

СХОДИМОСТЬ И ВРЕМЕННАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА β III-ТУБУЛИНА В ТКАНИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

А.А. Башарина¹, Т.А. Богуш¹, Е.А. Рукавишников², Е.А. Богуш^{1,3}, С.А. Калужный¹,
Н.О. Вихлянцев¹, В.С. Косоруков¹

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

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

³ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Анна Александровна Башарина basharinaa@inbox.ru

Введение. Введение в клиническую практику молекулярного фенотипирования опухолей продемонстрировало необходимость создания новых аналитических методов оценки экспрессии маркеров в солидных новообразованиях, поскольку рутинно используемый метод иммуногистохимии характеризуется рядом существенных недостатков.

Цель исследования — аналитическая валидация разработанного авторами иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитометрией, для изучения опухолевых белковых маркеров в ткани солидных новообразований.

Материалы и методы. Валидация метода проведена при количественной оценке экспрессии белка β III-тубулина (TUBB3) в суспензиях клеток немелкоклеточного рака легкого, полученных из хирургических образцов опухоли. Для иммунофлуоресцентного окрашивания использованы первичные антитела к TUBB3 (ab7751) и вторичные — конъюгированные с красителем DyLight 650 (ab98729). Для измерения флуоресценции клеток использовали проточный цитометр Navios (Beckman Coulter). Для оценки валидационных параметров использован коэффициент вариации, рассчитанный как отношение среднеквадратического отклонения уровня TUBB3 к его среднему значению.

Результаты. Проведен анализ 2 параметров: сходимости и временной стабильности результатов оценки экспрессии TUBB3. Показано, что средний коэффициент вариации уровня экспрессии исследованного маркера в ткани опухоли при оценке сходимости и стабильности иммунофлуоресцентной окраски не превысил 20 %. Согласно рекомендациям по аналитической валидации методов, основанных на использовании проточного цитометра, это доказывает валидность метода по исследованным параметрам.

Заключение. Показана сходимость и временная стабильность результатов количественной оценки экспрессии прогностически и предиктивно значимого белка TUBB3 в ткани солидных опухолей при использовании разработанного авторами метода иммунофлуоресцентного окрашивания, ассоциированного с проточной цитометрией. Отмечена практическая значимость факта временной стабильности иммунофлуоресцентной окраски при хранении суспензии окрашенных клеток в темноте при 4 °C в течение 24 ч, что указывает на возможность варьирования интервала времени от завершения аналитической части исследования до работы на проточном цитометре.

Ключевые слова: валидация, проточная цитометрия, β III-тубулин, иммунофлуоресцентный анализ

Для цитирования: Башарина А.А., Богуш Т.А., Рукавишников Е.А. и др. Сходимость и временная стабильность количественной оценки экспрессии белка β III-тубулина в ткани солидных опухолей. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(3): 52–6.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-52-56



THE INTRA-ASSAY PRECISION AND TIME STABILITY OF QUANTITATIVE β III-TUBULIN EXPRESSION ASSESSMENT IN SOLID TUMOR TISSUE

A.A. Basharina¹, T.A. Bogush¹, E.A. Rukavishnikova², E.A. Bogush^{1,3}, S.A. Kaliuzhny¹, N.O. Vikhlyantseva¹, V.S. Kosorukov¹

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

²M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia;

³Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Build 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

Introduction. The introducing of tumor molecular profiling into clinical practice has revealed the need for development of new analytical methods for estimating marker expression in solid tumors, as routinely used method of immunohistochemistry has a number of significant drawbacks.

Objective. Analytical validation of immunofluorescence staining and flow cytometry method developed by the authors for the examination of tumor protein markers in the solid tumors tissue.

Materials and methods. Method validation was carried out by quantitative estimation of β III-tubulin (TUBB3) expression in single-cell suspensions of non-small-cell lung cancer obtained from surgical tumor samples. Primary antibodies to TUBB3 (ab7751) and secondary DyLight 650-conjugated antibodies (ab98729) were used for immunofluorescent staining. The «Navios» flow cytometer (Beckman Coulter) was used to measure the fluorescence. The validation parameters were assessed by the coefficient of variation calculated as the ratio of standard deviation of TUBB3 level to its mean value.

