

УДК 618.11-006.6-085.277.3:616-073.524:616-097

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ERCC1 ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗНЫХ КЛОНОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ – 8F1 И FL297

Т.А. Богуш\*, И.А. Мамичев, С.А. Калужный, Б.Е. Полоцкий, В.Т. Заркуа,  
А.С. Тюляндина, Е.А. Богуш, М.М. Давыдов

*(Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; \*e-mail: labmedchem@mail.ru)*

Проведена оценка согласованности результатов анализа экспрессии ERCC1 при использовании антител к ERCC1 клонов 8F1 и FL297. Количественное иммунофлуоресцентное исследование экспрессии маркера в ткани рака яичников проведено с использованием проточной цитофлуориметрии ( $n = 53$ ). Согласованность результатов оценивали посредством корреляционного анализа, а также методом Блэнда–Альтмана. Показано, что несмотря на широкий разброс показателей экспрессии ERCC1, полученных с использованием клонов 8F1 и FL297, оба клон позволяют достаточно точно выявить уровень экспрессии белка в опухоли, т.е. количество клеток в исследуемом опухолевом узле, экспрессирующих ERCC1.

**Ключевые слова:** иммунофлуоресцентный анализ, проточная цитофлуориметрия, серозный рак яичников, ERCC1.

Анализ множества работ по оценке клинической значимости молекулярных маркеров опухолей высветил важнейшую проблему – необходимость совершенствования методической базы подобных исследований. Очевидной стала необходимость строгой стандартизации и упрощения преаналитической подготовки опухолевого материала, важность строго количественной оценки экспрессии маркеров, исключая субъективизм анализа, и унификации методов, позволяющих нивелировать искажение результатов анализа вследствие гетерогенности опухоли.

Эти требования актуальны для всех опухолевых маркеров – как вошедших в рутинную лабораторную практику, так и находящихся на пути клинического внедрения. К последним относится ERCC1, белок эксцизионной репарации ДНК, в том числе и повреждений, ассоциированных с воздействием препаратов платины. Вклад ERCC1 в противоопухолевое действие препаратов платины доказан в многочисленных экспериментальных исследованиях и является общепринятым фактом [1]. При прочих равных условиях повышение активности ERCC1 сопровождается уменьшением цитотоксичности препаратов платины для опухолевых клеток, а снижение уровня ERCC1 приводит к повышению цитотоксичности. В клинической ситуации, когда биологиче-

ские характеристики опухоли у всех пациентов разные, выявить такую закономерность удается не всегда. И значительный вклад в неопределенность оценок могут вносить, помимо упомянутых выше методических проблем, разнообразие моноклональных антител к ERCC1 и их различная специфичность.

Показано, что наиболее часто используемые антитела к ERCC1 помимо ERCC1 выявляют еще один антиген – холинфосфат-цитидилтрансферазу альфа. Активность этого фермента, участвующего в синтезе фосфолипидов, регулируется белком RAS, который ассоциирован с резистентностью к препаратам платины [2, 3]. Таким образом, строгой специфичности антител к ERCC1 по отношению к ERCC1 нет, и антитела могут не подходить для анализа экспрессии этого маркера. Наиболее специфичными в отношении ERCC1 можно считать антитела к ERCC1 клонов 8F1 и FL297 [4].

В настоящем исследовании в целях определения возможного вклада неспецифической реактивности антител 8F1 в конечный результат определения экспрессии ERCC1 проведена сравнительная оценка результатов количественной оценки показателей экспрессии ERCC1 в одном и том же образце опухоли при использовании антител клонов 8F1 и FL297.

## Материалы и методы

Работа проведена на одноклеточных суспензиях, полученных из хирургических биопсийных образцов серозного рака яичников. Исследованы 53 опухолевых образца. Параметры экспрессии молекулярных маркеров оценивали с помощью ранее разработанного и запатентованного авторами количественного иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией, который адаптирован для исследования солидных опухолей [5, 6].

