

УДК 577.29

## ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЙ ПОДХОД К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ГИСТИДИНБОГАТОГО ГЛИКОПРОТЕИНА И КАДГЕРИНА-Е В СУПЕРНАНТАХ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ И БИОПТАТА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЕЁ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОМ И НЕЗЛОКАЧЕСТВЕННОМ ЗАБОЛЕВАНИИ

© 2020 г. А. И. Аутеншлюс<sup>1,2,\*</sup>, А. В. Бернадо<sup>1</sup>, А. А. Студеникина<sup>1</sup>, А. В. Проскура<sup>2</sup>,  
К. И. Давлетова<sup>1</sup>, И. П. Жураковский<sup>1,2</sup>, С. А. Архипов<sup>1,2</sup>, Н. А. Варакин<sup>3</sup>,  
С. В. Сидоров<sup>4</sup>, академик РАН В. В. Ляхович<sup>2</sup>

Поступило 11.09.2019 г.  
После доработки 11.09.2019 г.  
Принято к публикации 11.09.2019 г.

Исследован материал пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа (ИКНТ) и незлокачественными заболеваниями (НЗ) молочной железы. При сравнении концентрации гистидинбогатого гликопротеина (HRG) и кадгерина-Е (CDH1) статистически значимые различия между ИКНТ и НЗ были получены по HRG в супернантате клеток крови и при его спонтанной продукции биоптатами, а по CDH1 при его индуцированной продукции, а также по индексам влияния поликлональных активаторов на продукцию CDH1. При сравнении показателей экспрессии иммуногистохимических маркёров между ИКНТ и НЗ статистически значимых различий получено не было.

*Ключевые слова:* протеомика, гистидинбогатый белок, кадгерин-Е, иммуногистохимические маркёры, заболевания молочной железы

DOI: 10.31857/S2686738920010023

В работе [1] показано, что экспрессия мРНК гистидинбогатого гликопротеина (HRG) при инвазивной карциноме неспецифического типа (ИКНТ) наблюдалась в 70% случаев, но также обнаружена и при незлокачественных заболеваниях молочной железы (НЗ), что, на наш взгляд, связано с экспрессией в биоптатах НЗ иммуногистохимических (ИГХ) маркёров эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП): коллагена II типа (СII), бета-1-интегрина (CD29) и кадгерина-Е (CDH1). Известно, что анализ на уровне транскриптов не всегда может отражать клеточные функции вследствие различных биологических механизмов, в то время как протеом более точно отражает функциональное состояние клетки [2, 3].

Опухолевые клетки секретируют характерные белки, которые могут обнаруживаться в крови и других жидкостях организма [4]. Это побудило нас расширить исследования и изучить концентрации HRG и CDH1, потеря которого как раз свидетельствует об ЭМП.

Целью работы явилось определение концентрации гистидинбогатого белка и кадгерина-Е в супернантатах клеток крови и биоптатов ткани при влиянии на них поликлональных активаторов и изучение в биоптатах экспрессии иммуногистохимических маркёров при опухолях молочной железы.

Материалом служила периферическая кровь и биоптаты молочной железы 23 пациентов, 12 из которых имели ИКНТ, а 11 – НЗ (фиброаденоматоз и фиброаденомы с гиперплазией и без неё). Все исследования были проведены в соответствии с Хельсинской декларацией. От каждого пациента получено информированное согласие на проведение исследования. Этический комитет ФГБОУ ВО НГМУ дал разрешение на проведение этого исследования.

Для индуцирования продукции HRG и CDH1 использовали комплекс поликлональных актива-

<sup>1</sup> Новосибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики, ФИЦ, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> АО «Вектор-Бест», Кольцово Новосибирской обл., Россия

<sup>4</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск Россия

\*e-mail: lrciir@211.ru

**Таблица 1.** Концентрации гистидинбогатого гликопротеина (HRG) и кадгерина-Е (CDH1) в супернатантах иммунокомпетентных клеток крови и биоптатов при спонтанной и индуцированной продукции и индексы влияния поликлональных активаторов при ИКНТ и НЗ молочной железы

