

*На правах рукописи*

**МАМИЧЕВ ИВАН АНДРЕЕВИЧ**

**БЕТА-III ТУБУЛИН КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР  
НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО**

14.01.12 – онкология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН **Стилиди Иван Сократович**).

**Научные руководители:**

доктор биологических наук, профессор

**Богуш Татьяна Анатольевна**

доктор медицинских наук,

член-корреспондент РАН

**Давыдов Михаил Михайлович**

**Официальные оппоненты:**

**Высоцкая Ирина Викторовна**, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры онкологии лечебного факультета федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет).

**Боженко Владимир Константинович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущее учреждение:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр».

Защита состоится «7» марта 2019 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России (115478 г. Москва, Каширское шоссе, д.23).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России (115478, г. Москва Каширское шоссе, д.24) и на сайте [www.ronc.ru](http://www.ronc.ru)

Автореферат разослан «.....» .....201\_ года

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

**Кадагидзе Заира Григорьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

Белок микротрубочек бета-III тубулин (TUBB3) регистрируется в широком спектре опухолей разных локализаций и ассоциируется с устойчивостью к химиотерапевтическим препаратам из группы таксанов.

Экспрессия TUBB3 в опухоли также может быть прогностическим фактором агрессивности заболевания и регионарного метастазирования. В работах *in vitro* показано, что экспрессия TUBB3 связана с реализацией клеточного фенотипа, устойчивого к неблагоприятным воздействиям, таким как гипоксия, недостаток глюкозы или окислительный стресс. Все это указывает, что TUBB3 как маркер может быть не только предиктивным (т.е. предсказывающим эффективность химиотерапии), но и прогностическим (предсказывающим характер естественного течения болезни и выживаемость).

Уникальность TUBB3 как потенциального опухолевого маркера заключается в том, что он практически не экспрессируется в эпителиальных тканях. В норме его экспрессия регистрируется только в нейронах, меланоцитах, эндотелиоцитах, макрофагах. Это, по нашему мнению, в перспективе позволит применять анализ экспрессии TUBB3 для выявления малигнизированных клеток в визуально доброкачественной ткани и диагностики местной распространенности злокачественного процесса.

Таким образом, белок TUBB3 как потенциальный молекулярный маркер может иметь три модальности: предиктивную, прогностическую, и диагностическую.

Объектом настоящего исследования выбран немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) – одно из наиболее распространенных в мире злокачественных новообразований. Несмотря на все увеличивающийся спектр диагностических и терапевтических методов, результаты лечения НМРЛ по-прежнему остаются неудовлетворительными, продолжается поиск новых молекулярных маркеров этого заболевания. Изучение экспрессии белка TUBB3 в немелкоклеточном раке легкого перспективно по нескольким причинам.

Во-первых, гиперэкспрессия TUBB3 прогнозирует резистентность опухоли к таксанам, которые, в комбинации с препаратами платины используются в

послеоперационной лекарственной терапии НМРЛ. Выявление высокого уровня белка в хирургическом образце может быть доводом для исключения таксанов из схемы лечения, что в итоге избавляет больного от заведомо неэффективной и высокотоксичной терапии. Тем не менее, имеющихся данных пока недостаточно для включения анализа экспрессии TUBB3 в стандарты скрининга или клинические рекомендации.

Во-вторых, учитывая экспериментальные данные о туморогенных свойствах белка TUBB3, его экспрессия в опухоли должна свидетельствовать о неблагоприятном прогнозе течения болезни и выживаемости пациентов. Тем не менее, результаты немногочисленных исследований прогностической значимости TUBB3 при немелкоклеточном раке легкого пока остаются противоречивыми.

И, наконец, в-третьих, отсутствие экспрессии TUBB3 в нормальной паренхиме легкого открывает перспективы для его использования в диагностике локальной распространенности опухолевого процесса за пределами видимого очага поражения. Данная тема практически не поднимается в литературе и именно ей посвящена значительная часть работы.

### **Цель исследования**

Охарактеризовать экспрессию белка TUBB3 в опухолевой и морфологически нормальной ткани легкого и сформулировать прогностическую и диагностическую значимость маркера TUBB3 при немелкоклеточном раке легкого.

### **Задачи исследования**

1. Определить, является ли анализируемая выборка больных репрезентативной по клинико-морфологическим характеристикам заболевания и структуре выживаемости пациентов
2. Провести количественную оценку экспрессии белка TUBB3 в опухолевой ткани немелкоклеточного рака легкого.
3. Установить, как экспрессия TUBB3 в опухоли связана с факторами прогноза заболевания: полом, возрастом, статусом курения пациентов, степенью морфологической дифференцировки опухоли, стадией заболевания.
4. Проанализировать связь экспрессии TUBB3 в опухоли с показателями агрессивности заболевания: вращением опухоли в висцеральную плевру и регионарным метастазированием.

5. Провести количественную оценку экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого на разном отдалении от первичного опухолевого узла.

6. Установить, как экспрессия TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого связана с клинико-морфологическими характеристиками заболевания.

7. Исследовать характер экспрессии TUBB3 в опухолевой и морфологически нормальной ткани пищевода и сделать предварительные выводы о диагностической ценности TUBB3 в оценке локальной распространенности опухолевого процесса для опухолей разной локализации.

### **Методология и методы исследования**

Хирургические образцы немелкоклеточного рака легкого, рака пищевода, а также морфологически нормальной ткани на разном отдалении от первичной опухоли получены от пациентов, оперированных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 1998 по 2018 гг. С использованием разработанной в лаборатории методики из образцов ткани приготовлены одноклеточные суспензии, пригодные для анализа на проточном цитофлуориметре. Далее методом иммунофлуоресцентной проточной цитофлуориметрии исследована экспрессия белка TUBB3. Суммарно изучено более 400 образцов 203 пациентов с немелкоклеточным раком легкого и 40 пациентов с раком пищевода.

Проанализированы истории болезни 126 пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Оценивались клинически значимые характеристики заболевания: пол, возраст, статус курения пациентов, степень морфологической дифференцировки опухоли, стадия заболевания.

