

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**ИЗМЕРЕНИЕ ЭСТРОГЕНОВ В ТКАНЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЕТОДОМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

*Д.А. Олисов¹, В.В. Чаговец², Н.Л. Стародубцева², А.А. Сметник², В.В. Родионов², В.В. Кометова²,
К.С. Чингин³, В.Е. Франкевич^{2*}*

¹Сколковский институт науки и технологий, Сколково

²Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова, 117513, Москва, ул. Академика Опарина, 4, стр 2; *e-mail: vfrankevich@gmail.com

³East China University of Technology, Nanchang, China

Воздействие эстрогенов считается одним из основных факторов риска развития рака молочной железы, однако механизмы действия этого фактора до конца не изучены. В связи с этим актуальным является создание методов оценки содержания эстрогенов в тканях молочной железы. В данной работе представлены результаты разработки метода количественного определения эстрогена и эстрадиола в образцах ткани молочной железы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией. Аналиты экстрагировали метил-трет-бутиловым эфиром в ультразвуковой бане и дериватизировали дансилхлоридом. Были рассмотрены варианты нормировки количественных данных на исходную массу ткани и на массу экстрагированных липидов. Точность и прецизионность конечного метода были выше 20% для большинства концентраций. С помощью метода были проанализированы уровни эстрогена и эстрадиола в образцах нормальной и злокачественной ткани молочной железы. Разработанный метод может быть использован в дальнейших исследованиях влияния эстрогена на риск развития рака молочной железы.

Ключевые слова: эстрогены; рак молочной железы; ВЭЖХ-МС

DOI: 10.18097/BMCRM00147

ВВЕДЕНИЕ

Стероидные гормоны регулируют множество жизненно важных функций в организме человека и поэтому широко используются в клиническом анализе для диагностики различных заболеваний [1, 2]. Эстрогены, например, участвуют в развитии вторичных женских характеристик, однако их более продолжительное воздействие на протяжении всей жизни считается ведущей причиной риска развития рака молочной железы [3-5]. Многочисленные исследования были сосредоточены на изучении уровня циркулирующих эстрогенов; прямое измерение стероидов в молочной железе проводили преимущественно методом радиоиммуноанализа, и работы по данному направлению малочисленны [6-8].

Чтобы лучше понять роль локальных концентраций эстрогенов в развитии рака молочной железы (РМЖ), необходим точный метод, который может определять низкие физиологические концентрации гормонов. Преимущество использования для этой цели высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) по сравнению с иммуноферментным анализом заключается в повышенной чувствительности и селективности, а также одновременном количественном определении нескольких аналитов [9, 10].

Предыдущие работы по измерению эстрогенов в образцах ткани молочной железы (МЖ) с помощью ВЭЖХ-МС были сфокусированы на анализе тонкоигольных аспириатов ткани МЖ [11], образцов жировой ткани МЖ [12], и клеточной культуры РМЖ [13]. Тем не менее, разработка метода исследования ткани МЖ с быстрым приготовлением образцов, не требующим использования трудоемких

процедур экстракции, остается многообещающей. Более того, описанные методы различаются подходами к нормировке количества эстрогенов, оставляя открытой для обсуждения обоснованность каждого метода нормировки.

Таким образом, целью исследования была разработка метода определения содержания эстрогенов в тканях МЖ с помощью ВЭЖХ-МС. Основными требованиями к разрабатываемой методике были малое время и удобство для высокопроизводительных анализов, а также точность и чувствительность для количественного определения эстрогенов в образцах тканей молочной железы.

МЕТОДИКА

Проведено исследование на биоптатах рака молочной железы пациентов, проходящих лечение в Национальном медицинском исследовательском центре акушерства, гинекологии и перинатологии имени ак. В.И. Кулакова. Средний возраст пациенток составил 56 ± 7 лет. Половина пациенток ($n=10$) имели стадию pT1N0M0, вторая ($n=10$) – pT2N0M0.

