

УДК 616-006-073.524-076.5:576.385.5

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ *DE NOVO* ЭКСПРЕССИИ ВИМЕНТИНА В ТКАНИ РАКА ЯИЧНИКОВ: ХИРУРГИЧЕСКИЕ ОБРАЗЦЫ VS ПАРАФИНОВЫЕ БЛОКИ

Т.А. Богуш¹, А.А. Башарина¹, Е.А. Богуш^{1,2}, А.Н. Гришанина¹, Д.М. Сакаева¹,
В.Ю. Кирсанов², М.М. Давыдов², В.С. Косоруков¹

(¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; ² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет); e-mail: tatbogush@mail.ru)

Проведено сравнение результатов анализа эпителиально-мезенхимальной трансформации серозного рака яичников разработанным авторами методом двойного иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитометрии при исследовании хирургических образцов опухоли и ткани, заключенной в парафиновые блоки. При оценке *de novo* экспрессии мезенхимального белка виментина в эпителиальных опухолевых клетках, экспрессирующих цитokerатины, результаты оказались близки не только по количественным показателям, но и визуально по характеру распределения клеток на точечных диаграммах. Полученные результаты указывают на перспективность внедрения в рутинную лабораторную практику разработанной новой технологии молекулярной диагностики эпителиально-мезенхимальной трансформации опухолей человека.

Ключевые слова: иммунофлуоресцентный анализ, проточная цитометрия, виментин, цитokerатины, парафиновые блоки, эпителиально-мезенхимальная трансформация.

Эпителиально-мезенхимальная трансформация (ЭМТ) опухолевых клеток – важнейшая молекулярная характеристика злокачественных эпителиальных новообразований, позволяющая оценить агрессивность опухолевого заболевания. При этом эпителиальные опухолевые клетки в состоянии ЭМТ приобретают свойства, характерные для клеток мезенхимального происхождения [1–2], при этом изменяются уровень экспрессии и профиль ряда опухолевых белков [3–7], что приводит к индукции лекарственной резистентности и увеличению метастатического потенциала клеток [8–9]. Важнейшим маркером этой молекулярной модификации, позволяющей провести персонализированную оценку опухолевого процесса, служит *de novo* экспрессия в эпителиальных клетках специфического мезенхимального белка виментина [10–12].

В предыдущем исследовании были представлены данные о разработке нового метода иммунофлуоресцентного количественного анализа экспрессии виментина в популяции эпителиальных опухолевых клеток, выделенных из хирургических биопсийных образцов солидных

новообразований [13]. Однако при анализе опухолевых маркеров в клинике наибольшую практическую ценность представляет возможность проведения подобного исследования клеток, полученных из образцов опухолевой ткани, заключенных в парафиновые блоки. С учетом того, что в этом случае преаналитическая подготовка более агрессивна, в частности включает дегидратацию и регидратацию ткани, в настоящей работе проведен сравнительный анализ информативности разработанного метода иммунофлуоресцентного анализа при исследовании такого рода материала и хирургических образцов опухоли одного и того же пациента. Предметом исследования стала оценка уровня эпителиально-мезенхимальной трансформации серозного рака яичников по количественному показателю экспрессии в эпителиальных опухолевых клетках специфического мезенхимального белка виментина.

Материалы и методы

Исследование проводили на клетках, полученных из хирургических биопсийных образцов серозного рака яичников и на клетках, выделенных

из образцов, заключенных в парафиновые блоки. В работу включены 10 пар сравнения (20 образцов опухолей).

Метод получения одноклеточной суспензии из хирургических образцов опухолей. Хирургический образец опухоли (до 2 см в диаметре) тщательно измельчали острыми ножницами и инкубировали в растворе Версена при 37 °С в течение 30 мин. Полученную «кашицу» гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе шестикратным аккуратным движением пестика и фильтровали через фильтр с диаметром пор 40 мкм («BD Falcon», США). Суспензию клеток центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин, осадок ресуспендировали в растворе фосфатного буфера (рН 7,4) и при интенсивном встряхивании в течение 2 мин (для предупреждения образования конгломератов клеток) фиксировали формальдегидом в конечной концентрации 4%.