Связь экспрессии TUBB3 с данными параметрами исследована с использованием современных статистических методов. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакетов прикладных программ STATISTICA 12.0 и GraphPad PRIZM 6.0.

Для выявления прогностической роли TUBB3 прослежена выживаемость 126 больных немелкоклеточным раком легкого. Разделение больных на группы сравнения проводилось по уровню и интенсивности экспрессии TUBB3. Анализ выживаемости пациентов проведен методом Каплана–Мейера, для сравнения выживаемости в разных группах использован логранговый критерий.

Образцы немелкоклеточного рака легкого и окружающей морфологически нормальной ткани охарактеризованы по уровню экспрессии TUBB3. Проведено сравнение трех групп по экспрессии маркера: (1) опухоль, (2) морфологически нормальная ткань на границе с опухолью и (3) морфологически нормальная ткань, максимально отдаленная от опухолевого узла и лежащая вблизи края резекции. Аналогичное исследование проведено для рака пищевода.

### **Научная новизна**

На большом клиническом материале (более 300 образцов) охарактеризована популяция больных НМРЛ по уровню экспрессии TUBB3. Впервые подобная оценка проведена не только для опухоли, но и для нормальной ткани легкого, окружающей первичный очаг.

Впервые для определения экспрессии TUBB3 использован строго количественный метод проточной иммуноцитофлуориметрии, позволяющий с высокой точностью оценить экспрессию изучаемого белка в большой клеточной популяции (2 – 5 тыс. клеток).

Впервые показано, что в морфологически нормальной ткани легкого у больных НМРЛ выявляется специфический опухолевый маркер TUBB3. Впервые описана экспрессия данного белка в морфологически нормальной слизистой пищевода у больных раком пищевода.

Сформулировано новое представление о том, что морфологически нормальная ткань органа, пораженного опухолью, должна стать объектом молекулярной диагностики для оценки местного распространения опухолевого процесса.

### **Теоретическая и практическая значимость**

В работе использован строго количественный иммунофлуоресцентный метод, который лишен субъективизма и характеризуется высокой степенью воспроизводимости. Исследовалась большая популяция клеток, что позволило избежать диагностических ошибок, возникающих вследствие внутриопухолевой гетерогенности. Подобный подход к определению любого опухолевого маркера, не только TUBB3, может существенно обогатить арсенал диагностических методов.

С использованием нового метода подтверждены известные ранее факты об экспрессии TUBB3 в ткани немелкоклеточного рака легкого: преобладание белка в

аденокарциноме по сравнению с плоскоклеточным раком, гетерогенность экспрессии в опухолях разных больных.

Получены новые данные о вовлеченности морфологически нормальной паренхимы легкого в опухолевый процесс на молекулярном уровне. Описанный феномен оказался не уникален для немелкоклеточного рака легкого. Как минимум еще одно заболевание – рак пищевода – обладает такой же особенностью.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Исследованная группа больных является репрезентативной по клинико-морфологическим характеристикам заболевания и структуре выживаемости пациентов.

2. В подавляющем большинстве опухолевых образцов немелкоклеточного рака легкого экспрессируется белок бета-3 тубулин (TUBB3), однако интенсивность и уровень экспрессии сильно различаются у разных больных.

3. В ткани аденокарциномы легкого интенсивность экспрессии TUBB3 выше по сравнению с плоскоклеточным раком.

4. Несмотря на то, что TUBB3 считается предиктивным маркером резистентности к таксанам, он не является прогностическим маркером общей выживаемости пациентов.

5. TUBB3 экспрессируется в морфологически нормальной ткани легкого, окружающей опухолевый очаг, при значительной гетерогенности доли TUBB3-позитивных клеток у разных больных.

6. TUBB3 также экспрессируется в морфологически нормальной слизистой пищевода у больных раком пищевода.

7. Экспрессия ассоциированного с опухолевым ростом белка TUBB3 в морфологически нормальной ткани может указывать на локальную распространенность немелкоклеточного рака легкого и служить ориентиром при выборе тактики послеоперационного ведения больных, особенно на начальных стадиях заболевания.

8. Морфологически нормальная ткань пораженного органа должна являться объектом молекулярной диагностики наряду с опухолью.

### **Личный вклад автора**

Автором лично проведен анализ научной литературы по теме диссертации. Автор принимал непосредственное участие в постановке целей и задач настоящего

исследования, их экспериментальной реализации, анализе и обобщении данных, изложении полученных результатов в виде научных публикаций.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – онкология, конкретно пункту 2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)».

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Количество больных и исследованных образцов, длительный период наблюдения за пациентами, а также применение современных методов исследования и статистического анализа полученных данных делают полученные результаты достоверными.

Апробация диссертации состоялась 19 июля 2018 года на объединенной научной конференции с участием лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, лаборатории фармакологии и токсикологии, лаборатории экспериментальной химиотерапии, лаборатории иммунофармакологии, лаборатории клеточного иммунитета, лаборатории рекомбинантных опухолевых антигенов, лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза, лаборатории разработки лекарственных форм, лаборатории химического синтеза НИИ ЭДиТО; лаборатории онкопротеомики, лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

### **Публикации**

Материалы диссертационных исследований опубликованы в 7 статьях в рецензируемых изданиях, рекомендованных перечнем ВАК при Минобрнауки России.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результатов собственных экспериментов, обсуждение результатов, выводы. Работа изложена на 105 страницах, включает 9 таблиц, 23 рисунка и 139 ссылки на литературные источники, из них – 30 отечественных и 109 зарубежных.



## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Ранее коллектив лаборатории адаптировал метод проточной цитофлуориметрии, традиционно применяемый в исследованиях биологических жидкостей и клеток *in vitro*, для изучения солидных опухолей человека. Метод позволяет относительно быстро и точно исследовать экспрессию интересующего белка в большой популяции опухолевых клеток, что в значительной степени решает проблему гетерогенности опухоли.

