

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

МАМИЧЕВ ИВАН АНДРЕЕВИЧ

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

14.01.12. – онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор

Богуш Татьяна Анатольевна

доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН

Давыдов Михаил Михайлович

Москва - 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Основные принципы работы микротрубочек.....	13
1.2. Изоформы β -тубулина.....	13
1.3. Специфические особенности TUBB3.....	14
1.4. Регуляция экспрессии TUBB3.....	19
1.5. TUBB3 в нормальных клетках.....	20
1.6. TUBB3 в опухолях нервной системы.....	21
1.7. TUBB3 в эпителиальных опухолях человека.....	22
1.8. Перспективы использования TUBB3 в клинической практике.....	25
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	29
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	43
3.1. Характеристика группы больных, включенных в исследование.....	43
3.2. Экспрессия TUBB3 в ткани немелкоклеточного рака легкого.....	50
3.2.1. Общая характеристика экспрессии TUBB3 в опухолевой ткани легкого.....	50
3.2.2. Связь экспрессии TUBB3 в опухоли с клинико-морфологическими характеристиками немелкоклеточного рака легкого.....	55
3.2.3. Экспрессия TUBB3 в опухоли и выживаемость пациентов.....	60
3.2.4. Связь экспрессии TUBB3 в опухоли с инвазивным ростом и регионарным метастазированием.....	65
3.3. Исследование экспрессии TUBB3 в ткани легкого, удаленной от очага первичного поражения.....	66
3.3.1. Сравнительная характеристика экспрессии TUBB3 в нормальной и опухолевой ткани легкого.....	66
3.3.2. Связь экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого с клинико-морфологическими характеристиками заболевания.....	74
3.3.3. Связь экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого с инвазивным и метастатическим потенциалом опухоли.....	76
3.3.4. Экспрессия TUBB3 морфологически нормальной ткани легкого и выживаемость пациентов.....	77
3.4. Характеристика экспрессии TUBB3 в ткани рака пищевода и окружающей морфологически нормальной ткани.....	79
Глава 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	84
ВЫВОДЫ	92
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	93

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

FISH – fluorescence in situ hybridization; флуоресцентная гибридизация in situ

GBP-1 – guanylate-binding protein 1

Gli1 – glioma-associated oncogene

HIF-1 – hypoxia-inducible factor 1

HR – hazard ratio; соотношение рисков

HuR – human antigen R; ELAV-like protein 1

ISCN – An International System for Human Cytogenetic Nomenclature; Международная система цитогенетической номенклатуры хромосом человека

KM-PF – Kaplan-Meier estimate of potential follow-up; reverse Kaplan-Meier; оценка Каплана–Мейера потенциального периода наблюдения

MAP – Microtubule-associated proteins

Pgp – P-glycoprotein 1; multidrug resistance protein 1 (MDR1); ATP-binding cassette sub-family B member 1 (ABCB1); cluster of differentiation 243 (CD243)

PTEN – phosphatase and tensin homolog; фосфатаза и гомолог тензина

REST – RE1 Silencing Transcription Factor

TUBB3 – Beta-3 tubulin; бета-3 тубулин

АК – аденокарцинома

АТФ – аденозинтрифосфат

ВПЧ – вирус папилломы человека

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ДИ – доверительный интервал

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

ПКР – плоскоклеточный рак

СР – соотношение рисков; hazard ratio (HR)

ЦОМТ – центр организации микротрубочек

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Бета-тубулины – семейство белков, входящих в состав микротрубочек. У позвоночных известно как минимум 9 изоформ бета-тубулина, которые кодируются разными генами, расположенными на разных хромосомах, и имеют тканеспецифичный паттерн экспрессии. На сегодняшний день из всей группы наиболее полно изучен бета-III тубулин (TUBB3), поскольку этот белок регистрируется в широком спектре опухолей разных локализаций и традиционно ассоциируется с устойчивостью к химиотерапевтическим препаратам из группы таксанов. Эти препараты, связываясь с бета-тубулином, нарушают динамику микротрубочек, вызывают остановку митоза и, в конечном счете, апоптоз.

Эффективность антитубулиновых агентов значительно варьирует у разных пациентов. Одной из причин неэффективности терапии считается гиперэкспрессия в опухоли TUBB3, который обладает низкой аффинностью к таксанам, в результате чего опухоль ускользает от лекарственного лечения. Существуют свидетельства, что TUBB3 также связан с резистентностью к другой группе антитубулиновых агентов – алкалоидам Винка. Следовательно, белок TUBB3 может служить клеточным маркером резистентности опухолей различных локализаций к этим препаратам.

Экспрессия TUBB3 в опухоли также может быть прогностическим фактором агрессивности заболевания и регионального 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. Включение данной изоформы бета-тубулина в состав микротрубочек изменяет их динамические свойства, усиливает клеточную локомоцию и позволяет эпителиальным клеткам терять связь с базальной мембраной и мигрировать за ее пределы. В итоге гиперэкспрессия TUBB3 в опухоли увеличивает ее метастатический потенциал. 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). Несмотря на то, что в клиническом исследовании зачастую сложно отделить прогностическую роль маркера от предиктивной, существуют работы, в которых прямо показана именно прогностическая роль TUBB3 в опухолях различной локализации вне зависимости от выбранного типа послеоперационной химиотерапии.

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 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 имеет три модальности: предиктивную, прогностическую, и диагностическую. Исследования ведутся по каждому из трех направлений для опухолей различных локализаций, таких как немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак пищевода, рак молочной железы, рак простаты, меланома, ряд лимфопролиферативных заболеваний и лейкозов. В литературе предлагается использовать анализ экспрессии TUBB3 для решения многих актуальных клинических задач. В зависимости от нозологической формы заболевания, стадии и предполагаемого лечения, определение этого маркера может быть ориентиром для назначения лекарственной терапии, тактики ведения пациента и объема оперативного вмешательства.

Объектом представленного исследования выбран немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) – наиболее распространенное в мире злокачественное новообразование. 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 служат «золотым стандартом» послеоперационной лекарственной терапии НМРЛ. Данный аспект TUBB3 как маркера наиболее полно представлен в литературе. Действительно, 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. Результаты немногочисленных исследований прогностической значимости TUBB3 при немелкоклеточном раке легкого остаются противоречивыми. И все же мы считаем, что белок, который принципиально меняет работу системы микротрубочек, обеспечивает потерю связи опухолевой клетки с микроокружением

и повышает ее жизнеспособность в условиях недостатка питательных веществ, скорее всего вносит свой вклад в опухолевый рост и метастазирование, а значит, с помощью анализа этого белка можно прогнозировать исход заболевания как минимум у некоторой группы больных. Вопрос в том, чтобы определить эту группу, найти пороговый уровень экспрессии маркера и подобрать условия теста. Поэтому исследования роли TUBB3 в прогнозе НМРЛ должны продолжаться, пока гипотеза о прогностической значимости этого маркера не будет окончательно подтверждена или опровергнута. В настоящем исследовании как раз предпринята попытка определить связь параметров экспрессии TUBB3 в опухоли с долгосрочными результатами хирургического лечения больных НМРЛ с использованием прецизионного метода проточной цитофлуориметрии.

