

УДК 616.33–006.6–076–079

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ БЕТА-III ТУБУЛИНА (TUBB3) В ТКАНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЖЕЛУДКА И МОРФОЛОГИЧЕСКИ НОРМАЛЬНОЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ ТКАНИ ОРГАНА

Т.А. Богуш^{1*}, Е.М. Капура-Бреховских², А.А. Башарина¹, Е.А. Богуш³, В.Ю. Кирсанов³, О.Б. Абу-Хайдар¹, П.А. Лозбина², Н.О. Вихлянцева¹, В.С. Косоруков¹

(¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; ² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; ³ Институт клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); *e-mail: tatbogush@mail.ru)

С использованием проточной цитометрии проведен иммунофлуоресцентный анализ опухоль-ассоциированного белка TUBB3 в ткани рака желудка и в окружающей морфологически нормальной ткани органа (суммарно 48 образцов). Экспрессия TUBB3 выявлена в опухоли (100% случаев) и в «норме» (79,2% случаев), при этом в 36,8% случаев уровень экспрессии маркера в «нормальной» ткани был приблизительно равен показателю в опухоли, а в 63,2% случаев был значительно (в 1,8 раза) ниже. Выявлена прямая корреляция между уровнем экспрессии TUBB3 в опухоли и в «норме» ($p = 0,0061$). Сделан вывод, что экспрессия TUBB3 в ткани желудка, окружающей очаг опухоли, может являться молекулярным маркером локальной распространенности рака желудка и ориентиром при выборе оптимальной тактики послеоперационного ведения больных.

Ключевые слова: бета-III тубулин (TUBB3), проточная цитометрия, рак желудка, иммунофлуоресцентное окрашивание, морфологически нормальная окружающая ткань.

Выявление экспрессии ассоциированных с опухолью белков в «нормальной» окружающей ткани пораженного органа показывает, что такая ткань может быть трансформирована на молекулярном уровне, даже если при микроскопическом исследовании признаков опухолевого роста не обнаружено. Однако до настоящего времени морфологически нормальная ткань, окружающая опухоль, не является объектом молекулярного фенотипирования наряду с опухолью.

Нами была впервые сформулирована гипотеза о том, что выявление ассоциированных с опухолью белков в морфологически нормальной ткани, окружающей опухолевый очаг, может служить молекулярным маркером локальной распространенности опухолевого процесса при сравнительной оценке экспрессии белка бета-III тубулина (TUBB3) в «нормальной» и опухолевой ткани немелкоклеточного рака легкого [1, 2].

В рамках настоящего исследования объектом сравнительного молекулярного фенотипирования выбрана опухолевая и окружающая опухоль мор-

фологически нормальная ткань рака желудка, так как результаты лечения этого заболевания остаются неудовлетворительными и нет четких показаний для выбора оптимальной тактики лечения.

Прогностически неблагоприятными факторами считаются увеличение стадии рака желудка, глубина инвазии опухоли, наличие регионарных метастазов, низкая степень дифференцировки рака, диффузно-инфильтративная форма роста, проксимальная локализация и распространение на пищевод [3], а также наличие признаков высокой биологической агрессивности опухоли [4–6]. Предложены различные алгоритмы и формулы расчета риска возникновения, локализации и срока рецидива на основании ряда прогностических факторов [3, 7, 8], но прогноз часто оказывается неинформативным, и даже после радикальной операции у 20% больных в течение года диагностируются локальные рецидивы опухоли.

По нашему мнению, дополнительным ориентиром при выборе оптимального ведения больных раком желудка, как, впрочем, и других

сóлидных новообразований, может стать оценка локальной «молекулярной» распространенности процесса, основанная на сравнительном исследовании прогностически значимых маркёров не только в опухолевой, но и в морфологически нормальной окружающей опухоль ткани желудка. В настоящем исследовании в качестве такого маркёра изучен опухоль-ассоциированный белок TUBB3, который экспрессируется в клетках рака желудка [9, 10] и других эпителиальных злокачественных новообразований, но не в нормальных эпителиальных тканях [11, 12].

Материалы и методы

Для исследования использовали 24 пары хирургических биопсийных образцов опухолевой и «нормальной» ткани желудка (всего изучено 48 образцов). Оценку экспрессии TUBB3 в ткани рака желудка и морфологически нормальной ткани органа проводили адаптированным для исследования плотных тканей иммунофлуоресцентным методом, ассоциированным с проточной цитометрией [13].

