

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ БЕТА-III ТУБУЛИНА В ОПУХОЛЕВОЙ И ОКРУЖАЮЩЕЙ НОРМАЛЬНОЙ ТКАНИ ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

И.А. Мамичев, Т.А. Богущ, Е.А. Дудко, О.М. Рябинина, А.Н. Гришанина,
В.Ю. Кирсанов, Б.Е. Полоцкий, М.М. Давыдов

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Мамичев Иван Андреевич labmedchem@mail.ru

Введение. Бета-III тубулин (TUBB3) — одна из 8 изоформ белка микротрубочек бета-тубулина, экспрессирующаяся в организме взрослого человека исключительно в нейронах и клетках Сертоли. В то же время экспрессия TUBB3 выявляется в клетках солидных опухолей, в частности немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), где его экспрессию обычно связывают с неблагоприятным прогнозом и устойчивостью к терапии препаратами платины и таксанами.

Цель исследования — проверка выдвинутой нами гипотезы, что TUBB3 может экспрессироваться не только в первичном опухолевом узле, но и за его пределами. Исследовано 60 хирургических биопсийных образцов немелкоклеточного рака легкого и морфологически нормальной окружающей ткани 30 пациентов, оперированных в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Материалы и методы. Образцы переводили в одноклеточную суспензию, фильтровали, фиксировали в 4 % растворе формальдегида, окрашивали моноклональными антителами к TUBB3 и анализировали методом проточной цитофлуориметрии, разработанным в лаборатории медицинской химии НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина и запатентованным.

Результаты. Экспрессия TUBB3 в группе образцов НМРЛ была выше, чем в группе образцов морфологически нормальной ткани. Тем не менее в подавляющем большинстве образцов морфологически нормальной ткани (25 из 30) TUBB3 экспрессировался, достигая значения в 39 % окрашенных клеток.

Выводы. В целом, полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности присутствия TUBB3-позитивных клеток за пределами первичной опухоли — в ткани, визуально не вовлеченной в опухолевый процесс.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), нормальная ткань легкого, бета-III тубулин (TUBB3), проточная цитофлуориметрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-16-18

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

I.A. Mamichev, T.A. Bogush, E.A. Dudko, O.M. Ryabinina, A.N. Grishanina, V.E. Kirsanov, B.E. Polotsky, M.M. Davydov
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. Class III beta-tubulin (TUBB3) is one of the eight beta tubulin isotypes identified in human. It is constitutively expressed in brain and testis but not in lung tissue. TUBB3 is also known to appear in solid tumors, in particular in non-small cell lung cancer (NSCLC), and it is often associated with poor prognosis and resistance to taxanes and Vinka alkaloids.

Objective: We have suggested that TUBB3 expression may cover not only the primary tumor but also a wide adjacent area of morphologically normal lung tissue. To check the hypothesis we have measured TUBB3 expression both in the non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and remote lung tissue derived from the same lung. 60 surgical biopsy specimens of NSCLC and morphologically normal lung tissue of 30 patients were investigated.

Materials and methods. Biopsy specimens were converted to suspension, fixed in 4 % formaldehyde and analyzed by flow cytometry using monoclonal antibodies to TUBB3. The method was developed in the laboratory of medicinal chemistry research Institute of experimental diagnostics and therapy of tumors (N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center) and patented.

Results. Fraction of TUBB3-positive cells in the group of adjacent lung tissue specimens was lower compared to NSCLC group but still positive in the majority of adjacent lung tissue specimens (25 of 30) and achieved up to 39 % of cells.

Conclusion. We suggest that TUBB3 expression in adjacent morphologically normal lung tissue indicates presence of transformed and potentially malignant cells far from the primary site.

Key words: non-small cell lung carcinoma (NSCLC), normal lung tissue, class III beta-tubulin (TUBB3), flow cytometry

Введение

Микротрубочки — важнейший компонент эукариотической клетки, обеспечивающий ее архитектуру, локомоцию, пролиферацию, расхождение хромосом в митозе и мейозе, транспорт органоидов. На ультраструктурном уровне каждая микротрубочка представляет собой свернутый лист, состоящий из повторяющихся гетеродимеров белков альфа- и бета-тубулинов [1]. У человека насчитывается 8 изоформ белка бета-тубулина, которые кодируются разными генами с тканеспецифичной экспрессией [2].