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 будет посвящена основная часть работы. Основным методом лечения НМРЛ является радикальная хирургическая операция. Аджьювантная терапия, как лекарственная, так и лучевая, назначается на основе клинико-морфологических показателей заболевания, в особенности на данных клинического (TNM) и послеоперационного (pTNM) стадирования, учитывающих размер опухоли, ее локализацию, регионарное и отдаленное метастазирование. Послеоперационное уточнение локальной распространенности опухолевого процесса на основании гистологического исследования внутрилегочных лимфатических узлов является важным прогностическим показателем, который позволяет более точно определить интенсивность планируемого лечения. Однако проведение такого исследования возможно лишь в случае визуально увеличенных внутрилегочных лимфатических узлов, а потому такой подход нельзя признать исчерпывающим с точки зрения охвата всех прооперированных пациентов. Учитывая сказанное выше, становится очевидной необходимость в создании более точного и универсального для всех пациентов подхода к оценке локальной распространенности опухолевого процесса у больных раком легкого. Мы предположили, что ключом к решению этой задачи может стать сравнительная молекулярная диагностика опухолевого узла и окружающей ткани легкого, основанная на исследовании белка, который экспрессируется только в опухолевых, но не в нормальных клетках. Обнаружение такого белка в нормальной ткани легкого, окружающей опухолевый очаг, будет указывать на локальную распространенность процесса, а значит, и на более агрессивное течение болезни.

Изучение экспрессии TUBB3 в окружающей нормальной ткани легкого на различном отдалении от опухоли поможет ответить на ряд вопросов. В частности, существует ли некий градиент убывания количества малигнизированных клеток, экспрессирующих TUBB3, по мере удаления от опухолевого узла и насколько он выражен? Как связан процесс миграции опухолевых клеток с уровнем экспрессии TUBB3 в опухолевом узле? Коррелирует ли этот параметр с показателем регионарного метастазирования?

Понимание того, как часто опухолеспеассоциированный белок присутствует в условно нормальной ткани, позволит уточнить истинный масштаб опухолевого поражения при НМРЛ. Немелкоклеточный рак легкого – опухоль с высоким локальным метастатическим потенциалом, поэтому большинство торакальных хирургов в настоящее время придерживаются тактики максимального радикализма операции. В то же время обоснованность такого подхода в отношении ранних стадий заболевания остается дискуссионной. Обнаружение TUBB3-позитивных клеток за пределами опухоли, особенно на ранних стадиях, могло бы стать дополнительным доводом в пользу радикализма хирургического лечения.

Цель исследования

На репрезентативной выборке больных немелкоклеточным раком легкого охарактеризовать уровень и интенсивность экспрессии опухолеспеассоциированного белка TUBB3 в опухолевой и морфологически нормальной ткани методом проточной иммуноцитофлуориметрии. Установить истинную степень вовлечения визуально здоровой паренхимы легкого в опухолевый процесс. 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: полу, возрасту, статусу курения, стадии, гистологическому типу и др. Изучить структуру выживаемости больных как в целом по группе, так и на различных стадиях заболевания. Сопоставить полученные данные с данными литературы по эпидемиологии и структуре НМРЛ в России и мире.

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. Сравнить полученные данные с данными для немелкоклеточного рака легкого. Сделать предварительные выводы о диагностической ценности TUBB3 в оценке локальной распространенности опухолевого процесса для опухолей разной локализации.

Научная новизна

На большом клиническом материале (более 300 образцов тканей) 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, лишенный недостатков существующих иммуногистохимических методов и 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 РП.

Практическая и теоретическая значимость

Учитывая накопленный объем знаний о туморогенных функциях TUBB3, неудивительно, что в работах последнего времени делаются попытки найти корреляцию между уровнем экспрессии данного белка и метастатическим потенциалом опухолей разных локализаций. Однако эти данные фрагментарны и зачастую противоречивы. Безусловно,

такая неоднозначность клинических корреляций обусловлена недостаточной точностью оценки молекулярного фенотипа солидных опухолей человека. По мнению ряда исследователей, которое разделяют и авторы работы, важнейшей причиной являются недостатки существующих методов, в частности, их многообразие (оценка экспрессии маркеров проводится по уровню мРНК, белка, методами иммуноблоттинга, иммуногистохимии и т.д.) и отсутствие стандартизации.

В работе использовался 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. Мы считаем, что 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. Также получены принципиально новые данные.

В результате всесторонней характеристики экспрессии TUBB3 в ткани легкого обоснована необходимость молекулярной диагностики не только непосредственно опухолевого узла, но и окружающей ткани органа. Предлагаемый подход позволяет уточнить истинный масштаб опухолевого поражения и выбрать оптимальную тактику лечения больных. К примеру, обнаружение TUBB3-позитивных клеток за пределами опухоли, особенно на ранних стадиях заболевания, может служить дополнительным доводом в пользу радикализма хирургического лечения.

Получены новые данные о степени вовлечения морфологически нормальной паренхимы легкого в опухолевый процесс: по предварительным оценкам, у 87% пациентов присутствуют TUBB3-позитивные клетки за пределами первичной опухоли. Описанный феномен оказался не уникален для немелкоклеточного рака легкого. Как минимум еще одно заболевание – рак пищевода – обладает такой же особенностью. Это открытие поддерживает новую концепцию «опухолевых полей», согласно которой множественные предраковые очаги, невидимые при микроскопическом исследовании возникают системно во всем эпителии органа.

Таким образом, представленные результаты значимы не только для клинической, но и для фундаментальной онкологии.

Методология и методы исследования

Операционные 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 тканевых операционных образцов приготовлены одноклеточные суспензии, пригодные для анализа на проточном цитофлуориметре. Далее методом иммунофлуоресцентной проточной цитофлуориметрии исследована экспрессия опухолеассоциированного белка микротрубочек бета-3 тубулина (TUBB3). Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) с применением программного обеспечения Navios Software. Суммарно изучено более 400 образцов 203 пациентов с немелкоклеточным раком легкого и 40 пациентов с раком пищевода.

Исследовались два показателя экспрессии белка. 1. Уровень экспрессии, т.е. доля (%) специфически флуоресцирующих клеток в образце по отношению к образцу этой же суспензии, окрашенной только вторичными антителами. 2. Интенсивность экспрессии – средняя интенсивность флуоресценции в экспериментальном образце, нормированная на контроль, окрашенный только вторичными антителами.

