

УДК 577.171.6:616-006:543.4

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ Pgp В СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЯХ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

Т.А. Богуш, М.В. Тихомиров, Е.А. Дудко, М.Н. Синицина, Р.Ю. Раманаускайте,  
Б.Е. Полоцкий, С.А. Тюляндин, М.И. Давыдов

*(Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина" РАМН; e-mail: labmedchem@mail.ru)*

Разработан и адаптирован для клинического применения иммунофлуоресцентный метод количественного определения уровня и интенсивности экспрессии в солидных опухолях человека маркера множественной лекарственной резистентности Pgp с использованием проточной цитофлуориметрии и моноклональных антител фирмы «BD Pharmingen» (клон 17F9). Особенность этапов проведения анализа заключается в следующем. Приготовление одноклеточной суспензии из хирургического биопсийного образца опухоли возможно как из нативной ткани, так и после ее фиксации 4%-м раствором формальдегида. В течение, по крайней мере, двух лет хранения опухолевого материала возможна верификация результатов анализа. Экономические затраты на проведение анализа снижены за счет увеличения продолжительности инкубации антител с исследуемыми клетками и уменьшения концентрации антител. Возможно исследование опухолевой ткани минимального размера (например, эндоскопические образцы) за счет понижения концентрации клеток в суспензии при проведении инкубации с антителами до 100 тыс./мл, а количества клеток, анализируемых на проточном цитофлуориметре – до 1000. По временным параметрам выполнения анализа разработанный метод, несмотря на свою протяженность, не требует изменения рабочего графика исследователей.

**Ключевые слова:** *P-гликопротеин, иммунофлуоресцентный анализ, проточная цитофлуориметрия, солидные опухоли человека.*

Одной из причин недостаточной эффективности лекарственного лечения многих заболеваний, в том числе и злокачественных новообразований, является множественная лекарственная резистентность, обусловленная активацией АТФ-зависимых транспортных белков, выбрасывающих препараты из клеток. Большинство широко применяемых в клинике противоопухолевых лекарств, в том числе и некоторые таргетные препараты, например ингибиторы тирозинкиназ иматиниб [1–3] и гефитиниб [4, 5], относятся к субстратам этих транспортных белков. Среди них наиболее изученным как по структуре, так и по механизму функционирования является Р-гликопротеин (P-glycoprotein, Pgp) – признанный маркер множественной лекарственной резистентности [6, 7].

Важность определения Pgp в ткани опухолей с целью предсказания чувствительности к химиотерапии не вызывает сомнения. Однако до настоящего времени в повседневной клинической практике оценка этого опухолевого маркера не проводится и в пер-

вую очередь из-за отсутствия четкой методической базы для такой оценки. Получаемые разными методами данные, которые фиксируют в клетке экспрессию мРНК гена, кодирующего Pgp, часто не коррелируют с ответом опухоли на химиотерапию. И это понятно, так как факт присутствия в клетке мРНК не означает, что с этой матрицы произойдет трансляция белка. Поскольку существует возможность регуляции образования белка на уровне трансляции, не выглядит неожиданностью тот факт, что в некоторых работах экспрессию мРНК выявляют в большем числе случаев, чем присутствие в клетке белка [8, 9]. Что касается наиболее часто используемого для оценки Pgp полуколичественного метода иммуногистохимии, то главным его недостатком является субъективизм при визуальной оценке результатов [10]. Это часто вносит неоднозначность в оценку экспрессии Pgp и приводит к противоречивости данных как об уровне экспрессии маркера в опухолях одной локализации, так и о корреляции экспрессии этого опухолевого маркера

с результатами химиотерапии [11–14]. Важность разработки адекватных количественных методов оценки уровня разных опухолевых маркеров, что необходимо для определения их прогностической и предикативной значимости, широко обсуждается в литературе. В полной мере это относится и к маркерам множественной лекарственной резистентности.

Цель настоящего исследования – разработка количественного иммунофлуоресцентного метода с использованием проточной цитофлуориметрии, адаптированного для оценки интенсивности и уровня экспрессии Pgp в клетках солидных опухолей человека.

### Материалы и методы

В работе использованы монослойные культуры клеток человека – рак шейки матки линии *HeLa*, аденокарцинома легкого линии *A549*, эпидермоидная карцинома легкого линии *Calu-1*, а также суспензионная культура Т-лимфобластного лейкоза линии *Jurkat* и образцы солидных опухолей человека, полученные во время хирургических операций.

Для приготовления суспензий клеток монослойных культур питательную среду из культурального матрикса сливали, монослой дважды промывали раствором фосфатного буфера (pH 7,4), добавляли раствор Версена до покрытия клеток тонким слоем жидкости и инкубировали в течение 20 мин при 37°C. Клетки снимали со дна флакона резиновым рабером, переносили в пробирку с раствором фосфатного буфера (pH 7,4), затем пипетировали до получения одноклеточной суспензии.