Results. Two parameters were analyzed: intra-assay precision and time stability of the results of the TUBB3 expression assessment. It was demonstrated that the mean coefficients of variation of the marker expression level in the tumor tissue did not exceed 20 % for both parameters. According to recommendations on the analytical validation of methods based on flow cytometry, it proves the validity of the method for these parameters.

Conclusions. The intra-assay precision and time stability were demonstrated for the results of a quantitative estimation of TUBB3 expression in solid tumor tissue using immunofluorescence staining and flow cytometry method developed by the authors. The practical value of the time stability of immunofluorescence stain during 24 h storage of a stained cells suspension in the dark at 4 °C was highlighted. It shows the possibility of adjusting the time interval between completion of the analytical study part and flow cytometer measurement.

Key words: validation, flow cytometry, β III-tubulin, immunofluorescent analysis

For citation: Basharina A.A., Bogush T.A., Rukavishnikova E.A. et al. The intra-assay precision and time stability of quantitative β III-tubulin expression assessment in solid tumor tissue by. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(3):52–6. (In Russ.).

Введение

Введение в клиническую практику молекулярно-фенотипирования опухолей продемонстрировало необходимость создания новых аналитических методов оценки экспрессии маркёров в солидных новообразованиях, поскольку рутинно используемый иммуногистохимический (ИГХ) метод характеризуется рядом существенных недостатков [1]. Наиболее значимые из них — крайне агрессивная пробоподготовка, субъективизм оценки полученных результатов, локальность исследования молекулярно-гетерогенного опухолевого узла и, как следствие, плохая воспроизводимость результатов [2]. Так, при повторном ИГХ-исследовании экспрессии белка ERCC1 в образцах немелкоклеточного рака легкого более 500 больных дискордантность результатов достигла 36 % [3].

Ранее мы адаптировали иммунофлуоресцентный метод, ассоциированный с проточной цитометрией, для изучения опухолевых маркёров в ткани солидных новообразований [4]. По сравнению с ИГХ-исследованием метод обладает рядом преимуществ: мягкая преаналитическая подготовка, строго количественная оценка результатов, нивелирование молекулярной гетерогенности опухоли за счет исследования маркёра в большом объеме опухолевого образца [2].

В настоящей работе проведена аналитическая валидация методики на примере оценки в ткани немелкоклеточного рака легкого экспрессии белка β III-тубулина (TUBB3), который прогнозирует агрессивность течения этого заболевания и чувствительность к терапии таксанами [5].

Цель исследования — анализ сходимости и временной стабильности результатов оценки TUBB3 в ткани солидных опухолей методом иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитометрии.

Материалы и методы

Валидация разработанного авторами иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитометрией, проведена при исследовании экспрессии белка TUBB3 в ткани немелкоклеточного рака легкого.

Приготовление одноклеточных суспензий

Для получения одноклеточной суспензии образец опухоли (до 2 см в диаметре), зафиксированный в 4 % нейтральном растворе формальдегида, тщательно измельчали и инкубировали в растворе Версена при 37 °C в течение 30 мин. К измельченному образцу опухоли добавляли раствор фосфатного буфера (pH = 7,4), гомогенизировали 5-кратным движением пестика в стеклянном гомогенизаторе и пропускали через фильтр BD Falcon (Becton, Dickinson and Company) с диаметром пор 40 мкм. Полученную суспензию клеток центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин, осадок ресуспендировали в 4 % нейтральном растворе формальдегида при интенсивном встряхивании в течение 2 мин (для предупреждения образования клеточных конгломератов). Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток проводили в 100 мкл суспензии с концентрацией 200 тыс. клеток/мл.

Иммунофлуоресцентное окрашивание и проточная цитометрия

Суспензию опухолевых клеток инкубировали в течение ночи (15–20 ч) при 4 °C с первичными моноклональными мышинными антителами к TUBB3 (ab7751, клон TU-20, Abcam) в конечном разведении 1 : 500. Далее после однократной отмывки 0,5 % раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) проводили инкубацию в течение 1,5 ч при 4 °C с вторичными

антимышинными антителами, конъюгированными с флуорохромом DyLight 650 (ab98729, Abcam), в конечном разведении 1 : 1000. Для удаления из анализа дебриса и эритроцитов клетки инкубировали в течение 15 мин с ДНК-красителем Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) в концентрации 1,2 мкг/мл, после чего дважды отмывали 0,5 % раствором BSA.