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. Репрезентативность группы и ее адекватность задачам исследования подтвердилась при сопоставлении полученных данных с данными литературы по эпидемиологии и структуре НМРЛ в России и мире.

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) ткань без признаков злокачественного роста, максимально отдаленная от опухолевого узла и лежащая вблизи края резекции. Аналогичное исследование проведено для рака пищевода.

На основании полученных результатов и анализа данных литературы сделаны выводы о роли белка TUBB3 в прогнозе агрессивности и местной распространенности немелкоклеточного рака легкого.

Положения, выносимые на защиту

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

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

3. Предииктивного маркера резистентности к таксанам TUBB3 не является прогностическим маркером общей выживаемости пациентов.

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

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

6. 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 на начальных стадиях заболевания.

Степень достоверности и апробация результатов

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.

Результаты представленного исследования были представлены и обсуждены на конференциях: «XIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова» (Москва, 2016), «II Всероссийская конференция «Молекулярная онкология» (Москва, 2016 г.), «XX Российский онкологический конгресс (Москва, 2016 г.)», «24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (EACR24) (Манчестер, 2016), «II Петербургский онкологический форум “Белые Ночи”» (Санкт-Петербург, 2016), «ESMO 2017» (Мадрид, 2017), «XIV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» имени А.Ю. Барышникова» (Москва, 2017), «XXI Российский онкологический конгресс» (Москва, 2017), «III Петербургский онкологический форум “Белые Ночи”» (Санкт-Петербург, 2017), «IX Съезд Ассоциации Онкологов России» (Уфа, 2017), «IV Петербургский онкологический форум “Белые Ночи”» (Санкт-Петербург, 2018), «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины». (Томск, 2018).

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Основные принципы работы микротрубочек

Микротрубочки – линейные белковые полимеры диаметром около 24 нм, которые образуют в клетках трехмерные упорядоченные структуры, а также входят в состав центриолей, аксонем и базальных телец. Работа системы микротрубочек лежит в основе подвижности эукариотической клетки, транспорта органоидов, поддержания клеточной архитектуры, а также расхождения хромосом в митозе и мейозе. Обеспечение этих функций достигается благодаря способности микротрубочек к самосборке из субъединиц белков α и β -тубулина, которые присутствуют в цитоплазме в свободной форме [1]. Переход тубулина от растворенной к связанной форме происходит, когда его концентрация достигает некоторого порогового значения при условии наличия в среде ГТФ и Mg^{2+} [2].

В образовании микротрубочки выделяют три фазы. Фаза нуклеации или замедленная фаза включает образование гетеродимеров α и β -тубулина и начало их ассоциации друг с другом. Для того чтобы тубулиновый гетеродимер ассоциировал с другим гетеродимером, формируя протофиламент, ГТФ должен быть связан как с α , так и с β -субъединицами. Димеры ассоциируют упорядоченно, по принципу «голова-хвост»; на минус-конце находится молекула α -тубулина, на плюс-конце – молекула β -тубулина. Тело микротрубочки состоит из 13 протофиламентов, формирующих листок, свернутый в цилиндр. После образования листка структура становится более стабильной и наступает фаза элонгации – быстрый рост микротрубочки благодаря добавлению новых димеров, которые связываются с её плюс-концом. С наступлением фазы равновесия длина полимера в растворе не меняется [3]. В клетке большинство микротрубочек не собираются *de novo*, а радиально отходят от центров организации микротрубочек (ЦОМТ), которые играют роль «затравки», позволяющей пропустить фазу нуклеации.

1.2. Изоформы β -тубулина

Суперсемейство тубулинов включает в себя несколько семейств: α , β , γ , δ , ϵ , ζ и η -тубулины [4]. В состав микротрубочек входят только α и β -тубулины, остальные белки выполняют регуляторную функцию. Семейства α и β являются мультигенными: на 2017 год у позвоночных известно 9 изоформ α -тубулина и 9 изоформ β -тубулина, которые кодируются разными генами, расположенными на разных хромосомах [5]. Мультигенные свойства α -тубулина пока мало изучены, гораздо больше известно об изоформах β -тубулина.

В организме человека и других млекопитающих экспрессия изоформ β -тубулина тканеспецифична. Ткани, в которых экспрессированы определенные изотипы β -тубулина, подробно рассмотрены в обзоре Ричарда Лудуэни (Richard Ludueña) [6]. На момент написания обзора таких изотипов было известно 7. β_I -тубулин присутствует во всех тканях и, наряду с β_V -тубулином, составляет минорный компонент базальных тел жгутиков и ресничек. β_{II} -тубулин более характерен для эмбриональных тканей, иногда неспецифически экспрессируется в опухолях. TUBB3 представлен в нейронах, меланоцитах и часто экспрессируется в опухолях. В экспериментальной эмбриологии данный белок используется как маркер нейрональной дифференцировки. У млекопитающих β_{IV} -тубулин представлен двумя формами – β_{IVa} и β_{IVb} , причем β_{IVa} -тубулин экспрессируется исключительно в нервной ткани (как в нейронах, так и в глиальных клетках; есть данные об его присутствии в олигодендроцитах), в то время как β_{IVb} -тубулин встречается по всему организму, особенно в семенниках, сердце и скелетной мускулатуре. β_V -тубулин присутствует практически во всех тканях, исключая головной мозг, тимус, костный мозг и лейкоциты, но при этом его содержание в клетке никогда не превышает 12-13% от всего β -тубулина. β_{VI} -тубулин встречается в лейкоцитах, тромбоцитах, мегакариоцитах, костном мозге и селезенке.

Гены β -тубулинов являются по отношению друг к другу паралогами – гомологами, возникшими в результате нескольких последовательных дупликаций одного исходного гена. По-видимому, наиболее древней, предковой формой был β_{IV} -тубулин – обязательный компонент ресничек и жгутиков, как простейших, так и многоклеточных животных [6]. В соответствии с гипотезой неофункционализации, дупликация гена высвобождает одну из копий от необходимости выполнять функции предковой формы и, таким образом, появляется потенциал для развития новой функции [7]. Вопрос о том, случайно ли наблюдаемое распределение и существуют ли специфические функции у разных изоформ β -тубулина в настоящее время активно изучается. Наиболее полно исследованы свойства TUBB3, который часто экспрессируется в опухолях и считается маркером устойчивости к таксанам. Особенности этого белка делают его хорошим кандидатом на роль прогностического маркера, позволяющего охарактеризовать агрессивность течения таких заболеваний как немелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, рак яичников и рак желудка [8].

1.3. Специфические особенности TUBB3

В 1994 году было показано, что микротрубочки меняют свои динамические характеристики в зависимости от изотипов β -тубулина, входящих в их состав. *In vitro* нуклеация микротрубочек, состоящих исключительно из $\alpha\beta_{III}$ -димеров, занимает больше

времени, однако получившиеся структуры более динамичны: сборка и разборка плюс концов $\alpha\beta_{III}$ -микротрубочек происходит вдвое быстрее по сравнению с микротрубочками, состоящими из $\alpha\beta_{II}$ и $\alpha\beta_{IV}$ димеров [9].