Для получения одноклеточной суспензии хирургические образцы рака яичников, зафиксированные в 4%-м растворе формальдегида, тщательно измельчали и инкубировали в растворе Версена при 37 °С в течение 30 мин. К измельченному образцу добавляли раствор фосфатного буфера (рН 7,4), гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе пятикратным движением пестика и фильтровали через фильтры «BD Falcon» с диаметром 40 мкм («Becton», «Dickinson and Company»). Полученную суспензию клеток центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин, осадок ресуспендировали в фосфатном буферном растворе (рН 7,4).

После получения одноклеточных суспензий клетки инкубировали в течение 1,5 ч со специфическими к ERCC1 первичными моноклональными антителами клонов 8F1 (ab2356, «Abcam», Великобритания) или FL297 (sc-10785, «Santa Cruz Biotechnology», США) в конечном разведении по 1:400 для каждого антитела. Далее в течение 1,5 ч проводили инкубацию с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями DyLight650 (ab98510 и ab98729, «Abcam», Великобритания) в конечном разведении 1:1000 для каждого антитела. Во всех расчетах контролем служили клетки, инкубированные только с вторичными антителами. Для выведения из анализа дегриса и эритроцитов после завершения инкубации с вторичными антителами клетки инкубировали в течение 15 мин со специфическим красителем ДНК Hoechst 33258 («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 1,2 мкг/мл. Анализировали только клетки с окрашенными ядрами, исключая клеточные конгломераты путем дополнительного гейтирования.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре «Navios» («Beckman Coulter», США). Для возбуждения флуоресценции использовали твердотельные диодные лазеры с длиной волны испускаемого света 405 и 638 нм. Регистрацию сигналов флуоресценции красителей

Hoechst 33258 и DyLight650 проводили в каналах FL-9 и FL-6 соответственно. Использовали средний показатель скорости подсчета анализируемых клеток; число анализируемых событий 5000. Точечные диаграммы распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре получали с помощью программы WinMDI 2.9, количество специфически флуоресцирующих клеток рассчитывали с помощью теста Колмогорова–Смирнова, включенного в программу FlowJo 10.0.8 («FlowJo LLC», США).

Проанализированы три показателя экспрессии ERCC1.

1. Уровень экспрессии – количество специфически флуоресцирующих клеток в процентном отношении к контролю (инкубация с вторичными антителами).

2. Интенсивность экспрессии (усл. ед.) – отношение средней специфической интенсивности флуоресценции к аналогичному показателю в контроле.

3. Интегральный индекс экспрессии – произведение доли клеток, экспрессирующих ERCC1, и интенсивности экспрессии маркера.

Для статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ STATISTICA 12.0 («Statsoft Inc.», США).

## Результаты и обсуждение

Перед началом основного этапа исследования были построены калибровочные кривые зависимости специфической флуоресценции клеток от концентрации антител, на основании которых выбраны рабочие концентрации специфических антител, находящиеся непосредственно перед и в начале выхода кривых на плато (далее – низкая и высокая концентрации антител).

При анализе экспрессии ERCC1 установлено, что при использовании моноклональных антител клонов 8F1 и FL297 маркер выявлен во всех исследованных образцах опухолей. Показатели уровня, интенсивности и интегрального индекса экспрессии ERCC1 в исследованной группе опухолей при использовании двух значений концентрации антител приведены в таблице.

По показателям экспрессии маркера опухоли отличались значительно, при этом отмечена четкая зависимость значений от концентрации использованных антител и сходство показателей при использовании моноклональных антител к разным эпитопам. Так, средний уровень экспрессии ERCC1 (количество клеток, экспрессирующих ERCC1) при низкой концентрации антител 8F1 и FL297 составил 46,2 и 48,5%, а при высокой – 64,2