Метод приготовления суспензий клеток из образцов опухолей, заключенных в парафиновый блок. Не менее 10 срезов ткани толщиной 50 мкм помещали в стеклянную пробирку объемом 15 мл. Для освобождения от парафина образцы трехкратно инкубировали в течение 15 мин в *m*-ксилоле. Затем проводили регидратацию ткани, последовательно инкубируя образцы в течение 10 мин в растворах этилового спирта (двукратно в 100%-м и 96%-м спирте и однократно в 80%-м, 70%-м и 50%-м). Далее в течение 5 мин образцы двукратно инкубировали в фосфатном буфере (рН 7,4), а по окончании центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин. Осадок измельчали острыми ножницами и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин в растворе Версена. Полученную «кашицу» гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе шестикратным аккуратным движением пестика и фильтровали через фильтр с диаметром пор 40 мкм («BD Falcon», США). Суспензию клеток центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин, осадок ресуспендировали в растворе фосфатного буфера (рН 7,4) и при интенсивном встряхивании в течение 2 мин (для предупреждения образования конгломератов клеток) фиксировали формальдегидом в конечной концентрации 4%.

Проточная цитометрия. В работе использовали первичные моноклональные антитела (в конечном разведении 1:200) – мышинные антитела, специфичные к широкому спектру цитокератинов (панцитокератины, клон MNF116, «DAKO», США) и кроличьи, специфичные к белку виментину (клон SP20, «BIOCARE»,

США). В качестве вторичных использовали антикроличьи антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем DyLight650 (ab98510, Великобритания) и антимышинные – конъюгированные с DyLight488 (ab98637, Великобритания) в конечном разведении 1:1000 и 1:120 соответственно. Для удаления из анализа дегриса и эритроцитов использовали краситель ДНК Hoechst 33258 («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 1,2 мкг/мл. В анализ включали только клетки с окрашенными ядрами, клеточные конгломераты выводили из анализа путем дополнительного гейтирования.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитометре «Navios» («Beckman Coulter», США). Регистрацию сигнала флуоресценции красителей DyLight488, DyLight650 и Hoechst 33258 проводили в каналах FL-1, FL-6 и FL-9 соответственно. Для визуализации распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре использовали точечные диаграммы, построенные с помощью программы WinMDI 2.9. Уровень *de novo* экспрессии виментина в эпителиальных клетках определяли как отношение (%) числа клеток, коэкспрессирующих цитокератины и виментин, к общему числу опухолевых клеток, экспрессирующих цитокератины.

Для статистической обработки полученных результатов использовали парный *t*-критерий Стьюдента, включенный в пакет GraphPad Prism 7.0 («GraphPad Software», США). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При анализе полученных результатов необходимо отметить важнейшие методические детали, которые были отработаны на этапе подготовки одноклеточной суспензии из опухолевой ткани, заключенной в парафиновый блок. Во-первых, мы показали, что оптимальная толщина срезов составляет 50 мкм, так как при более тонких срезах резко снижается выход неповрежденных клеток, пригодных для анализа на проточном цитометре, а при увеличении толщины значительно увеличиваются продолжительность и кратность инкубации с *m*-ксилолом для полного растворения парафина. Это принципиально важная деталь, поскольку любое усложнение преаналитической стадии, как и недостаточное количество опухолевых клеток, включенных в анализ, снижают его точность. Повышению выхода интактных клеток способствует и другой нюанс – интенсивное

встряхивание суспензии в течение 2 мин при фиксации клеток формальдегидом. При неточном соблюдении этого условия фиксации значительная часть клеток образует плотные конгломераты, которые не только не включаются в анализ, но еще и нарушают работу проточного цитометра.