Образцы ткани МЖ были собраны после мастэктомии у женщин в постменопаузе, а затем специалистом-гистологом для каждой пациентки были выделены злокачественная ткань МЖ и здоровая ткань и разделены на две части для гистологического и масс-спектрометрического анализа. Образцы последних замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C

В работе использовали следующие химические вещества: эстрон (E1) («Sigma-Aldrich», Италия), эстрадиол (E2) («Sigma-Aldrich», Китай), 17β -эстрадиол-D5 («Sigma-Aldrich», США), муравьиная кислота (98%,



Таблица 1. Условия масс-спектрометрического анализа для каждого аналита

Аналиты	M1* (Да)	M3* (Да)	DP* (В)	EP* (В)	CE* (В)	CXP* (В)
Эстрон, количественный переход	504.110	171.100	56	10	43	14
Эстрон, качественный переход	504.110	115.100	56	10	113	14
Эстрадиол, качественный переход	506.213	170.700	46	10	47	16
Эстрадиол, количественный переход	506.213	115.000	46	10	119	18
Эстрадиол-ВС, количественный переход	511.201	171.100	101	10	45	20
Эстрадиол-ВС, качественный переход	511.201	115.000	101	10	119	8

Примечание: * - параметры масс-анализатора: M1, M3 – масса иона в дальтонах, на которую настраивается первый и третий квадруполь; DP – потенциал декластеризации (Declustering Potential), В; EP – входной потенциал (Entrance Potential), В; CE – энергия столкновений (Collision Energy), В; CXP – выходной потенциал из ячейки столкновений (Collision Cell Exit Potential), В.

для масс-спектрометрии, «Sigma-Aldrich», Германия), деионизированная вода, приготовленная с помощью системы очистки воды Milli-Q Reference («Molsheim», Франция), ацетонитрил (для ВЭЖХ, «Fisher Chemicals», Великобритания), метанол (для ВЭЖХ, «Fisher Chemicals», Великобритания), метил-трет-бутиловый эфир (МТБЭ) (для ВЭЖХ, «Sigma-Aldrich», США), дансилхлорид ($\geq 99.0\%$, «Sigma-Aldrich», Швейцария) и карбонат натрия ($\geq 99.8\%$, «Sigma-Aldrich», США).

Для дериватизации эстрогенов были приготовлены растворы дансилхлорида в ацетонитриле (1 г/л) и карбоната натрия в воде (10 ммоль/л).

Стандартные растворы эстрогенов готовили растворением 1 мг в 1 мл метанола. Рабочие стандарты (10 пг/мл, 50 пг/мл, 100 пг/мл, 1000 пг/мл) были приготовлены путем последовательного разбавления стандартных растворов и последующего добавления в пул из нескольких экстрактов тканей, полученных способом, описанным в разделе подготовки образцов. Раствор 17 β -эстрадиола-D5 в метаноле (10 нг/мл) использовали в качестве внутреннего стандарта (эстрадиол-ВС).

Образцы тканей взвешивали и помещали в пластиковые пробирки. Затем добавляли 1 мл МТБЭ и 10 мкл раствора внутреннего стандарта. Экстракцию проводили в ультразвуковой бане в течение 15 мин при комнатной температуре. После переноса органического слоя в новые пробирки экстракцию повторяли с добавлением 1 мл МТБЭ и 200 мкл воды. Объединенный экстракт сушили в атмосфере азота и взвешивали липидный остаток. Полученные массы использовали для нормировки сигнала эстрогенов. После добавления 0.5 мл холодного метанола смесь встряхивали в течение 1 минуты и центрифугировали в течение 5 минут при 15000 g. Супернатант переносили в пластиковые пробирки и сушили в атмосфере азота. Дериватизацию проводили добавлением 20 мкл растворов дансилхлорида и карбоната натрия. Образцы встряхивали и инкубировали 10 мин при 70° С. Далее добавляли 60 мкл раствора ацетонитрил/вода (50/50, об./об.), после раствор переносили в стеклянные виалы для анализа. Подготовка образцов проводили по методике, описанной ранее [11]. Объединенные образцы экстрактов тканей были получены путем объединения экстрактов из 5 частей одного образца ткани.