Для измерения флуоресценции клеток использовали проточный цитометр Navios (Beckman Coulter). Регистрацию сигнала флуоресценции красителей DyLight 650 и Hoechst 33258 проводили в каналах FL-6 и FL-9 соответственно. Уровень экспрессии TUBB3 (%) рассчитывали как количество специфически флуоресцирующих клеток относительно контрольных (инкубация клеток только с вторичными антителами). Расчет параметра выполняли в программе FlowJo 10.0.8 (FlowJo, LLC) с использованием статистического критерия Колмогорова–Смирнова. Гистограммы распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции строили с помощью программы WinMDI 2.9.

Обработку результатов выполнили в программе Microsoft Excel 2010 (Microsoft Windows).

Результаты и обсуждение

Валидация — это этап исследования при разработке аналитических методик, который необходим для доказательства достоверности и воспроизводимости получаемых результатов. Для методов, основанных на использовании проточного цитометра, к оценке обязательны следующие параметры: специфичность, прецизионность 3 уровней (сходимость, внутри- и межлабораторная воспроизводимость результатов), чувствительность, временная стабильность иммунофлуоресцентной окраски [6].

В данной работе проведен анализ 2 валидационных параметров: сходимости и временной стабильности результатов оценки экспрессии TUBB3 в ткани солидных опухолей методом иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитометрии.

Сходимость результатов

Сходимость — это первый уровень прецизионности методики, основанный на оценке воспроизводимости результатов, полученных при многократном анализе одного и того же образца в одинаковых условиях.

Оценка данного валидационного параметра проведена на 3 образцах опухолей разных больных при 3 повторных измерениях экспрессии TUBB3 в каждом образце в 2 повторных опытах с интервалом 24 ч. Все манипуляции, включающие иммунофлуоресцентное окрашивание и измерение на проточном цитометре, выполнены одним исследователем на одном и том же оборудовании. Измерение флуоресценции клеток проведено в течение 1 ч после завершения окрашивания образцов.

Для статистического анализа полученных результатов использована мера относительного разброса количественного показателя TUBB3 — коэффициент вариации (CV, %), рассчитанный как отношение среднеквадратического отклонения уровня TUBB3 к его среднему значению.

Таблица 1. Сходимость результатов количественной оценки уровня экспрессии β III-тубулина (TUBB3) в ткани немелкоклеточного рака легкого методом иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитометрии

Table 1. The intra-assay precision of quantitative β III-tubulin (TUBB3) expression assessment in non-small cell lung cancer tissue by immunofluorescence staining and flow cytometry

Параметр Parameter	Уровень экспрессии TUBB3, % Expression level of TUBB3, %					
	№ образца опухоли Tumor sample No.					
	1	2	3			
	№ опыта Experiment No.					
№ измерения Measurement No.	1	2	1	2	1	2
1	43	45	20	19	55	48
2	47	42	15	24	47	52
3	41	48	17	17	59	60
CV, %*	7,0	6,7	14,5	18,0	11,4	11,5
Среднее значение CV, %** Mean CV, %**	6,8		16,3		11,4	

*CV — коэффициент вариации; **среднее значение CV для каждого исследованного образца рассчитано по результатам 6 измерений в 2 повторных экспериментах.

*CV — coefficient of variation; **average CV for each investigated sample was calculated based on the results of 6 measurements in 2 repeated experiments.

В табл. 1 представлены полученные результаты. Видно, что независимо от уровня экспрессии маркера для всех образцов опухолей коэффициенты вариации и их средние значения не превышают 20 %. При таких коэффициентах вариации результаты метода считаются сходимыми [6]. При этом рассеивание данных считается незначительным при коэффициенте вариации <10 % (как в образце опухоли 1) и умеренным при коэффициентах вариации от 10 до 20 % (как в образцах опухолей 2 и 3).

Таким образом, доказана сходимость результатов количественной оценки уровня экспрессии белка TUBB3 в ткани солидных опухолей при использовании иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитометрии.