Результаты сравнительной оценки уровня эпителиально-мезенхимальной трансформации ткани рака яичников при исследовании хирургических биопсийных образцов и парафиновых блоков одной и той же опухоли представлены в таблице. Видно, что опухоли разных локализаций существенно различаются по уровню коэкспрессии виментина в эпителиальных опухолевых клетках, экспрессирующих цитokerатины. При исследовании хирургических образцов показатель колебался в целом по группе от 22 до 70%, а в блоках от 19 до 63% (образцы № 1 и № 7 соответственно).

Различия между показателями «внутри одной опухоли» при исследовании парафинового блока и хирургического образца были несущественны и только в 2 из 10 случаев достигали 10%. В остальных парах сравнения результаты оказались практически одинаковыми и в целом по группе при оценке различий методом парного *t*-критерия Стьюдента статистически недостоверны ($p = 0,09$).

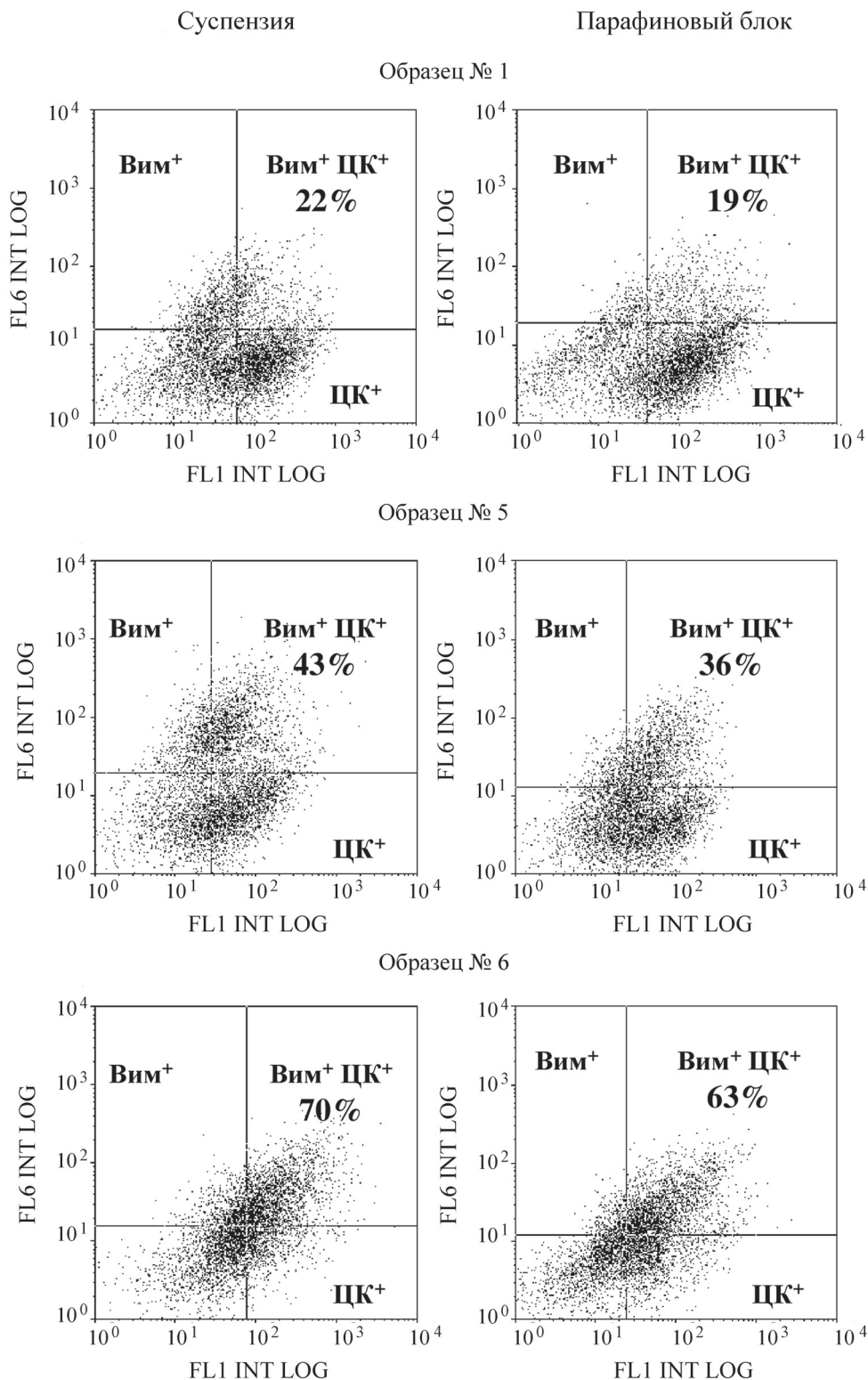
Незначительные различия между группами сравнения, выявленные в результате анализа, подтверждают важность отмеченных выше методических деталей – строгого контроля толщины среза парафинового блока и связанных с этим условий отмывки образца ткани *m*-ксилолом. В противном случае, повышение агрессивности преаналитической подготовки материала или чрезмерное «загрязнение» суспензии разрушенными клетками может стать причиной искажения молекулярного показателя агрессивности исследуемой опухоли.