Метод получения одноклеточных суспензий из хирургических биопсийных образцов тканей, а также метод проведения иммунофлуоресцентного окрашивания подробно описаны ранее [13]. В данной работе использованы первичные моноклональные мышиные антитела к TUBB3 (ab7751, клон TU-20, Abcam) в конечном разведении 1:500 и вторичные антимышьи антитела, конъюгированные с флуорохромом DyLight650 (ab98729, Abcam), в конечном разведении 1:1000. Инкубация одноклеточной суспензии с первичными антителами проведена в течение ночи (15–20 ч) при 4 °С. После отмывки 20-кратным объемом 0,5%-го раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA) клетки инкубировали с вторичными антителами в течение 1,5 ч при 4 °С. Для выведения из анализа эритроцитов и разрушенных клеток суспензию в течение 15 мин инкубировали с ДНК-красителем Hoechst 33258 («Sigma-Aldrich») в концентрации 1,2 мкг/мл, после чего дважды отмывали 20-кратным объемом 0,5%-го раствора BSA.

Измерение флуоресценции клеток проводили на проточном цитометре «Navios» («Beckman Coulter»). Флуоресценцию красителей DyLight650 и Hoechst 33258 регистрировали в каналах FL6 и FL9 соответственно.

В работе оценивали уровень экспрессии TUBB3 (%) – число специфически флуоресцирующих клеток относительно контроля (инкубация

клеток только с вторичными антителами). Для расчета показателя использовали статистический критерий Колмогорова–Смирнова в программе FlowJo 10.0.8 («FlowJo», «LLC»). Гистограммы распределения клеток в зависимости от интенсивности специфической флуоресценции строили с помощью программы WinMDI 2.9.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью метода квантильных диаграмм, критерия Шапиро–Уилка, *t*-критерия Стьюдента, линейного коэффициента корреляции *r*-Пирсона, включенных в пакет GraphPad Prism 7.0 («GraphPad Software», США). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Первый важный факт, который выявлен в настоящем исследовании, – опухоль-ассоциированный белок TUBB3 экспрессируется не только в ткани рака желудка, но и в окружающей морфологически нормальной ткани органа. Это подтверждает сформулированную нами при изучении немелкоклеточного рака легкого гипотезу о возможности диагностики локальной молекулярной распространенности опухолевого процесса [1, 2]. При этом важно отметить, что, как и в случае немелкоклеточного рака легкого, частота встречаемости и соотношение показателей уровня экспрессии в опухолевой и «нормальной» ткани у разных больных различаются (рис. 1).

Так, в опухолевой ткани экспрессия TUBB3 выявлена в 100% случаев, а в «нормальной» – у 79,2% больных (рис. 1, большие круговые диаграммы). При этом в 36,8% случаев уровень экспрессии маркёра в «нормальной» ткани приблизительно равен показателю в опухоли, а в 63,2% случаев был значительно (в среднем в 1,8 раза) ниже (рис. 1, малая круговая диаграмма).

На рис. 2 представлены примеры, демонстрирующие случаи разного соотношения показателей экспрессии TUBB3 в парах «опухоль vs норма». Приведены гистограммы распределения клеток в зависимости от интенсивности специфической флуоресценции после иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к TUBB3. Первый пример демонстрирует случай, когда уровень экспрессии маркёра в обеих тканях одинаков (38 и 40%), второй – когда уровень экспрессии TUBB3 в ткани рака желудка значительно превышает данный показатель экспрессии маркёра в морфологически нормальной ткани органа (соответственно 71 и 39%).