**Сравнение параметров экспрессии ERCC1 при использовании моноклональных антител разных клонов – 8F1 и FL297**

Концентрация антител (1 < 2)	Среднее значение показателя ± стандартное отклонение		Диапазон значений показателя		Различия между группами (8F1/FL297), W-критерий Вилкоксона, <i>p</i>
	клон антител		клон антител		
	8F1	FL297	8F1	FL297	
Уровень экспрессии ERCC1					
1	46,2±10,2%	48,5±11,0%	24–64%	25–71%	0,18
2	64,2±9,2%	62,2±10,9%	40–80%	30–87%	0,15
Интенсивность экспрессии ERCC1					
1	3,1±1,2	3,0±0,8	1,5–7,6	1,8–5,1	0,66
2	5,6±2,6	5,0±1,6	2,4–16,2	2,4–9,4	0,07
Индекс экспрессии ERCC1					
1	1,5±0,9	1,5±0,7	0,4–4,4	0,5–3,6	0,9
2	3,5±2,1	3,2±1,5	1,0–12,6	0,7–8,1	0,06

Примечание: 1, 2 – низкая и высокая концентрация антител соответственно.

и 62,2% соответственно. Сходным был и разброс показателей уровня ERCC1 (диапазон между минимальными и максимальными значениями). При низкой и высокой концентрации антител этот показатель составил соответственно 24–64 и 40–80% (для 8F1), 25–71 и 30–87% (для FL297). Аналогичные закономерности отмечены при сравнительной оценке интенсивности и интегрального индекса экспрессии ERCC1 при использовании разных концентраций моноклональных антител разных клонов (таблица).

Для оценки статистической значимости различий между показателями экспрессии ERCC1 при попарном сравнении результатов окраски одних и тех же образцов опухоли разными моноклональными антителами (клоны 8F1 и FL297) использовали W-критерий Вилкоксона для связанных групп при пороговом уровне значимости  $p \leq 0,05$ . С помощью критерия Шапиро–Уилка для каждой анализируемой выборки показано, что во всех случаях распределение исследованных показателей соответствовало нормальному, поэтому в дальнейшем для описания всех распределений использовали среднее значение и стандартное отклонение.

Данные, представленные в таблице, показывают, что независимо от концентрации антител для

всех анализируемых параметров различия между попарно сравниваемыми группами не достигли статистической значимости. Тем не менее при высокой концентрации антител наблюдается отчетливая тенденция к увеличению различий между параметрами интенсивности и индекса экспрессии ERCC1, выявляемыми с использованием разных клонов. Средние значения этих показателей выше для клона 8F1 по сравнению с клоном FL297, при этом различия лишь немного не достигают порога статистической значимости ( $p = 0,07$  и  $p = 0,06$  соответственно).

Последнее наблюдение послужило основанием для дополнительной оценки силы связи между переменными – параметрами флуоресценции, полученными при использовании разных клонов антител. Для каждой выборки данных построены ожидаемые линии регрессии и подсчитан коэффициент корреляции Пирсона (рис. 1). В качестве независимых и зависимых переменных выбраны значения, полученные для клонов FL297 и 8F1 соответственно. Такой выбор обусловлен упомянутым выше фактом, что, согласно данным литературы, антитела клона FL297 специфичны по отношению к ERCC1 [4], в то время как антитела 8F1 имеют дополнительную неспецифическую