### **Получение одноклеточных суспензий из хирургических биопсийных образцов**

Для приготовления одноклеточной суспензии образцы ткани тщательно измельчали в чашке Петри, добавляли раствор Версена и инкубировали при 37°C в течение 30 мин., периодически помешивая. Затем измельченный образец порциями переносили в стеклянный гомогенизатор, добавляли фосфатный буферный раствор (pH 7,4) до увеличения объема смеси в 2 раза, и шестикратным движением пестика гомогенизировали. После полученную смесь фильтровали с помощью нейлоновых фильтров с диаметром пор 40 мкм, центрифугировали 10 мин. при 3000 об/мин., осадок ресуспендировали в фосфатном буферном растворе (pH 7,4) и фиксировали клетки 10% нейтральным забуференным формалином.

### **Анализ экспрессии TUBB3 с помощью непрямой реакции иммунофлуоресценции на проточном цитофлуориметре**

Перед проведением иммунофлуоресцентного окрашивания клетки осаждали из аликвоты суспензии центрифугированием в течение 5 мин. при 3700 об/мин., надосадочную жидкость отбирали и к осадку клеток добавляли 0,5% раствор BSA в фосфатном буфере (pH 7,4) в объеме, достаточном для получения концентрации 200 тыс. кл/мл.

Инкубацию клеток с антителами (ab7751, клон TU-20, Abscam, Великобритания) проводили в темноте при 4°C в пластиковых пробирках для проточного цитофлуориметра в 100 мкл клеточной суспензии с концентрацией 200 тыс. кл/мл. Продолжительность инкубации с первичными специфическими антителами составляла 15-20 ч (ночь). Затем к суспензии клеток добавляли вторичные антитела (ab98729, Abscam, Великобритания) и инкубировали в течение 1,5 ч., периодически встряхивая пробирки. Для выведения из анализа дегрису и эритроцитов после завершения инкубации с вторичными антителами клетки инкубировали в течение 15 мин со

специфическим красителем ДНК Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1,2 мкг/мл. После окончания инкубации для отмывки свободных антител (однократно или повторно) в каждую пробирку добавляли по 2 мл 0,5% раствора BSA в фосфатном буфере (рН 7,4) и центрифугировали при 3700 тыс. об/мин. в течение 5 мин. Надосадочную жидкость отбирали и осадок ресуспендировали в 200 мкл фосфатного буферного раствора.

Исследовалось два показателя экспрессии белка. 1. Доля (%) специфически флуоресцирующих клеток в образце по отношению к образцу этой же суспензии, окрашенной только вторичными антителами. 2. Еще одним важным параметром при оценке экспрессии белка является средняя интенсивность флуоресценции или  $\Delta MF I$  – mean fluorescence intensity. Данная величина вычисляется как среднее геометрическое интенсивности флуоресценции в экспериментальном образце минус аналогичное значение в пробе, окрашенной только вторичными антителами.

Для контроля активности антител и стандартизации условий проведения анализа в каждом эксперименте с участием биопсийного материала человека использовали 2 контрольные суспензии: культуру MCF-7 и суспензию опухоли с охарактеризованным и воспроизводимым уровнем экспрессии TUBB3.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) с применением программного обеспечения Navios Software.

Анализ результатов проводили с использованием программного обеспечения FlowJo 10.0.8. Гистограммы распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции строились с помощью программы WinMDI 2.9.

### **Статистическая обработка данных**

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакетов прикладных программ STATISTICA 12.0 (StatSoft, США) и GraphPad PRIZM 6.0 (GraphPad Software, США). Выбор статистического критерия каждый раз определялся распределением значений признака в сравниваемых выборках, числом сравниваемых выборок и их объемом.

Анализ выживаемости пациентов проводился методом Каплана–Мейера. Кривые выживаемости разных групп больных сравнивали с помощью логрангового критерия (Log-rang). Корреляционный анализ выполнялся с помощью коэффициента ранговой

корреляции Спирмена с указанием статистической значимости выявленной связи между переменными (p), а также доверительных интервалов для коэффициентов корреляции.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Характеристика группы больных, включенных в исследование

На первом этапе работы включенные в исследование больные были охарактеризованы по полу, возрасту, статусу курения, стадии, гистологическому типу опухоли. Полностью клинические характеристики пациентов, собранные на основании анализа историй болезни, приведены в таблице 1.

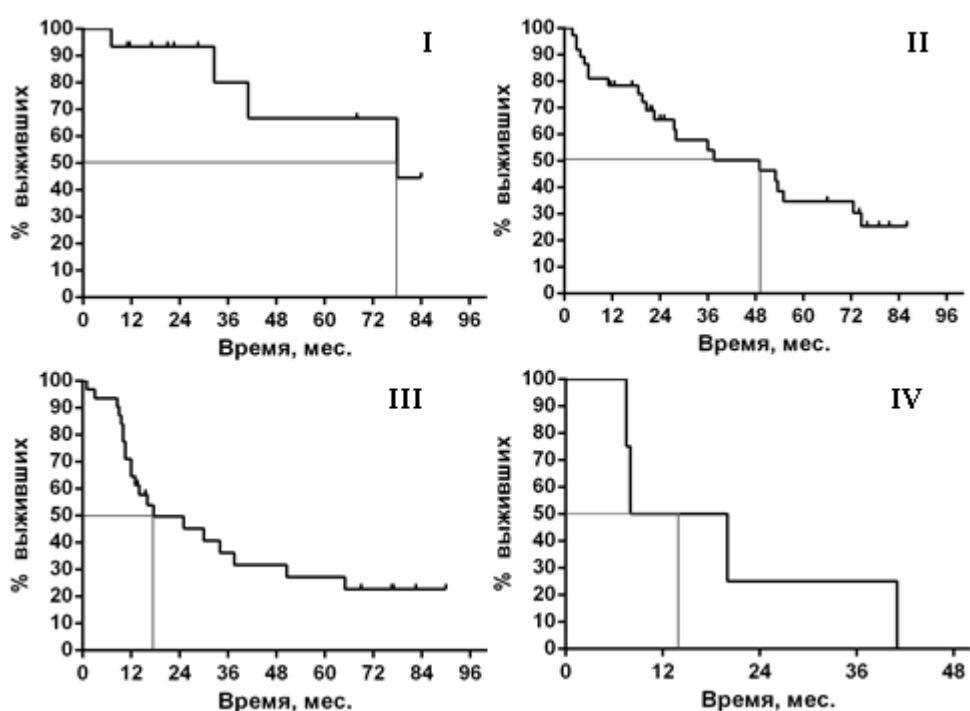
При анализе выживаемости больных данные о продолжительности жизни после хирургического лечения удалось получить для 86 пациентов при медиане продолжительности наблюдения 73,1 мес. (максимально – 90 мес).

