

# КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ БЕТА-III-ТУБУЛИНА В ТКАНЯХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ И ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

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

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

Контакты: Иван Андреевич Мамичев labmedchem@mail.ru

**Введение.** Бета-III-тубулин (TUBB3) может экспрессироваться в ткани немелкоклеточного рака легкого и считается маркером неблагоприятного прогноза заболевания и устойчивости опухоли к терапии таксанами и винкалкалоидами. В настоящее время недостаточно изучены особенности экспрессии данного маркера в зависимости от гистологического типа опухоли.

**Цель исследования** – охарактеризовать 2 группы пациентов с аденокарциномой легкого и плоскоклеточным раком (ПКР) легкого по уровню экспрессии TUBB3 в опухолевой ткани.

**Материалы и методы.** В работе исследованы образцы опухолевой ткани 43 пациентов с аденокарциномой и 39 с ПКР легкого. Образцы переводили в одноклеточную суспензию, фильтровали, фиксировали в 4 % растворе формальдегида, окрашивали моноклональными антителами к TUBB3 и вторичными антителами к IgG мыши и анализировали методом проточной цитофлуориметрии, разработанным в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина Минздрава России.

**Результаты.** Средний уровень экспрессии TUBB3 в группе аденокарциномы достоверно выше, чем в группе ПКР ( $33,1 \pm 12,4$  % клеток, экспрессирующих маркер, в ткани аденокарциномы против  $26,0 \pm 13,6$  % клеток в ткани ПКР; различия статистически значимы). Средний уровень экспрессии TUBB3 в опухолевой ткани аденокарциномы у женщин составил  $29,7 \pm 8,1$  %, у мужчин –  $34,9 \pm 13,9$  % клеток, экспрессирующих маркер (различия статистически незначимы). Поскольку группа пациентов, страдавших аденокарциномой, была представлена как мужчинами, так и женщинами, в то время как группу пациентов, страдавших ПКР легкого, составили только мужчины, из анализа исключили пациентов женского пола. Статистически достоверные различия между группами сохранились.

**Выводы.** Экспрессия TUBB3 в ткани опухоли не зависит от пола, по крайней мере среди пациентов с аденокарциномой легкого, и в то же время уровень TUBB3 в ткани аденокарциномы выше по сравнению с уровнем в ткани ПКР.

**Ключевые слова:** немелкоклеточный рак легкого, бета-III-тубулин, аденокарцинома легкого, плоскоклеточный рак легкого, проточная цитофлуориметрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-95-98

## QUANTITATIVE ASSESSMENT OF BETA-III TUBULIN EXPRESSION IN LUNG ADENOCARCINOMA AND SQUAMOUS CELL CARCINOMA

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

**Background.** Beta-III tubulin (TUBB3) is a tumor-specific isoform of the microtubule protein beta-tubulin. TUBB3 is considered to be a marker of adverse prognosis and tumor resistance to therapy with taxanes and Vinka alkaloids. Association between TUBB3 expression and histological type of the tumor has not been studied properly yet.

**Objective.** The expression level of TUBB3 in non-small cell lung cancer biopsy specimens has been measured on 2 groups of patients with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma.

**Materials and methods.** The samples with adenocarcinoma ( $n = 43$ ) and squamous cell carcinoma ( $n = 39$ ) were converted to suspension, filtered, fixed with 4 % formaldehyde, stained with monoclonal antibodies for TUBB3 and DyLight 650-conjugated secondary antibodies to mouse IgG and analyzed by flow-cytometry. The method was developed in N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center.

**Results.** The average level of TUBB3 expression in the adenocarcinoma group is higher than in the squamous cell carcinoma group ( $33.1 \pm 12.4$  % of cells expressing the marker in adenocarcinoma vs.  $26.0 \pm 13.6$  % in squamous cell carcinoma; differences were statistically significant). The average level of TUBB3 expression in adenocarcinoma is  $29.7 \pm 8.1$  % in female and is  $34.9 \pm 13.9$  % in male (differences statistically insignificant). Since the group of patients with adenocarcinoma was presented by both men and women, while the group of patients with squamous cell carcinoma was only men, from the analysis was excluded all female patients. Differences between the groups remained statistically significant.