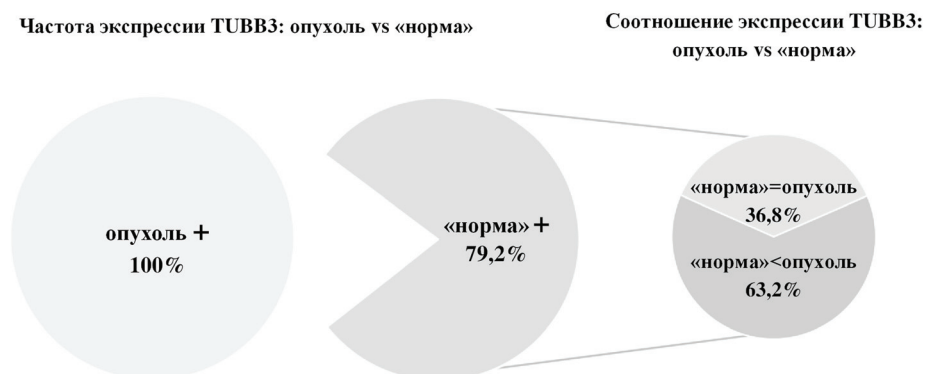
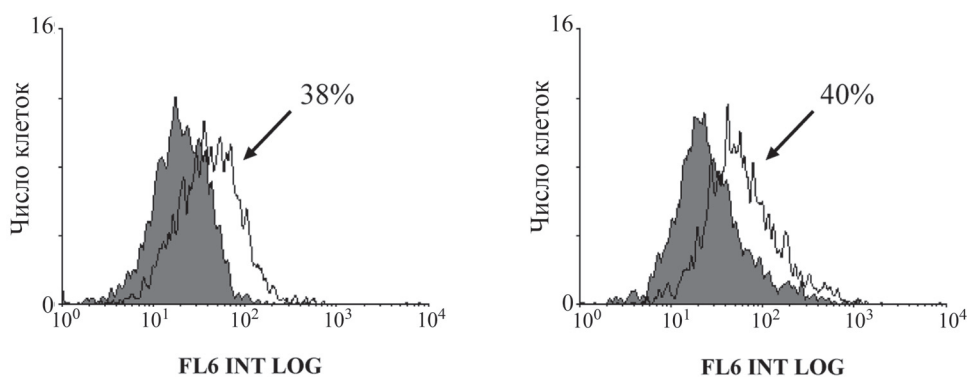


Рис. 1. Характеристика частоты встречаемости и соотношение показателей экспрессии TUBB3 в ткани рака желудка и морфологически нормальной ткани органа (опухоль + и «норма» + – выявлена экспрессия TUBB3 в ткани рака желудка и морфологически нормальной ткани органа соответственно)

Морфологически нормальная окружающая ткань Ткань опухоли желудка

Пример 1: «норма» = опухоль



Пример 2: «норма» < опухоль

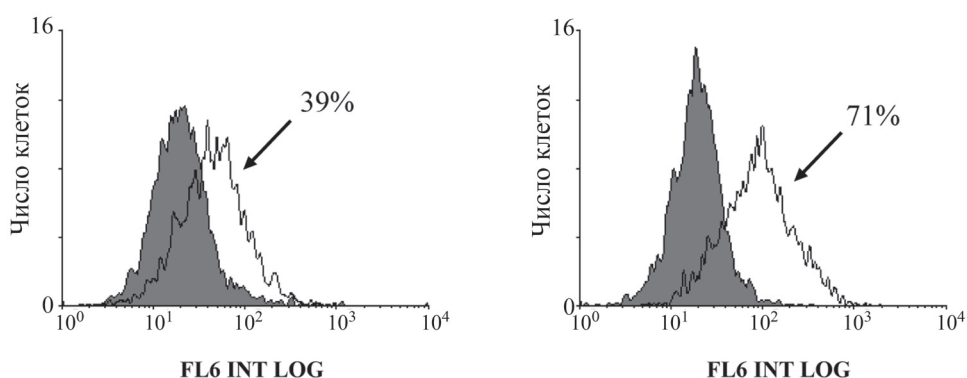


Рис. 2. Примеры гистограмм распределения клеток рака желудка и морфологически нормальной окружающей ткани органа в зависимости от интенсивности специфической флуоресценции. По осям абсцисс – интенсивность специфической флуоресценции в канале проточного цитометра FL6 (усл. ед.), по осям ординат – число клеток; серые гистограммы – после инкубации с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем (контроль), прозрачные – после инкубации с антителами к TUBB3; числа на гистограммах – уровень экспрессии маркера (%)