Образцы анализировали с использованием жидкостного хроматографа серии Agilent 1200 («Agilent Technologies», Германия). Хроматографическое разделение проводили на колонке Kinetex C18 (2.1 \times 50 мм, размер частиц сорбента 2.6 мкм, «Phenomenex», США). Объем дозируемых проб 50 мкл. Расход элюента 0.4 мл/мин. Температура колонки 30° С. Подвижная фаза А – деионизированная вода с

добавлением муравьиной кислоты (0.1%), В – ацетонитрил с добавлением муравьиной кислоты (0.1%). Градиент подвижной фазы (фаза В) был следующим: от 30% до 99% 0-3 мин; 99%, 3-5.7 мин; от 99% до 43% 5.7-6 мин; 30%, 6-10 мин.

Система ВЭЖХ была соединена с тройным квадрупольным масс-спектрометром AB Sciex QTRAP 5500 («ABSciex», Сингапур). Количественную оценку выполняли с помощью мониторинга множественных реакций (MRM) в режиме положительных ионов. Переходы MRM и их параметры для каждого аналита и внутреннего стандарта показаны в таблице 1.

Для калибровки метода к объединенным экстрактом тканей добавляли заданное количество эстрогенов (0 пг/образец, 5 пг/образец, 10 пг/образец, 20 пг/образец, 30 пг/образец, 40 пг/образец, 50 пг/образец, 100 пг/образец) и после анализировали с помощью ЖХ-МС/МС. Калибровочные кривые строили как отношение площадей пиков (аналит /внутренний стандарт) к количеству аналитов и корректировали по фоновому сигналу эстрогенов в объединенных экстрактах тканей.

Точность и воспроизводимость оценивали с использованием стандартных растворов, добавленных в экстракт ткани (2,5 пг/образец, 5 пг/образец, 10 пг/образец, 25 пг/образец, 100 пг/образец). Для каждой концентрации использовали 4 раствора.

Наконец, было проанализировано распределение эстрогенов в образцах здоровой и злокачественной ткани МЖ от 20 пациентов. Статистическую обработку данных анализа проводили в R (R Core Team, 2020) с использованием программного обеспечения RStudio («RStudio Team», 2020).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом разработки метода было определение оптимального способа подготовки образцов ткани МЖ. Для этого из трех разных участков биоптата ткани от одного пациента было взято несколько образцов одинаковой массы. Часть образцов без предварительного измельчения была перенесена в пробирки, вторая часть была разрезана на несколько крупных фрагментов, а третья часть была нарезана на предметном стекле на фрагменты порядка 0.3 мм. После этого проводили приготовление полученных образцов в соответствии с описанной процедурой. Для сравнения интенсивности сигнала эстрадиола и эстрона в образцах, приготовленных с помощью трех процедур, абсолютные значения интенсивности для каждого типа процедуры были нормированы на среднюю площадь хроматографического пика, полученную для образцов из

Таблица 2. Нормированные площади пиков эстрогенов для каждого участка и типа обработки. С помощью t-критерия Стьюдента проводилось сравнение для каждого типа измельчения

Эстрадиол					
Тип измельчения	Участок 1	Участок 2	Участок 3	Среднее значение	t-критерий Стьюдента
1	0.378	0.383	0.288	0.350	
2	0.317	0.271	0.344	0.311	0.256
3	0.305	0,346	0.368	0.340	0.426
Эстрон					
1	0.493	0.432	0.382	0.436	
2	0.258	0.307	0.455	0.340	0.200
3	0.248	0.261	0.163	0.224	0.005

Таблица 3. Воспроизводимость и точность методики.