В клиническом контексте активно изучается бета-III тубулин (TUBB3) — потенциальный прогностический маркер агрессивности заболевания и предиктивный маркер устойчивости к таксанам [3]. Экспрессия TUBB3, как показывают многочисленные исследования на культурах опухолевых клеток, связана с развитием агрессивного клеточного фенотипа, устойчивого к таксанам [4], оксидативному стрессу [5, 6] и анойкису [7]. В норме белок экспрессируется только в нейронах и клетках Сертоли, но выявляется и в ткани солидных опухолей разной локализации, в том числе в ткани немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), что дает надежду на использование данного маркера в качестве дифференцировочного, позволяющего отличить опухолевую ткань от здоровой.

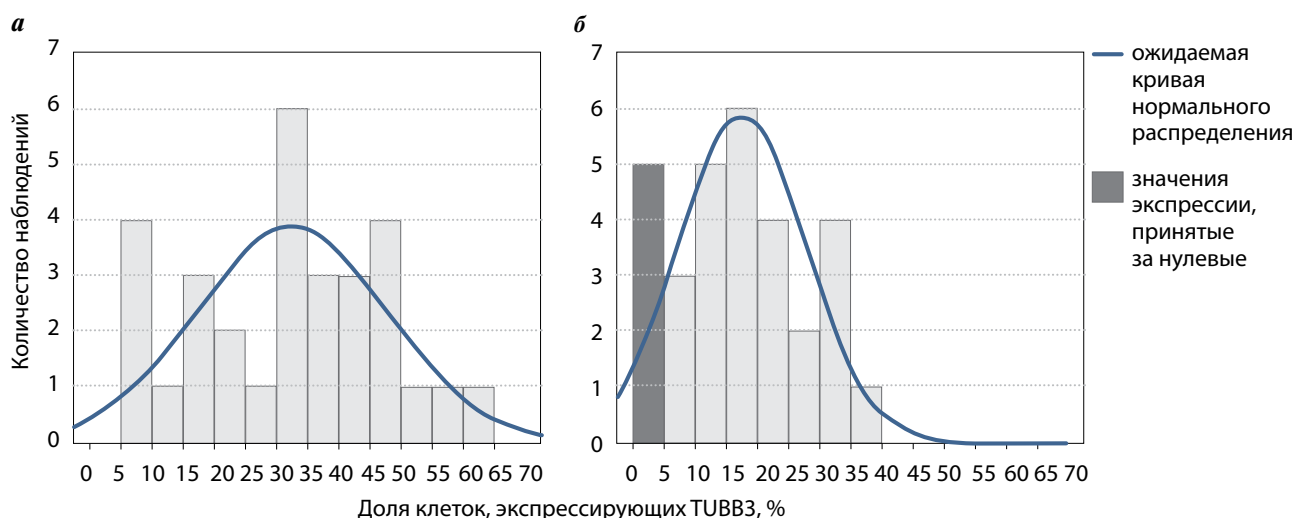
Мы предположили, что в случае выявления TUBB3 в нормальной ткани, окружающей первичный опухолевый очаг, белок может быть также маркером локальной распространенности опухолевого процесса и, таким образом, маркером агрессивности течения болезни. Справедливость этого предположения проверена на примере НМРЛ при сравнительной количественной оценке экспрессии TUBB3 в опухолевой и морфологически нормальной ткани органа.

Материалы и методы

Исследовано 60 хирургических биопсийных образцов НМРЛ и морфологически нормальной окружающей ткани органа, взятых у 30 пациентов, оперированных в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Образцы тщательно измельчали, инкубировали в растворе Версена при 37 °С в течение 30 мин, гомогенизировали и пропускали через фильтры диаметром 40 мкм. Полученную клеточную суспензию центрифугировали, осадок ресуспензировали в фосфатном буферном растворе (рН = 7,4) и фиксировали в 4 % растворе формальдегида. Суспензионные образцы инкубировали с первичными (ab7751) антителами в течение ночи и затем 1,5 ч с вторичными (ab98729) антителами, конъюгированными с DyLight650. Полученную суспензию анализировали на проточном цитофлуориметре Navios (производитель «Beckman Coulter», США). Методика, разработанная и запатентованная в лаборатории медицинской химии НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина, неоднократно использовалась для выявления экспрессии различных белковых маркеров [8].

Уровень экспрессии TUBB3 определяли как количество специфически флуоресцирующих клеток относительно общего количества клеток, включенных в анализ, вычисленное в программе FlowJo 10.0 с использованием статистического критерия Колмогорова—Смирнова. Пороговое значение уровня экспрессии маркера — 5 % и менее специфически флуоресцирующих клеток.

Статистический анализ проведен с использованием пакета прикладных программ STATISTICA фирмы StatSoft (США) версии 6.0. Анализ соответствия распределения уровня экспрессии TUBB3 параметрам нормального распределения проведен



Гистограммы распределения экспрессии TUBB3 в ткани немелкоклеточного рака легкого (а) и морфологически нормальной ткани легкого (б).