**Conclusion.** *TUBB3 expression in tumor tissue does not depend on the gender, at least among patients with adenocarcinoma of the lung, and at the same time, the level of TUBB3 in adenocarcinoma tissue is higher in comparison with squamous cell carcinoma tissue.*

**Key words:** *non-small cell lung cancer, beta-III tubulin, adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, flow cytometry*

### Введение

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) представляет собой морфологически неоднородную группу опухолей, обычно рассматриваемую отдельно от мелкоклеточного рака. Согласно новейшей гистологической классификации опухолей легких WHO/IASLC 2015 г. НМРЛ подразделяется на плоскоклеточный рак (ПКР) легкого, аденокарциному легкого, крупноклеточный рак легкого и некоторые более редкие формы, такие как аденосквамозный рак [1,2]. Каждая морфологическая форма опухоли имеет свои особенности клинического течения, лечения и прогноза.

Среди всех форм НМРЛ преобладают 2 гистологических подтипа: аденокарцинома и ПКР, на долю которых приходится около 80 % всех случаев.

Согласно клиническим данным ПКР более характерен для мужчин и, как правило, ассоциирован с курением, тогда как аденокарцинома чаще встречается у женщин и некурящих мужчин.

Некоторые клиницисты считают, что пациенты, страдающие аденокарциномой, в среднем имеют лучший прогноз общей выживаемости, чем пациенты, страдающие ПКР [3].

Клинические исследования эффективности ряда таргетных препаратов (пеметрексед, бевацизумаб и др.) свидетельствуют о наличии молекулярных прогностических и предиктивных опухолевых маркеров, специфичных по отношению к разным гистологическим формам заболевания. В рекомендациях ESMO 2010 г. подчеркивается необходимость дифференцировать по крайней мере плоскоклеточный и неплюскоклеточный гистологические подтипы НМРЛ при назначении 1-й линии лечения [4]. В последних клинических рекомендациях ASCO приведены алгоритмы использования специфических режимов лечения в зависимости от результатов гистологического анализа [5].

Известно, что для определенных гистологических подтипов НМРЛ характерны специфические генетические изменения. В последнее время предприняты попытки классифицировать основные мутации и профили экспрессии генов, присущие тому или иному подтипу. К примеру, установлено, что мутации EGFR и транслокации ALK-EML4 более характерны для аденокарциномы [6, 7], амплификация FGFR1 и SOX2 – для ПКР [8, 9]. Ранее нами была установлена более выраженная экспрессия эстрогеновых рецепторов бета в ткани аденокарциномы легкого по сравнению с ПКР [10].

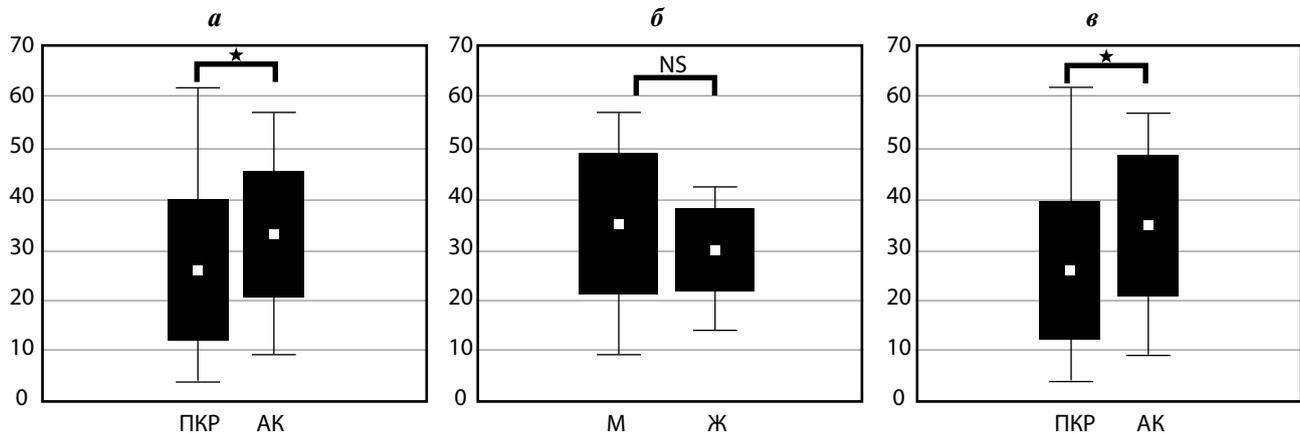
В настоящей работе охарактеризованы 2 группы пациентов по уровню бета-тубулина (beta-III-tubulin, TUBB3) в опухолевой ткани в зависимости от гистологического типа новообразования: аденокарцинома легкого или ПКР. TUBB3 – характерная для опухолей изоформа белка микротрубочек бета-тубулина, экспрессия которой запускается в ответ на гипоксию и гормональную стимуляцию. Более того, TUBB3 считают маркером неблагоприятного прогноза заболевания и устойчивости к антитубулиновым агентам – таксанам и винкалкалоидам, широко используемым в терапии НМРЛ.

