

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКА RRM1 В ТКАНИ СЕРОЗНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

С.А. Калужный, Е.А. Дудко, В.Т. Заркуа, Е.А. Богуш, В.Ю. Кирсанов, С.Д. Коломийцев,
Н.О. Вихлянцева, А.С. Тюляндина, Т.А. Богущ

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

Контакты: Сергей Андреевич Калужный labmedchem@mail.ru

Цель исследования — определение уровня экспрессии RRM1 в ткани серозной аденокарциномы яичников.

Материалы и методы. Определение уровня экспрессии RRM1 в ткани серозной аденокарциномы яичников проведено с использованием разработанного и запатентованного авторами строго количественного иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией.

Результаты. Экспрессия RRM1 выявлена в 100 % образцов серозной аденокарциномы яичников со значительными отличиями в уровне показателя у разных пациенток. Высокий уровень RRM1 (≥ 40 % клеток, экспрессирующих маркер) выявлен в 65 % исследованных образцов опухолей, низкий (< 40 % клеток, экспрессирующих маркер) — в 35 % случаев.

Заключение. Данные о низкой экспрессии RRM1 в 1/3 исследованных образцов первичной серозной аденокарциномы яичников согласуются с клиническими наблюдениями эффективности монотерапии гемцитабином у 25–30 % больных. Авторы считают, что строго количественное определение уровня маркера в опухолевой ткани может помочь в преодолении неоднозначности оценок клинической значимости RRM1 в предсказании эффективности лечения гемцитабином.

Ключевые слова: серозная аденокарцинома яичников, гемцитабин, RRM1, проточная цитофлуориметрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-87-89

QUANTITATIVE IMMUNOFLUORESCENT DETECTION OF RRM1 PROTEIN IN OVARIAN CANCER TISSUE BY FLOW CYTOMETRY

S. A. Kalyuzhny, E. A. Dudko, V. T. Zarkua, E. A. Bogush, V. Yu. Kirsanov, S. D. Kolomiitsev, N. O. Vichlyantseva,
A. S. Tyulandina, T. A. Bogush

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Objective of the research was determination level of RRM1 expression in ovarian cancer tissue.

Materials and methods. To avoid disadvantages of those evaluations, the present study of the RRM1 expression level in ovarian cancer tissue determination was held using strictly quantitative immunofluorescence flow cytometry-associated method developed by the authors.

Results. RRM1 expression was detected in 100 % of samples of ovarian serous adenocarcinoma, with significant differences in the indicator level in variable patients. The high level of RRM1 (≥ 40 % of cells expressing the marker) was detected in 65 % of the tumor samples studied, low (< 40 %) — in 35 % of cases. Data on the lower expression of RRM1 in one-third of the test samples from primary serous ovarian cancer corresponds with clinical observations of gemcitabine monotherapy efficiency in 25–30 % of patients.

Conclusion. The authors believe that a strictly quantitative determination of the marker level in tumor tissue can help to overcome the ambiguity of RRM1 clinical significance estimation in gemcitabine treatment effectiveness prediction.

Key words: ovarian cancer, gemcitabine, RRM1, flow cytometry

Введение

Серозная аденокарцинома яичников — распространенное онкологическое заболевание, стандартом 1-й линии химиотерапии которого является комбинация препаратов платины и таксанов [1]. При диагностировании резистентности часто назначают

из препаратов 2-й линии гемцитабин как в монотерапии, так и в комбинации с препаратами платины.

Гемцитабин представляет собой нуклеозидный аналог цитозина (2',2'-дифтор-дезоксифитидин), в механизме противоопухолевого действия которого главную роль играет нарушение синтеза ДНК. Активированный

гемцитабин в клетке ковалентно связывается с белком RRM1. Это мономер фермента рибонуклеотидредуктазы, тетрамер, включающий 2 субъединицы — RRM1 и RRM2. В экспериментальных исследованиях показано, что высокая экспрессия RRM1 ассоциирована с резистентностью к гемцитабину [2].

Клинические данные о предиктивной значимости экспрессии белка RRM1 в прогнозе резистентности к гемцитабину неоднозначны, хотя во многих исследованиях четко показано, что гиперэкспрессия RRM1 является предиктивным фактором худшего ответа на терапию гемцитабином [3, 4]. По нашему мнению, эти противоречия во многом связаны с тем, что в большинстве работ по оценке экспрессии RRM1 были использованы полуколичественные методы иммуногистохимии и полимеразной цепной реакции. Чтобы избежать недостатков таких оценок, в настоящем исследовании определение уровня экспрессии RRM1 в ткани серозной аденокарциномы яичников проведено с использованием разработанного и запатентованного авторами строго количественного иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией.

Материалы и методы

В работе исследовано 44 хирургических образца ткани серозной аденокарциномы яичников. Одно-клеточные суспензии инкубировали с первичными (ab81085, Abcam) антителами в течение ночи, а затем 1,5 ч со вторичными (DyLight650, ab98510, Abcam) антителами. Для выведения из анализа дебриса и эритроцитов после завершения инкубации со вторичными антителами клетки инкубировали в течение 15 мин со специфическим красителем ДНК Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1,2 мкг/мл. В анализ включали только клетки с окрашенными ядрами, исключая клеточные конгломераты путем дополнительного гейтирования.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter,