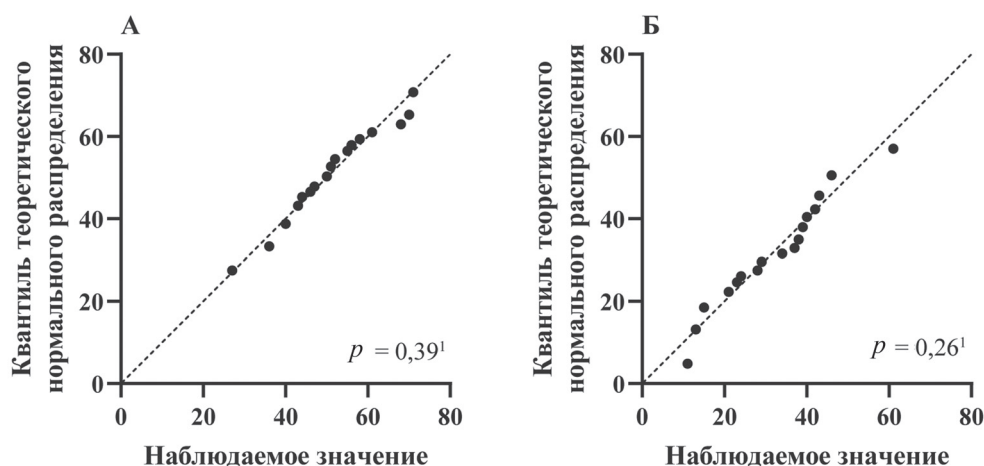


Рис. 3. Квантильные диаграммы для значений уровня экспрессии TUBB3 в опухолевой (А) и морфологически нормальной (Б) ткани легкого (пунктирная линия соответствует нормальному распределению (линия регрессии)). ¹ p – нормальность распределения рассчитана с помощью критерия Шапиро–Уилка)

Перед проведением сравнительной оценки уровня экспрессии TUBB3 в опухоли и окружающей «нормальной» ткани желудка проанализирован характер распределения полученных результатов с помощью метода квантильных диаграмм и критерия Шапиро–Уилка.

На рис. 3 видно, что распределение значений уровня экспрессии TUBB3 как в опухолевой, так и в морфологически нормальной ткани желудка соответствует нормальному, так как большинство значений на графиках А и Б попадают на линию регрессии (пунктирная линия), соответствующую нормальному распределению. При этом достигнутый уровень значимости оказался выше 0,05 и составил согласно критерию Шапиро–Уилка для опухолевой и «нормальной» ткани соответственно 0,39 и 0,26. Поэтому при дальнейшем анализе полученных результатов мы использовали средние значения уровня экспрессии TUBB3 как в опухолевой, так и в морфологически нормальной ткани желудка. Результаты этого анализа представлены в таблице.

Выявлены различия в соотношении уровня экспрессии TUBB3 в группах «опухоль vs норма» и гетерогенность показателей экспрессии маркера как в опухолевой, так и в морфологически нормальной окружающей опухоль ткани органа у разных больных.

Минимальное значение уровня экспрессии TUBB3 в опухоли составило 27% клеток, максимальное – 71%, медиана – 50%, а половина всех значений оказалась в интервале от 43 до 57,5%. В морфологически нормальной ткани

показатели уровня экспрессии TUBB3 были другими: минимальное значение составило 11%, максимальное – 61%, медиана – 31,5%, а 50% всех значений оказались в интервале от 21 до 39,8%. Необходимо обратить внимание на то, что минимальное значение уровня экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной окружающей ткани составило 11%, что ниже принятого порога позитивности экспрессии маркера ($\leq 15\%$). Различия между группами сравнения «опухоль vs норма» статистически значимы ($p < 0,0001$).

Принципиально важной представляется выявленная статистически значимая прямая корреляция ($p = 0,0061$) между уровнем экспрессии TUBB3 в опухолевой и морфологически нормальной окружающей ткани желудка. При этом коэффициент корреляции r -Пирсона составил 0,54. Это соответствует средней силе связи между исследованными параметрами и означает, что, по крайней мере, в части случаев вероятность молекулярной трансформации морфологически нормальной ткани органа выше при более высоком уровне экспрессии TUBB3 в ткани рака желудка.

Сопоставление этого факта с данными о том, что уровень экспрессии TUBB3 в опухоли является прогностически неблагоприятным маркером, прогнозирующим агрессивное течение болезни [14], подтверждает важность выявления ассоциированного с опухолью белка в морфологически нормальной ткани желудка, окружающей опухолевый очаг. Особенно важно это обстоятельство при начальных стадиях болезни, когда информа-

Количественные показатели экспрессии TUBB3 в клетках рака желудка и морфологически нормальной окружающей ткани органа

Группы сравнения ¹	Уровень экспрессии TUBB3 (%)					
	средние значения ²	min ³	нижний квартиль	медиана	верхний квартиль	max ³
Рак желудка	50,9	27	43	50	57,5	71
«Нормальная» окружающая ткань	30,9	11	21	31,5	39,8	61
опухоль vs «норма» (p^4)	<0,0001					
Коэффициент корреляции между опухолью и «нормой» ⁵	0,543 (95% ДИ: 0,179–0,776) $p = 0,0061$					