Медиана выживаемости больных в общей группе составила 36,0 мес. Что касается выживаемости больных НМРЛ в зависимости от стадии, то полученные значения полностью соответствуют данным литературы. Кривые выживаемости для каждой стадии НМРЛ представлены на рисунке 1.

**Таблица 1** – Клинические характеристики пациентов с раком легкого, включенных в исследование

Характеристика	Количество обследованных больных (%), n= 122			
	Мужчины 100 (81,3%)		Женщины 22 (17,9%)	
<b>Гистологический тип опухоли</b>				
аденокарцинома	33 (33,0%)		21 (90,9%)	
плоскоклеточный рак	60 (60,0%)		1 (4,5%)	
крупноклеточный рак	1 (1,0%)		–	
железисто-плоскоклеточный рак	1 (1,0%)		–	
неизвестно	5 (5,0%)		–	
<b>Статус курения</b>				
курили	71 (71,0%)		2 (9,1%)	
не курили	29 (29,0%)		20 (86,4%)	
<b>Возраст (годы)</b>				
средний; разброс значений	61; 35-82		58; 37-73	
<b>Распределение больных по стадиям</b>				
	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Доля пациентов	32 (26,2%)	40 (32,8%)	43 (35,3%)	7 (5,7%)

В целом данную группу больных можно считать репрезентативной. Состав группы по полу, возрасту, статусу курения, стадии, гистологическому типу сопоставим с данными литературы по эпидемиологии и структуре НМРЛ в России и мире. В исследуемой группе прослеживаются основные закономерности, неоднократно отмеченные во многих исследованиях: неодинаковая распространенность заболевания у женщин и мужчин (последние заболевают значительно чаще), преобладание аденокарциномы у женщин и плоскоклеточного рака у мужчин; ассоциация плоскоклеточного рака с курением; преимущественное выявление заболевания на поздних стадиях. Репрезентативность группы подтверждается и при анализе структуры выживаемости пациентов



**Рисунок 1** – Кривые выживаемости для каждой стадии НМРЛ. I стадия: n = 14, Медиана = 78 мес. II стадия: n = 37, M = 49 мес. III стадия: n = 31, M = 17,5 мес. IV стадия: n = 4, M = 14 мес. Серой линией обозначена медиана общей выживаемости.

### **Экспрессия TUBB3 в ткани немелкоклеточного рака легкого**

Используя описанный выше метод, проведена сравнительная оценка экспрессии TUBB3 в ткани немелкоклеточного рака в опухолевой ткани 126 больных с использованием трех концентраций первичных антител: 0,04, 0,08 и 0,16 мкг/мл. Все закономерности, выявленные на концентрации 0,16 мкг/мл, оказались справедливы для меньших концентраций: 0,04 и 0,08 мкг/мл. В связи с этим для описания результатов

использовались значения, полученные для концентрации первичных антител 0,16 мкг/мл.

Для концентрации антител 0,16 мкг/мл медиана уровня экспрессии составила 45%, интерквартильный размах: 32–55%; медиана интенсивности экспрессии составила 161 усл.ед., интерквартильный размах: 102–258 усл. ед.

В таблице 3 приведено распределение значений уровня и интенсивности экспрессии TUBB3 опухолевой ткани легкого.

На основании полученных данных можно сделать вывод о гетерогенности экспрессии белка TUBB3 в группе образцов немелкоклеточного рака легкого.

**Таблица 2** – Количественные показатели экспрессии TUBB3 в группе немелкоклеточного рака легкого (n = 126)

Нормальность распределения	Минимум	Максимум	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
<b>Уровень экспрессии (% окрашенных клеток)</b>					
да (p = 0,2680)	10	74	45	32	55
<b>Интенсивность (ΔMFI)</b>					
нет (p < 0,0001)	9	852	161	102	258

Концентрация первичных антител – 0,16 мкг/мл

Основываясь на данных литературы, за пороговый уровень, ниже которого экспрессию TUBB3 в опухоли считать негативной, было выбрано значение уровня экспрессии, равное 15% окрашенных клеток. Стоит подчеркнуть, что данное значение является оценочным и дальнейшее его уточнение – задача будущих исследований.

С учетом выбранного порогового значения уровня экспрессии TUBB3 и оптимальной концентрации первичных антител в 0,16 мкг/мл получается, что данный белок экспрессируется в 97% исследованных образцов (118/122).

В среднем по группе маркер экспрессируется в  $43,1 \pm 14,9\%$  клеток, минимальное значение составляет 10%, максимальное – 74%.

На следующем этапе проанализирована ассоциация между уровнем/интенсивностью экспрессии TUBB3 в опухоли и клинико-морфологическими

характеристиками НМРЛ. Исследовались признанные факторы прогноза заболевания: пол, возраст, статус курения пациентов, степень морфологической дифференцировки опухоли, стадия заболевания.

Анализ заключался в проверке гипотезы о наличии различий между двумя или более группами (например, между группой курящих и группой некурящих пациентов) по экспрессии TUBB3. В результате получены данные, представленные в таблице 3.

Как видно из таблицы, между группами, выделенными по полу, возрасту, статусу курения пациентов, по степени морфологической дифференцировки опухоли и по стадии заболевания, не было выявлено различий ни по уровню, ни по интенсивности экспрессии TUBB3.