Количество аналита (пг)	Воспроизводимость		Точность	
	RSD, E1(%)	RSD, E2 (%)	RME, E1(%)	RME, E2(%)
2.5	5.3	14.3	21.8	18.4
5	10.1	5.8	19.7	20.9
10	7.8	9.3	17.8	18.6
25	9.6	11.2	10.4	16.2
100	8.0	10.5	11.5	13.3

Примечание: здесь и далее RSD – относительное стандартное отклонение, RME – средняя ошибка аппроксимации, E1 – эстрон, E2 – эстрадиол.

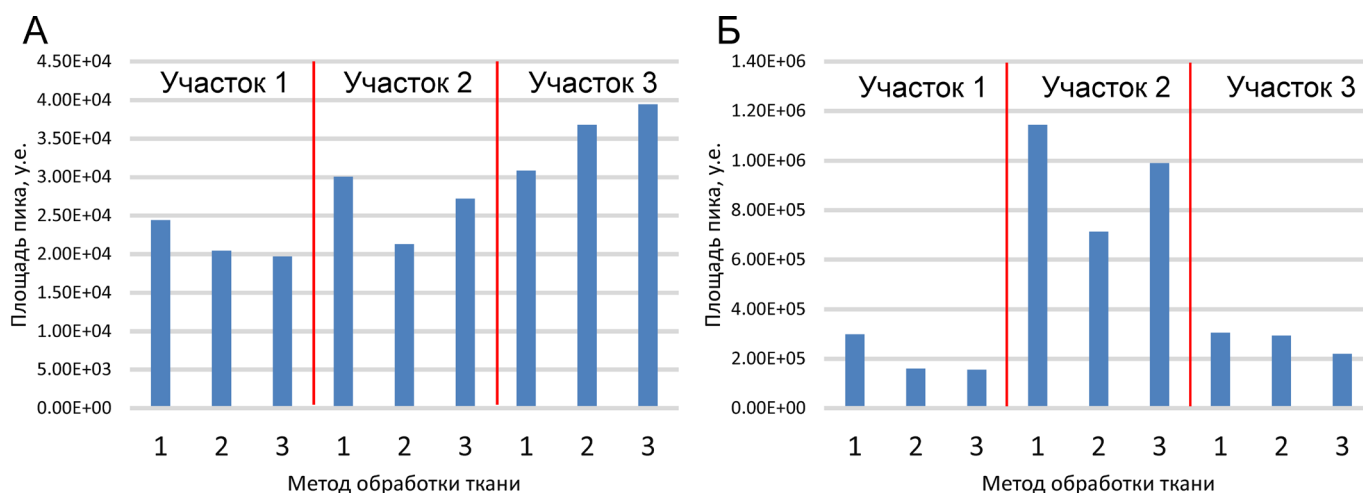


Рисунок 1. Абсолютные площади пиков эстрадиола (А) и эстрона (Б) в трех участках одного биоптата, для каждого из которых использовали три варианта измельчения перед этапом экстракции. 1 – цельный кусок, 2 – нарезанный на крупные части, 3 – мелко нарезанный.

одного участка ткани. Полученные площади сравнивались между каждым типом измельчения и образцами без измельчения с использованием t-критерия Стьюдента (табл. 2). В результате было обнаружено, что измельчение образца описанными выше способами искажает определяемое содержание гормонов, поскольку для эстрона нормированные площади для обоих типов измельчения были статистически значимо меньше по сравнению с площадью, полученной для образцов без измельчения. Уменьшение площади может быть связано с потерей доли аналитов в составе липидного остатка на предметном стекле который не был перенесен. Соответствующие абсолютные площади пиков представлены на рисунке 1. Экстракция из цельного куска ткани с использованием ультразвуковой ванны без предварительного измельчения может быть использована для приготовления образцов ткани, что было описано в предыдущих