Примечания: ¹ исследованы 24 пары хирургических образцов опухолевой и «нормальной» ткани желудка (суммарно – 48 образцов); ² среднее значение ± стандартное отклонение; ³ min и max – минимальные и максимальные значения уровня экспрессии TUBB3 в исследованных образцах опухоли желудка и окружающей морфологически нормальной ткани органа (пороговый уровень позитивности экспрессии TUBB3 ≤15%); ⁴ p – достоверность различий между средними показателями в норме и в опухоли (t -критерий Стьюдента). Различия достоверны при $p \leq 0,05$; ⁵ линейный коэффициент корреляции r -Пирсона (статистическая значимость коэффициента при $p \leq 0,05$).

ция о распространенности опухолевого процесса в морфологически нормальной ткани органа может стать дополнительным ориентиром при выборе оптимальной тактики ведения пациента (в частности, при выборе оптимального объема хирургической операции). Напомним, что хирургическое лечение рака желудка остается методом выбора, поскольку консервативное лечение редко приводит к достоверному улучшению отдаленных результатов.

Таким образом, из полученных результатов можно сделать важный вывод. Поскольку почти у 70% больных раком желудка окружающая опухоль морфологически нормальная ткань в большей или меньшей степени вовлечена в опухолевый процесс, она должна являться объектом столь же пристальной молекулярной диагностики, как и ткань опухоли. При этом фенотипиро-

вание должно включать строго количественное определение опухоль-ассоциированных белков, в частности, как в настоящем исследовании при оценке уровня экспрессии TUBB3 с привлечением проточной цитометрии.

Работа выполнена в рамках программы исследований ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (тема НИР: «Разработка и оценка клинической значимости новой технологии молекулярного прогнозирования резистентности и агрессивности солидных эпителиальных новообразований», рег. № АААА-А20-120020690077-0).

Конфликта интересов нет.

Дополнительных материалов нет.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ponomarenko E.A., Mamichev I.A., Bogush T.A., Ryabinina O.M., Dyakova J.B., Novikov D.V., Polotsky B.E., Davydov M.M. // *Annals of Oncology*. 2017. Vol. 28. P. 592 (DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx390.065>).
2. Мамичев И.А., Богуш Т.А., Дудко Е.А., Рябинина О.М., Гришанина А.Н., Кирсанов В.Ю., Полоцкий Б.Е., Давыдов М.М. // *Российский биотерапевтический журнал*. 2016. Т. 15. № 2. P. 16 (<https://doi.org/10.17650/1726-9784-2016-15-2-16-18>).
3. Schwarz R.E., Zagala-Nevarez K. // *Ann. Surg. Oncol*. 2002. Vol. 9. P. 394 (DOI: 10.1007/BF02573875).
4. Жарков В.В., Михайлов И.В. // *Медицинские новости*. 2005. № 9. С. 17.
5. Барышев А.Г. // *Российский биотерапевтический журнал*. 2011. Т. 10. № 2. С. 85.
6. Panani A.D. // *Cancer Lett*. 2008. Vol. 89. P. 99 (DOI: 10.1016/j.canlet.2008.02.053).
7. Shiraishi N., Inomata M., Osawa N., Yasuda K., Adachi Y., Kitano S. // *Cancer. United States*. 2000. Vol. 89. N2. P. 255