**Таблица 3** — Связь экспрессии TUBB3 в опухоли с клинико-морфологическими характеристиками

Характеристика	n	%	TUBB3*							
			Доля TUBB3-позитивных клеток (%)			p	Интенсивность флуоресценции			p
			Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль		Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль	
<b>Возраст, годы</b>										
≤ 60	64	50,8	32	43	50	0,20	104	160	264	0,79
> 60	62	49,2	34	46,5	56		94	164,5	251	
<b>Пол</b>										
Мужчины	102	81,6	32	43	55	0,99	103	152,5	242	0,15
Женщины	23	18,4	32	46	52		97	242	299	
<b>Гистологический тип опухоли</b>										
Аденокарцинома	56	47,1	35	46	56	0,29	<b>133,5</b>	<b>223</b>	<b>291</b>	<b>0,00*</b>
Плоскоклеточный рак	63	52,9	32	42	55		<b>89</b>	<b>121</b>	<b>205</b>	
<b>Статус курения</b>										
Курят	74	58,7	31,5	44	55	0,76	102	161	256	0,95
Нет /неизвестно	52	41,3	32	44,5	53		101	161,5	259	
<b>Степень морфологической дифференцировки (G)</b>										
G1	8	8,1	35,5	45	56,5	0,64	37,5	76	440	0,60
G2	55	55,6	34	45	53		107	160	241	
G3	36	36,3	27	41	56		64,5	159	260	
<b>Стадия заболевания</b>										
I	27	22,0	35	41	53	0,84	110	186	249	0,94
II	49	39,8	31	46	55		98	162	255,5	
III	42	34,1	29	42,5	57		102	136	272	
IV	5	4,1	45	47	52,5		54	161	374	

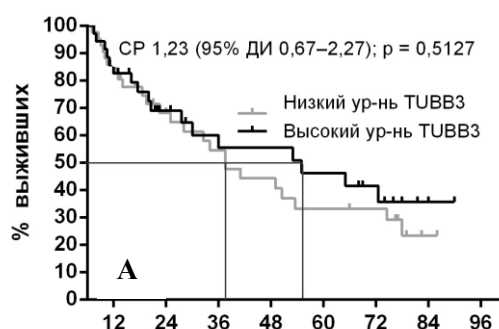
\* Полу жирным указаны статистически значимые различия

Также не выявлено различий по уровню экспрессии TUBB3 между группами аденокарциномы и плоскоклеточного рака. В то же время по интенсивности экспрессии TUBB3 между группами отмечена разница (по Манну–Уитни  $U = 1112$ ,  $Z = 3,36$ ,  $p = 0,0007$ ).

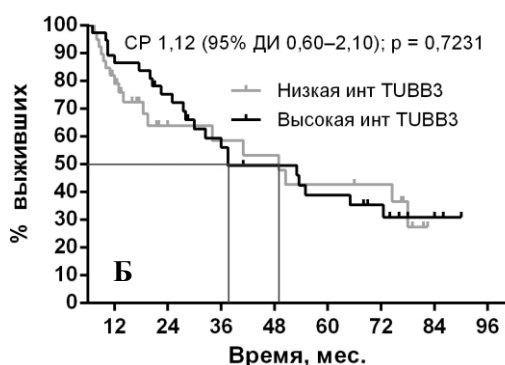
Дополнительно анализировалась связь экспрессии TUBB3 с такими показателями, как вращание опухоли в висцеральную плевру и метастазирование в регионарные лимфоузлы. Обе характеристики отражают соответственно инвазивный и метастатический потенциал опухоли. Между группами с высокой и низкой экспрессией TUBB3 не выявлено статистически значимых различий. По-видимому, в НМРЛ TUBB3 не связан с инвазивным и метастатическим потенциалом опухоли.

### Экспрессия TUBB3 в опухоли и выживаемость пациентов

Анализ выживаемости включенных в исследование пациентов в зависимости от показателей экспрессии TUBB3 представлен на рис. 2.



Число больных	Годы наблюдения	1	2	3	4	5	6	Медиана (мес)
	Низкий уровень TUBB3		42	33	21	17	12	10
Высокий уровень TUBB3		35	28	18	13	13	11	55,0



Число больных	Годы наблюдения	1	2	3	4	5	6	Медиана (мес)
	Низкая интенс. TUBB3		39	27	13	13	11	9
Высокая интенс. TUBB3		37	33	27	19	15	12	37,5

**Рисунок 2** – Оценка выживаемости пациентов ( $n = 77$ ) в зависимости от экспрессии TUBB3. **А.** Разделение на группы по медиане уровня экспрессии TUBB3. **Б.** Разделение на группы по медиане интенсивности экспрессии TUBB3. В таблицах справа приведены данные по динамике смертности и выбытия пациентов из исследования в течение всего срока наблюдения.

Всего в исследование вошло 86 больных немелкоклеточным раком легкого, для которых была измерена экспрессия TUBB3 в опухолевой ткани и собраны данные о прослеженности после завершения хирургического лечения. Медиана наблюдения составила 73,1 месяцев (макс. – 90 месяцев). Девять пациентов, умерших до 6 месяцев включительно после окончания срока госпитализации исключены из исследования, так как смертность на ранних сроках как правило не связана с прогрессией основного заболевания.

Мерой разделения уровня экспрессии TUBB3 на высокий и низкий служила медиана этого показателя по всей группе, которая составила 44% TUBB3-позитивных клеток. Аналогично, по медиане, больные были разбиты на 2 группы по интенсивности экспрессии TUBB3. Медиана интенсивности составила 161 усл. ед.

Показано отсутствие статистически значимых различий в выживаемости пациентов с высоким и низким уровнем экспрессии TUBB3:  $p=0,5127$ ;  $CP=1,23$ ; 95% ДИ 0,67–2,27 (рисунок 2А). Также отсутствовали различия в выживаемости пациентов с высокой и низкой интенсивностью экспрессии TUBB3:  $p=0,7231$ ;  $CP=1,12$ ; 95% ДИ 0,60–2,10 (рисунок 2Б).

Далее выживаемость пациентов с высокой и низкой экспрессией TUBB3 была рассмотрена отдельно для I, II и III стадии НМРЛ. Аналогично не было выявлено статистически значимых различий при постадийном анализе выживаемости пациентов с высокими и низкими значениями интенсивности/уровня экспрессии TUBB3.

Итак, в исследованной группе больных выживаемость не зависела от экспрессии в опухоли белка TUBB3. Прогностическая роль TUBB3 не подтвердилась ни для общей группы больных, ни при постадийном сравнении выживаемости групп с высокой и низкой экспрессией белка.