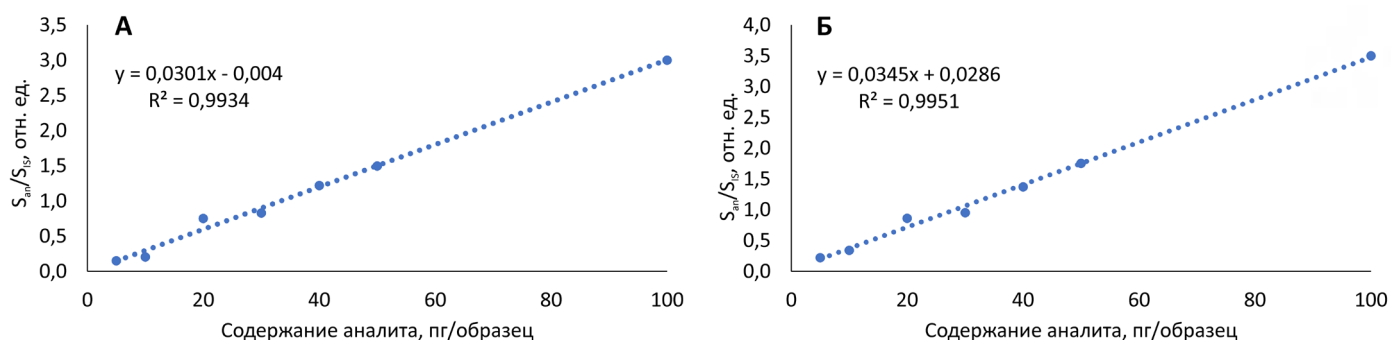
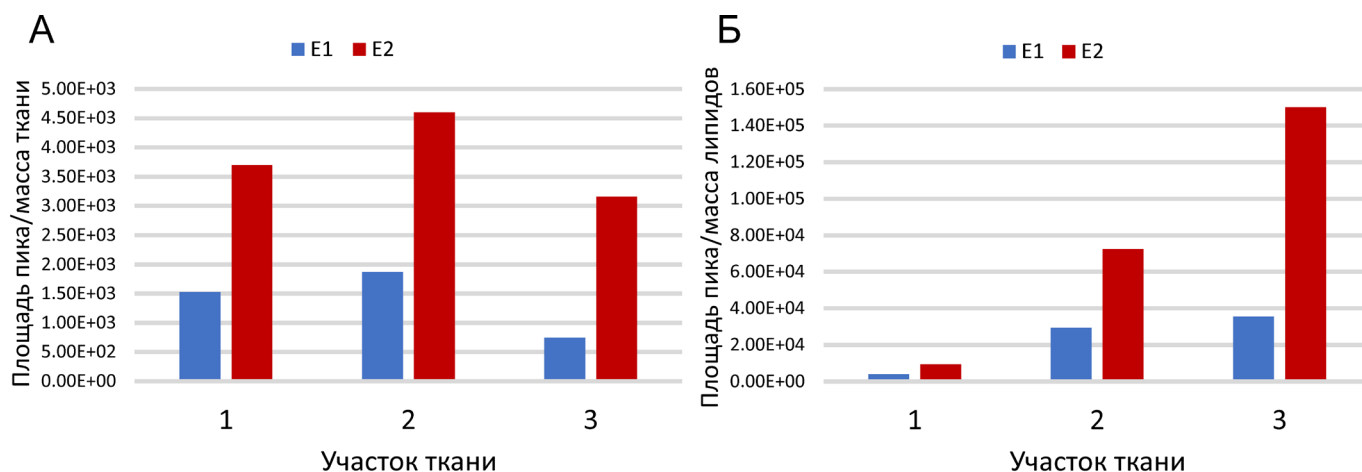
исследованиях [14]. Также была предпринята попытка осуществить механическую гомогенизацию образцов ткани по аналогии с ранее описанными процедурами [12,15], однако во время подготовки часть образца теряется в процессе, что может привести к искажению результатов. Поэтому было решено готовить все образцы тканей без измельчения.