Примеры точечных гистограмм, полученных при исследовании хирургических биопсийных образцов опухолей и опухолевого материала, заключенного в парафиновые блоки, представлены на рисунке. Подробная информация о построении точечных диаграмм, границ деления на квадранты и количественной оценке уровня эпителиально-мезенхимальной трансформации опухоли приведена в предыдущей публикации [13]. Оценка информативности полученных результатов при иммунофлуоресцентном анализе опухолевого материала из хирургических образцов и парафиновых блоков проведена при сравнении доли клеток, коэкспрессирующих цитokerатины и виментин (двойное иммунофлуоресцентное

Уровень эпителиально-мезенхимальной трансформации клеток серозного рака яичников при исследовании экспрессии виментина в эпителиальных опухолевых клетках, полученных из хирургических образцов и парафиновых блоков

Номер образца опухоли	Уровень коэкспрессии виментина в эпителиальных опухолевых клетках, экспрессирующих цитokerатины (%)		Различия между хирургическим образцом и парафиновым блоком (%)*	p^{**}
	хирургические образцы	парафиновые блоки		
1	22	19	3	0,09
2	57	48	9	
3	38	48	↑10	
4	45	42	3	
5	43	36	7	
6	37	38	1	
7	70	63	7	
8	28	25	3	
9	58	48	↓10	
10	25	22	3	

*Разница между показателями экспрессии виментина (%) при исследовании хирургического образца и парафинового блока: «↓» и «↑» – соответственно уменьшение и увеличение показателя; ** парный *t*-критерий Стьюдента между группами «хирургический образец» и «парафиновый блок».



Точечные диаграммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции клеток при последовательном двойном окрашивании клеток рака яичников антителами к эпителиальным цитокератинам (ЦК) и к мезенхимальному белку виментину (Вим). По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции (усл. ед.) красителя DyLight488; по оси ординат – интенсивность флуоресценции (усл. ед.) красителя DyLight650 (обозначения в квадрантах: левый нижний – неокрашенные клетки (автофлуоресценция); левый верхний и правый нижний – клетки, экспрессирующие Вим или ЦК соответственно; правый верхний – эпителиальные опухолевые клетки, коэкспрессирующие Вим и ЦК (двойное иммунофлуоресцентное окрашивание)). Номера образцов опухолей соответствуют таблице

окрашивание), в общей популяции эпителиальных клеток исследованных опухолей.

На рисунке показано, что результаты близки не только по количественным показателям, но и визуально – по характеру распределения клеток на точечных диаграммах. Таким образом, полученные данные демонстрируют возможность использования для молекулярной диагностики эпителиально-мезенхимальной трансформации методом двойного иммунофлуоресцентного анализа не только хирургических, но и заключенных в парафиновые блоки образцов тканей. Ранее аналогичные результаты были получены при исследовании экспрессии ERCC1 – маркера эксцизионной репарации ДНК [14].

