хромосоме 11q12.2 [2] и кодирует белок, относящийся к семейству эпителиальных секреторных белков утероглобинов, состоит из 93 аминокислотных остатков, связанных с сигнальной гидрофобной последовательностью из 19 аминокислот. Как правило, кодируемый геном белок hMAM определяется в ткани молочной железы в комплексе с BU101, также известным как липофилин В [3].

Во многом уникальной особенностью hMAM как маркера опухолевой прогрессии при раке молочной железы является вектор изменения его экспрессии в зависимости от фенотипа опухоли. В исследованиях, в которых проводилась оценка изменения экспрессии маммаглобина при сравнении с морфологическими характеристиками опухоли, отмечено наличие обратной корреляции между уровнем его экспрессии и распространенностью заболевания [4].

Целью настоящего исследования была оценка экспрессии мРНК hMAM в различных типах ткани молочной железы (неизменная ткань, фиброаденома и рак молочной железы), а также поиск возможных корреляций с клинико-морфологическими характеристиками опухоли у больных раком молочной железы.

**Материалы и методы.** Всего было исследовано 114 образцов ткани молочной железы, из них 57 образцов рака молочной железы (РМЖ) I—IV стадии и 57 образцов неизменной ткани молочной железы в качестве контрольной группы. В группу больных раком молочной железы вошли больные в возрасте от 36 до 87 лет, средний возраст составил  $57,2 \pm 11,6$  лет. По гистологическому строению в 63% случаев опухоль представляла собой инфильтративный протоковый рак. Более чем в 70% размер первичной опухоли не превышал 5 см. Регионарные и отдаленные метастазы отсутствовали в 54,4 и 93%, соответственно. В таблице ниже представлены основные клинико-морфологические характеристики больных РМЖ.

Все пациентки проходили обследование и получали лечение в хирургических отделениях ФГБУ Российский научный центр рентгенрадиологии в период с ноября 2008 по июль 2009 года. После получения информированного согласия от пациентов забор исследуемого материала проводился во время операции по поводу рака молочной железы или фиброаденомы. После получения ткань немедленно помещалась в стабилизирующий раствор (РНК-лейтер) и хранилась при  $-70$  °С. В каждом случае одновременно производился забор неизменной ткани на расстоянии от зоны операции, после морфологического подтверждения данная ткань включалась в исследование как морфологически неизменная.

**Выделение РНК.** Образцы тканей вынимали из раствора для хранения материала, гомогенизировали. Выделение РНК проводили согласно инструкции с помощью наборов реагентов для выделения РНК («ДНК-технология», Россия) или комплекта реагентов для выделения РНК («Syntol», Россия) или RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, USA). Объем образцов после выделения составил 100 мкл.

*Проведение обратной транскрипции.* Реакцию обратной транскрипции ставили, используя наборы НПО «ДНК Технология» согласно инструкции. Реакцию проводили при температуре 40 °С в течение 30 минут, с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95 °С в течение 5 минут. Для увеличения объемов образцов после ОТ кДНК разводили в 10 раз в ТЕ-буфере.

Для постановки ПЦР использовали реактивы фирмы «ЗАО НПФ ДНК-Технология». Контроль отсутствия реакции на геномной ДНК ставили с образцами, не прошедшими реакцию обратной транскрипции, которые разводили в ТЕ-буфере в конечной концентрации, эквивалентной конечной концентрации кДНК.

Аmplификацию осуществляли в режиме «реального времени» в объеме 35 мкл по следующей программе: 1 цикл — 80 °С 30 сек., 94 °С 1 мин.; 50 циклов — 94 °С 10 сек., 64 °С 20 сек., использовали приборы «ДТ-322» и «ДТ-964» производства фирмы ЗАО «НПФ ДНК-Технология». Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 64 °С.

Уровень экспрессии мРНК измеряли в относительных единицах, определяемых методом сравнения индикаторных циклов (Ср). Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием методов непараметрического анализа.

Подбор праймеров и зондов осуществляли путем анализа последовательностей ДНК и мРНК генов базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

**Результаты исследования.** Экспрессия маммаглобина в образцах рака молочной железы значительно и статистически значимо превышала пороговый уровень неизменной ткани ( $p = 0,0019$ ). Кроме того, наблюдались определенные тенденции изменения экспрессии hMAM при увеличении размеров опухоли ( $p = 0,033$ ), стадии заболевания ( $p = 0,037$ ) и степени злокачественности ( $p = 0,035$ ). Вероятным объяснением повышения экспрессии в образцах Т4, значения которой сравнимы с Т2, являются различные подходы к стадированию заболевания по категориям Т1—3, где в основе лежит размер первичной опухоли, и Т4, где учитывается распространение на соседние структуры. При этом средний объем ткани опухоли в образцах Т2 и Т4 был равен  $4,46 \pm 1,2$  см.