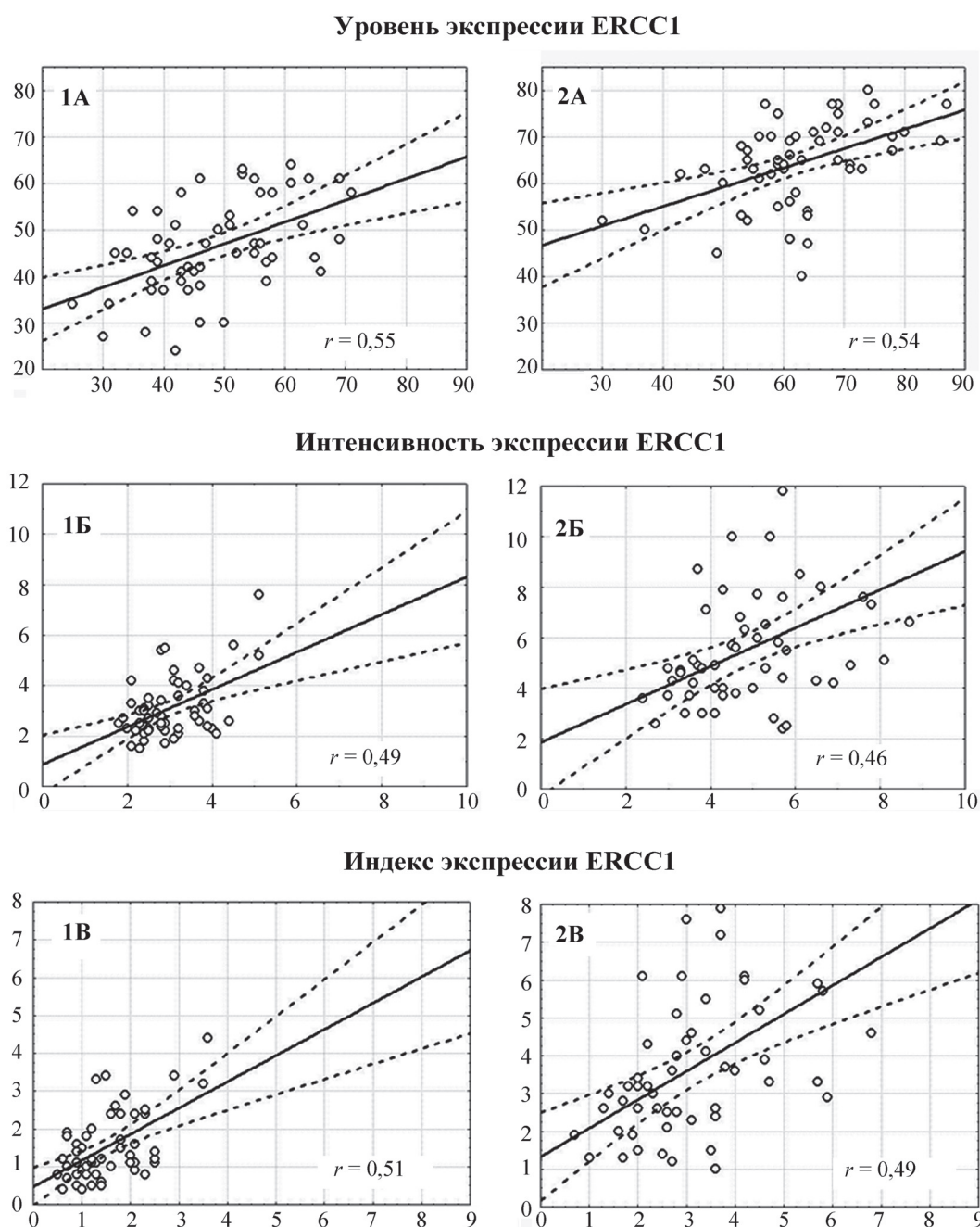


Рис. 1. Оценка соотношения между показателями экспрессии ERCC1 в ткани рака яичников при иммунофлуоресцентном анализе с использованием разных клонов моноклональных антител к ERCC1 (значения параметров экспрессии, полученные с использованием антител FL297 и 8F1, указаны по оси абсцисс и оси ординат соответственно). Линии на рисунках: сплошная – предполагаемая граница регрессии; пунктирные – 95% доверительный интервал. 1 (А–В) и 2 (А–В) – соответственно низкая и высокая концентрации антител;  $r$  – коэффициент корреляции показателей экспрессии ERCC1, полученных при использовании разных клонов антител к ERCC1

активность [2, 3]. Между двумя переменными в каждом случае отмечена умеренная или средняя корреляция. Коэффициент корреляции составил от 0,46 до 0,55. Это указывает на отсутствие тесной линейной связи между переменными. В дополнение к корреляционному анализу была проведена оценка согласованности результатов методом Блэнда–Альтмана.

