

ЭКСПРЕССИЯ БЕТА-III ТУБУЛИНА В ТКАНИ РАКА ПИЩЕВОДА И ОКРУЖАЮЩЕЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИ НОРМАЛЬНОЙ ТКАНИ

И.А. Мамичев¹, Т.А. Богущ¹, Е.А. Богущ¹, А.Н. Гришанина¹, Н.О. Вихлянцева¹,
Н.С. Сапрыкина¹, А.А. Каменский²

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;
Россия, 119991 Москва, ул. Ленинские Горы, 1

Контакты: Иван Андреевич Мамичев Mamichev99@gmail.com

Введение. Белок микротрубочек бета-III тубулин (TUBB3) в норме не экспрессируется в эпителиальных клетках, но присутствует во многих опухолях эпителиального происхождения. Мы предположили, что выявление экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной ткани за пределами первичной опухоли может использоваться для молекулярной диагностики местной распространенности опухолевого процесса, что особенно важно для локально рецидивирующих опухолей, в частности, для рака пищевода.

Цель исследования — количественная оценка экспрессии TUBB3 в опухолевой и окружающей морфологически нормальной ткани пищевода, прилежащей к опухоли и отдаленной от нее.

Материалы и методы. Методом проточной иммуноцитофлуориметрии исследована экспрессия белка TUBB3 в хирургических биопсийных образцах рака пищевода и морфологически нормальной ткани органа 40 оперированных больных.

Результаты. Экспрессия TUBB3 выявлена в 35 из 40 исследованных образцов рака пищевода, в 10 из 13 образцов прилежащей к опухоли морфологически нормальной ткани пищевода и в 25 из 40 образцов максимально удаленной от опухоли ткани пищевода вблизи края резекции. В подавляющем большинстве случаев уровень и интенсивность экспрессии TUBB3 у каждого больного в опухоли превышали те же показатели в отдаленной морфологически нормальной ткани. Показано, что в ряду «норма → норма вблизи опухоли → опухоль» экспрессия TUBB3 растет, т.е. прослеживается положительный градиент уровня и интенсивности экспрессии белка по мере приближения к опухоли.

Заключение. Экспрессия ассоциированного с опухолевым ростом белка TUBB3 за пределами первичной опухоли указывает на молекулярную вовлеченность в опухолевый процесс визуально нормальной ткани органа и может использоваться в качестве дополнительного показателя при стадировании заболевания и определении тактики послеоперационного ведения пациентов.

Ключевые слова: рак пищевода, бета-III тубулин, проточная цитофлуориметрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-48-52

BETA-III TUBULIN EXPRESSION IN ESOPHAGEAL CANCER AND ADJACENT MORPHOLOGICALLY NORMAL TISSUE

I.A. Mamichev¹, T.A. Bogush¹, E.A. Bogush¹, A.N. Grishanina¹, N.O. Vikhlyantseva¹, N.S. Saprykina¹, A.A. Kamenskiy²

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia;

²Lomonosov Moscow State University; GSP-1, Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

Introduction. Beta-III tubulin (TUBB3), the structural protein of microtubules, is not expressed in normal epithelium, but is frequently present in different epithelial tumors. We suggested that the screening for TUBB3 in morphologically normal tissue outside the tumor may be used for the molecular diagnostics of the local spread of cancer, which is particularly significant in case of the tumors with a high rate of local recurrence, like esophageal cancer.

Objective. The quantitative assessment of TUBB3 expression in tumor and morphologically normal esophageal tissue adjacent and remote from the tumor.

Materials and methods. The expression of TUBB3 in surgical biopsy specimens of tumor and morphologically normal tissue derived from 40 patients after radical surgery for esophageal cancer was measured by immunocytometry.

Results. TUBB3 expression was detected in 35 out of 40 studied samples of esophageal cancer, as well as in 10 out of 13 samples of morphologically normal esophagus tissue adjacent to the tumor, and in 25 out of 40 samples of esophagus tissue most distant from the tumor near the resection edge. It was shown that the expression of TUBB3 in tissue specimens increases as follows: “normal tissue → adjacent normal tissue → tumor”, which basically means the existence of a positive gradient of TUBB3 expression level and intensity towards the tumor.