Пока не известно, зависит ли подвижность клетки от динамических характеристик микротрубочек. Если допустить, что клетки с $\alpha\beta_{III}$ -микротрубочками более подвижны, сразу несколько эмпирических фактов находят объяснение. Во-первых, у млекопитающих TUBB3 присутствует в эмбриональных тканях, которые быстро растут, мигрируют и меняют форму. В постнатальном периоде экспрессия TUBB3 снижается [10,11]. Во-вторых, объясняется гиперэкспрессия TUBB3 в клетках инвазивного фронта колоректальной карциномы [12]. Еще одна недавно открытая особенность TUBB3 связана с клеточной пролиферацией. В некоторых опухолевых клеточных линиях, а также в эмбриональных фибробластах и кератиноцитах, присутствие TUBB3 регистрируется в области веретена деления [13]. Возможно, высокая скорость сборки-разборки $\alpha\beta_{III}$ -микротрубочек оказалась полезной для митоза. Эта гипотеза нуждается в дальнейшей проверке, однако представляется вероятным, что гиперэкспрессия TUBB3 в опухолях может значительно ускорить их пролиферацию. И это может объяснить наблюдаемую во многих клинических исследованиях корреляцию между высокой экспрессией TUBB3 и агрессивностью злокачественных новообразований (см. ниже).

По-видимому, TUBB3 может выполнять защитные функции в нормальных и опухолевых тканях. Несмотря на то, что белок широко представлен в нервной ткани. (более 25% всего β -тубулина в нейронах), присутствия в клетках его гомолога β_{II} -тубулина достаточно для осуществления основных функций, таких как аксональный транспорт и регенерация поврежденных отростков [14]. На первый взгляд, экспрессия TUBB3 в нейронах необязательна, а учитывая данные об усиленной динамике микротрубочек, включающих $\alpha\beta_{III}$ -димеры, даже вредна: микротрубочки нервной системы относительно стабильны, и нейроны экспрессируют большое количество белков MAP, по-видимому, лишь для того, чтобы ингибировать их избыточную активность [15].

Очевидно, белок обладает некими уникальными свойствами, которые необходимы для нормальной работы нейронов. В обзоре, посвященном эволюции тубулинов, Р. Лудуэнья объясняет присутствие TUBB3 в нейронах его устойчивостью к окислительному стрессу. У наиболее распространенных в организме человека β -тубулинов: β_I , β_{II} , и β_{IV} , в 239 положении аминокислотной последовательности присутствует цистеин, который легко окисляется, формируя дисульфидные мостики между молекулами α и β -тубулина, тем самым ингибируя сборку микротрубочек. Иными словами, микротрубочки являются редокс-зависимыми

структурами. В TUBB3 239 цистеин замещен на серин, что делает молекулу устойчивой к окислению. Это особенно интересно, учитывая, что в тканях, для которых в норме характерен высокий уровень TUBB3, регистрируется повышенный уровень нитроксильных радикалов и супероксида [6].

Многие макромолекулы, способные связываться с молекулой TUBB3 участвуют в реализации ответа на оксидативный стресс и кислородно-глюкозную депривацию. Эти данные хорошо согласуются с тем фактом, что появление TUBB3 на эволюционном древе приблизительно совпадает с кислородным скачком в конце протерозоя около 500 млн лет до н.э. Особая роль TUBB3 в эволюции цитоскелета, согласно Р. Лудуэнье, заключается в том, что этот белок возник как адаптация к резко возросшему уровню кислорода в атмосфере, но, в силу своих канцерогенных свойств, сохранился лишь в некоторых тканях, где польза от его экспрессии перевешивает возможный вред [6].

Если TUBB3 защищает клетки от повреждений, вызванных оксидативным стрессом, можно ожидать, что нарушение его синтеза приведет к повышению чувствительности клеток к такому стрессу. Действительно, в культивируемых клетках нейробластомы нокдаун TUBB3 в нормальных условиях никак не влияет на жизнеспособность, но стимуляция окислительного стресса комбинацией глутамата и глицина приводит к гибели или повреждению до 50% клеток [14]. Нокдаун TUBB3 в линиях H460 и Calu-6 (немелкоклеточный рак легкого) повышает их чувствительность к противоопухолевым агентам, в частности, к доксорубину [16]. Неспецифическая цитотоксичность доксорубина как раз связана с увеличением продукции активных форм кислорода, что приводит к уменьшению внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала и, в конечном итоге, к индукции апоптоза [17]. Устойчивость TUBB3 к окислению – это одна из возможных причин резистентности опухолей с высокой экспрессией белка к противоопухолевой терапии (см. ниже).

Благодаря устойчивости к окислению TUBB3 успешно справляется с неканонической функцией β -тубулинов – регуляцией энергетического обмена клетки. Известно, что свободный тубулин способен ассоциировать с разнообразными биологическими мембранами, в частности с наружными мембранами митохондрий [18]. Появившиеся в последнее время работы свидетельствуют о том, что свободные $\alpha\beta$ -димеры способны блокировать потенциал-зависимые анионные каналы митохондрий, замедляя обмен метаболитами, такими как АТФ, фосфат и сукцинат между митохондриями и цитозолем [19]. Учитывая, что митохондрии являются источниками супероксидных анионов, устойчивый к окислению TUBB3 как регулятор клеточного дыхания имеет преимущество перед другими

изоформами. Анализ распределения β -тубулинов в 7 клеточных линиях человека подтверждает эту гипотезу: среди свободных β -тубулинов, секвестрированных на наружной мембране митохондрий преобладает именно TUBB3 [20]. Ингибирование работы митохондрий и переход на аэробный гликолиз – важный этап опухолевой трансформации, и TUBB3, по-видимому, может способствовать этому процессу.

Еще одна функция TUBB3, важная с точки зрения развития опухолевого процесса, заключается в ингибировании анойкиса. В нормальном эпителиальном пласте постоянно активен сигнал к выживанию, идущий от внеклеточного матрикса через интегрины по сигнальной сети, включающей, в частности сигнальную ось PTEN/Akt. Активированный Akt ингибирует посредством фосфорилирования ряд проапоптотических белков (в частности Bad), подавляет экспрессию проапоптотических генов и поддерживает митохондриальный гомеостаз, тем самым способствуя выживанию клеток. Потеря контакта интегринов с белками внеклеточного матрикса приводит к разрыву Akt-сигнального пути и индукции апоптоза. Для эпителиальной опухолевой клетки анойкис (гибель клетки, вызванная откреплением от внеклеточного матрикса) служит основным барьером на пути к метастазированию, и приобретение устойчивости к нему – один из ключевых этапов в процессе малигнизации. Недавнее исследование продемонстрировало роль TUBB3 в возникновении устойчивости к анойкису [21]. Опыты на клеточной культуре H460 (немелкоклеточный рак легкого), показали, что нокдаун TUBB3 приводит к следующим изменениям:

- 1) округлые клетки с плохо различимыми актиновыми стресс-фибриллами (фенотип, характерный для суспензионных культур и клеток асцитных опухолей) приобретают распластанную форму и восстанавливаются стресс-фибриллы;
- 2) после нокдауна восстанавливается чувствительность клеток к анойкису;
- 3) повышается сродство клеток к фибронектину – основному белку межклеточного матрикса;
- 4) изменяется молекулярный профиль: уровень фосфорилированного (активного) Akt снижается, а уровень экспрессии PTEN (фосфатазы, инактивирующей Akt) повышается.