Суспензию клеток *Jurkat* в питательной среде осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 3 000 об/мин, дважды промывали и ресуспендировали осадок в растворе фосфатного буфера (pH 7,4), пипетировали до получения одноклеточной суспензии.

Для получения одноклеточной суспензии биопсийные образцы опухолей человека (немелкоклеточный рак легкого, рак желудка и пищевода) тщательно измельчали и инкубировали в растворе Версена при 37°C в течение 30 мин. К измельченному образцу опухоли массой от 0,15 до 0,70 г добавляли раствор фосфатного буфера (pH 7,4) в соотношении 1:2, гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе пятикратным движением пестика и фильтровали через фильтры «*BD Falcon*» («*Becton, Dickinson and Company*») с диаметром пор сначала 100, а затем 40 мкм. Полученную суспензию клеток центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин, осадок ресуспендировали в фосфатном буферном растворе (pH 7,4).

Часть полученной суспензии использовали в тот же день для проведения опыта с живыми клетками, другую часть фиксировали раствором формальдегида до конечной концентрации 4%. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева и доводили фосфатным буферным раствором (pH 7,4) до концентрации 500 тыс. клеток в мл.

При проведении иммунофлуоресцентного анализа в пластиковые пробирки для проточного цитофлуориметра к 100 мкл суспензии клеток в разной концентрации добавляли специфические и изотипические антитела в эквивалентных концентрациях и инкубировали при 4°C в течение 30 мин или 16–20 ч. После окончания инкубации клетки дважды отмывали 20-кратным объемом фосфатного буферного раствора (pH 7,4), центрифугируя при 3 000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в 300 мкл фосфатного буферного раствора (pH 7,4).

В работе использованы мышинные моноклональные антитела, меченные FITC (клон 17F9), специфические к внешнему эпитопу трансмембранного белка Pgp человека. В качестве изотипического контроля использованы мышинные моноклональные антитела IgG2b, меченные FITC (оба антитела фирмы «*BD Pharmingen*»). Исследованы образцы с конечным разведением коммерческих специфических и изотипических антител от 1:20 до 1:800. Разведение 1:20 принято за 1 усл. ед.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре «*BD FACSCanto II*» с применением программного обеспечения FACSDiva 6.0. Для возбуждения флуоресценции использовали твердотельный лазер «*Coherent Sapphire*» с длиной волны испускаемого света 488 нм; регистрацию сигнала проводили по параметру FITC-H, который позволяет регистрировать флуоресценцию клеток, меченных флуорохромом FITC, при напряжении 500 В. Значение порога, отсекающего разрушенные клетки, составляло 8 000. Скорость ламинарного потока жидкости в капилляре была средней, количество анализируемых событий изменяли от 1 000 до 5 000.

Для анализа результатов использовали программное обеспечение FlowJo 7.6 и WinMDI 2.9. Результаты экспериментов оценивали по двум параметрам экспрессии Pgp. Уровень экспрессии Pgp в исследуемой опухоли, т.е. количество клеток, экспрессирующих маркер, определяется количеством специфически флуоресцирующих клеток относительно изотипического контроля и выражается в процентах (%). Интенсивность экспрессии Pgp в исследуемой опухоли,

т.е. количество Pgp в каждой опухолевой клетке, экспрессирующей этот маркер, определяется отношением средней специфической флуоресценции клеток к аналогичному показателю изотипического контроля и выражается в относительных единицах (далее – отн. ед.). Уровень экспрессии рассчитывали с помощью статистического теста Колмогорова–Смирнова, включенного в программу FlowJo.

### Результаты и их обсуждение

Согласно рекомендациям производителя антител фирмы «BD Pharmingen» определение Pgp должно проводиться в живых клетках. Однако, принимая во внимание цель исследования, а именно разработку метода для использования в клинической практике, когда часто возникает необходимость подтверждения результатов анализа, первоочередной задачей стало изучение влияния на результат оценки экспрессии Pgp фиксации опухолевого материала 4%-м раствором формальдегида. Опыты проведены на клетках Т-лимфобластного лейкоза человека линии *Jurkat* с выраженной экспрессией этого транспортного белка. Нарис. 1 показан распределение клеток в зависимости от интенсивности специфической флуоресценции после окрашивания моноклональными антителами

к Pgp живых (*a*) и фиксированных 4%-м раствором формальдегида (*б*) клеток Т-лимфобластного лейкоза человека линии *Jurkat*. Представлены типичные результаты одного из трех экспериментов. Данные, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что после фиксации чувствительность иммунофлуоресцентной окраски клеток с использованием моноклональных антител к Pgp не только не уменьшается, но значительно возрастает. Так, при инкубации антител с живыми клетками (рис. 1, *a*) доля специфически флуоресцирующих клеток составила 39%, а после фиксации 4%-м раствором формальдегида – 81% (рис. 1, *б*). При этом отношение специфической флуоресценции к изотипической было также значительно выше в фиксированных клетках по сравнению с живыми – в 2,9 и 1,5 раза соответственно. Это указывает на то, что в фиксированных клетках происходит увеличение доступности антигена для взаимодействия с антителом, что повышает чувствительность, а следовательно, и точность оценки.