Conclusion. The expression of TUBB3, a protein associated with tumor growth, outside the primary tumor may indicate that the tissue appearing to be normal is already affected by the malignancy. It can be used as an additional factor in tumor staging and post-operative patient management.

Key words: esophageal cancer, β III-tubulin, flow cytometry

Введение

Бета-тубулины — семейство белков, входящих в состав микротрубочек: у позвоночных известно как минимум 9 изоформ бета-тубулина, которые кодируются разными генами и экспрессируются в разных тканях.

В злокачественных опухолях часто экспрессируются нетипичные для исходной ткани изоформы бета-тубулина. В частности, белок бета-III тубулин (TUBB3), который в норме присутствует только в нейронах, меланоцитах, эндотелиоцитах и макрофагах, экспрессируется многими опухолями эпителиального происхождения [1]. TUBB3 связан с устойчивостью к препаратам из группы таксанов [2], а также обеспечивает выживание опухолевых клеток в неблагоприятном микроокружении и, возможно, увеличивает метастатический потенциал опухоли [3].

Поскольку TUBB3 в норме отсутствует в большинстве тканей, мы предположили, что выявление его в морфологически нормальной ткани за пределами опухоли может быть использовано для молекулярной диагностики местной распространенности опухолевого процесса. Обнаружение TUBB3-позитивных клеток за пределами опухоли будет указывать на большую распространенность болезни [4].

Молекулярная диагностика локальной распространенности особенно важна для опухолей, характеризующихся частым местным рецидивированием, в частности, для рака пищевода — высокоагрессивной опухоли с крайне неблагоприятным прогнозом. Даже после радикальной операции в течение года у 20 % больных диагностируются местные рецидивы опухоли [5].

Цель исследования — количественная оценка экспрессии ассоциированного с опухолевым ростом белка TUBB3 в опухолевой и окружающей морфологически нормальной ткани пищевода, прилежащей к опухоли и отдаленной от нее.

Материалы и методы

Изучены хирургические биопсийные образцы рака пищевода и морфологически нормальной ткани 40 больных. У каждого больного охарактеризована экспрессия TUBB3 в опухолевой и морфологически нормальной ткани, удаленной от первичного очага. Дополнительно у 13 пациентов исследован материал ткани пищевода, непосредственно прилежащей к опухоли. Суммарно исследовано 93 образца.

Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии TUBB3 проведен с помощью непрямой реакции иммунофлуоресценции на проточном цитофлуориметре. Ранее метод проточной цитофлуориметрии, традиционно применяемый в исследованиях биологических жидкостей и клеток *in vitro*, был адаптирован для изучения солидных опухолей человека. Кратко: в процессе пробоподготовки хирургические биопсийные образцы переводят в одноклеточную суспензию и фиксируют 10 % раствором нейтрального формалина [6].

Для определения TUBB3 использованы первичные мышинные моноклональные антитела (ab7751, клон TU-20, Abcam, Великобритания), специфичные к фрагменту aa441–448 последовательности белка TUBB3 в конечной концентрации 0,16 мкг/мл. В качестве вторичных антител использованы козы антимышинные поликлональные антитела, конъюгированные с красителем DL650 (ab98729, Abcam, Великобритания) в конечной концентрации 0,5 мкг/мл.

Инкубацию клеток с антителами проводили в темноте при 4 °C в течение 15–20 ч (ночь). После инкубации суспензию клеток отмывали 0,5 % раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в фосфатном буфере (pH 7,4), добавляли вторичные антитела и инкубировали в течение 1,5 ч при 4 °C. Для выведения из анализа дебриса 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. После окончания инкубации пробы дважды отмывали раствором BSA.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) с применением программного обеспечения Navios Software. Исследованы 2 показателя экспрессии белка: 1) уровень экспрессии — доля специфически флуоресцирующих клеток, выраженная в процентах, и 2) интенсивность экспрессии — средняя интенсивность флуоресценции всех клеток за вычетом автофлуоресценции (Δ MF1, в у. е.). Для попарных сравнений использован одновыборочный критерий Вилкоксона с поправкой на множественные сравнения.