Итак, TUBB3 поддерживает антиапоптотический сигнал даже в случае потери связи между интегринными и внеклеточным матриксом.

Приведенная работа – еще один пример возможного вклада TUBB3 в опухолевую прогрессию.

И, наконец, в литературе накопились сведения, что $\alpha\beta$ -микротрубочки устойчивы к воздействию таксанами. β -тубулин является мишенью многих противоопухолевых

препаратов, нацеленных на остановку клеточного цикла и последующую гибель неопластических клеток. Среди таких препаратов можно выделить агенты, стабилизирующие микротрубочки (таксаны), и дестабилизирующие (алкалоиды Винка). Связываясь с β -тубулином, антитубулиновые агенты задерживают или блокируют переход из метафазы в анафазу митоза за счет нарушения образования веретена деления [22].

Пристальный интерес к TUBB3 со стороны клиницистов обусловлен, прежде всего, классической концепцией, согласно которой экспрессия данного белка является причиной устойчивости опухолей к таксанам [23].

Механизм взаимодействия паклитаксела с микротрубочками детально рассмотрен в работе Холли Фридман (Holly Freedman) и коллег [24]. Было локализовано точное место проникновения паклитаксела внутрь растущей микротрубочки, идентифицированы сайты связывания – промежуточный и конечный, подсчитана кинетика и энергетика реакции. Также было показано, что проникновение молекулы паклитаксела внутрь микротрубочки происходит в несколько этапов, один из которых включает формирование водородной связи с 275 серином, который в молекуле TUBB3 замещен на аланин. Авторы предлагают следующее объяснение резистентности опухолей к таксанам: в резистентных опухолевых клетках микротрубочки построены в основном из $\alpha\beta$ -димеров. Замена одной аминокислоты приводит к понижению константы скорости реакции и увеличению среднего времени, необходимого для связывания молекулы паклитаксела с нескольких секунд до десятков минут. Этот временной интервал приблизительно соответствует среднему времени жизни микротрубочек. Таким образом, лишь небольшое число молекул лекарства успевает связаться с мишенью до того, как начнется деполимеризация и тубулиновые димеры из связанной формы перейдут обратно в растворимую.

В настоящее время некоторые авторы отмечают, что в клинических исследованиях корреляция между уровнем TUBB3 и эффективностью терапии таксанами прослеживается далеко не всегда. Более того, существуют данные о высокочувствительных опухолях, активно экспрессирующих TUBB3. В некоторых клеточных линиях человека TUBB3 связан с резистентностью не только к таксанам, но и к другим цитостатикам, в частности, к цисплатину [16].

Дизайн новых специфических ингибиторов TUBB3 – весьма сложная задача, ввиду отсутствия адекватной модели *in vitro*, отражающей сборку микротрубочек с учетом белков-регуляторов и посттрансляционных модификаций тубулина. Более продуктивным может оказаться подход «сверху», нацеленный на ингибирование клеточных онкогенов, таких как

GBP-1 и PIM-1, которые регулируют экспрессию не только TUBB3, но и ряда других белков, вовлеченных в прогрессию опухоли [25].

Итак, представление о том, что экспрессия TUBB3 является необходимым и достаточным условием для возникновения устойчивости к таксанам – упрощение. С учетом новых данных о полифункциональности TUBB3, сложности его регуляции и большого количества взаимодействующих белков, становится очевидным, что анализа единственного маркера недостаточно для адекватного прогноза резистентности [23]. Более того, помимо TUBB3 в инактивации таксанов участвует еще как минимум один белок – ABC-транспортер Pgp, который селективно выбрасывает препараты этой группы из клетки. Реальный вклад TUBB3 в развитие резистентности к таксанам сложно оценить еще и потому, что эти препараты практически никогда не применяются в монотерапии. Обычно их применяют в комбинации с другими цитостатиками, резистентность к которым развивается по другим механизмам.

1.4. Регуляция экспрессии TUBB3

Как показывают исследования на клеточных культурах рака яичников, экспрессия TUBB3 может быть реализована в ответ на гипоксию, гипогликемию или повышение уровня активных форм кислорода. Роль цитоскелета в адаптации опухолевой клетки к агрессивному микроокружению – перспективная, но еще малоизученная тема. В условиях гипоксии роль TUBB3 состоит в инкорпорации антиапоптотических киназ, таких как PIM1, в состав цитоскелета. Экспрессия TUBB3 в ответ на гипоксию закодирована в самой структуре гена *TUBB3* – его 3' - фланкирующая область содержит последовательность, которая связывается с индуцируемыми при гипоксии транскрипционными факторами HIF-1 α и HIF-2 α [26]. В условиях гипогликемии и гипоксии регуляция экспрессии TUBB3 осуществляется также и на посттранскрипционном уровне с участием РНК-связывающего белка HuR, облегчающего трансляцию TUBB3, и микроРНК miR-200C, в то время как трансляция β I-тубулина, наоборот, ингибируется [27].

Приобретение миграционного фенотипа – еще одна стратегия, позволяющая опухолевой клетке выжить в неблагоприятных условиях. В некоторых клеточных линиях рака яичников экспрессия TUBB3 находится под контролем Gli1 – одного из факторов эпителиально-мезенхимального перехода. Этот факт хорошо согласуется с гипотезой о том, что α III-микротрубочки повышают клеточную подвижность и метастатический потенциал опухолевой клетки [28].

Значительную роль в экспрессии и регуляции TUBB3 могут играть эстрогены, что было доказано на культуре клеток рака молочной железы. Показано, что воздействие эстрадиола на клетки MCF-7, экспрессирующие эстрогеновые рецепторы (ЭР) альфа, приводило к повышению уровня TUBB3 (измерялся как уровень мРНК, так и собственно белок). Такого эффекта не отмечено в экспериментах на клетках линии MDA-MD-231 с негативным статусом эстрогеновых рецепторов. В дальнейшем авторы работы показали, что антиэстрогены тамоксифен и фульвестрант ингибируют синтез TUBB3 только в ЭР-положительных клеточных культурах рака молочной железы. Анализ промотора гена *TUBB3* показал, что транскрипция гена активируется не напрямую через эстрогеновые рецепторы, так как в гене отсутствуют эстроген-респонсивные элементы (ЭРЭ), а через эстроген-зависимые транскрипционные факторы: AP-1, NF-κB и Sp-1 [29].