При построении калибровочных кривых, сигнал аналитов был линейным в диапазоне 5-100 пг/образец ($R^2=0.9934$ и $R^2=0.9951$ для эстрона и эстрадиола соответственно). Градуировочные кривые представлены на рисунке 2.

Значения воспроизводимости и точности показаны в таблице 3. Воспроизводимость, которую оценивали по величине относительного стандартного отклонения и составила меньше 15% для всех измерений. Точность методики, оцениваемая по величине средней ошибки аппроксимации, была в интервале от 10.4 % до 21.8 %.

Таблица 4. Нормированные площади пиков эстрогена и эстрадиола, проанализированные в 3 участках одного биоптата.

S(E1) /масса ткани	RSD (%)	S(E2) /масса ткани	RSD (%)	S(E1) /масса липидов	RSD (%)	S(E1) /масса липидов	RSD (%)
1.53E+03		3.57E+03		4.02E+03		9.40E+03	
1.87E+03	42	4.60E+03	20	2.95E+04	73	7.24E+04	92
7.50E+02		3.16E+03		3.56E+04		1.50E+05	

**Рисунок 2.** Градуировочные кривые исследуемых эстрогенов (А - эстрон, Б - эстрадиол). S_{an} - площадь пика аналита, S_{is} - площадь пика внутреннего стандарта.**Рисунок 3.** Гистограмма нормированных площадей пиков эстрогена и эстрадиола в трех участках образца ткани молочной железы; А – нормировка на массу ткани, Б – нормировка на массу липидной фракции. E1 – эстрон, E2 – эстрадиол

Значения средней ошибки выше 15%, возможно, являются следствием интенсивного матричного эффекта и процесса дериватизации.

Сравнение методов нормировки на массу образца ткани или массу липидного остатка, которые были ранее описаны в работах [11, 12], выполнено с использованием трех образцов примерно одинаковой массы, взятых из трех разных частей биоптата от одного пациента и проанализированы. Нормированные площади пиков эстрогена и эстрадиола представлены в таблице 4. Более четкая демонстрация значительной разницы между площадями пиков эстрогенов, нормированных на массу ткани и нормированных на массу липидов, показана на рисунке 3. Нормировка на массу ткани не приводит к значительным различиям между образцами, однако нормировка на массу липидной фракции приводит к значительной вариации в 73 и 92% для эстрогена и эстрадиола соответственно. Этот факт заставляет задуматься о том,

является ли нормировка количества эстрогенов на массу липидной фракции подходящим методом.

Очевидно, что незначительные изменения количества жировой ткани в биоптате могут кардинально повлиять на нормировку площади пиков эстрогена и эстрадиола. Учитывая тот факт, что эпителиальная секреторная ткань МЖ окружена жировой тканью, потенциально небольшая примесь жировой ткани в биопсийном материале может значительно исказить концентрации гормонов при использовании метод нормировки их содержания на массе липидов.

Нормировка количества эстрогенов на массу ткани дает менее противоречивые результаты, однако все же значительные отклонения могут указывать на плохую воспроизводимость экстракции гормонов из ткани или неоднородность самой ткани с точки зрения содержания гормонов в ее различных частях. Для установления причины могут потребоваться дальнейшие исследования.