Временная стабильность иммунофлуоресцентной окраски

Оценка временной стабильности иммунофлуоресцентной окраски особенно актуальна в лабораториях с большой нагрузкой и наличием 1 прибора, когда измерение флуоресценции на проточном цитометре не может быть проведено непосредственно после завершения окрашивания [7, 8].

В настоящей работе данный валидационный параметр исследован на 3 образцах опухолей разных больных при 3 повторных измерениях экспрессии TUBB3 в каждом образце в 1 повторе опыта: после завершения окрашивания (в течение 1 ч), а также через 6 и 24 ч. Все манипуляции, включающие иммунофлуоресцентное окрашивание и измерение на проточном цитометре, выполнены одним исследователем на одном и том же оборудовании, образцы между измерениями хранились в темноте при 4 °С. Необходимо отметить, что этот раздел исследования проведен на тех же образцах опухолевой ткани, что и оценка сходимости результатов.

Для статистического анализа полученных данных использован коэффициент вариации (CV, %) между начальным уровнем экспрессии TUBB3 (оценен в течение 1 ч после завершения иммунофлуоресцентного окрашивания) и последующими временными точками анализа — 6 и 24 ч.

Полученные результаты представлены в табл. 2. Видно, что средние коэффициенты вариации уровня экспрессии TUBB3 в опухолевых клетках через 6 и 24 ч после завершения окрашивания относительно исходных показателей (в течение 1 ч после окрашивания) составили 7,6 и 9,1 % соответственно. При таких коэффициентах вариации иммунофлуоресцентная окраска признается стабильной [6]. Более того, рассеивание данных в обеих временных точках незначительно, поскольку коэффициенты вариации составили <10 %.

Таким образом, после завершения иммунофлуоресцентного окрашивания измерение флуоресценции образцов опухолей на проточном цитометре может быть отсрочено на 6 и 24 ч без искажения результатов анализа, что указывает на временную стабильность окраски по крайней мере в течение суток.

Заключение

В настоящей работе проведена аналитическая валидация иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитометрией, который адаптирован авторами для изучения белковых маркеров в ткани солидных новообразований. Проведен анализ 2 параметров: сходимости и временной ста-

Таблица 2. Временная стабильность результатов количественной оценки уровня экспрессии β III-тубулина (TUBB3) в ткани немелкоклеточного рака легкого методом иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитометрии

Table 2. Time stability of quantitative β III-tubulin (TUBB3) expression assessment of in non-small-cell lung cancer tissue by immunofluorescence staining and flow cytometry

Временной интервал после окрашивания Time interval after staining	Показатель, % Parameter, %	№ образца опухоли Tumor sample No.			Среднее значение CV, %** Mean CV, %**
		1	2	3	
≤1 ч ≤1 h	Уровень экспрессии TUBB3 TUBB3 expression level	44	19	48	—
6 ч 6 h	CV*	41	18	55	
	CV*	5,0	8,3	9,6	7,6
24 ч 24 h	Уровень экспрессии TUBB3 TUBB3 expression level	39	21	43	—
	CV*	8,5	10,9	7,7	
	CV*	8,5	10,9	7,7	9,1

*CV — коэффициент вариации; **среднее значение CV 3 образцов опухолей в 2 временных интервалах: 6 и 24 ч после завершения иммунофлуоресцентного окрашивания.

*CV — coefficient of variation; **average CV of 3 tumor samples in 2 time intervals: 6 and 24 hours after completing immunofluorescent staining.

бильности результатов оценки экспрессии β III-тубулина в ткани немелкоклеточного рака легкого.

Показано, что средний коэффициент вариации уровня экспрессии исследованного маркера в ткани опухоли при оценке сходимости и стабильности иммунофлуоресцентной окраски не превысил 20 %, что, согласно рекомендациям по аналитической валидации методов, основанных на использовании проточного цитометра, доказывает валидность метода по этим параметрам [6].

Важно отметить практическую значимость факта временной стабильности иммунофлуоресцентной окраски при хранении суспензии окрашенных клеток в темноте при 4 °С в течение 24 ч, что указывает на возможность варьирования интервала времени от завершения аналитической части исследования до работы на проточном цитометре.