Диагноз	HRG				CDH1			
	Концентрация в супернатанте нг/мл			у.е.	Концентрация в супернатанте пг/мл			у.е.
	ИКК крови	СП биоптатами	ПА биоптатами	ИВПА	ИКК крови	СП биоптатами	ПА биоптатами	ИВПА
ИКНТ	3666	3436	3335	0.97	5443	7162	6218	0.87
	4005	3809	2376	0.62	8177	19460	6641	0.34
	3986	4064	1845	0.45	7509	17456	5217	0.30
	3944	4164	3639	0.87	6193	12987	5644	0.44
	3681	3326	1823	0.55	7780	14643	5669	0.39
	3904	3474	1846	0.53	8720	3901	980	0.25
	3614	3346	2024	0.61	5993	12499	4689	0.38
	3847	3529	1071	0.30	7633	14181	2535	0.18
	3809	3592	1180	0.33	8498	3901	775	0.20
	3759	3449	1373	0.40	6691	7410	251	0.03
	3754	3239	1327	0.41	6889	8868	2912	0.33
	2802	1704	2262	1.33	14168	7728	16505	2.14
	ФАМ с пролиферацией и перидуктальным воспалением	2622	1618	482	0.30	9137	6776	9187
Внутрипротоковый папилломатоз на фоне ФАМа	2369	2309	1438	0.62	9483	8647	10836	1.25
ФАМ с участками склерозирующего аденоза	2056	1378	1070	0.78	9931	9582	9483	0.99
ФАМ с протоковой гиперплазией и участками склерозирующего аденоза	2301	971	507	0.52	13003	9681	12637	1.31
ФА, смешанный тип с участками протоковой гиперплазии	2515	2359	1947	0.83	9137	9582	8210	0.86
ФА с выраженной протоковой гиперплазией	1976	1939	1643	0.85	8745	8892	14436	1.62
	2251	2807	2654	0.95	8355	6494	8892	1.37
ФА	3104	2525	991	0.40	9384	14758	10432	0.71
	3861	4090	2892	0.71	4360	5769	3515	0.61
ФА смешанного типа	3760	3994	2768	0.69	5343	10147	4916	0.49
ФАМ с участками склерозирующего аденоза	2641	2823	1163	0.41	8550	10836	11396	1.05

Примечание. ФАМ – фиброаденоматоз, ФА – фиброаденома, ИКК – иммунокомпетентные клетки крови, СП – спонтанная продукция, ПА – индуцированная продукция, ИВПА – индекс влияния ПА.

торов (ПА) (АО “Вектор-Бест”, Россия). Биоптаты, полученные методом трепанобиопсии, делили на две части по 8 мм<sup>3</sup>. Одну часть инкубировали в питательной среде DMEM-F12 для определения спонтанной продукции, а другую – в таком же объеме среды при 37°C в течение 72 ч с комплексом ПА для определения индуцированной продукции, после чего клетки осаждали центрифугированием при 2000 об/мин, 15 мин и получали супернатант. Супернатант иммунокомпетентных клеток (ИКК) крови получали следующим образом: цельную кровь в количестве 1 мл помещали в стерильный флакон с 4 мл питательной среды DMEM-F12 и культивировали при 37°C в течение 24 ч, затем осаждали центрифугированием в вышеуказанном режиме. Концентра-

ции HRG и CDH1 в супернатантах определяли иммуноферментным анализом с использованием специфичных наборов производства “Cloud-Clone Corp.” (США) согласно стандартной инструкции. Индекс влияния поликлональных активаторов (ИВПА) на продукцию протеинов биоптатами опухолей высчитывали по формуле  $ИВПА = A/B$ , где  $A$  – концентрация протеина в супернатанте после инкубации биоптата с ПА, а  $B$  – концентрация протеина в супернатанте биоптата без стимуляции ПА.