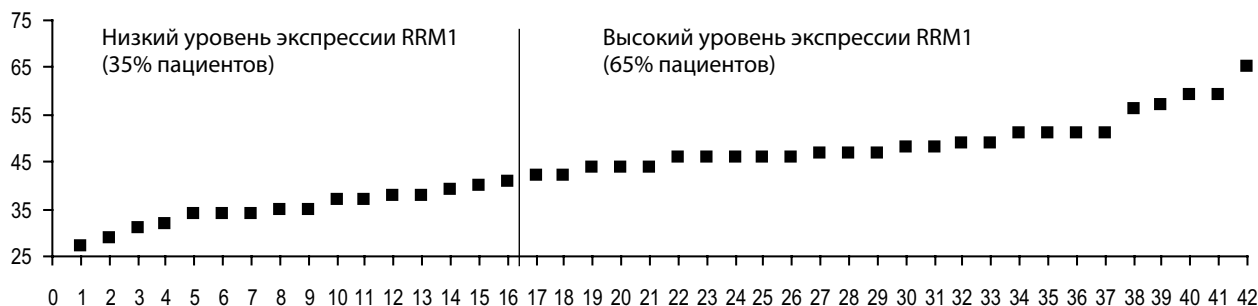
США). Для возбуждения флуоресценции использовали твердотельные диодные лазеры с длиной волны испускаемого света 405 и 638 нм. Регистрацию сигнала флуоресценции Hoechst 33258 проводили в канале FL-9, а для DyLight650 использовали канал FL-6. При измерении использовали средний показатель скорости подсчета клеток; число анализируемых событий — 5000.

Показатели экспрессии RRM1 анализировали с помощью программы FlowJo статистическим методом Колмогорова—Смирнова. Интенсивность экспрессии RRM1 рассчитывали как отношение специфической флуоресценции к контрольному показателю (только вторичные антитела): высокая — $\geq 2,5$; низкая — $< 2,5$ усл. ед. Уровень экспрессии RRM1 рассчитывали как процент специфически флуоресцирующих клеток относительно общего количества клеток, включенных в анализ: высокий — количество специфически окрашенных клеток в опухоли $\geq 40\%$, низкий $< 40\%$.

Результаты и обсуждение

При оценке уровня экспрессии RRM1 в ткани серозной аденокарциномы яичников экспрессия маркера выявлена в 100 % опухолей со значительными отличиями в уровне экспрессии маркера у разных пациентов (см. рисунок). Средний показатель уровня экспрессии RRM1 в целом по группе составил $40,4 \pm 9,9\%$ при минимальном и максимальном значениях количества клеток, экспрессирующих маркер, — 35 и 65 % соответственно.

Высокий уровень экспрессии RRM1 ($\geq 40\%$ клеток, экспрессирующих маркер) выявлен в 65 % исследованных образцов опухолей, при этом средний показатель в этой подгруппе составил $49,0 \pm 5,8\%$, а медиана — 48,0 % клеток, экспрессирующих маркер. Подгруппу с низким уровнем экспрессии RRM1 ($\geq 40\%$ клеток, экспрессирующих маркер) составили 35 % исследованных образцов опухолей при среднем значении показателя $33,2 \pm 6,9\%$ и медиане 34,5 %.



Уровень экспрессии RRM1 в ткани серозной аденокарциномы яичников. По оси абсцисс — номера исследованных образцов опухолей; по оси ординат — уровень экспрессии RRM1 (процент специфически окрашенных клеток относительно контроля). Вертикальная линия на рисунке разделяет образцы опухолей с низким ($\leq 40\%$ клеток, экспрессирующих маркер) и высоким ($> 40\%$ клеток, экспрессирующих маркер) уровнем экспрессии RRM1

Показатели средней интенсивности экспрессии RRM1 (отношение специфической флуоресценции к контрольному показателю) в ткани серозной аденокарциномы яичников в группах с высоким и низким уровнем маркера не различались и составили $2,9 \pm 0,7$ и $2,1 \pm 0,6$ усл. ед. соответственно ($p > 0,05$).

Полученные данные о низкой экспрессии RRM1 в 1/3 исследованных образцов первичной серозной аденокарциномы яичников согласуются с клиническими наблюдениями эффективности монотерапии гемцитабином у 25–30 % больных [5]. Это показывает, что строго количественное определение уровня маркера в опухолевой ткани может помочь в прео-

долении упомянутой выше неоднозначности оценок клинической значимости RRM1 в предсказании эффективности лечения гемцитабином. Сам же факт, что этот белок является предиктивным маркером, сомнений не вызывает, так как определяющая роль RRM1 в реализации противоопухолевого эффекта гемцитабина безусловна и подтверждена в многочисленных экспериментальных исследованиях [2, 3].

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

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

1. Тюляндина А.С. Лекарственное лечение рака яичников. Практическая онкология 2014;15(4):168–75.
2. Jordheim L.P., Dumontet C. Review of recent studies on resistance to cytotoxic deoxynucleoside analogues. Biochim Biophys Acta 2007;1776(2):138–59. PMID: 17881132.
3. Besse B., Olaussen K.A., Soria J.C. ERCC1 and RRM1: ready for prime time? J Clin Oncol 2013;31(8):1050–60. DOI: 10.1200/JCO.2012.43.0900. PMID: 23401439.
4. Jordheim L.P., Sève P., Trédan O., Dumontet C. The ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) as a predictive factor in patients with cancer. Lancet Oncol 2011;12(7):693–702. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70244-8. PMID: 21163702.
5. Edwards S.J., Barton S., Thurgar E., Trevor N. Topotecan, pegylated liposomal doxorubicin hydrochloride, paclitaxel, trabectedin and gemcitabine for advanced recurrent or refractory ovarian cancer: a systematic review and economic evaluation. Health Technol Assess 2015;19(7):1–11. DOI: 10.3310/hta19070. PMID: 25626481.