Результаты и обсуждение

Экспрессия TUBB3 зарегистрирована в большинстве исследованных образцов рака пищевода. При этом отмечена значительная гетерогенность уровня

Количественные показатели нормальной и злокачественной ткани пищевода

Quantitative data of TUBB3 expression in normal and malignant esophageal tissue

Группы сравнения Comparison groups	Минимум Minimum	Нижний квартиль Lower quartile	Медиана Median	Верхний квартиль Upper quartile	Максимум Maximum
	Уровень экспрессии TUBB3 (%) TUBB3 expression level (%)				
Норма, $n = 40$ Norm, $n = 40$	3	13	21	31,5	75
Норма вблизи опухоли, $n = 13$ Norm near the tumor, $n = 13$	6	15,5	31	45	56
Опухоль, $n = 40$ Tumor, $n = 40$	7	22	36	51	60
	Интенсивность экспрессии TUBB3 (у. е.) TUBB3 expression intensity (conventional unit)				
Норма, $n = 40$ Norm, $n = 40$	3	7	15,5	22	65
Норма вблизи опухоли, $n = 13$ Norm near the tumor, $n = 13$	2	7,5	13	32,5	76
Опухоль, $n = 40$ Tumor, $n = 40$	0	19	31	56	184

экспрессии маркера в опухоли у разных пациентов: минимальное значение уровня экспрессии TUBB3 – в 7 % клеток, максимальное – в 60 %, медиана – 36 %, а половина всех значений заключена в интервале от 22 до 51 %. Та же закономерность проявляется при анализе интенсивности экспрессии TUBB3 (см. таблицу).

Неожиданным оказалось обнаружение TUBB3 в морфологически нормальной ткани пищевода, как удаленной от первичной опухоли, так и непосредственно прилежащей к ней. Экспрессия TUBB3 в этих группах также оказалась неоднородной: минимальный уровень экспрессии – в 3 % клеток, максимальный – 75 %, медиана – 21 %, половина всех значений заключена в интервале от 13 до 31,5 %. Полностью количественные характеристики экспрессии TUBB3 в опухолевой и морфологически нормальной ткани пищевода приведены в таблице.

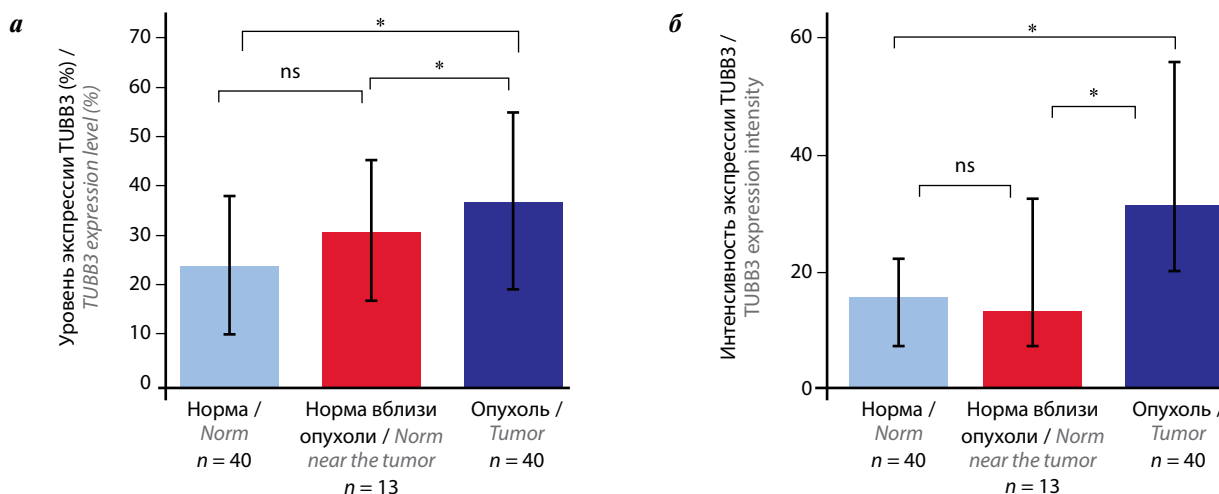
Отдельная проблема, требующая пристального внимания, – определение пороговых значений экспрессии TUBB3 в опухоли, ниже которых ее можно считать негативной. Как уже упоминалось, белок TUBB3 не выявляется в большинстве нормальных клеток пищевода, однако существуют данные, согласно которым белок экспрессируется в базальных клетках [7]. Эти клетки, несомненно, присутствуют в исследуемых суспензионных образцах, и при этом известно, что в ткани пищевода на базальный слой у человека приходится около 15 % всей толщины эпителия [8]. В связи с этим мы приняли пороговый уровень экспрессии TUBB3 равным 15 %.