Вторая стоящая перед нами задача заключалась в том, чтобы охарактеризовать экспрессию Pgp в ряде клеточных культур с тем, чтобы выбрать клетки с высоким, стабильно воспроизводимым в пассажах

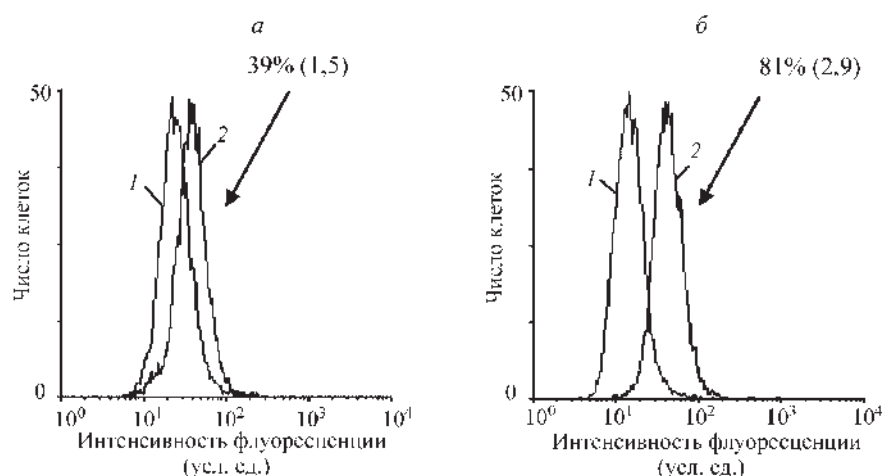


Рис. 1. Иммунофлуоресцентное окрашивание моноклональными антителами к Pgp живых и фиксированных 4% раствором формальдегида клеток Т-лимфобластного лейкоза человека линии *Jurkat*. Представлены гистограммы распределения клеток в зависимости от интенсивности специфической флуоресценции после инкубации в течение 30 мин с антителами в количестве 1 усл. ед. (соответствует разведению коммерческих антител 1:20). По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции (усл. ед.), по оси ординат – количество специфически флуоресцирующих клеток относительно изотипического контроля: 1 – клетки после инкубации с изотипическими антителами, 2 – после инкубации с антителами к Pgp; *a* – живые клетки, *б* – клетки, фиксированные 4%-м раствором формальдегида. Стрелками на рисунке отмечено количество (%) специфически флуоресцирующих клеток, в скобках – отношение интенсивности специфически флуоресцирующих клеток к изотипической. Представлены типичные результаты одного из трех экспериментов

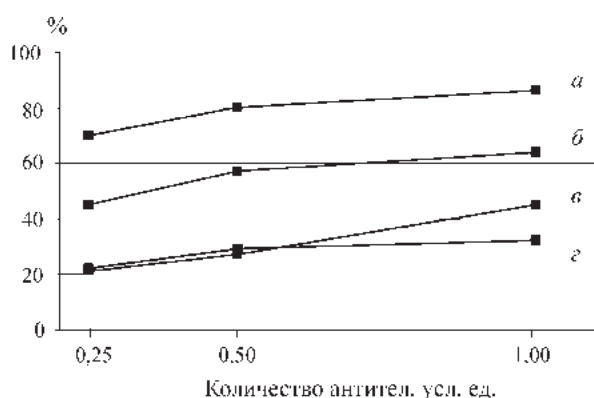


Рис. 2. Зависимость специфического иммуофлуоресцентного окрашивания клеток человека разных линий от концентрации моноклональных антител к Pgp. По оси абсцисс – количество антител (усл. ед., 1 усл. ед. соответствует разведению коммерческих антител 1:20); по оси ординат – количество специфически флуоресцирующих клеток относительно изотипического контроля (%). Время инкубации – 30 мин. Использованы культуры опухолевых клеток человека: Т-лимфобластный лейкоз линии *Jurkat* (*a*), рак шейки матки линии *HeLa* (*b*), аденокарцинома легкого линии *A549* (*c*) и эпидермоидная карцинома легкого линии *Calu-1* (*z*). Для каждой культуры клеток представлен типичный результат одного из трех экспериментов

уровнем Pgp и в дальнейшем использовать их в качестве позитивного контроля для оценки активности специфических антител. Данные, представленные на рис. 2, показывают, что при кратковременной (30 мин) инкубации во всех исследованных клеточных культу-

рах выявлена зависимость флуоресценции специфического окрашивания клеток от концентрации моноклональных антител к Pgp. Наиболее интенсивное окрашивание клеток в исследуемом диапазоне концентраций отмечено в клетках Т-лимфобластного лейкоза линии *Jurkat* – 70, 80 и 86% клеток. Высокое окрашивание отмечено в клетках рака шейки матки линии *HeLa* (45, 57 и 64%), умеренное – в клетках аденокарциномы легкого линии *A549* (21, 27 и 45%), низкое – в клетках эпидермоидной карциномы легкого *Calu-1* (22, 29 и 32%).