В клетках Сертоли мышей и крыс ген *TUBB3*, единственный из всех генов, кодирующих β-тубулины, регулируются андрогенами. Впоследствии обнаружилось, что первый интрон гена *TUBB3* несет 4 андроген-респонсивных элемента (АРЭ), мутация одного из которых резко снижает транскрипцию гена в ответ на стимуляцию андрогенами. Итак, экспрессия TUBB3 напрямую регулируется андрогенами, которые стимулируют сперматогенез, в том числе за счет изменения цитоскелета клеток Сертоли [30]. Андрогенная регуляция TUBB3 также описана в нормальных нейронах и некоторых опухолях человека. К числу таких опухолей относятся, например, колоректальный рак и рак предстательной железы [31, 32].

В исследовании Масакадзу Шибасаки (Masakatsu Shibasaki) и коллег показано, что экспрессия TUBB3 в культивируемых клетках НЕК293 (эмбриональная почка человека) и HeLa меняется в зависимости от стадии клеточного цикла. Уровень белка и мРНК в цитоплазме достигает своего пика в G₂/M фазу, а затем снижается. Как оказалось, белок удаляется из цитоплазмы путем убиквитин-зависимого протеолиза. Одновременно происходит репрессия транскрипции с участием транскрипционного фактора REST. Авторы считают, что TUBB3 может участвовать в пролиферации нормальных тканей, не связанных с половой и нервной системами, но в этом случае его экспрессия контролируется REST системой, а по завершении митоза белок удаляется из цитоплазмы [33].

1.5. TUBB3 в нормальных клетках

Ген *TUBB3* человека локализован в длинном плече 16 хромосомы (16q24.3 по номенклатуре ISCN), состоит из 4 экзонов и кодирует белок длиной в 450 аминокислот [34]. В гетерозиготном состоянии мутации гена приводят к нарушениям работы

глазодвигательного нерва, параличу лицевого нерва, и сенсомоторной аксональной полиневропатии [35]. Это указывает на важную роль *TUBB3* в нормальном развитии нервной системы. Подобно остальным изотипам β -тубулина, *TUBB3* содержит ГТФазный домен, необходимый для нормальной сборки и разборки микротрубочек. *TUBB3* отличается от остальных изотипов главным образом аминокислотной последовательностью С-концевого участка, на котором локализованы сайты связывания с регуляторными белками, а также сайт-мишень паклитаксела [34].

В обзорах Кристоса Касетоса (Cristos Katsetos) и соавторов обобщены данные об экспрессии *TUBB3* в нормальных тканях и опухолях центральной нервной системы [8,36].

По ходу эмбрионального развития млекопитающих, включая человека, экспрессия *TUBB3* регистрируется в следующих структурах нервной системы: нейробластах, которые впоследствии формируют кору мозжечка, сетчатку и субвентрикулярную зону; прогениторных клетках глии и дифференцированных постмитотических нейронах; клетках-предшественниках симпатoadреналовой системы и, возможно, в клетках-предшественниках олигодендроцитов. Также имеются данные об эмбриональной экспрессии *TUBB3* в единичных клетках диффузной эндокринной системы легкого.

У некоторых млекопитающих экспрессия *TUBB3* регистрируется во взрослом возрасте в отдельных компонентах репродуктивной системы. Так, в семенниках грызунов *TUBB3* локализован в клетках Сертоли [37] а у хряка *TUBB3* присутствует в жгутиках сперматозоидов [38].

Во взрослом организме человека экспрессия *TUBB3* сохраняется в нейронах (как в перинуклеарном пространстве, так и в отростках) центральной и периферической нервной системы. Описано присутствие *TUBB3* в меланоцитах – клетках, происходящих из нервного гребня и экспрессирующих ряд нейроспецифических маркеров [39]. Также *TUBB3* обнаружен в стволовых клетках bulge-зоны волосяного фолликула [40].

1.6. TUBB3 в опухолях нервной системы

Экспрессия *TUBB3* сохраняется в опухолях нервной системы, как высоко-, так и низкодифференцированных, однако его распределение в тканях неравномерно. Высокий уровень белка отмечается в клеточных популяциях, демонстрирующих нейрональную дифференцировку и ограниченный пролиферативный потенциал, в то время как в менее дифференцированных участках той же опухоли экспрессия белка значительно ниже [41, 42]. Эта закономерность наблюдается в медуллобластомах, ретинобластомах и феохромоцитомах. Поскольку экспрессия *TUBB3* в опухолях данной локализации отражает

степень их дифференцировки, а высокодифференцированные опухоли обычно медленнее растут и реже метастазируют, можно сделать вывод, что те опухоли, в которых уровень TUBB3 остается высоким, в целом должны иметь лучший прогноз. Тем не менее, для медуллобластом высокая степень дифференцировки ассоциирована с худшим прогнозом общей выживаемости [43]. К. Касетос и соавторы подчеркивают, что, учитывая сложность и противоречивость биологического контекста, нельзя однозначно установить связь между экспрессией TUBB3 и прогнозом заболевания. По-видимому, анализ экспрессии TUBB3 в этих опухолях не имеет перспектив для клинического использования [8].

В глиомах, напротив, присутствие TUBB3 ассоциировано с низкой степенью дифференцировки, поскольку в нормальных клетках глии этот белок не экспрессируется. Результаты иммуногистохимического исследования тканевых матриц 378 опухолей мозга с использованием 37 моноклональных антител демонстрируют, что TUBB3 входит в число 6 маркеров, отражающих разницу между высоко- и низкодифференцированными глиомами [44]. Для астроцитарных и олигодендроглиом также показана прямая корреляция между высоким уровнем экспрессии TUBB3 и пролиферативным индексом Ki-67 [45,41]. Более того, уровень экспрессии TUBB3 в астроцитомах оказался выше на поздних стадиях заболевания, чем на ранних [45]. По-видимому, наблюдаемые TUBB3-позитивные структуры в глиомах представляют собой наиболее агрессивные и низкодифференцированные субклоны опухолевых клеток, обладающие наибольшим опухолевым потенциалом. Интересно отметить, что в тканевых образцах мультиформной глиобластомы выделяются две фракции TUBB3-позитивных клеток: (а) низкодифференцированные небольшие анапластические клетки, напоминающие глиальные клетки-предшественники или бипотентные клетки кортикальных предшественников и (б) опухолевые клетки, находящиеся на границе ишемического некроза [46]. Последнее согласуется с экспериментальными данными, согласно которым экспрессия TUBB3 в условиях *in vitro* может включаться в ответ на гипоксию (см. выше).