С учетом выбранного порогового значения экспрессии TUBB3 выявлена в 87,5 % исследованных образцов рака пищевода (35 из 40). В прилежащей к опухоли морфологически нормальной ткани пищевода экспрессия TUBB3 выявлена в 76,9 % образцов (10 из 13). В удаленной от опухоли морфологически нормальной ткани пищевода – в 62,5 % образцов (25 из 40).

Важно отметить, что у 95 % больных (38 из 40) уровень экспрессии TUBB3 в опухоли был выше, чем в нормальной ткани, а в 90 % случаев (36 из 40) в опухоли была выше и интенсивность экспрессии маркера.

Чтобы оценить статистическую силу наблюдаемых различий экспрессии TUBB3 в опухолевом узле и морфологически нормальной ткани на разном отдалении от него, проведено попарное сравнение показателей экспрессии TUBB3 в 3 связанных группах с введением поправки на множественные сравнения. Результаты представлены на рисунке.

Видно, что в ряду «норма → норма вблизи опухоли → опухоль» экспрессия TUBB3 растет, т. е. прослеживается положительный градиент уровня и интенсивности экспрессии белка по мере приближения к опухоли. Статистически значимые различия по уровню и интенсивности экспрессии TUBB3 выявлены как между опухолевой и отдаленной морфологически нормальной тканью пищевода, так и между опухолью и непосредственно прилежащей к ней нормальной тканью. В то же время разница показателей экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной



Количественные показатели экспрессии TUBB3 в нормальной и опухолевой ткани пищевода: а – уровень экспрессии; б – интенсивность экспрессии. *Различия статистически значимы; ns – различия статистически незначимы

Quantitative indicators of TUBB3 expression in normal and tumor tissue of the esophagus: а – expression level; б – expression intensity. *Differences are statistically significant; ns – differences are not statistically significant

ткани на разном отдалении от опухоли оказалась статистически незначимой. Последнее, впрочем, может быть обусловлено малым количеством образцов прилежащей к опухоли морфологически нормальной ткани, и результаты требуют дальнейшего уточнения.

Заключение

Впервые с использованием строго количественного метода показано, что в морфологически нормальной ткани пищевода, пораженного опухолевым процессом, выявляется ассоциированный с опухолевым ростом молекулярный маркер TUBB3. Экспрессия белка в морфологически нормальной ткани пищевода всегда ниже, чем в опухоли, и варьирует в широких пределах: от 3 до 75 % клеток, экспрессирующих TUBB3.

Учитывая, что экспрессия TUBB3 в норме нехарактерна для ткани пищевода, полученные данные свидетельствуют о наличии малигнизированных кле-

ток за пределами первичной опухоли – в окружающей морфологически нормальной ткани. Это может отражать наличие «опухолевого поля», т. е. множественных фокусов трансформированных клеток по всему органу, не выявляемых под микроскопом [9], что в свою очередь указывает на молекулярную вовлеченность в опухолевый процесс морфологически нормальной ткани органа. Аналогичные результаты были получены нами ранее при сравнительной оценке количественных показателей экспрессии TUBB3 в ткани немелкоклеточного рака легкого и окружающей морфологически нормальной ткани органа [10].