Таким образом, оптимальными с точки зрения контроля активности специфических антител следует признать две клеточные культуры – линии *Jurkat* и *HeLa*. В обоих случаях достаточно высокий уровень Pgp выявляется при низких концентрациях антител – 0,25 и 0,5 усл. ед. В обоих случаях подтверждена практически идеальная воспроизводимость результатов от пассажа к пассажу и в течение двух лет хранения фиксированных 4%-м раствором формальдегида суспензий клеток. В настоящей работе в качестве позитивного контроля во всех экспериментах использованы клетки линии *Jurkat*, так как в сравнении с монослойной культурой клеток линии *HeLa* получение одноклеточной суспензии из суспензионной культуры *Jurkat* менее трудоемко.

Следующим разделом работы явилась оценка возможности снижения концентрации антител за счет увеличения времени экспозиции, что очень важно с

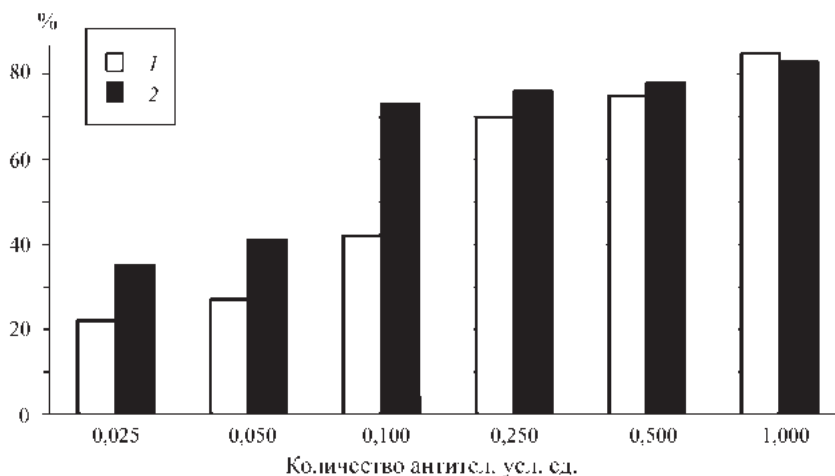


Рис. 3. Зависимость количества специфически окрашенных клеток Т-лимфобластного лейкоза человека линии *Jurkat* от концентрации антител к Pgp и продолжительности инкубации с антителами. По оси абсцисс – количество специфических антител (усл. ед.; 1 усл. ед. соответствует разведению коммерческих антител 1:20); по оси ординат – количество специфически флуоресцирующих клеток относительно изотипического контроля (%). Продолжительность инкубации клеток с антителами: 30 мин (1) до 16–20 ч (2). Представлены типичные результаты одного из трех экспериментов

экономической точки зрения при выполнении клинических анализов. Проведено сравнение результатов, полученных при 30 мин и ночной (16–20 ч) инкубации клеток с моноклональными антителами в диапазоне концентраций 0,025–1,000 усл. ед., соответствующих разведению коммерческих антител от 1:800 до 1:20. Данные, представленные на рис. 3, демонстрируют два принципиально важных факта.

Во-первых, при всех использованных концентрациях антител специфическая флуоресценция клеток после ночной инкубации с антителами превышает таковую после кратковременной (30 мин) инкубации. При низкой концентрации антител (вплоть до 0,25 усл. ед.) количество специфически флуоресцирующих клеток после длительной инкубации было в 1,5–2,5 раза выше, чем после кратковременной. Во-вторых, плато количества специфически окрашенных клеток при продолжительной инкубации клеток с антителами достигается при более низкой concentra-

ции антител (0,1 усл. ед.). При кратковременной инкубации клеток с антителами плато достигается при концентрации антител более чем в 2 раза большей. Таким образом, увеличение времени инкубации клеток с моноклональными антителами к Pgp с 30 мин до 16–20 ч позволяет выявить все клетки, экспрессирующие Pgp, при использовании существенно меньших количеств антител, т.е. повысить экономическую эффективность проводимого анализа.

Следующий этап работы включал оценку минимального количества клеток, которое может быть использовано при их инкубации с антителами и при дальнейшей оценке интенсивности флуоресценции клеток на проточном цитофлуориметре. В качестве стандарта были приняты рекомендации производителей:  $1,0\text{--}1,5 \cdot 10^3$  клеток/мл и 5–10 тыс. клеток соответственно для концентрации клеток в суспензии при инкубации с антителами и для анализа на проточном цитофлуориметре. Необходимость такого исследова-