Также экспрессия hMAM статистически значимо снижалась при увеличении стадии заболевания.

Проводилась оценка экспрессии маммаглобина в зависимости от различных морфологических характеристик опухоли в образцах РМЖ. Достоверные отличия были получены только для степени злокачественности (G), где наблюдалось значительное снижение экспрессии hMAM в случае G3.

Корреляции экспрессии hMAM с РЭ и РП была оценена в связи с наличием сообщений некоторых авторов о роли рецепторов стероидных гормонов в регуляции экспрессии маммаглобина. Экспрессия генов рецепторов стероидных гормонов и hMAM статистически значимо коррелировала в морфологически неизменной ткани ( $p < 0,05$ ). В образцах РМЖ значения экспрессии hMAM, ESR и PGR вели себя как независимые переменные, при этом было отмечено появление корреляции hMAM — HER-2/neu, отсутствовавшее в неизменной ткани.

**Корреляционный анализ экспрессии генов рецепторов стероидных гормонов в морфологически неизменной ткани и при раке молочной железы**

Показатель	Корреляционный анализ экспрессии мРНК маммаглобина	
	Морфологически неизменная ткань	PMЖ
ESR	<b>0,273993*</b>	0,134431
PRG	<b>0,428892</b>	0,245917
HER-2/new	0,232443	<b>0,331189</b>

\*Выделены значения корреляции для которых  $p < 0,05$ .

Таким образом, полученные результаты оценки информативности обнаружения мРНК маммаглобина в крови как метода диагностики PMЖ позволяют говорить о перспективности его использования не только для мониторинга опухолевого процесса, но и как возможного диагностического маркера PMЖ.

**Обсуждение результатов.** Маммаглобин является привлекательной диагностической мишенью по нескольким причинам. Во-первых, продемонстрированные в настоящем исследовании и описанные рядом авторов закономерности экспрессии выгодно отличают его от других маркеров PMЖ, во-вторых, определение экспрессии именно на уровне мРНК обладает рядом преимуществ по сравнению с анализом экспрессии ДНК и белка. Это связано с сочетанием достаточного количества копий мРНК в клетке и высокой чувствительностью метода. Именно сочетание высокой экспрессии мРНК hMAM на начальных стадиях заболевания с достаточной для анализа концентрацией молекул в периферической крови вызывают повышенный интерес клиницистов. В настоящем исследовании мы описали наличие взаимосвязи между экспрессией hMAM и клинико-морфологическими характеристиками опухоли, а также динамику экспрессии в окружающей опухоль морфологически неизменной ткани в зависимости от особенностей опухоли. Экспрессия hMAM была зафиксирована во всех исследуемых образцах. Эти результаты отличаются от данных [5] некоторых авторов, которые описали отсутствие экспрессии hMAM в ряде исследуемых образцов PMЖ, в основном в ткани инфильтративного протокового рака высокой степени злокачественности (G3). Возможно, эти отличия связаны с различной точностью используемых методов, так как в нашей работе в отличие от указанных выше авторов проводилась количественная оценка экспрессии. Однако в целом нами отмечена тенденция к уменьшению уровня экспрессии hMAM в низкодифференцированных опухолях, что не противоречит данным литературы [6]. Причины снижения экспрессии маммаглобина в низкодифференцированных опухолях до настоящего времени неизвестны. Можно обсуждать несколько гипотез: во-первых, hMAM может принимать непосредственное участие в механизмах дифференцировки клеток, и его экспрессия может снижаться в процессе злокачественной трансформации. В пользу этой гипотезы свидетельствуют данные, указывающие на то, что при трансфекции кДНК утероглобина на клеточные линии PMЖ в клетках активируется экспрессия этого гена и восстанавливаются некоторые черты нормального фенотипа [7], кроме того, ген маммаглобина локализован на 11q12.2—13.1 хромосоме, делеции или мутации данного региона описаны при различных формах злокачественных заболеваний