1.7. TUBB3 в эпителиальных опухолях человека

Экспрессия TUBB3 часто регистрируется и в опухолях эпителиального происхождения, при том, что в нормальной эпителии этот белок не экспрессируется [47]. Впервые ассоциация TUBB3 с устойчивостью к таксанам [48,49] показана для рака яичников. В дальнейшем было неоднократно подтверждено, что экспрессия TUBB3 также ассоциирована с неблагоприятным прогнозом общей выживаемости пациентов, получавших лекарственную терапию на основе препаратов платины и таксанов [50,51]. Еще в одном

исследовании было продемонстрировано, что среди всех гистологических типов рака яичников высокий уровень TUBB3 чаще обнаруживается в светлоклеточной аденокарциноме, которая признана наиболее устойчивой к химиотерапии [52]. Для этой же гистологической формы был получен парадоксальный результат: вопреки ожиданиям, гиперэкспрессия TUBB3 ассоциировалась с лучшим прогнозом общей выживаемости среди пациентов, получавших химиотерапию [53].

В ткани немелкоклеточного рака легкого также обнаружена экспрессия TUBB3. Данные исследований прогностической и предиктивной роли TUBB3 объединены в обзорах Яна Якобсона (J. N. Jakobsen) 2014 и 2015 года [54,55]. Кратко: (1) высокий уровень экспрессии в опухоли TUBB3 ассоциирован с уменьшением эффективности химиотерапии и продолжительностью жизни больных по сравнению с группой пациентов с низкой экспрессией маркера в опухоли; (2) результаты большинства исследований показывают, что экспрессия в опухоли TUBB3 достоверно выше на поздних стадиях немелкоклеточного рака легкого и выше в ткани аденокарциномы по сравнению с плоскоклеточным раком легкого; (3) в зависимости от стадии заболевания разные исследования дают разные результаты относительно клинической значимости TUBB3 как маркера устойчивости к таксанам и прогноза заболевания.

Экспрессия TUBB3 широко исследована в опухолях молочной железы. В частности, иммуногистохимический анализ 1652 хирургических биопсийных образцов опухолей выявил прямую корреляцию между уровнем TUBB3 и степенью злокачественности по Блуму-Ричардсону, индексом пролиферации Ki-67, амплификацией HER2 и другими прогностически неблагоприятными признаками [56]. В то же время не было выявлено связи со стадией заболевания и метастазированием, что, по словам авторов статьи, ставит под сомнение ключевую роль белка в опухолевой прогрессии и метастазировании. Большинство исследований свидетельствуют об отсутствии выраженной связи между уровнем TUBB3 и такими показателями, как общая и безрецидивная выживаемость пациентов и устойчивость к химиотерапии на основе таксанов [23]. По мнению авторов, это может быть связано с тем, что экспрессия TUBB3 в клетках рака молочной железы регулируется эстрогеновыми рецепторами, а опухоли с экспрессией эстрогеновых рецепторов более чувствительны к гормональной и цитотоксической терапии. С точки зрения прогноза эффективности лечения позитивный статус эстрогеновых рецепторов может «перевешивать» неблагоприятные эффекты TUBB3.

Важные данные получены в ходе исследования метастазов рака молочной железы в головной мозг. Оказалось, что опухолевые клетки, локализованные в мозге, экспрессируют

нейроспецифические маркеры: TUBB3, Нестин и AchE. Продолжив исследование на модельных клеточных культурах, авторы показали, что клетки с нокдауном гена *TUBB3* хуже мигрируют в просвет «раны» монослоя *in vitro* (scratch wound migration assay), а также слабее прикрепляются к подложке, содержащей белки внеклеточного матрикса: ламинин и фибронектин. Так было подтверждено участие белка в процессах миграции опухолевых клеток, а следовательно – в инвазии и метастазировании опухолевых клеток [57].

TUBB3 также обнаружен в ткани рака желудка. По разным оценкам доля опухолей, экспрессирующих TUBB3, составляет от 37% [58] до 67%. [59]. Поскольку ключевой группой препаратов, применяемых в лекарственной терапии распространенного рака желудка, являются таксаны, неоднократно предпринимались попытки понять, существует ли связь между высокой экспрессией TUBB3 и эффективностью химиотерапии. В совокупности проведенные исследования не дают четкого ответа на этот вопрос [23].

Статус TUBB3 в ткани колоректального рака описан в ряде работ. Разные исследования дают разные оценки доли TUBB3-позитивных опухолей: от 23% [60] до 82% [61]. Для опухолей данной локализации продемонстрирована связь между высоким уровнем TUBB3 и высоким уровнем рецепторов андрогенов [31]. В дальнейшем, уже на клеточных культурах было показано, что экспрессия белка запускается в ответ на стимуляцию андрогенами (см. ниже). Наиболее подробно экспрессия TUBB3 в ткани колоректального рака охарактеризована в публикации А. Портянко [12]. В частности, показано, что TUBB3 в опухолевой ткани экспрессируется неравномерно и максимальный уровень наблюдается в клетках инвазивного фронта. Это свидетельствует о связи TUBB3 с инвазивным потенциалом опухолевых клеток. Еще одно важное наблюдение: уровень TUBB3 зависит от преобладающего гистоархитектонического строения опухоли: максимальная экспрессия наблюдается в участках, не имеющих тубулярного строения, минимальная – в простых и сложных железах. При этом экспрессия TUBB3 практически отсутствует в морфологически нормальной слизистой оболочке. В другой работе А. Портянко заключает, что гиперэкспрессия TUBB3 – лишь часть комплексного процесса ремоделирования цитоскелета в опухолях толстой кишки. Этот процесс включает повышение уровня β_I , β_{II} и β_{III} тубулинов, тирозинированного α -тубулина и понижение уровня ацетилированного α -тубулина [62].

Экспрессия TUBB3 выявлена и в ткани рака простаты. Высокая экспрессия позволяет дифференцировать резистентный рак предстательной железы и гормончувствительный. У пациентов с резистентными опухолями уровень TUBB3 обычно выше по сравнению с чувствительными [32]. TUBB3, по некоторым данным, также является независимым прогностически неблагоприятным фактором общей и безрецидивной выживаемости

пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии [63]. Впрочем, в другом исследовании подтвердилась лишь связь высокой экспрессии TUBB3 со сниженной безрецидивной выживаемостью [64]. По-видимому, основной потенциал клинического использования TUBB3 в терапии рака предстательной железы связан с предсказанием эффективности гормональной терапии.

Еще одна опухоль, связанная с гиперэкспрессией TUBB3 – рак мочевого пузыря. При исследовании биопсийных образцов (n=686) экспрессия TUBB3 была обнаружена в 43% опухолей. На основании иммуногистохимического и цитогенетического (FISH) анализов было показано, что высокая экспрессия маркера ассоциирована с хромосомными нарушениями и ускоренной пролиферацией опухолевых клеток [65].