Это наблюдение очень важно с точки зрения практического использования разработанного метода молекулярной диагностики, поскольку расширяет перспективы проведения анализа при получении материала из отдаленных клиник. Более того, возможность использования опухолевого материала из парафиновых блоков позволяет в случае необходимости верифицировать молекулярный диагноз. И наконец, использование архивного материала опухолей делает возможными проведение ретроспективных научных исследований и оценку корреляций с клиническими характеристиками течения заболевания или ответа на лекарственную терапию.

Однако при выборе материала для проведения иммунофлуоресцентного анализа экспрессии опухолевых маркеров с использованием проточной цитометрии предпочтение следует отдавать хирургическим биопсийным образцам, так как преаналитическая подготовка парафиновых блоков более трудоемка и агрессивна. При

этом не исключены случаи повреждения мишени, что может изменить ее доступность не только для специфического, но и для неспецифического взаимодействия с моноклональными антителами. При использовании двойного иммунофлуоресцентного окрашивания объектом исследования служат два белка (цитокератины и виментин), поэтому вероятность ошибки при проведении рутинного исследования может увеличиться.

В заключение важно еще раз подчеркнуть сходство количественных показателей уровня эпителиально-мезенхимальной трансформации при исследовании разных видов опухолевого материала (хирургических образцов и ткани из парафиновых блоков). Данные получены при оценке *de novo* коэкспрессии мезенхимального белка виментина в эпителиальных опухолевых клетках, экспрессирующих цитокератины, с использованием разработанного ранее метода двойного иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитометрии, что указывает на перспективность внедрения в рутинную лабораторную практику этой новой молекулярной технологии.

Работа выполнена в рамках программы исследований, запланированных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (тема НИР: «Разработка и оценка клинической значимости новой технологии молекулярного прогнозирования резистентности и агрессивности солидных эпителиальных новообразований», рег. № АААА-А20-120020500021-1). Конфликта интересов нет.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thiery J.P, Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A. // Cell. 2009. Vol. 119. № 6. P. 1420.
2. Kalluri R., Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition // J. Clin. Invest. 2010. Vol. 120. N 6. P. 1420.
3. Lamouille S., Xu J., Derynck R. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2014. Vol. 15. N 3. P. 178.
4. Caramel J., Papadogeorgakis E., Hill L., et al. // Cancer Cell. 2013. Vol. 24. N 4. P. 466.
5. Krebs A. M., Mitschke J., Losada M.L., et al. // Nat. Cell Biol. 2017. Vol. 19. P. 518.
6. Stemmler M.P, Eccles R.L, Brabletz S., Brabletz T. // Nat. Cell Biol. 2019 Vol. 21. P. 102.
7. Jakobsen J.N., Santoni-Rugiu E., Ravn J., Sørensen J. B. // Eur J Cancer. 2013. Vol. 49. N 11. P. 2494.
8. Roche J. // Cancers. 2018. Vol. 10. N 2. P. 52.
9. Williams E.D., Gao D., Redfern A., Thompson E.W. // Nat. Rev. Cancer. 2019. Vol. 19. N 12. P. 716.
10. Satelli A., Li S. // Cell Mol. Life Sci. 2011 Vol. 68. N 18. P. 3033.
11. Vuoriluoto K., Haugen H., Kiviluoto S., Mpindi J-P., Nevo J., Gjerdrum C., Tiron C., Lorens J.B., Ivaska J. // Oncogene. 2011 Vol. 30. N 12. P. 1436.
12. Richardson A.M., Havel L.S., Koyen A.E., Konen J.M., Shupe J., Wiles W.G., Martin D.W., Grossniklaus H.E., Sica G., Gilbert-Ross M., Marcus A.I. // Clin. Cancer Res. 2018. Vol. 24. N 2. P. 420.
13. Богущ Т.А., Калюжный С.А., Башарина А.А., Гришанина А.Н., Дьякова Ю.Б., Богущ Е.А., Кирсанов В.Ю., Давыдов М.М. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии виментина в эпителиальных клетках // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2019. Т. 60. № 6. С. 34 [Bogush T.A., Kaliuzhny S.A., Basharina A.A., Grishanina A.N., Dyakova Yu.B., Bogush E.A., Kirsanov V.Yu., Davydov M.M. // Moscow University Chemistry