- (DOI: 10.1002/1097-0142(20000715)89:2<255::aid-cncr8>3.0.co;2-n).
8. Yoo C.H., Noh S.H., Shin D.W., Choi S.H., Min J.S. // *Br. J. Surg.* 2000. Vol. 87. N 2. P. 236 (DOI: 10.1046/j.1365-2168.2000.01360.x).
 9. Di Bartolomeo M., Raimondi A., Cecchi F., Catenacci D., Schwartz S., Sellappan S., Tian Y., Miceli R., Pellegrinelli A., Giommoni E., Aitini E., Spada F., Rosati G., Marchet A., Pucci F., Zaniboni A., Tambari S., Pressiani T., Sanna G., Cantore M., Mosconi S., Bolzoni P., Pinto C., Landi L., Soto Parra H.J., Cavanna L., Corallo S., Martinetti A., Hembrough T.A., Pietrantonio F. // *Tumori Journal*. 2020 (DOI: 10.1177/0300891620930803).
 10. Höflmayer D., Öztürk E., Schroeder C., Hube-Magg C., Blessin N.C., Simon R., Lang D.S., Neubauer E., Göbel C., Heinrich M. C., Fraune C., Möller K., Armbrust M., Freytag M., Hinsch A., Lühr C., Noack M., Reiswich V., Weidemann S., Bockhorn M., Perez D., Izbicki J.R., Sauter G., Jacobsen F. // *Oncol Lett.* 2018. Vol. 16. N 6. P. 7139 (DOI: 10.3892/ol.2018.9502).
 11. Person F., Wilczak W., Hube-Magg C., Burdelski C., Möller-Koop C., Simon R., Noriega M., Sauter G., Steurer S., Burdak-Rothkamm S., Jacobsen F. // *Tumor Biology*. 2017. Vol. 39. N 10 (DOI: 10.1177/1010428317712166).
 12. Leandro-García L. J., Leskelä S., Landa I., Montero-Conde C., López-Jiménez E., Letón R., Cascón A., Robledo M., Rodríguez-Antona C. // *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2010. Vol. 67. N 4. P. 214-223 (DOI: 10.1002/cm.20436).
 13. Bogush T.A., Basharina A.A., Eliseeva B.K., Kaliuzhny S.A., Bogush E.A., Kirsanov V.Y., Davydov M.M., Kosorukov V.S. // *Biotechniques*. 2020. Vol. 69. N 4. P. 1 (DOI: 10.2144/btn-2020-0024).
 14. Мамичев И.А., Богуш Т.А., Богуш Е.А., Терентьева Н.С., Кирсанов В.Ю., Давыдов М.М. // *Антибиотики и химиотерапия*. 2018. Т. 63 № 7–8. P. 79.

Поступила в редакцию 11.01.2021

Получена после доработки 14.01.2021

Принята к публикации 20.01.2021

COMPARATIVE IMMUNOFLUORESCENCE ANALYSIS OF BETA-III TUBULIN (TUBB3) EXPRESSION IN GASTRIC CANCER TISSUE AND MORPHOLOGICALLY NORMAL TISSUE ADJACED TO THE TUMOR

T.A. Bogush^{1*}, E.M. Kapura-Brekhovskikh², A.A. Basharina¹, E.A. Bogush³, V.Yu. Kirsanov³, O.B. Abu-Khaidar¹, P.A. Lozbina², N.O. Vikhlyantseva¹, V.S. Kosorukov¹

¹ FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation; ² Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V. Lomonosov Moscow State University (Lomonosov MSU); ³ N.V. Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University); *e-mail: tatbogush@mail.ru

Immunofluorescence analysis of tumor-associated protein TUBB3 in gastric cancer tissue and morphologically normal tissue adjacent to the tumor was carried out using flow cytometry (in total – 48 samples). Expression of TUBB3 was detected in 100% of the tumors and in 79.2% of the “normal” tissue samples. In 36.8% of “normal” tissue samples the marker expression level was approximately equal to that in the tumor. It was significantly (1.8-fold) lower in 63.2% of the cases. Direct correlation was found between the level of TUBB3 expression in tumor and “normal” tissue ($p = 0.0061$). It is concluded that the TUBB3 expression in morphologically normal tissue adjacent to the tumor could be a molecular marker of the local spread of gastric cancer and a guideline for the optimal adjuvant treatment.

Key words: beta-III tubulin (TUBB3), flow cytometry, gastric cancer, immunofluorescence staining, morphologically normal tissue adjacent to the tumor.

Сведения об авторах: Богуш Татьяна Анатольевна – руководитель группы молекулярных маркеров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, докт. биол. наук, профессор, (tatbogush@mail.ru); Капура-Бреховских Евгения Михайловна – студент-

ка факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова (labmedchem@mail.ru); *Башарина Анна Александровна* – науч. сотр. группы молекулярных маркёров лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (basharinaa@inbox.ru); *Богуш Елена Александровна* – ассистент кафедры онкологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФGAOУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru); *Кирсанов Владислав Юрьевич* – доцент кафедры онкологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФGAOУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru); *Абу-Хайдар Омар Бассамович* – ст. науч. сотр. хирургического отделения № 11 (Торакальной онкологии) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru); *Лозбина Полина Антоновна* – студентка магистратуры кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (polina.lozbina@gmail.com); *Вихлянцева Надежда Олеговна* – мл. науч. сотр. группы молекулярных маркёров лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (labmedchem@mail.ru); *Косоруков Вячеслав Станиславович* – заведующий лабораторией трансгенных препаратов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. биол. наук (labmedchem@mail.ru).