В совокупности с имеющимися данными, полученные результаты указывают на невысокую значимость экспрессии белка TUBB3 в опухоли для прогноза выживаемости больных НМРЛ в целом. Что касается прогностической значимости TUBB3 на определенных стадиях заболевания, то для окончательного вывода пока недостаточно данных.



## **Исследование экспрессии TUBB3 в ткани легкого, удаленной от очага первичного поражения**

Несмотря на то, что TUBB3 не оправдал ожиданий как предиктор выживаемости больных немелкоклеточным раком легкого и маркер агрессивности заболевания, данный белок обладает еще одним свойством, которое может быть использовано в клинической практике: этот белок цитоскелета практически не экспрессируется в большинстве нормальных тканей, однако выявляется в опухолях, в том числе и в НМРЛ.

В нашем исследовании предпринята попытка определить истинную степень опухолевого поражения легкого на основании анализа экспрессии TUBB3 в паренхиме органа, лежащей за пределами опухолевого узла.

Проведена сравнительная оценка экспрессии TUBB3 в ткани немелкоклеточного рака и в морфологически нормальной окружающей ткани органа. Исследованы хирургические биопсийные образцы 77 пациентов. Забор материала «нормальной» ткани проводился из максимально удаленного от опухоли участка доли легкого. Дополнительно из 77 пациентов, включенных в исследование, у 58 получен материал морфологически нормальной ткани легкого, непосредственно прилежащей к опухоли.

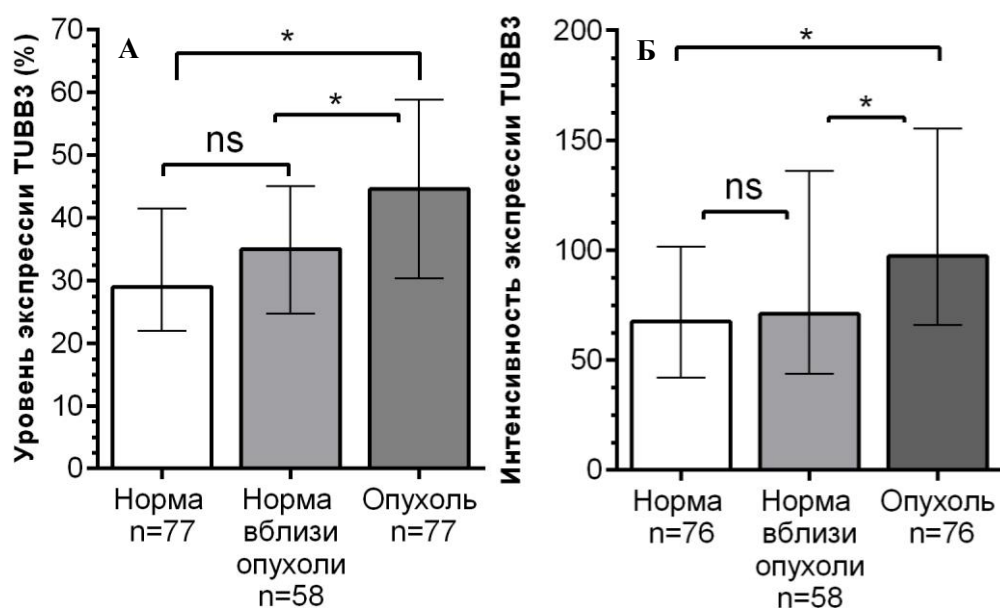
Полученные значения уровня и интенсивности экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого, отдаленной от первичного очага, сильно варьировали у разных пациентов: уровень экспрессии колебался от 0 до 57% со средним значением  $31,2 \pm 13,7\%$ . Интенсивность – от 0 до 337 усл. ед. с медианой 67,5 (интерквартильный размах: 42,0–101,5) усл.ед. В 87% (67/77) исследованных образцов нормальной ткани обнаружены клетки, экспрессирующие TUBB3.

Далее было проведено сравнение интенсивности и уровня экспрессии TUBB3 в опухолевой и «нормальной» ткани легкого. При попарном сравнении выяснилось, что различия между опухолевой и отдаленной нормальной тканью, а также между опухолью и непосредственно прилежащей к ней тканью по уровню и интенсивности экспрессии TUBB3 статистически значимы. В то же время различия между нормальными тканями, лежащими на разном удалении от опухоли, оказались статистически незначимыми (рис.3).

При сравнении экспрессии маркера в морфологически нормальной и опухолевой ткани у каждого индивидуального больного оказалось, что у подавляющего

большинства больных (64/77) в опухоли выявляется больше TUBB3-позитивных клеток, чем в нормальной ткани. Из оставшихся 13-ти больных у 12-ти разница в уровне экспрессии не превышала 15%, т.е. выбранного порогового значения, обусловленного погрешностью измерения и наличием клеток, экспрессирующих TUBB3 в норме.

Полученные результаты свидетельствуют, что в морфологически нормальной ткани легкого у больных НМРЛ выявляется опухолевый маркер TUBB3, его экспрессия всегда ниже, чем непосредственно в опухоли и не меняется в зависимости от расстояния до опухолевого узла.



	Уровень экспрессии TUBB3	Интенсивность экспрессии TUBB3
<b>Группы сравнения</b>	<b>Значимость различий по критерию Вилкоксона</b>	
Опухоль vs Норма	<b>p &lt; 0,0001</b>	<b>p &lt; 0,0001</b>
Опухоль vs Норма вблизи опухоли	<b>p &lt; 0,0001</b>	<b>p = 0,0080</b>
Норма вблизи опухоли vs Норма	p = 0,1859 (не значимо)	p = 0,1117 (не значимо)

**Рисунок 3** – Сравнение показателей уровня (А) и интенсивности (Б) экспрессии TUBB3 в клетках опухоли и в клетках морфологически нормальной ткани легкого. Обозначения: *Норма* – интактный участок легкого, максимально отдаленный от опухоли; *Норма вблизи опухоли* – непосредственно прилежащий к опухоли участок легкого; \* – различия статистически значимы ( $p < 0,017$ ), *ns* – различия статистически незначимы ( $p \geq 0,017$ ). Результаты попарного сравнения – в таблице под рисунком.