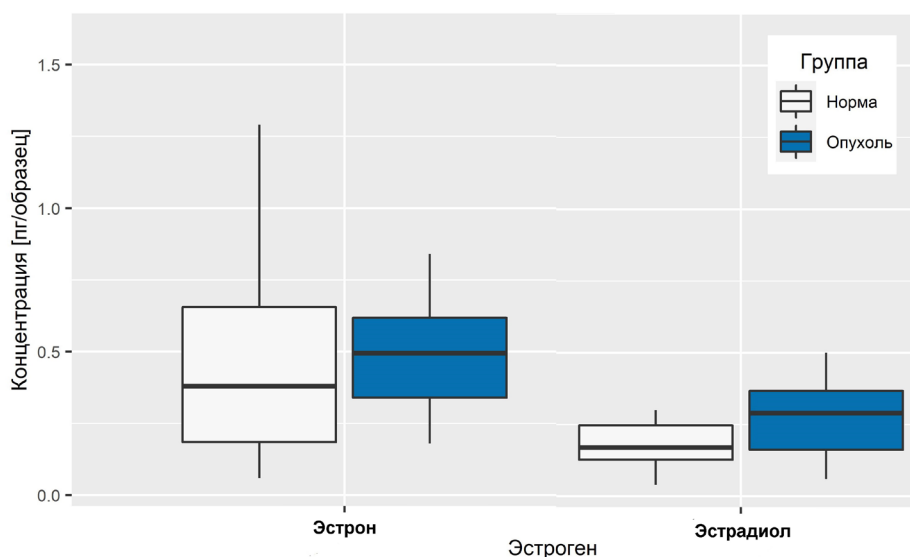


Рисунок 4. Распределение содержания эстрогенов в образцах здоровой ткани и неоплазии.

Наконец, уровни эстрадиола и эстрона были измерены в образцах нормальной и злокачественной ткани МЖ, взятых от 20 пациентов в менопаузе. Поддающиеся количественной оценке концентрации гормонов были обнаружены в 15 образцах из 20. Площади полученных хроматографических пиков были выше верхнего предела количественного определения в нескольких образцах. Данные представлены в виде диаграмм размаха на рисунке 4. Количество эстрогенов было нормировано на массу ткани (массы эстрогенов в пг делили на массу ткани в мг). Представленная диаграмма четко указывает на значительный разброс уровней эстрона как в норме, так и при патологии. По сравнению с эстроном наблюдается меньшая вариабельность содержания эстрадиола.

Сравнение содержания эстрогенов в образцах здоровой и злокачественной ткани с помощью теста Вилкоксона не продемонстрировало статистически значимой разницы (значения p для эстрона и эстрадиола составляют 0.1882 и 0.0868 соответственно). Корреляционный анализ позволил выявить корреляцию содержания эстрона в нормальной и злокачественной тканях (ρ Спирмена = 0.5640, $p = 0.0148$), в то время как для содержания эстрадиола статистически значимой корреляции не наблюдалось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан метод ВЭЖХ-МС/МС для одновременного измерения эстрона и эстрадиола в образцах ткани молочной железы, оценены воспроизводимость, точность и чувствительность методики. Несмотря на то, что не было обнаружено статистически значимой разницы между уровнями эстрогенов в нормальных и злокачественных образцах ткани молочной железы женщин в постменопаузе, многопараметрическое исследование с участием большого числа пациентов является перспективным для более глубокого понимания влияния эстрогенов на развитие рака молочной железы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все клинические исследования проводили в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации. Все пациенты прочитали и подписали

информированное согласие, одобренное этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени ак. В.И. Кулакова (протокол №9 от 22.11.2018).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке РФФИ и Национального фонда естественных наук Китая в рамках проекта № 19-515-55021.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Holst J.P., Soldin O.P., Guo T., and Soldin S.J. (2013) Steroid hormones: relevance and measurement in the clinical laboratory, NIH Public Access, **24** (1), 105–118. DOI: 10.1016/j.cll.2004.01.004
- Keevil B.G. (2016) LC-MS/MS analysis of steroids in the clinical laboratory, *Clinical Biochemistry*, **49** (13–14), 989–997. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2016.04.009
- Russo J.R. and I.H. (2007) The role of estrogen in the initiation of breast cancer, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **102** (1–5), 89–96. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2006.09.004
- Hamajima N., et al. (2012) Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies, *The Lancet Oncology*, **13** (11), 1141–1151. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70425-4
- Dall G.V., Britt K.L. (2017) Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk, *Frontiers in Oncology*, **7**, 1–10. DOI: 10.3389/fonc.2017.00110
- Vermeulen A., Deslypere J.P., Paridaens R., Leclercq G., Roy F., Heuson J.C. (1986) Aromatase, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase and intratissular sex hormone concentrations in cancerous and normal glandular breast tissue in postmenopausal women, *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, **22** (4), 515–525. DOI: 10.1016/0277-5379(86)90121-5
- Lønning P.E., Helle H., Duong N.K., Ekse D., Aas T., Geisler J. (2009) Tissue estradiol is selectively elevated in receptor positive breast cancers while tumour estrone is reduced independent of receptor status, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **117** (1–3), 31–41. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2009.06.005
- Giudicessi, J. R., & Ackerman, M. J. (2013). Determinants of incomplete penetrance and variable expressivity in heritable cardiac arrhythmia syndromes. *Translational Research*, **161**(1), 1-14. DOI: 10.1016/j.trsl.2012.08.005
- Wudy S.A., Schuler G., Sánchez-Guijo A., Hartmann M.F. (2018) The art of measuring steroids: Principles and practice of current hormonal steroid analysis, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **179**, 88–103. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.09.003