Метод позволяет провести сравнение результатов измерений, выполненных двумя разными способами. Суть состоит в том, что для каждой пары измерений вычисляются разность и среднее значение. Средняя разность, вычисленная для всех пар признаков в исследуемом наборе данных, характеризует систематическое расхождение показателей, наличие которого указывает на неполное соответ-



ствие результатов, полученных разными методами, а стандартное отклонение разностей – степень разброса результатов. В том случае, если ни один из используемых методов (в данном случае – разных клонов антител) нельзя считать абсолютно надежным, истинное значение измеряемого признака (экспрессия ERCC1) наиболее адекватно описывается средним значением пары измерений [7, 8]. Результаты оценки согласованности показателей экспрессии ERCC1 в ткани рака яичников при иммунофлуоресцентном анализе с использованием разных клонов моноклональных антител к ERCC1 представлены на диаграмме Блэнда–Альтмана (рис. 2). Приведены разности показателей уровня, интенсивности и индекса экспрессии ERCC1 для каждого усредненного значения, полученного при использовании высокой или низкой концентрации сравниваемых клонов антител.

Наблюдаемый при низкой концентрации антител большой разброс разности показателей уровня экспрессии ERCC1 (95%-й доверительный интервал (ДИ) лежит в диапазоне от  $-22,9$  до  $18,4\%$ , а разброс средних значений составляет  $29$ – $65\%$  ERCC1-позитивных клеток) не позволяет с уверенностью свидетельствовать в пользу наличия или отсутствия согласованности результатов (рис. 2, А1). Тем не менее средняя разность между измерениями уровня экспрессии ERCC1 незначительна и составляет  $-2,2 \pm 2,9$ , что свидетельствует об отсутствии систематического расхождения. Это указывает на то, что разброс разностей может быть обусловлен случайными ошибками измерений и погрешностями метода, но не различиями в специфичности антител, так как систематического расхождения выявлено не было.

Аналогичные выводы можно сделать и для интенсивности экспрессии ERCC1, оцененной при низкой концентрации антител (рис. 2, Б1). Выявлен большой разброс разностей по сравнению со средними значениями (диапазон 95%-го ДИ от  $-2,0$  до  $2,2$ ; разброс средних от  $1,9$  до  $6,4$ ), но при этом отмечено отсутствие систематического расхождения (средняя разность показателей составляет  $0,1 \pm 0,3$ , что близко к нулю). Для показателя индекса экспрессии, как производной от интенсивности и уровня экспрессии ERCC1 (рис. 2, В1), картина оказалась сходной. Вычисленные показатели 95%-го ДИ (от  $-1,5$  до  $1,5\%$ ) и разброса средних (от  $0,5$  до  $4,0$ ) свидетельствуют об отсутствии систематического расхождения результатов анализа (средняя разность составила  $0,0 \pm 0,2$ ).

Результаты анализа согласованности показателей экспрессии ERCC1 в ткани рака яичников при

использовании моноклональных антител к ERCC1 разных клонов в высокой концентрации представлены на рис. 2.

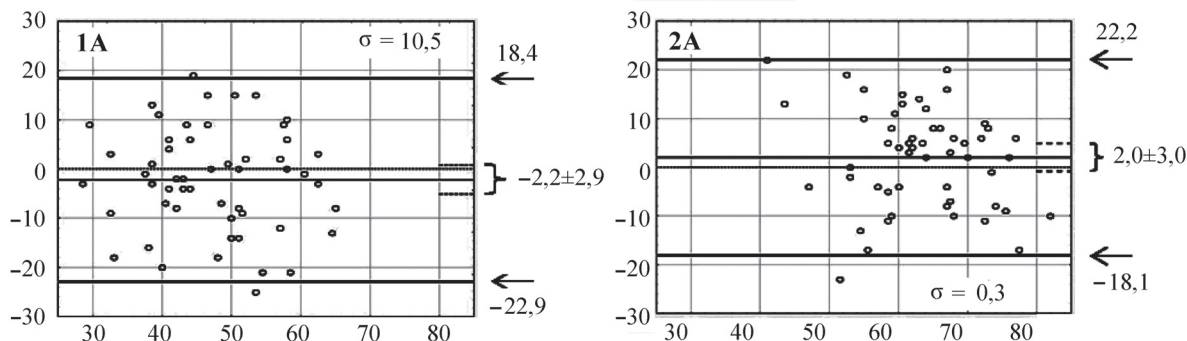
При использовании высокой концентрации антител (рис. 2, А2) наблюдается большой разброс разностей уровня экспрессии белка (95%-й ДИ лежит в диапазоне от  $-18,1$  до  $22,2\%$ , разброс средних значений уровня экспрессии составляет  $41$ – $82\%$ ). Согласованность результатов спорная. Важно, что обнаружена (в отличие от низкой концентрации антител) тенденция к появлению положительного систематического расхождения, величина которого составляет  $2,0 \pm 3,0$ . Это свидетельствует о том, что при высокой концентрации антитела 8F1 в отдельных случаях могут окрашивать больший процент клеток, чем FL297.