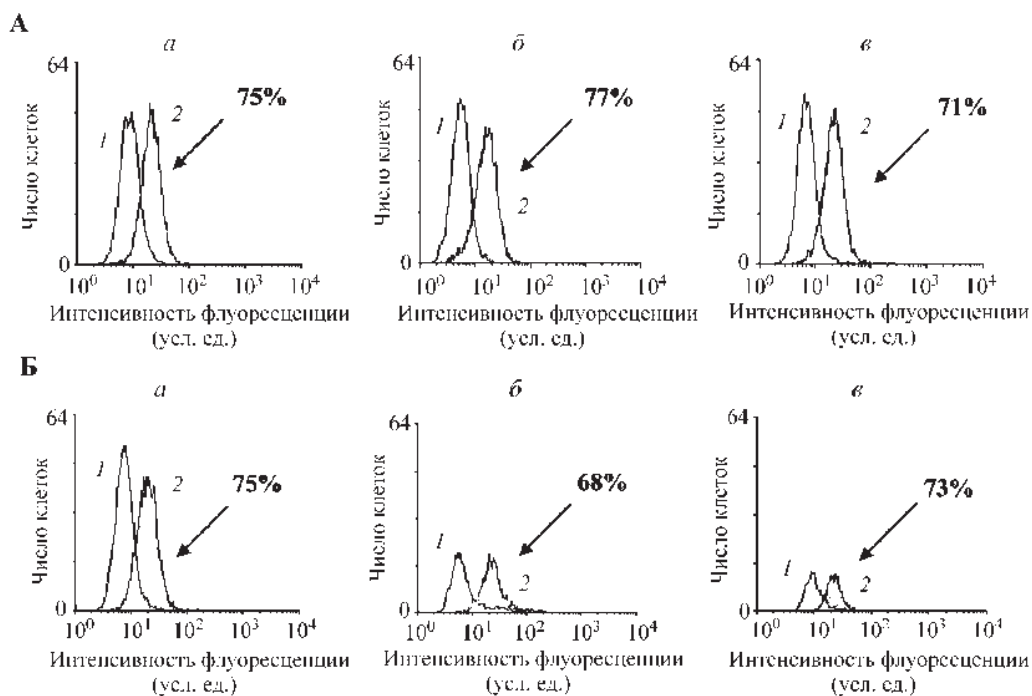


Рис. 4. Уровень экспрессии Pgp в клетках Т-лимфобластного лейкоза человека линии Jurkat при разных условиях иммунофлуоресцентного анализа экспрессии Pgp. Представлены гистограммы распределения клеток в зависимости от интенсивности специфической флуоресценции после 30 мин инкубации с антителами в количестве 0,5 усл. ед., соответствующей разведению коммерческих антител 1:40. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции (усл. ед.), по оси ординат – количество специфически флуоресцирующих клеток относительно изотипического контроля: 1 – клетки после инкубации с изотипическими антителами; 2 – после инкубации с антителами к Pgp. Стрелками на рисунке отмечено количество (%) специфически окрашенных клеток в исследованной суспензии. Представлены типичные результаты одного из трех экспериментов



ния обусловлена тем, что количество клинического материала часто ограничено (например, при исследовании эндоскопических образцов опухолевой ткани).

Чтобы определить минимальную концентрацию исследуемых клеток, которая позволяет провести иммунофлуоресцентный анализ без искажения результата, на клетках Т-лимфобластного лейкоза линии *Jurkat* проведен ряд опытов с разной концентрацией клеток в суспензии – 100, 500 тыс. и 1 млн/мл, а также с разным количеством клеток, анализируемых на проточном цитофлуориметре – 1, 2 и 5 тыс. Полученные данные представлены на рис. 4. Видно, что уменьшение концентрации клеток в суспензии от 1 млн/мл до 100 тыс./мл (рис. 4, А) не приводит к изменению результатов. Количество специфически флуоресцирующих клеток во всех случаях было одинаковым (71–77%). Уменьшение числа анализируемых событий, т.е. количества клеток, анализируемых на проточном цитофлуориметре (от 5 до 1 тыс. клеток), также не повлияло на результат. Во всех случаях (рис. 4, Б) количество специфически флуоресцирующих клеток было приблизительно одинаковым – 75, 68 и 73%.

Таким образом, в случае необходимости, т.е. при анализе биопсийных опухолевых образцов минимального размера, концентрация клеток в суспензии при инкубации с антителами может быть

снижена до 100 тыс. в мл, а число анализируемых на проточном цитофлуориметре событий уменьшено до 1 тыс. клеток.