[8]. Во-вторых, не исключено, что экспрессия hMAM, как и ряд других внутриклеточных процессов, находится под контролем каскадных путей стероидных гормонов, что, например, характерно для ряда других представителей семейства утероглобинов. В нашем исследовании отмечена положительная корреляция между уровнем экспрессии hMAM и наличием рецепторов стероидных гормонов (EP, PP), но только при анализе неизменной ткани, и в этом случае не исключена роль рецепторов стероидных гормонов в процессах регуляции активности hMAM. Возможно, подобный механизм реализуется в процессе физиологического развития эпителия. Однако в случае же РМЖ подобная корреляция отсутствовала, что может свидетельствовать о выходе механизмов экспрессии hMAM из-под контроля стероидных каскадных путей; одновременно нами было отмечено появление корреляции с HER-2/neu при РМЖ, что также не исключает наличия механизмов, связывающих процессы экспрессии hMAM и HER-2/neu. В литературе не удалось найти возможного объяснения данных результатов, и судить о распространении влияния HER-2/neu опосредованных механизмов на контроль экспрессии hMAM не представляется возможным, однако можно утверждать, что в случае нарушения процессов дифференцировки эпителиальной клетки при развитии рака молочной железы имеет место ремоделирование механизмов контроля этого процесса, маркером чего может служить hMAM. Единого мнения по данным мировой литературы по данному вопросу нет: ряд авторов указывает на возможное наличие связи между экспрессией hMAM и рецепторами стероидных гормонов при РМЖ, хотя в других работах продемонстрировано отсутствие подобной зависимости [9].

Тенденции изменения экспрессии маммаглобина в морфологически неизменной ткани при РМЖ могут являться следствием системного эффекта, оказываемого злокачественной опухолью на окружающую ткань. Одинаковый вектор изменения экспрессии маммаглобина в морфологически нормальной ткани и в ткани опухоли в зависимости от размера опухоли и степени злокачественности может свидетельствовать о том, что данные результаты вряд ли являются случайными, кроме того для тенденций изменения экспрессии в ткани опухоли в зависимости от стадии заболевания, а также в морфологически неизменной ткани в зависимости от уровня экспрессии HER2/neu в референтных образцах (морфологически неизменная ткань для стадии заболевания и ткань опухоли для экспрессии HER2/neu) подобных закономерностей отмечено не было. С этих позиций изменение экспрессии маммаглобина представляется куда более интересным, чем маркер клинического прогрессирования заболевания, отражая системный характер онкологического заболевания.

**Заключение.** Определение экспрессии маммаглоина при РМЖ представляет собой интересное сочетание анализа функциональной роли данного гена в процессах метаболизма как нормальной, так и злокачественной клетки, с одной стороны, и возможного клинического значения результатов как маркера нарушения этих процессов, с другой. Значительное повышение его экспрессии при РМЖ представляет большой клинический интерес, однако недостатки понимания его биологической роли не позволяют идентифицировать ряд морфологических или биологических признаков, которые позволили бы диверсифицировать показания для выбора пациентов, для которых анализ был бы максимально информативным.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Боженко В.К., Васкевич Е.Ф., Кудинова Е.А., Чазова Н.Л., Берцанская А.М., Мельникова Н.В., Тащян А.А., Слонов А.В.* Возможности оценки экспрессии маммаглобина при различной патологии молочной железы. Литературный обзор // Вест РНЦПР. — М., 2010. — № 9. — С. 35—43.
- [2] *Боженко В.К., Васкевич Е.Ф., Чазова Н.Л. и др.* Исследование экспрессии мРНК маммаглобина А при различной патологии молочных желез // Вест РНЦПР. — М., 2009. — № 9. — С. 55—58.
- [3] *Adkins K.L.* Partial nephrectomy safely preserves renal function in patients with a solitary kidney // *J. Urol.* — 2003. — Vol. 169. — P. 79—81.
- [4] *Albani J.M., Novick A.C.* Renal pseudoaneurysm after partial nephrectomy: three case reports and a literature review // *Urology.* — 2003. — Vol. 62. — P. 227—231.
- [5] *Ardela D.E., Miguel M.B., Gutierrez D.J.M.* Comparative study of differential renal function by DMSA and MAG-3 in congenital unilateral uropathies // *Cir. Pediatr.* — 2002. — Vol. 15. — P. 118—121.
- [6] *Yeo E.E., Low J.C.* Intrarenal arteriovenous fistula simulating a hypervascular renal tumor on radionuclide renal imaging // *Clin. Nucl. Med.* — 1995. — Vol. 20. — P. 549—550.
- [7] *Zajic T., Moser E.* Procedure guidelines for dynamic renal scintigraphy // *Nuklearmedizin.* — 2004. — Vol. 43. — P. 177—180.
- [8] *Zecchin R., Monici M., Englaro G.C.* Tradioisotopes in the diagnosis of diseases of the kidney // *Friuli Med.* — 1964. — Vol. 19. — P. 456—468.
- [9] *Zecchin R., Giannoni R.* Is scintigraphy a useful means of diagnosis of renal neoplasms? // *Friuli Med.* — 1964. — Vol. 19. — P. 1079—1095.