Bulletin. 2019. Vol. 74. N 6. P. 290 (DOI: 10.3103/S0027131419060063)].

14. Богущ Т.А., Дудко Е.А., Гришанина А.Н., Заркуа В.Т., Богущ Е.А., Башарина А.А., Полоцкий Б.Е., Тюляндин С.А., Давыдов М.М., Давыдов М.И. //

ДАН. 2017. № 2. С. 215. [Bogush T.A., Dudko E.A., Grishanina A.N., Zarkua V.T., Bogush E.A., Basharina A.A., Polotsky B.E., Tjulandin S.A., Davydov M.M., Davydov M.I. // Dokl. Biochem. Biophys. 2017. Vol. 474. N 1. P. 9 (DOI: 10.1134/S1607672917010033).

Поступила в редакцию 11.02.2020
Получена после доработки 16.02.2020
Принята к публикации 14.04.2020

IMMUNOFLUORESCENT ASSAY OF *DE NOVO* VIMENTIN EXPRESSION IN OVARIAN CANCER TISSUES: SURGICAL SPECIMENS VS PARAFFIN-EMBEDDED TISSUE BLOCKS

T.A. Bogush¹, A.A. Basharina¹, E.A. Bogush^{1,2}, A.N. Grishanina¹, D.M. Sakaeva¹, V.Yu. Kirsanov², M.M. Davydov², V.S. Kosorukov¹

(¹FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation; ²FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University); e-mail: tatbogush@mail.ru)

The results of analysis of epithelial-mesenchymal transition in serous ovarian cancer were compared by the developed method of double immunofluorescent staining and flow cytometry of different tumor material types (surgical specimens vs paraffin-embedded tissue blocks). Estimation of *de novo* coexpression of mesenchymal protein vimentin in epithelial tumor cells expressing cytokeratins showed that the results were similar not only in quantitative terms, but also visually in the way of cell distribution on flow cytometry dot plots. The obtained results indicate prospects of the developed new technology for molecular diagnostics of tumor epithelial-mesenchymal transition into routine laboratory practice.

Key words: immunofluorescent assay, flow cytometry, vimentin, cytokeratins, paraffin-embedded tissue blocks, epithelial-mesenchymal transition.

Сведения об авторах: Богущ Татьяна Анатольевна – руководитель группы молекулярных маркеров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, докт. биол. наук, профессор (tatbogush@mail.ru); Башарина Анна Александровна – мл. науч. сотр. группы молекулярных маркеров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (basharinaa@inbox.ru); Богущ Елена Александровна – ст. науч. сотр. отделения хирургического № 2 ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, ассистент кафедры онкологии лечебного факультета ФGAOY BO Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru); Гришанина Анна Николаевна – науч. сотр. группы молекулярных маркеров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (labmedchem@mail.ru); Сакаева Дарья Маратовна – лаборант-исследователь группы молекулярных маркеров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей (labmedchem@mail.ru); Кирсанов Владислав Юрьевич – доцент кафедры онкологии лечебного факультета ФGAOY BO Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru); Давыдов Михаил Михайлович – зав. кафедрой онкологии лечебного факультета ФGAOY BO Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, докт. мед. наук, чл.-корр. РАН (labmedchem@mail.ru); Косоруков Вячеслав Станиславович – зав. лабораторией трансгенных препаратов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. биол. наук (labmedchem@mail.ru).