Поскольку разрабатываемый метод ориентирован на клинику и предусматривает работу с образцами опухолей человека, полученных во время хирургических операций, необходимо было также оценить возможность получения суспензии клеток не только из нативного опухолевого материала, но и после его фиксации 4%-м раствором формальдегида. Связано это с необходимостью оптимизировать условия работы сотрудников, проводящих клинический анализ. Время проведения хирургической операции практически всегда отнесено ко второй половине дня, а получение одноклеточной суспензии из образца ткани требует не менее 1,5–2,0 ч. В данном исследовании проведена сравнительная оценка показателей экспрессии Pgp в одном и том же образце опухоли при приготовлении суспензии клеток из нативной и фиксированной 4%-м раствором формальдегида ткани. Данные, представленные в таблице, демонстрируют практически полное совпадение результатов анализа солидных опухолей разных локализаций (немелкоклеточного рака легкого, рака пищевода и желудка) при получении суспензии клеток до и после фиксации образцов опухолевой ткани. Следовательно,

Влияние времени получения суспензии клеток относительно фиксации биопсийного материала опухолей

Концентрация антител, усл. ед. <sup>4)</sup>	Фиксация <sup>1)</sup>			
	клеточной суспензии		образца ткани	
	параметры экспрессии Pgp			
	уровень, % <sup>2)</sup>	интенсивность отн. ед. <sup>3)</sup>	уровень, %	интенсивность отн. ед.
немелкоклеточный рак лёгкого				
0,25	17	1,3	9	1,3
0,50	20	1,3	28	2,0
1,00	38	2,5	39	2,7
рак пищевода				
0,25	57	3,3	50	2,8
0,50	61	3,8	55	3,1
1,00	61	3,7	59	3,6
рак желудка				
0,25	18	1,3	19	1,3
0,50	20	1,5	27	1,6
1,00	25	2,0	32	1,8

*Примечания.* <sup>1)</sup> Зафиксирован раствором 4%-го формальдегида либо нативный образец опухоли, либо клеточная суспензия, приготовленная из нативного образца; <sup>2)</sup> количество клеток, окрашенных антителами к Pgp, флуоресценция которых превышает флуоресценцию изотипического контроля; <sup>3)</sup> отношение специфической и изотипической флуоресценции клеток; <sup>4)</sup> 1 усл. ед. соответствует разведению коммерческих антител 1:20.

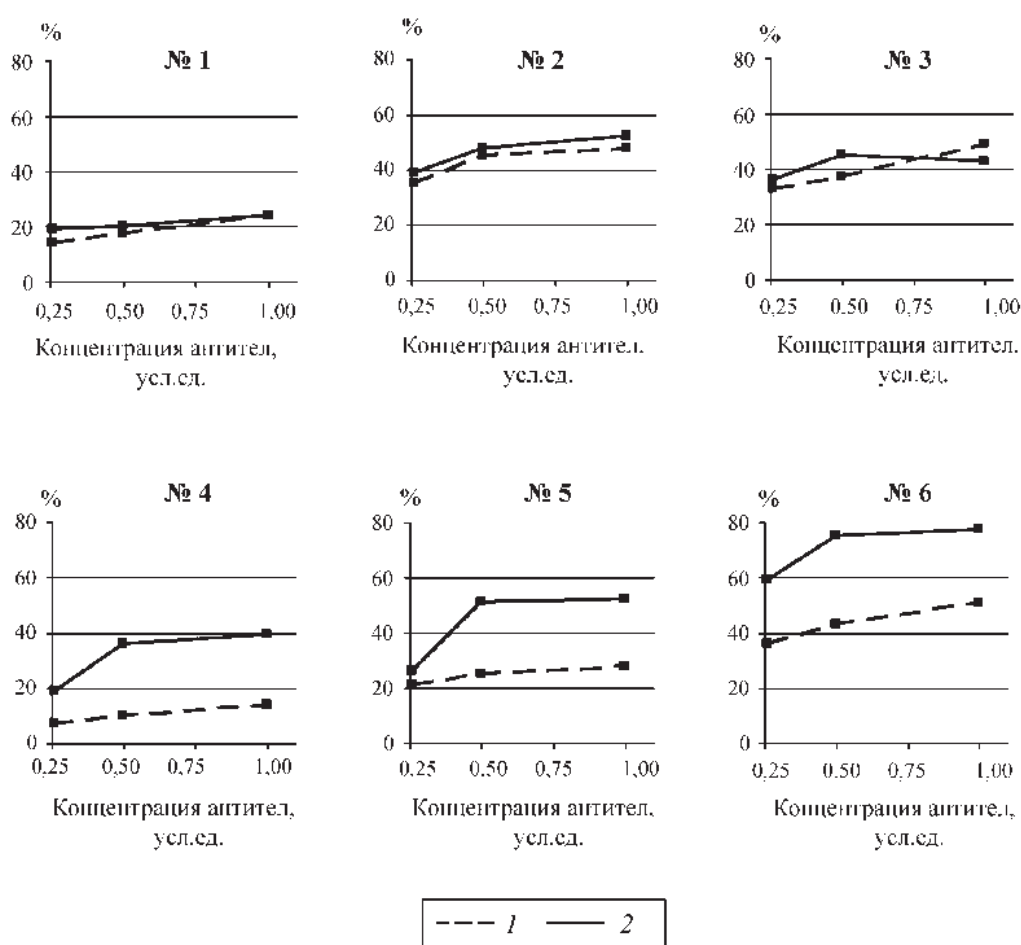


Рис. 5. Влияние времени инкубации на результаты оценки экспрессии Pgp в клетках немелкоклеточного рака легкого человека. По оси абсцисс – концентрация антител (усл. ед.; 1 усл. ед. соответствует разведению коммерческих антител 1:20); по оси ординат – количество специфически флуоресцирующих клеток относительно изотипического контроля (%). Продолжительность инкубации клеток с антителами: 1 – 30 мин, 2 – 16-20 ч. Представлены результаты исследования образцов опухолей шести пациентов (№№ 1–6)

время фиксации опухолевого материала является выбором исследователя.