При сравнении значений интенсивности экспрессии ERCC1, выявленных с использованием высокой концентрации антител (рис. 2, Б2), диапазон 95%-го ДИ составляет от  $-3,9$  до  $5,1$ , а разброс средних значений – от  $2,7$  до  $12,8$ . Систематическое расхождение средней разности показателей было существенным и составило  $0,6 \pm 0,6$ . Это означает, что при высокой концентрации антитела разных клонов окрашивают клетки с разной интенсивностью – клон 8F1 дает более интенсивную окраску клеток, чем клон FL297. При анализе индекса экспрессии ERCC1 (рис. 2, В2) диапазон 95%-го ДИ составляет от  $-3,0$  до  $4,0$ , а разброс средних значений – от  $1,2$  до  $10,4$ . Систематическое расхождение средней разности показателей также существенно и составляет  $0,5 \pm 0,5$ .

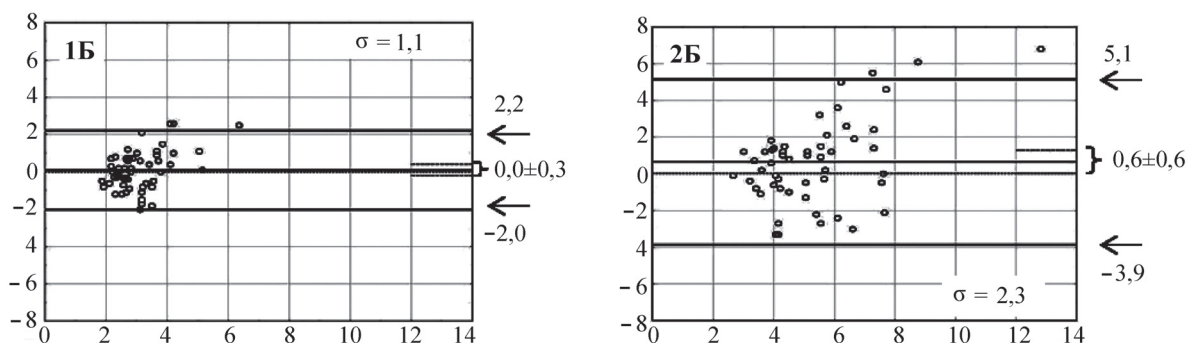
Обращает на себя внимание тот факт, что средняя разность показателей интенсивности и индекса экспрессии ERCC1 больше при высокой концентрации антител, чем при низкой. Систематическое расхождение для показателей интенсивности ( $0,0 \pm 0,3$ ) и индекса ( $0,0 \pm 0,2$ ) при увеличении концентрации антител возросло до  $0,6 \pm 0,6$  и  $0,5 \pm 0,5$  соответственно (рис. 2, Б, В). Это свидетельствует о вкладе неспецифического окрашивания клеток антителами 8F1 в результат иммунофлуоресцентной оценки экспрессии ERCC1. В данном случае речь идет, вероятно, о холинфосфат-цитидилтрансферазе альфа, сродство к которой антител 8F1 описано в литературе. При этом важно заметить, что систематическая ошибка появляется только при высокой концентрации антител. Это может указывать на меньшее сродство антител 8F1 к холинфосфат-цитидилтрансферазе альфа в сравнении с ERCC1, что согласуется с ранее опубликованными данными [2].