с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для оценки различий между попарно сравниваемыми группами по доле специфически флуоресцирующих клеток использован непараметрический W-критерий Вилкоксона для связанных групп. За пороговый уровень значимости принимали величину $p < 0,05$.

Результаты

Экспрессия TUBB3 зарегистрирована в 100 % исследованных образцов НМРЛ. При этом отмечена значительная гетерогенность количественных показателей уровня экспрессии маркера в опухоли у разных пациентов – от 6 до 62 % клеток, экспрессирующих TUBB3. Данные, представленные на рисунке (а), показывают, что распределение значений признака соответствует нормальному ($p = 0,662$ по критерию Шапиро–Уилка). Средний уровень экспрессии составляет $32,3 \pm 15,4$ %, медиана – 33,5 % клеток, экспрессирующих TUBB3.

Среди образцов морфологически нормальной ткани легкого, окружающей первичный опухолевый узел, экспрессия TUBB3 зарегистрирована в 83 % случаев (25 из 30 исследованных образцов). Показатель уровня экспрессии маркера варьирует от 4 до 39 % специфически флуоресцирующих клеток. Гистограмма распределения значений признака среди исследованных образцов ткани, представленная на рисунке (б), демонстрирует, что распределение соответствует нормальному ($p = 0,564$ по критерию Шапиро–Уилка). Средний уровень экспрессии TUBB3 составляет $17,7 \pm 10,2$ %, медиана – 17,5 % клеток, экспрессирующих TUBB3.

Таким образом, в нормальной ткани легкого, окружающей очаг немелкоклеточного рака, выявляется опухолевый маркер TUBB3, но его экспрессия слабее, чем в опухоли, что подтверждается попарным сравне-

нием уровня экспрессии маркера в этих группах с использованием статистического критерия Вилкоксона ($p < 0,05$). Средний уровень экспрессии TUBB3 в опухоли практически в 2 раза превышает этот показатель в окружающей нормальной ткани легкого (32,3 % vs 17,7 % клеток, экспрессирующих маркер).

Заключение

Так как экспрессия TUBB3 в норме нехарактерна для клеток, образующих паренхиму легкого, то полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности присутствия малигнизированных клеток за пределами первичной опухоли – в ткани, визуалью не вовлеченной в опухолевый процесс. Это может быть как следствием «расселения» опухолевых клеток из первичного очага в окружающую нормальную ткань органа, так и свидетельством наличия в нормальной ткани легкого фокусов трансформированных клеток – возможных предшественников опухолевого узла.

Независимо от причин описанного феномена гетерогенность экспрессии TUBB3 за пределами первичной опухоли указывает на информативность количественной оценки маркера для молекулярной диагностики локальной распространенности заболевания, что подтверждает правомочность сформулированной авторами гипотезы. Более того, исследование TUBB3 может стать важным молекулярным дополнением к морфологическому исследованию лимфатических узлов при стадировании опухолевого процесса.

И, наконец, полученные данные являются молекулярным подтверждением обоснованности радикализма хирургического вмешательства по поводу НМРЛ даже на начальных стадиях заболевания.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (№15-04-06991-а, 16-34-01049-мол-а) и гранта Президента РФ МК-7709.2016.7.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Nogales E. Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 2000;69:277–302. PMID:10966460.
2. Leandro-García L.J., Leskelä S., Landa I. et al. Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isotypes. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010;67(4):214–23. doi: 10.1002/cm.20436. PMID: 20191564.
3. Jakobsen J.N., Santoni-Rugiu E., Sørensen J.B. Use of TUBBIII for patient stratification and prognosis in lung cancer. *Lung Cancer Management* 2015;4(2): 97–110. doi:10.2217/lmt.15.6.
4. Derry W.B., Wilson L., Khan I.A. et al. Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes. *Biochemistry* 1997;36(12):3554–62. PMID: 9132006.
5. Carré M., André N., Carles G. et al. Tubulin is an inherent component of mitochondrial membranes that interacts with the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem* 2002; 13;277(37):33664–9. Epub 2002 Jun 26. PMID: 12087096.
6. 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. PMID: 23351710.
7. McCarroll J.A., Gan P.P., Erlich R.B. et al. TUBB3/ β III-tubulin acts through the PTEN/AKT signaling axis to promote tumorigenesis and anoikis resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2015;75(2):415–25. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2740. Epub 2014 Nov 20. PMID: 25414139.
8. Богуш Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А. и др. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека. *Вестник московского университета, сер. 2. Химия* 2011;52(4): 305–12.