На втором этапе работы с хирургическим биопсийным материалом опухолей человека проведена оценка правомочности заключения, сделанного при изучении культуры клеток Т-лимфобластного лейкоза линии *Jurkat*, о повышении чувствительности разрабатываемого метода при увеличении продолжительности инкубации с антителами. В опытах использованы клетки немелкоклеточного рака легкого, которые инкубировали с антителами в разных концентрациях в течение 30 мин или 16–20 ч. На рис. 5 представлены примеры опухолей, различающихся по ответу иммунофлуоресцентного окрашивания на изменение времени инкубации клеток с антителами. В ряде опухолей количество клеток, экспрессирующих Pgp, не зависело от про-

должительности инкубации с антителами (рис. 5, №№ 1–3). В то же время в других случаях (рис. 5, №№ 4–6) отмечено значительное увеличение выявленного числа клеток, экспрессирующих Pgp: 14 и 39%, 28 и 51%, 51 и 77% специфически флуоресцентно окрашенных клеток при сроках инкубации 30 мин и 16–20 ч соответственно. Эти данные, которые полностью совпадают с полученными ранее на культуре клеток *Jurkat* (рис. 3), позволили заключить, что длительная (16–20 ч) инкубация клеток с антителами является необходимой при клиническом иммунофлуоресцентном анализе экспрессии Pgp в солидных опухолях человека.

И наконец, важнейшим параметром клинического метода оценки любого молекулярного маркера опухоли является возможность повторного проведения анализа в случае необходимости верификации

диагноза. При повторных исследованиях клеток, хранящихся в виде суспензий в растворе фосфатного буфера (рН 7,4) с 4%-м содержанием формальдегида, показано, что независимо от гистологической структуры и локализации опухолей, совпадение показателей экспрессии Pgp практически идеально. Различия в уровне и интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания клеток в течение 24 мес. хранения материала не превышали 10%.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что разработан метод иммунофлуоресцентного анализа с использованием проточной цитофлуориметрии, который позволяет количественное определение уровня и интенсивности экспрессии Pgp в солидных опухолях человека. Особенность этапов проведения анализа, адекватность которых поставленной задаче подтверждена в настоящем исследовании, заключается в следующем.

1. Приготовление одноклеточной суспензии из хирургического биопсийного образца опухоли возможно как из нативной ткани, так и после ее фиксации 4%-м раствором формальдегида (подробно см. в разделе «Материалы и методы»).

2. В течение, по крайней мере, двух лет хранения опухолевого материала возможна верификация результатов анализа, т.е. его повторное проведение.

3. Экономические затраты на проведение анализа снижены за счет увеличения продолжительности инкубации антител с исследуемыми клетками и уменьшения концентрации антител. Для изученных в работе моноклональных антител к Pgp, конъюгированных с флуоресцентным красителем FITC («BD Pharmingen», клон 17F9), разведение коммерческих антител составляло 1:20 и 1:40. При этом достигается не только плато иммунофлуоресцентного

окрашивания клеток, т.е. выявление всех клеток, экспрессирующих Pgp, но и «внутренний повтор» результата, что увеличивает точность количественной оценки.

4. Возможно исследование опухолевой ткани минимального размера (например, эндоскопические образцы) за счет понижения концентрации клеток в суспензии при проведении инкубации с антителами до 100 тыс./мл, а количества клеток, анализируемых на проточном цитофлуориметре – до 1 000. Оценку активности антител на охарактеризованной в настоящем исследовании культуре клеток Т-лимфобластного лейкоза линии *Jurkat* можно проводить с низкими концентрациями антител за счет увеличения продолжительности их инкубации с клетками. Для использованных в настоящем исследовании моноклональных антител к Pgp фирмы «BD Pharmingen» (клон 17F9) разведение коммерческих антител составило 1:400 и 1:800 при ночной (16–20 ч) инкубации с клетками.