Приведенные результаты можно интерпретировать следующим образом. Антитела к ERCC1

**Уровень экспрессии ERCC1**



**Интенсивность экспрессии ERCC1**



**Индекс экспрессии ERCC1**

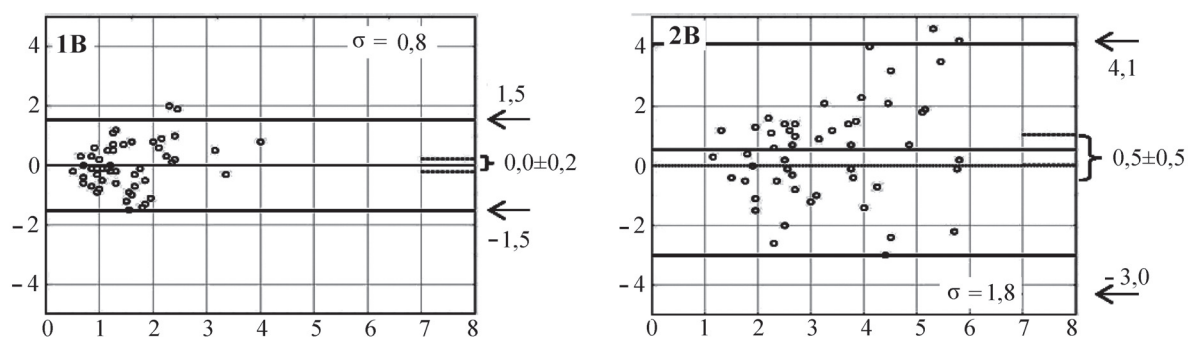


Рис. 2. Оценка согласованности показателей экспрессии ERCC1 в ткани рака яичников при иммунофлуоресцентном анализе с использованием разных клонов моноклональных антител к ERCC1 (метод Блэнда-Альтмана). По оси абсцисс – среднее значение показателя экспрессии ERCC1, полученного при анализе для одного и того же образца опухоли с использованием антител клонов 8F1 и FL297. По оси ординат – разность показателей экспрессии ERCC1, полученных при использовании антител клонов 8F1 и FL297. Центральная сплошная линия – средняя разность показателей, полученных при анализе одного и того же образца опухоли с использованием антител разных клонов. Линии крупным пунктиром – доверительный интервал. Верхняя и нижняя сплошные линии – пределы согласия (средняя разность  $\pm (1,96 \times \text{стандартное отклонение})$ ). Мелким пунктиром обозначена линия, соответствующая нулевой разности показателей экспрессии ERCC1. Номера 1 и 2 на рисунке означают, что результаты получены с использованием высокой или низкой концентрации антител соответственно;  $\sigma$  – стандартное отклонение

клонов 8F1 и FL297 позволяют достаточно точно выявить уровень экспрессии белка в опухоли, т.е. количество клеток в исследуемом опухолевом узле, экспрессирующих ERCC1. Данные, полученные с использованием антител этих клонов, хорошо согласуются между собой вне зависимости от концентрации антител в пределах исследованно-

го диапазона, а также от величины измеряемого признака. Умеренный коэффициент корреляции свидетельствует об отсутствии строгой линейной зависимости между результатами, полученными с использованием разных антител. При этом в каждой опухолевой клетке антитела клон 8F1 чаще дают более сильную флуоресценцию, чем анти-

тела клона FL297, что четко проявляется при высокой концентрации антител, которая находится в начале плато линейной зависимости интенсивности флуоресценции клеток от концентрации антител к ERCC1.

Таким образом, недостаточная специфичность антител клона 8F1 по отношению к ERCC1 не может быть причиной противоречивости данных о

прогностической значимости маркера. Противоречия обусловлены другими факторами. Необходимы строгая стандартизация и упрощение преаналитической подготовки. Крайне важны количественная оценка показателей экспрессии маркеров и разработка методов, позволяющих нивелировать гетерогенность опухоли, в том числе и по молекулярному фенотипу.