Мы считаем, что экспрессия TUBB3 за пределами первичной опухоли указывает на молекулярную вовлеченность в опухолевый процесс визуально нормальной ткани органа и может использоваться в качестве дополнительного показателя при стадировании заболевания и определении тактики послеоперационного ведения пациентов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Katsetos C.D., Herman M.M., Mörk S.J. Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003;55(2):77–96. DOI: 10.1002/cm.10116.
- Jordan A., Hadfield J.A., Lawrence N.J. et al. Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med Res Rev* 1998;18(4):259–96. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1128(199807)18:4<259::AID-MED3>3.0.CO;2-U.
- Ludueña R.F. A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013;302:41–185. DOI: 10.1016/B978-0-12-407699-0.00002-9.
- Мамичев И.А., Богуш Т.А., Богуш Е.А. и др. Белок микротрубочек βIII-тубулин: строение, экспрессия и функции в нормальных и опухолевых клетках. Антибиотики и химиотерапия 2018;63(7–8):79–90. [Mamichev I.A., Bogush T.A., Bogush E.A. et al. Microtubule Protein βIII-Tubulin: Structure, Expression and Functions in Normal and Tumor Cells. *Antibiotiki i khimioterapiya* = Antibiotics and Chemotherapy 2018;63(7–8):79–90. (In Russ.)].
- Скворцов М.Б. Рак пищевода: хирургическое лечение. Сибирский медицинский журнал 2011;4:21–30. [Skvortsov M.B. Esophageal Cancer: Surgical Treatment. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal* = The Siberian Medical Journal 2011;4:21–30. (In Russ.)].
- Шатурова А.С., Богуш Т.А., Дудко Е.А. и др. Экспрессия эстрогеновых

- рецепторов β и β_1 в ткани немелкоклеточного рака легкого человека. Антибиотики и химиотерапия 2012;57(5–6):11–7. [Shaturova A.S., Bogush T.A., Dudko E.A. et al. Expression of Estrogen Receptors α and β in Tissue of Human Non-Small Cell Lung Cancer. Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy 2012;57(5–6):11–7. (In Russ.)].
7. Person F., Wilczak W., Hube-Maqq C. et al. Prevalence of β III-tubulin (TUBB3) expression in human normal tissues and cancers. Tumor Biol 2017;39(10):1–11. DOI: 10.1177/1010428317712166.
8. Быков В.Л., Исева Е.А. Функциональная морфология покровного эпителия слизистой оболочки пищевода. Морфология 2006;129(3):7–21. [Bykov V.L., Iseyeva Ye.A. Functional Morphology of the Surface Epithelium of Esophageal Tunica Mucosa. Morfologiya = Morphology 2006;129(3):7–21. (In Russ.)].
9. Garcia S.B., Park H.S., Novelli M., Wright N.A. Field cancerization, clonality, and epithelial stem cells: the spread of mutated clones in epithelial sheets. J Pathol 1999;187(1):61–81. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199901)187:1<61::AID-PATH247>3.0.CO;2-I.
10. Мамичев И.А., Богуш Т.А., Дудко Е.А. и др. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии бета-III тубулина в опухолевой и окружающей нормальной ткани пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(2):16–8. [Mamichev I.A., Bogush T.A., Dudko E.A. et al. Immunofluorescent Analyses of Tumor Marker Beta-III Tubulin Expression in Tumor and Adjacent Normal Lung Tissue Derived from Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal 2016;15(2):16–8. (In Russ.)].

Вклад авторов

И.А. Мамичев, Т.А. Богуш: анализ данных, написание текста статьи;
Е.А. Богуш: получение данных для анализа;
А.Н. Гришанина, Н.О. Вихлянцева: обзор публикаций по теме статьи;
А.А. Каменский: разработка плана, дизайна статьи;
Н.С. Сапрыкина: перевод, оформление статьи.

Author's contributions

I.A. Mamichev, T.A. Bogush: data analyses, article writing;
E.A. Bogush: obtaining data for analysis;
A.N. Grishanina, N.O. Vikhlyantseva: reviewing of publications of the article's theme;
A.A. Kamenskiy: developing of the plan and design of the article;
N.S. Saprykina: translation and design of the article.

ORCID авторов/ORCID of authors

И.А. Мамичев/I.A. Mamichev: <https://orcid.org/0000-0002-6776-4502>
Т.А. Богуш/T.A. Bogush: <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>
Е.А. Богуш/E.A. Bogush: <https://orcid.org/0000-0001-5601-3669>
А.Н. Гришанина/A.N. Grishanina: <https://orcid.org/0000-0002-4277-9222>
Н.О. Вихлянцева/N.O. Vikhlyantseva: <https://orcid.org/0000-0002-1372-2980>
Н.С. Сапрыкина/N.S. Saprykina: <https://orcid.org/0000-0003-3378-895X>
А.А. Каменский/A.A. Kamenskiy: <https://orcid.org/0000-0003-4912-922X>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 23.01.19. Принята в печать: 05.08.2019.
Article received: 23.01.19. Accepted for publication: 05.08.2019.