Таким образом, разработанный иммунофлуоресцентный метод количественной оценки уровня и интенсивности экспрессии Pgp в солидных опухолях человека позволяет получать результаты, воспроизводимые в течение длительного хранения опухолевого материала, экономически мало затратный (по количеству используемых антител в сравнении с рекомендациями их производителей), а также, несмотря на свою протяженность, удобен по временным параметрам выполнения анализа и не требует изменения рабочего графика исследователей. Иными словами, и сам метод, и алгоритм проведения анализа пригодны для рутинной клинической количественной оценки уровня и интенсивности экспрессии важнейшего маркера множественной лекарственной резистентности – транспортного белка Pgp.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Widmer N., Colombo S., Buclin T., Decosterd L.A. // *Blood*. 2003. **102**. N 3. P. 1142.
2. Radujkovic A., Schad M., Topaly J., Veldwijk M.R., Laufs S., Schultheis B.S., Jauch A., Melo J.V., Fruehauf S., Zeller W.J. // *Leukemia*. 2005. **19**. N 7. P. 1198.
3. Nakanishi T., Shiozawa K., Hassel B.A., Ross D.D. // *Blood*. 2006. **108**. N 2. P. 678.
4. Yang C.H., Huang C.J., Yang C.S., Chu Y.C., Cheng A.L., Whang-Peng J., Yang P.C. // *Cancer Res*. 2005. **65**. N 15. P. 6943.
5. Nagashima S., Soda H., Oka M., Kitazaki T., Shiozawa K., Nakamura Y., Takemura M., Yabuuchi H., Fukuda M., Tsukamoto K., Kohno S. // *Cancer Chemother. Pharmacol*. 2006. **58**. N 5. P. 594.
6. Leschziner G.D., Andrew T., Pirmohamed M., Johnson M.R. // *The Pharmacogenomics J*. 2007. **7**. N 3. P. 154.
7. Higgins C.F. // *Nature*. 2007. **446**. N 7137. P. 749.
8. Zhao Y., Yu L., Lou F., Wang Q., Pu J. // *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 1999. **38**. N 11. P. 760.
9. Schwarzenbach H. // *Anal. Biochem*. 2002. **308**. N 1. P. 26.
10. Parker R.L., Huntsman D.G., Lesack D.W., Cupples J.B., Grant D.R., Akbari M., Gilks C.B. // *Am. J. Clin. Pathol*. 2002. **117**. N 5. P. 723.
11. Leonessa F., Clarke R. // *Endocr. Relat. Cancer*. 2003. **10**. N 1. P. 43.
12. Roy S., Kenny E., Kennedy S., Larkin A., Ballot J., Perez De Villarreal M., Crown J., O'Driscoll L. // *Anticancer Res*. 2007. **27**. N 3A. P. 1325.



13. Kreisholt J., Sorensen M., Jensen P.B., Nielsen B.S., Andersen C.B., Sehested M. Br. // J. Cancer. 1998. 77. N 9. P. 1469.
14. Peng Z.M., Luo J., Wang W.B., Wang X.H., Chen J.H., Lan S.M. // Ai Zheng. 2004. 23. N 8. P. 963.

Поступила в редакцию 12.01.12

## QUANTITATIVE IMMUNOFLUORESCENCE ESTIMATION OF Pgp EXPRESSION IN HUMAN SOLID TUMORS BY FLOW CYTOMETRY

T.A. Bogush, M.V. Tikhomirov, E.A. Dudko, M.N. Sinitsyna, R.J. Ramanauskaite,  
B.E. Polotsky, S.A. Tyulyandin, M.I. Davydov

(Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center" under the  
Russian Academy of Medical Sciences)

An immunofluorescence assay that enables quantitative detection of level and intensity of multidrug resistance marker Pgp expression in human solid tumors by using flow cytometry and monoclonal antibody (clone 17F9, BD Pharmingen) was developed and adapted for clinical assessment. The analysis includes the following relevant task-specific stages. Single-cell suspension can be prepared from both surgical biopsy native tumor tissues and tumor specimens fixed in 4% formaldehyde. The assay allows to result verification even after two years of tumor material storage. Cost of analysis can be decreased by increasing of period of cell incubation with antibody and reducing of the antibody concentration. It was shown also a possibility to analyze minimal tumor samples, e.g. endoscopic biopsy specimens, by decreasing concentration of cells incubated with antibodies to  $1 \times 10^5$  cells/ml, and flow cytometer counted cell number to  $1 \times 10^3$ . Although its continuance, the developed assay does not require any changes in investigator work schedule.

**Key words:** *P-glycoprotein, immunofluorescence assay, flow cytometry, human solid tumors.*

**Сведения об авторах:** *Богущ Татьяна Анатольевна* – профессор лаборатории медицинской химии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, докт. биол. наук (labmedchem@mail.ru); *Тихомиров Михаил Вячеславович* – аспирант лаборатории медицинской химии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (labmedchem@mail.ru); *Дудко Евгений Александрович* – сотр. лаборатории медицинской химии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, канд. биол. наук (labmedchem@mail.ru); *Синицина Марина Николаевна* – сотр. патологоанатомического отделения ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (labmedchem@mail.ru); *Раманаускайте Регина-Бируте Юозапо* – сотр. лаборатории медицинской химии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru); *Полоцкий Борис Евсеевич* – профессор хирургического торакального отделения ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, докт. мед. наук; *Тюляндин Сергей Алексеевич* – профессор отделения клинической фармакологии и химиотерапии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, докт. мед. наук; *Давыдов Михаил Иванович* – директор ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, акад. РАН и РАМН, профессор.