Учитывая, что экспрессия TUBB3 в норме нехарактерна для клеток, образующих паренхиму легкого, полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности присутствия малигнизированных клеток за пределами первичной опухоли – в ткани, визуально не вовлеченной в опухолевый процесс. Это может быть как следствием (а) «расселения» опухолевых клеток из первичного очага в окружающую нормальную ткань органа, так и (б) свидетельством наличия в нормальной ткани легкого с первичным опухолевым поражением фокусов трансформированных клеток – возможных предшественников первичного опухолевого узла, что согласуется с представлением об «опухолевом поле» (англ. cancerization field, field cancerization), которое является основой для формирования множественных зачатков новообразования. Не исключена и (в) экзосомная передача информации, так как известно, что одно из ключевых свойств опухолевых экзосом – способность инициировать опухолевую трансформацию или формирование опухолеподобного фенотипа клеток окружающей ткани.

Независимо от причин описанного феномена, гетерогенность экспрессии TUBB3 за пределами первичной опухоли указывает на информативность количественной оценки маркера для молекулярной диагностики локальной распространенности заболевания. Обнаружение TUBB3-позитивных клеток за пределами опухоли, особенно на ранних стадиях, могло бы стать дополнительным доводом в пользу радикализма хирургической операции.

Кроме того, выявление TUBB3-позитивных клеток в биопсийном образце визуально нормальной ткани также будет указывать на локальную распространенность процесса, а значит, и на более агрессивное течение болезни. Следовательно, дополнением к уже существующим методам послеоперационного уточнения локальной распространенности опухолевого процесса может стать сравнительная молекулярная диагностика опухолевого узла и окружающей ткани легкого.

Полученные данные особенно актуальны в связи с тем, что немелкоклеточный рак легкого отличается высокой частотой локального рецидивирования, прежде всего в культе бронха, корне легкого и средостении.

Итак, изучение экспрессии TUBB3 и других опухолевых маркеров за пределами непосредственно опухолевого очага – перспективное научное направление. Мы считаем,

что такой подход позволит лучше прогнозировать течение болезни, а также вид планируемого лечения и его интенсивность.

### **Характеристика экспрессии TUBB3 в ткани рака пищевода и окружающей морфологически нормальной ткани**

Учитывая важность описанного феномена, а именно присутствия опухолеассоциированного белка TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого, пораженного НМРЛ, мы посчитали необходимым «верифицировать» этот факт на примере другой опухоли, для которой также характерен возврат болезни после радикального хирургического лечения. Мы предположили, что если выявленный феномен имеет общебиологическое значение, он неизбежно должен проявиться при подобном новообразовании. В качестве объекта исследования был выбран рак пищевода – высокоагрессивная злокачественная опухоль, характеризующаяся частыми локальными рецидивами.

Исследовались образцы рака пищевода и нормальной слизистой органа 40 радикально оперированных больных. Был получен материал опухолевой и «нормальной» ткани, максимально удаленной от первичного очага. Дополнительно у 13 пациентов получен материал слизистой пищевода, непосредственно прилежащей к опухоли.

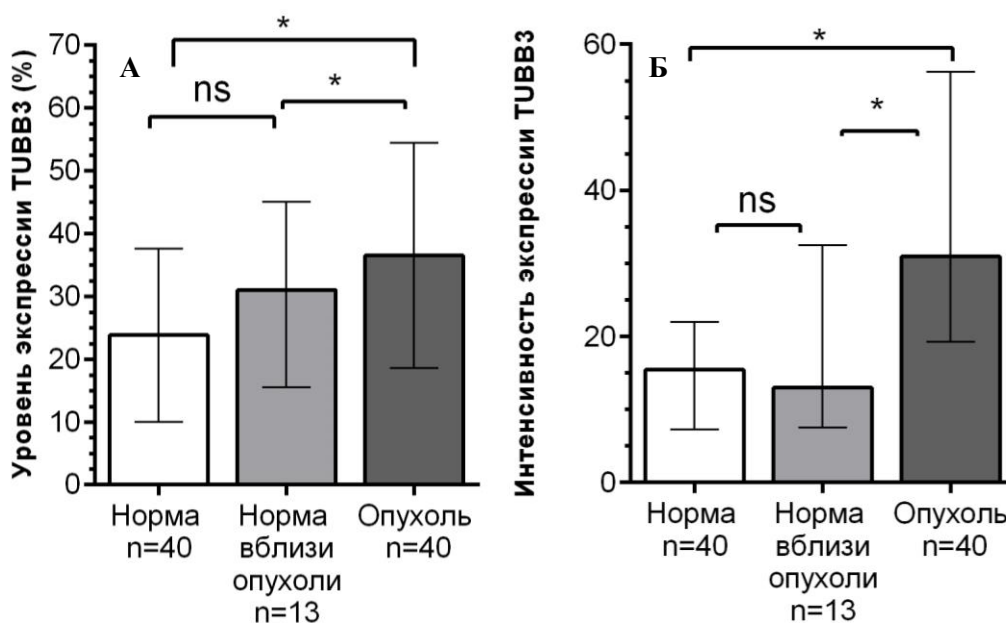
Чтобы оценить статистическую силу наблюдаемых различий экспрессии TUBB3 в опухолевом узле и морфологически нормальной ткани на разном отдалении от него, проведено попарное сравнение показателей экспрессии TUBB3 в трех связанных группах с введением поправки на множественные сравнения. Результаты представлены на рисунке 4.

Картина аналогична полученной ранее для немелкоклеточного рака легкого:

(1) в морфологически нормальной ткани органа, пораженного опухолевым процессом, выявляется специфический молекулярный опухолевый маркер TUBB3; (2) экспрессия маркера в морфологически нормальной ткани ниже, чем в опухоли; (3) по мере удаления от опухолевого узла экспрессия маркера, по-видимому, не меняется.

Итак, присутствие TUBB3 за пределами опухолевого очага – не уникальное свойство немелкоклеточного рака легкого. Как минимум еще одно заболевание – рак пищевода – обладает такой же особенностью. По-видимому, для более точной

диагностики этих злокачественных новообразований необходимо исследовать не только непосредственно опухолевую ткань, но и близлежащие ткани, молекулярные нарушения в которых могут свидетельствовать о местной распространенности процесса.