### Материалы и методы

Исследование проведено с использованием разработанной и запатентованной в лаборатории методики [10]. Кратко: хирургические образцы ткани НМРЛ пациентов, оперированных в РОНЦ им Н.Н. Блохина, тщательно измельчали, инкубировали в растворе Версена при 37 °С в течение 30 мин, гомогенизировали и фильтровали через фильтры диаметром 40 мкм. Полученную суспензию центрифугировали, ресуспендировали осадок 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 со вторичными (ab98729) антителами, конъюгированными с DyLight650. Полученную суспензию анализировали на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Уровень экспрессии TUBB3 определяли как отношение количества специфически флуоресцирующих клеток к общему количеству клеток, вычисленное в программе FlowJo 10.0 по статистическому критерию Колмогорова–Смирнова. Обработка количественных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica (StatSoft, США) версии 6.0. Суммарно проанализировано 82 хирургических биопсийных образца опухолевой ткани. Для оценки различий между попарно сравниваемыми группами по доле специфически флуоресцирующих клеток мы использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента и его непараметрический аналог – *U*-критерий Манна–Уитни. Выбранный критерий статистической значимости различий:  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

На первом этапе работы количественная оценка экспрессии TUBB3 в ткани НМРЛ проведена в 2 груп-



Уровень экспрессии бета-III-тубулина (TUBB3) в опухолевых образцах больных немелкоклеточным раком легкого (в % окрашенных клеток): а – сравнительная оценка экспрессии TUBB3 в опухолевой ткани в зависимости от гистотипа без учета пола пациентов; б – сравнительная оценка экспрессии TUBB3 в ткани аденокарциномы в зависимости от пола пациентов; в – сравнительная оценка экспрессии TUBB3 в зависимости от гистотипа у пациентов мужского пола. Белый квадрат в центре – среднее, закрашенная область – стандартное отклонение, вертикальные линии – разброс данных; ПКР – плоскоклеточный рак, АК – аденокарцинома, М – мужчины, Ж – женщины; \* различия статистически значимы, NS – различия статистически незначимы

пах сравнения без учета пола пациентов: аденокарцинома легкого ( $n = 43$ ) и ПКР легкого ( $n = 39$ ). Показано, что доли клеток, экспрессирующих TUBB3 (т. е. уровень экспрессии маркера в ткани), сильно различаются между образцами: от 9 до 57 % клеток в группе аденокарциномы и от 4 до 62 % в группе ПКР. Несмотря на близкие минимальные и максимальные значения показателя, данные показывают, что средний уровень экспрессии TUBB3 в группе аденокарциномы достоверно выше, чем в группе ПКР;  $33,1 \pm 12,4$  % клеток, экспрессирующих маркер, в ткани аденокарциномы против  $26,0 \pm 13,6$  % клеток в ткани ПКР;  $p = 0,01$  по критериям Стьюдента и Манна–Уитни (см. рис. а).

Учитывая экспериментальные данные об эстрогензависимой экспрессии TUBB3 [11] и разное течение заболевания у мужчин и женщин, мы предположили, что выявленные различия экспрессии TUBB3 в ткани аденокарциномы и в ткани ПКР легкого могут быть ассоциированы с гендерной принадлежностью. Однако разделение пациентов, страдающих аденокарциномой, на подгруппы женщин ( $n = 15$ ) и мужчин ( $n = 28$ ) и сравнение уровня экспрессии маркера в опухолевой ткани в этих подгруппах не выявили статистически достоверных различий (см. рис. б). Средний уровень экспрессии TUBB3 в опухолевой ткани у женщин составил  $29,7 \pm 8,1$  %, у мужчин –  $34,9 \pm 13,9$  % клеток, экспрессирующих маркер ( $p = 0,20$  и  $0,13$  по критериям Стьюдента и Манна–Уитни соответственно).

Для дополнительной оценки возможной ассоциации экспрессии TUBB3 с гистологическим типом опухоли легкого, выявленной на первом этапе работы (см. рис. а), проведена дополнительная стратификация исследованных образцов в группах сравнения.