## MAMMAGLOBIN MRNA EXPRESSION AS EARLY BREAST CANCER MARKER

**V. Bojenko, V. Solodky, E. Kudinova,  
E. Vaskevich**

Scientific Center of Roentgenoradiology of RAMS  
*Profsoyuznaya str., 86, Moscow, Russia, 117997*

**N. Kharchenko, I. Trotsenko**

Department of oncology and radiology  
People's Friendship University of Russia  
*Miklukho-Maklaya str., 6, Moscow, Russia, 117198*

**D. Trofimov**

“DNA Technology”  
*Varshavskoe str., 125, Moscow, Russia*

**O.V. Burmenskaya**

Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology  
*Oparin str., 4, Moscow, Russia, 117997*

Early breast cancer (BC) diagnosis is a basis for overall and relapse-free survival improvement. But methods of X-ray and morphological examination sometimes are failed in BC diagnosis. New molecular markers may give more information about BC progression. One of these markers is mammaglobin.

We studied 114 tissue samples: 57 I—IV stages BC samples and 57 samples of morphologically normal breast tissue (MNBT). mRNA mammaglobin expression was assessed by qPCR with reverse transcription.

mRAN mammaglobin expression was significantly higher in BC samples as compared to MNBT ( $p = 0,0019$ ), besides expression level decreased during BC progression: minimal level in T3 ( $p = 0,0338$ ), grade 3 ( $p = 0,037$ ) and stage IV ( $p = 0,035$ ) tumors. hMAM expression correlated with steroid receptors (estrogen receptor, progesterone receptor) in MNBT ( $p < 0.05$ ), but not in BC tissue.

hMAM mRNA expression decreased during BC progression and correlated with steroid receptors in MNBT. hMAM expression profiling may be used as a marker in BC diagnosis.

**Key words:** breast cancer, tumor progression, hMAM expression, mammaglobin, uteroglobin.

## REFERENCES

- [1] *Bozhenko V.K., Vaskevich E.F., Kudinova E.A., Chazova N.L., Berschanskaya A.M., Melnikova N.V., Tashchyan A.A., Slonov A.V.* Mammaglobin expression features in various pathologies of the breast. Review // *Bull. RNTSRR*. — M., 2010. — № 9. — P. 35—43.
- [2] *Bozhenko V.K., Vaskevich E.F., Chazova N.L. et al.* Study of mammaglobin A mRNA expression in various pathologies of the mammary glands // *Bull. RNTSRR*. — M., 2009. — № 9. — P. 55—58.
- [3] *Adkins K.L.* Partial nephrectomy safely preserves renal function in patients with a solitary kidney // *J. Urol.* — 2003. — V. 169. — P. 79—81.
- [4] *Albani J.M., Novick A.C.* Renal pseudoaneurysm after partial nephrectomy: three case reports and a literature review // *Urology*. — 2003. — V. 62. — P. 227—231.
- [5] *Ardela D.E., Miguel M.B., Gutierrez D.J.M.* Comparative study of differential renal function by DMSA and MAG-3 in congenital unilateral uropathies // *Cir. Pediatr.* — 2002. — V. 15. — P. 118—121.
- [6] *Yeo E.E., Low J.C.* Intrarenal arteriovenous fistula simulating a hypervascular renal tumor on radionuclide renal imaging // *Clin. Nucl. Med.* — 1995. — V. 20. — P. 549—550.
- [7] *Zajic T., Moser E.* Procedure guidelines for dynamic renal scintigraphy // *Nuklearmedizin*. — 2004. — V. 43. — P. 177—180.
- [8] *Zecchin R., Monici M., Englaro G.C.* Tradioisotopes in the diagnosis of diseases of the kidney // *Friuli Med.* — 1964. — V. 19. — P. 456—468.
- [9] *Zecchin R., Giannoni R.* Is scintigraphy a useful means of diagnosis of renal neoplasms? // *Friuli Med.* — 1964. — V. 19. — P. 1079—1095.