	Уровень экспрессии TUBB3	Интенсивность экспрессии TUBB3
<b>Группы сравнения</b>	<b>Достоверность различий</b>	
Опухоль vs Норма	<b>p = 0,0002*</b>	<b>p = 0,0002*</b>
Опухоль vs Норма вблизи опухоли	<b>p = 0,0071*</b>	<b>p = 0,0058*</b>
Норма вблизи опухоли vs Норма	p = 0,2635 (не значимо)	p = 0,4216 (не значимо)

**Рисунок 4** – Сравнение показателей уровня (А) и интенсивности (Б) экспрессии TUBB3 в клетках опухоли и в клетках морфологически нормальной ткани пищевода. Обозначения: *Норма* – интактный участок пищевода, максимально отдаленный от опухоли; *Норма вблизи опухоли* – непосредственно прилегающий к опухоли участок пищевода; \* – различия статистически значимы ( $p < 0,017$ ), *ns* – различия статистически незначимы ( $p \geq 0,017$ ). Результаты попарного сравнения представлены в таблице под рисунком.

## ВЫВОДЫ

1. Сформирована репрезентативная выборка образцов немелкоклеточного рака легкого и окружающей нормальной ткани 126 пациентов, охарактеризованных по клинико-морфологическим показателям и выживаемости.

2. Разработана методика количественного определения в плотных тканях экспрессии предиктивного маркера резистентности к таксанам – белка TUBB3. С

помощью этой метода в 97% образцов немелкоклеточного рака легкого выявлена экспрессия белка TUBB3; показана значительная гетерогенность интенсивности и уровня экспрессии белка; средний уровень экспрессии составил  $43,1 \pm 14,9\%$  TUBB3-позитивных клеток.

3. В ткани аденокарциномы легкого интенсивность экспрессии TUBB3 выше по сравнению с плоскоклеточным раком.

4. Не выявлено клинической значимости предиктивного маркера TUBB3 в прогнозе общей выживаемости пациентов с немелкоклеточным раком легкого.

5. Впервые показано, что у больных немелкоклеточным раком легкого в морфологически нормальной ткани органа экспрессирован ассоциированный с опухолевым ростом белок TUBB3 при значительной гетерогенности доли TUBB3-позитивных клеток у разных больных.

6. Присутствие ассоциированного с опухолевым ростом белка TUBB3 за пределами опухолевого очага – не уникальное свойство немелкоклеточного рака легкого, так как аналогичный феномен выявлен для рака пищевода.

7. Экспрессия специфического опухолевого белка TUBB3 в морфологически нормальной ткани может быть молекулярным показателем локальной распространенности немелкоклеточного рака легкого и ориентиром при выборе тактики послеоперационного ведения больных на начальных стадиях заболевания.

8. Морфологически нормальная ткань органа, пораженного опухолевым процессом, должна быть объектом молекулярного исследования наравне с опухолевой тканью.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В ЖУРНАЛАХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ПЕРЕЧНЕМ ВАК РФ**

1. Мамичев, И.А. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии бета-III тубулина в опухолевой и окружающей нормальной ткани пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого. / Мамичев И.А., Богуш Т.А., Дудко Е.А., Рябинина О.М., Гришанина А.Н., Кирсанов В.Ю., Полоцкий Б.Е., Давыдов М.М. // Российский биотерапевтический журнал. — 2016. — т.15, №2. — с. 16-18.

2. Давыдов, М.М. Количественная оценка экспрессии TUBB3 в ткани аденокарциномы и плоскоклеточного рака лёгкого. / Давыдов М.М., Мамичев И.А., Богуш Т.А., Дудко Е.А., Богуш Е.А., Полоцкий Б.Е., Давыдов М.И. // Российский биотерапевтический журнал. — 2016. — т.15, №3. — с.95-98.

3. Богуш, Т.А. Сравнительный анализ результатов иммунофлуоресцентной оценки экспрессии ERCC1 при использовании разных клонов моноклональных антител – 8F1 и FL297. / Богуш Т.А., Мамичев И.А., Калюжный С.А., Заркуа В.Т., Тюляндина А.С., Богуш Е.А., Давыдов М.М. // Вестник Московского университета. Серия 2: химия. — 2017. — т. 58, №6. — с. 292-298.

4. Богуш, Т.А. Молекулярные механизмы лекарственной резистентности клеток рака молочной железы линии MCF7/ADR / Богуш Т.А., Калюжный С.А., Четыркина М.Р., Ястребова М.А., Щербаков А.М., Рябинина О.М., Мамичев И.А., Богуш Е.А., Каменский А.А. // Вестник Московского университета. Серия 2: химия. — 2018. — т. 59, № 5. — с. 374-376.

5. Богуш, Т.А. Количественные показатели экспрессии ERCC1 в ткани серозного рака яичников и эффективность I линии химиотерапии с включением препаратов платины / Богуш Т.А., Стенина М.Б., Богуш Е.А., Заркуа В.Т., Калюжный С.А., Мамичев И.А., Тюляндина А.С., Тюляндин С.А. // Антибиотики и химиотерапия. — 2018. — т. 63, №1-2. — с. 24-31.

6. Богуш, Т.А. Анализ фракции диплоидных клеток G0/G1 в ткани рака яичников методом проточной цитофлуориметрии / Богуш Т.А., Мамичев И.А., Борисенко Ю.П., Богуш Е.А., Вихлянцева Н.О., Кирсанов В.Ю. // Вестник Московского университета. Серия 2: химия. — 2018. — т. 59, № 5. — с. 369-373

7. Мамичев, И.А. Белок микротрубочек  $\beta$ -тубулин: строение, экспрессия и функции в нормальных и опухолевых клетках. / Мамичев И.А., Богуш Т.А., Богуш Е.А., Терентьева Н.С., Полоцкий Б.Е., Давыдов М.М. // Антибиотики и химиотерапия. — 2018. — т.63, №7-8. — с. 78-87.