Кроме того, в срезах биоптатов молочной железы определяли экспрессию маркеров ЭМП: С11, CD29 и CDH1. ЭМП представляет собой сложный и динамический процесс, который включает в себя трансдифференцировку клеток

**Таблица 2.** Отношения экспрессии СП и CD29 к ее отсутствию (Н/О) и отношения отсутствия экспрессии CDH1 к ее наличию (Н/Э)

Диагноз	CDH1	CD29	СП
ИКНТ	0.018	0.302	0.117
	0.031	0.008	0.009
	0.209	0.200	0.072
	0.357	0.021	0.137
	0.241	0.132	0.175
	0.219	0.029	0.002
	0.012	0.206	0.056
	0.025	0.069	0.130
	0.066	0.055	0.193
	0.002	0.082	0.186
ФАМ с пролиферацией и перидуктальным воспалением Внутрипротоковый папилломатоз на фоне ФАМа ФАМ с участками склерозирующего аденоза ФАМ с протоковой гиперплазией и участками склерозирующего аденоза ФА, смешанный тип с участками протоковой гиперплазии ФА с выраженной протоковой гиперплазией	0.012	0.003	0.184
	0.035	0.011	0.450
	0.227	0.130	0.069
	1.515	0.231	0.123
	0.064	0.137	0.069
	0.107	0.156	0.253
	0.433	0.141	0.254
	0.157	0.057	0.020
	0.350	0.341	0.137
	0.512	0.136	0.075
ФА	0.090	0.099	0.208
	0.072	4.102	0.372
ФА смешанного типа	0.072	4.102	0.372
ФАМ с участками склерозирующего аденоза	0.255	0.112	0.127

**Примечание.** ФАМ – фиброаденоматоз, ФА – фиброаденома.

посредством изменений в состоянии клетки [5, 6]. Иммуногистохимическое исследование экспрессии СП, CD29 и CDH1 проводили на парафиновых срезах опухолей с использованием набора Vectastain Universal Elite ABC Kit (“Vector Laboratories”, USA) [7]. Анализ экспрессии изучаемых маркёров проводился с помощью морфометрического комплекса на базе микроскопа Микромед-6, цифровой камеры DSM 510 и программного обеспечения ImageJ 1.42g (Национальный институт здоровья, США). Для каждого пациента оценивалось по 10 изображений (площадь каждого составляла 95 578 мкм<sup>2</sup>). Подсчитывали относительное количество клеток, либо экспрессирующих (Э), либо не экспрессирующих каждый маркёр (Н). Для удобства оценки использовали отношения Э/Н для СП и CD29 и Н/Э для CDH1.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни при помощи Statistica V6.0.

При определении HRG в супернатантах ИКК крови и в супернатантах биоптатов при спонтанной и индуцированной продукции (табл. 1) были получены статистически значимо более высокие концентрации в супернатантах ИКК крови ( $p = 0.002$ ) и при спонтанной продукции биоптатами ( $p = 0.016$ )

больных ИКНТ по сравнению с НЗ молочной железы.

При определении CDH1 в супернатантах клеток крови, при спонтанной и индуцированной продукции в супернатантах биоптатов ткани молочной железы (табл. 1), концентрация CDH1 в супернатантах биоптатов больных ИКНТ, индуцированных ПА ( $p = 0.007$ ), была статистически значимо выше по сравнению с показателями НЗ.

При сравнении ИВПА на продукцию HRG и CDH1 статистически значимые более высокие ИВПА на продукцию CDH1 были получены при НЗ молочной железы ( $p = 0.002$ ) за счет индуцированной ПА продукции протеина по сравнению с ИКНТ (табл. 1).

Статистически значимых различий по показателям экспрессии ИГХ маркёров в препаратах биоптатов (табл. 2) между ИКНТ и НЗ не было получено (СП  $p = 0.268$ ; CD29  $p = 0.097$ ; CDH1  $p = 0.196$ ). Эти результаты свидетельствуют о том, что несмотря на имеющиеся у пациентов незлокачественные заболевания в их биоптатах были обнаружены клетки, экспрессирующие СП и CD29 и потерявшие способность к экспрессии CDH1, следовательно, данные клетки находятся в состоянии ЭМП. Этот процесс приводит к потере

эпителиальных особенностей и приобретению мезенхимальных свойств, таких как подвижность, инвазивность и устойчивость к апоптозу, т.е. к появлению клеточной атипичности, что в конечном счете может приводить к их трансформации в злокачественный фенотип [8], которая, однако, зависит от способности иммунной системы индивидуума элиминировать атипичные клетки.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей работы.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансирование исследования за счет государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации.

#### СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Все исследования были проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Все лица, участвующие в исследовании, дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Исследование одобрено комитетом по этике ФГБОУ ВО НГМУ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аутеншлюс А.И., Голованова А.В., Студеникина А.А., Брусенцов И.И., Проскура А.В., Жураковский И.П., Ар-

хитов С.А., Сидоров С.В., Вавилин В.А., Ляхович В.В. // ДАН. 2019. Т. 484. № 5. С. 624–628.

2. Shukla H.D., Mahmood J., Vujaskovic Z. Integrated Proteo-genomic Approach for Early Diagnosis and Prognosis of Cancer // *Cancer Lett.* 2015. V. 369. № 1. P. 28–36.
3. Zeidan B.A., Townsend P.A., Garbis S.D., et al. Clinical Proteomics and Breast Cancer // *Surgeon.* 2015. V. 13. № 5. P. 271–8.
4. Ankney J.A., Xie L., Wrobel J.A., et al. Novel Secretome-to-Transcriptome Integrated or Secretome-transcriptomic Approach to Reveal Liquid Biopsy Biomarkers for Predicting Individualized Prognosis of Breast Cancer Patients // *BMC Med. Genomics.* 2019. V. 12. № 78. P. 1–20.
5. Kumar S., Das A., Sen S. Extracellular Matrix Density Promotes EMT by Weakening Cell-cell Adhesions // *Mol. Biosyst.* 2014. V. 10. № 4. P. 838–50.
6. Lin J.H., Lee W.J., Wu H.C., et al. Small G Protein Signalling Modulator 2 (SGSM2) is Involved in Oestrogen Receptor-Positive Breast Cancer Metastasis Through Enhancement of Migratory Cell Adhesion via Interaction with E-cadherin // *Cell Adh. Migr.* 2019. V. 13. № 1. P. 120–37.
7. Tang X.B., Dong P.L., Wang J., et al. 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. 477–83.
8. Savci-Heijink C.D., Halfwerk H., Hooijer G.K.J., et al. Epithelial-to-mesenchymal Transition Status of Primary Breast Carcinomas and its Correlation with Metastatic Behavior // *Breast Cancer Res. Treat.* 2019. V. 174. №3. P. 649–59.

## PERSONALIZED APPROACH TO DETERMINATION OF HISTIDINE-RICH GLYCOPROTEIN AND CADHERIN-E IN SUPERNATANTS OF IMMUNOCOMPETENT BLOOD CELLS AND BREAST BIOPSY SPECIMENS IN ITS MALIGNANT AND NON-MALIGNANT DISEASE

A. I. Autenshlyus<sup>a,b,#</sup>, A. V. Bernado<sup>a</sup>, A. A. Studenikina<sup>a</sup>, A. V. Proskura<sup>b</sup>, K. I. Davletova<sup>a</sup>, I. P. Zhurakovskiy<sup>a,b</sup>, S. A. Arkhipov<sup>a,b</sup>, N. A. Varaksin<sup>c</sup>, S. V. Sidorov<sup>d</sup>, and Academician RAN V. V. Lyakhovich<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Novosibirsk State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>c</sup> AO "Vector-Best", 630559 Russia, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

<sup>d</sup> National Research Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

#e-mail: lpciip@211.ru

The material of patients with invasive carcinoma of a nonspecific type (ICNT) and non-malignant diseases (ND) of the mammary gland was studied. When comparing the concentrations of histidine-rich glycoprotein (HRG) and cadherin-E (CDH1), statistically significant differences between ICNT and ND were obtained by HRG in the supernatant of blood cells and its spontaneous production by biopsies, and by CDH1 with its induced production, as well as by influence indices polyclonal activators for the production of CDH1. When comparing the expression of immunohistochemical markers between ICNT and ND, no statistically significant differences were obtained.

**Keywords:** proteomics, histidine-rich glycoprotein, cadherin-E, immunohistochemical markers, breast diseases