В настоящий момент продолжается валидация разработанной методики по показателям внутри- и межлабораторной прецизионности и чувствительности.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Gown A.M. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 2008;(21Suppl 2):8–15. DOI: 10.1038/modpathol.2008.34.
2. Bogush T.A., Kaliuzhny S.A., Basharina A.A. et al. Immunofluorescence Analysis of the Vimentin Expression in Epithelial Cells. *Moscow Univ Chem Bull* 2019;74(6):290–5. DOI: 10.3103/S0027131419060063.
3. Friboulet L., Olausson K.A., Pignon J.P. et al. ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2013;368(12):1101–10. DOI: 10.1056/nejmoa1214271.
4. Bogush T.A., Shaturova A.S., Dudko E.A. et al. Quantitative immuno-fluorescent estimation of estrogen receptor β expression in human solid tumors using flow cytometry. *Moscow Univ Chem Bull* 2011;66:305–12. DOI: 10.3103/S0027131411040031.
5. Мамичев И.А., Богуш Т.А., Богуш Е.А. и др. Белок микротрубочек β III-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 β III-tubulin: structure, expression and functions in normal and tumor cells. *Antibiotiki i khimioterapiya* = Antibiotics and Chemotherapy 2018;63(7–8):79–90. (In Russ.)].
6. Selliah N., Eck S., Green C. et al. Flow cytometry method validation protocols. *Curr Protoc Cytom* 2019;87(1):53. DOI: 10.1002/cpcy.53.
7. Brown L., Green C., Jones N. et al. Recommendations for the evaluation of specimen stability for flow cytometric testing during drug development. *J Immunol Methods* 2015;418:1–8. DOI: 10.1016/j.jim.2015.01.008.
8. Wood B., Jevremovic D., Bene M.C. et al. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS – part V – assay performance criteria. *Cytometry B Clin Cytom* 2013;84(5):315–23. DOI: 10.1002/cyto.b.21108.

Вклад авторов

А.А. Башарина: анализ полученных результатов, написание статьи;
 Т.А. Богуш: идея исследования и руководство, написание статьи;
 Е.А. Рукавишникова: оформление статьи к публикации;
 Е.А. Богуш: сбор материала для исследования, редактирование статьи;
 С.А. Калюжный: проведение экспериментов;
 Н.О. Вихлянцева: преаналитическая подготовка материала;
 В.С. Косоруков: редактирование статьи, общее руководство темой НИР.

Authors' contributions

A.A. Basharina: analysis of the study data, writing of the manuscript;
 T.A. Bogush: conceptualization, project administration, writing of the manuscript;
 E.A. Rukavishnikova: technical editing of the manuscript;
 E.A. Bogush: provision of study materials, editing of the manuscript;
 S.A. Kaliuzhny: conduction of the research and investigation process;
 N.O. Vikhlyantseva: pre-analytic preparation of study materials;
 V.S. Kosorukov: editing of the manuscript, supervision of the research.

ORCID авторов/ORCID of authors

A.A. Башарина/A.A. Basharina: <https://orcid.org/0000-0002-4739-7733>
 Т.А. Богуш/T.A. Bogush: <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>
 Е.А. Рукавишникова/E.A. Rukavishnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6732-0899>
 Е.А. Богуш/E.A. Bogush: <https://orcid.org/0000-0001-5601-3669>
 С.А. Калюжный/S.A. Kaliuzhny: <https://orcid.org/0000-0002-8701-7707>
 Н.О. Вихлянцева/N.O. Vikhlyantseva: <https://orcid.org/0000-0002-1372-2980>
 В.С. Косоруков/V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках темы НИР: «Разработка и оценка клинической значимости новой технологии молекулярного прогнозирования резистентности и агрессивности солидных эпителиальных новообразований» (Пер. № AAA-A20-120020500021-1).

Financing. The study was carried out as part of the topic “Development and assessment of the clinical significance of a new technology for molecular prediction of resistance and aggressiveness of solid epithelial neoplasms” (Grant No. AAAA-A20-120020500021-1).

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

Compliance with the rules of bioethics. This article does not contain any research using humans or animals as objects.

Статья поступила: 05.04.2020. Принята к публикации: 30.06.2020.

Article submitted: 05.04.2020. Accepted for publication: 30.06.2020.