10. Taylor A.E., Keevil B., Huhtaniemi I.T. (2015) Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow, *European Journal of Endocrinology*, **173** (2), D1–D12. DOI: 10.1530/EJE-15-0338
11. Lee, O., Heinz, R. E., Ivancic, D., Muzzio, M., Chatterton, R. T., Zalles, C. M., ... & Khan, S. A. (2018). Breast hormone concentrations in random fine-needle aspirates of healthy women associate with cytological atypia and gene methylation. *Cancer Prevention Research*, **11**(9), 557–568. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-17-0323
12. Laforest S., et al. (2019) Simultaneous quantification of estrogens and glucocorticoids in human adipose tissue by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **195** (August), 105476. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105476
13. Huang H.J., Chiang P.H., Chen S.H. (2011) Quantitative analysis of estrogens and estrogen metabolites in endogenous MCF-7 breast cancer cells by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **879** (20), 1748–1756. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.04.020
14. Blonder J., et al. (2008) Quantitation of Steroid Hormones in Thin Fresh Frozen Tissue Sections, *Analytical Chemistry*, **80** (22), 8845–8852. DOI: 10.1021/ac801402a
15. Keski-Rahkonen P., Huhtinen K., Desai R., Tim Harwood D., Handelsman D.J., Poutanen M., Auriola S. (2013) LC-MS analysis of estradiol in human serum and endometrial tissue: Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization, *Journal of Mass Spectrometry*, **48** (9), 1050–1058. DOI: 10.1002/jms.3252

Поступила: 12.05.2021
 После доработки: 10.06.2021
 Принята к публикации: 15.06.2021

MEASUREMENT OF BREAST TISSUE ESTROGENS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY

D.A. Olisov¹, V.V. Chagovets², N. L. Starodubtseva², A.A. Smetnik², V.V. Rodionov², V.V. Kometova², K.S. Chingin³, V.E. Frankevich^{2}*

¹Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Russian Federation

²Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, 4 bld. 2 Oparina str., Moscow, 117513 Russia; e-mail: vfrankevich@gmail.com

³East China University of Technology, Nanchang, China

Although estrogen contribution to breast cancer development is not fully understood, an effective method of their measurement, in the mammary gland might provide additional insight. In this study, we have developed a LC-MS/MS method of simultaneous quantification of estrone and estradiol in breast tissue samples. Analytes were extracted with methyl tert-butyl ether by sonication and derivatized with dansyl chloride. Estrogens were analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with an electrospray ionization source. Accuracy and precision were better than 20% for most concentrations. Although estrone and estradiol levels in normal and malignant breast tissue samples analyzed using our method insignificantly differed. The method developed may be used in further studies aimed at evaluating a role estrogens in breast cancer risk.

Key words: estrogen; breast cancer; breast tissue; LC-MS/MS

FUNDING

This research was funded by RFBR and the National Natural Science Foundation of China (No. 19-515-55021 China_a).

Received: 12.05.2021, revised: 10.06.2021, accepted: 15.06.2021