Поскольку группа пациентов, страдавших аденокарциномой, была представлена как мужчинами, так и женщинами, в то время как группу пациентов, страдавших ПКР легкого, составили только мужчины, из анализа исключили пациентов женского пола (см. рис. б). Сравнительный анализ выявил статистически достоверные различия между получившимися группами. Средний показатель экспрессии TUBB3 в группе аденокарциномы ( $n = 28$ ) составил  $34,9 \pm 13,9$  %, а в группе ПКР ( $n = 39$ ) он остался равным  $26,0 \pm 13,6$  % клеток, экспрессирующих маркер ( $p = 0,01$ , критерии Стьюдента и Манна–Уитни). Таким образом, можно сделать вывод: экспрессия TUBB3 в ткани опухоли не зависит от пола пациента, по крайней мере среди пациентов, страдающих аденокарциномой легкого, в то же время уровень TUBB3 в ткани аденокарциномы выше такового в ткани ПКР легкого.

Обсуждая полученные результаты в целом, следует отметить, что повышенная экспрессия TUBB3 в ткани аденокарциномы по сравнению с ПКР легкого уже была продемонстрирована в ряде исследований [12] с использованием иммуногистохимического метода, который не исключает погрешностей, связанных с гетерогенностью опухоли и субъективной оценкой результатов.

В настоящей работе, выполненной с использованием строго количественного иммунофлуоресцентного метода с привлечением проточной цитофлуориметрии, получено подтверждение этого феномена, который на первый взгляд представляется не очевидным.

Согласно данным литературы аденокарцинома легкого имеет более благоприятное клиническое течение по сравнению с таковым при ПКР легкого

[3]. В то же время экспрессия опухолевого маркера TUBB3, ассоциированного с неблагоприятным прогнозом заболевания, более выражена именно в группе пациентов, страдающих аденокарциномой. По-видимому, потенциально онкогенные функции TUBB3 в ткани аденокарциномы маскируются другими, благоприятными факторами, которых, судя по клиническим данным, при аденокарциноме больше, чем при ПКР.

Иными словами, оценка экспрессии в опухолевой ткани лишь одного опухолевого белка, прогностическая и/или предиктивная значимость которого безусловно доказана в фундаментальных исследованиях, недостаточна для прогноза течения болезни в клинике.

*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. Владимирова Л. Ю., Кит О. И., Шолохова Е. А. Роль гистологического и молекулярного анализа в выборе метода лечения немелкоклеточного рака легкого поздних стадий. Фарматека 2012;241(8):9–22.
2. Travis W.D., Brambilla E., Nicholson A.G. et al. The 2015 world health organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. J Thorac Oncol 2015;10(9):1243–60. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000630. PMID: 26291008.
3. Hirsch F.R., Spreafico A., Novello S. et al. The prognostic and predictive role of histology in advanced non-small cell lung cancer: a literature review. J Thorac Oncol 2008;3(12):1468–81. DOI: 10.1097/JTO.0b013e318189f551. PMID: 19057275.
4. D'Addario G., Fruh M., Reck M. et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2014;25(3):27–39. DOI:10.1093/annonc/mdu199. PMID: 25115305.
5. Azzoli C.G., Temin S., Aliff T. et al. 2011 focused update of 2009 American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update on chemotherapy for stage IV non-small cell lung cancer. J Oncol Pract 2012;8(1):63–6. DOI: 10.1200/JOP.2011.000374. PMID: 22548014.
6. Shaw A.T., Yeap B.Y., Mino-Kenudson M. et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. J Clin Oncol 2009;27(26):4247–53. DOI:10.1200/JCO.2009.22.6993. PMID: 19667264.
7. Shigematsu H., Lin L., Takahashi T. et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. J Natl Cancer Inst 2005;97(5):339–46. PMID: 15741570.
8. Bass A.J., Watanabe H., Mermel C.H. et al. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. Nat Genet 2009;41(11):1238–42. DOI: 10.1038/ng.465. PMID: 19801978.
9. Weiss J., Sos M.L., Seidel D. et al. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. Sci Transl Med 2010;2(62):62–93. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001451. PMID: 21160078.
10. Богуш Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А. и др. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов  $\beta$  в солидных опухолях человека. Вестник Московского университета, сер. 2. Химия 2011;52(4):305–12.
11. Saussède-Aim J., Matera E.L., Ferlini C. et al. Beta-3-tubulin is induced by estradiol in human breast carcinoma cells through an estrogen-receptor dependent pathway. Cell Motil Cytoskeleton 2009;66(7):378–88. DOI: 10.1002/cm.20377. PMID: 19466750.
12. Reiman T., Lai R., Veillard A.S. et al. Cross-validation study of class III beta-tubulin as a predictive marker for benefit from adjuvant chemotherapy in resected non-small-cell lung cancer: analysis of four randomized trials. Ann Oncol 2012;23(1):86–93. DOI: 10.1093/annonc/mdr033. PMID: 21471564.