Исследование поддержано РФФИ (проекты № 15-04-06991-а и № 16-34-01049-мол-а).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богуш Т.А., Попова А.С., Дудко Е.А., Игнатова Е.А., Полоцкий Б.Е., Тюляндин С.А., Давыдов М.И. // Антибиотики и химиотерапия. 2013. Т. 58. № 7–8. С. 11.
2. Vaezi A.E., Bepler G., Bhagwat N.R., Malysa A., Rubatt J.M., Chen W., Hood B.L., Conrads T.P., Wang L., Kemp S.E., Niedernhofer L.J. // Cancer. 2014. Vol. 120. N 12. P. 1898.
3. Arsenault D.J., Yoo B.H., Rosen K.V., Ridgway N.D. // Journal of Biological Chemistry. 2013. Vol. 288. N 1. P. 633.
4. Rubatt J.M., Darcy K.M., Tian C., Muggia F., Dhir R., Armstrong D.K., Bookman M.A., Niedernhofer L.J., De-  
loia J., Birrer M., Krivak T.C. // Gynecologic Oncology. 2012. Vol. 125. N 2. P. 421.
5. Богуш Т.А., Дудко Е.А., Родионова М.В., Богуш Е.А., Кирсанов В.Ю., Родионов В.В., Воротников И.К. // Докл. АН. 2015. Т. 465. № 2. С. 235.
6. Богуш Т.А., Дудко Е.А., Гришанина А.Н., Заркуа В.Т., Богуш Е.А., Баширина А.А., Полоцкий Б.Е., Тюляндин С.А., Давыдов М.М., Давыдов М.И. // Докл. АН. 2017. Т. 472. № 2. С. 215.
7. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., 1999. С. 270 [Glantz S. Primer of Biostatistic. San Francisco, 1994. P. 270].
8. Giavarina D. // Biochemia Medica. 2015. Vol. 25. P. 141.

Поступила в редакцию 09.06.17

## COMPARATIVE ANALYSIS OF DATA OBTAINED BY IMMUNOFLUORESCENCE ESTIMATION OF ERCC1 EXPRESSION USING DIFFERENT CLONES OF MONOCLONAL ANTIBODIES 8F1 AND FL297

T.A. Bogush, I.A. Mamichev, S.A. Kaliuzhny, B.E. Polotskii, V.T. Zarkua, A.S. Tjulandina, E.A. Bogush, M.M. Davydov

(FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of Ministry of Health of the Russian Federation; e-mail: labmedchem@mail.ru)

**In the present research, we compared two datasets obtained from the quantitative estimation of ERCC1 protein using two monoclonal antibodies – 8F1 and FL297. Quantitative evaluation of immunofluorescence parameters was performed by flow cytometry on ovarian cancer biopsy specimens ( $n = 53$ ). Agreement between two different assays was estimated by correlation analyses and Bland-Altman plots. It was shown that, despite of large spread of differences between two measurements obtained by 8F1 and FL297, both clones may be used for estimation of ERCC1 expression level (i.e. number of positively stained cells) in tumor.**

**Key words:** immunofluorescence analysis, flow cytometry, serous ovarian cancer, ERCC1.

**Сведения об авторах** (все сотрудники ФГБУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина Минздрава России; e-mail: labmedchem@mail.ru): Богуш Татьяна Анатольевна – профессор лаборатории медицинской химии, докт. биол. наук; Мамичев Иван Андреевич – сотр. лаборатории медицинской химии; Калюжный Сергей Андреевич – сотр. лаборатории медицинской химии; Полоцкий Борис Евсеевич – профессор хирургического торакального отделения, докт. мед. наук; Заркуа Варлам Тенгизович – сотр. отделения клинической фармакологии и химиотерапии; Тюляндина Александра Сергеевна – сотр. отделения клинической фармакологии и химиотерапии; Богуш Елена Александровна – сотр. отделения клинической фармакологии и химиотерапии, канд. мед. наук; Давыдов Михаил Михайлович – зав. хирургическим торакальным отделением, член-корр РАН, докт. мед. наук.