TUBB3 экспрессируется также в ткани рака почки, причем экспрессия маркера сильно зависит от гистологического типа опухоли. Чаще всего TUBB3 регистрируется в папиллярных карциномах, онкоцитомах и хромоформных карциномах, реже – в светлоклеточных карциномах. При этом в светлоклеточных карциномах экспрессия TUBB3 ассоциируется с прогностически неблагоприятными признаками, такими как высокая степень злокачественности по Фурману, наличие метастазов в лимфоузлах и отдаленных метастазов, низкая общая выживаемость. Парадоксальным образом для папиллярных почечноклеточных карцином наблюдается обратная зависимость: высокая экспрессия TUBB3 коррелирует с ранней стадией заболевания и лучшим прогнозом по общей выживаемости [66].

Выше приведен далеко не полный перечень опухолей, экспрессирующих TUBB3. Экспрессия белка описана для многих злокачественных новообразований. К таким опухолям относятся: рак шейки матки [67], плоскоклеточный рак головы и шеи [68], рак вилочковой железы [69], меланома [70], экстрамамиллярный рак Педжета [71], базальноклеточный рак кожи [72], рак поджелудочной железы [21], мелкоклеточный рак легкого [73], мезотелиома плевры [74]. Неоднородна экспрессия TUBB3 в патологических клетках при различных лимфопролиферативных заболеваниях [75]. Однако к настоящему моменту связь этого важнейшего маркера с агрессивностью течения болезни и чувствительность опухоли к химиотерапии изучено недостаточно.

1.8. Перспективы использования TUBB3 в клинической практике

Как неоднократно отмечалось выше, попытки связать экспрессию TUBB3 с прогнозом заболевания или резистентностью к химиотерапии зачастую приводят к противоречивым результатам. Дискордантность результатов клинических исследований может быть

обусловлена тем, что мы по-прежнему мало знаем о регуляции гена *TUBB3* и его связи с другими опухолевыми маркерами. В зависимости от типа пораженного органа, гистологической формы новообразования, стадии заболевания или схемы лекарственного лечения *TUBB3* может вносить разный вклад в опухолевую прогрессию и устойчивость к химиотерапии. К примеру, в ткани рака молочной железы с позитивным статусом эстрогеновых рецепторов, по крайней мере, на культуральных моделях, экспрессия *TUBB3* находится под контролем эстрогенов. Если этот механизм сохраняется в опухолях *in vivo*, то присутствие белка в биопсийном образце будет указывать на чувствительность опухоли к антиэстрогенам и лучшие показатели выживаемости на фоне гормональной терапии. Но *TUBB3* может экспрессироваться в ином биологическом контексте – как ответ на гипоксию или недостаток питательных веществ. В этом случае присутствие белка в опухоли будет свидетельствовать о ее агрессивности вне зависимости от назначенного лечения [23].

На первый взгляд может показаться, что *TUBB3* не подходит для рутинного клинического использования в качестве прогностического или предиктивного маркера. Действительно, пока анализ экспрессии *TUBB3* не включен в стандарты скрининга или клинические рекомендации ни по одной из перечисленных нозологий. Тем не менее, предиктивный потенциал *TUBB3* возрастает, если использовать его в паре с другим маркером. Для немелкоклеточного рака легкого это ERCC1 – компонент системы эксцизионной репарации ДНК, который определяет резистентность опухоли к препаратам платины. Эффективность совместного использования ERCC1 и *TUBB3* в качестве маркеров устойчивости немелкоклеточного рака легкого к комбинации цисплатин/паклитаксел неоднократно продемонстрирована во многих исследованиях [76– 79].

В 2014 году опубликованы результаты проспективного исследования, в котором оценивалась клиническая значимость трех маркеров: ERCC1, RRM1 и *TUBB3* – для персонализированного выбора оптимальной комбинации препаратов платины, таксанов и гемцитабина. Опытная группа пациентов с немелкоклеточным раком легкого, в опухолях которых оценивали уровень экспрессии маркеров, была разделена на 2 подгруппы: 1 – с отсутствием или низким уровнем экспрессии ERCC1 и 2 – с высокой экспрессией маркера. Больные получали химиотерапию с включением препаратов платины только в первой подгруппе. В обеих подгруппах при назначении таксанов или гемцитабина врачи ориентировались на показатели экспрессии *TUBB3* и RRM1. Препараты назначали только в случае низкой экспрессии соответствующего маркера. Контрольную группу составили пациенты, которым не удалось провести молекулярное фенотипирование из-за отсутствия опухолевого материала. Этим больным проводили стандартную химиотерапию препаратами

платины в комбинации с таксанами или гемцитабином, которая выбиралась эмпирически с учетом общего состояния пациента. Анализ полученных результатов продемонстрировал бóльшую эффективность лечения в группе молекулярно обоснованного выбора схемы химиотерапии по ряду клинических показателей – по непосредственному ответу на лечение, а также по продолжительности безрецидивного течения болезни и одногодичной выживаемости [80].

Еще один пример: больные распространенным раком молочной железы, негативные по экспрессии TUBB3, лучше отвечают на химиотерапию. При введении в анализ дополнительных маркеров, ERCC1 и антиапоптотического белка Bcl-2, точность прогноза возрастает [81].

Уникальность TUBB3 как опухолевого маркера заключается в том, что он практически не экспрессируется в большинстве нормальных тканей. Луис Леандро-Гарсия (Luis J. Leandro-García) с соавторами методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-PCR) исследовали экспрессию различных изоформ β -тубулина на панелях кДНК из 21 типа нормальных тканей. Оказалось, что TUBB3 высоко экспрессируется лишь в ткани головного мозга, тогда как в образцах других тканей маркер не выявляется или уровень его экспрессии минимален (не более 3% от суммарной экспрессии разных изоформ β -тубулина). При сравнительной оценке экспрессии TUBB3 в опухолевой и соответствующей нормальной ткани органа того же больного показано, что в опухолевой ткани уровень экспрессии TUBB3 значительно превышает показатель в окружающей нормальной ткани. В частности, для немелкоклеточного рака легкого, рака яичников и молочной железы различия достигли 71, 43 и 1000 раз, соответственно. Авторы исследования подчеркивают важность оценки молекулярного профиля тубулинов для прогнозирования эффективности антитубулиновых противоопухолевых препаратов и важность разработки новых лекарств сходного механизма действия, но нацеленных на ингибирование разных изоформ тубулина [82].

На основании результатов иммуногистохимической сравнительной оценки экспрессии TUBB3 в ткани рака кожи и немалигнизированного эпидермиса предложено использовать этот маркер для дифференциальной диагностики небольших опухолевых очагов базальноклеточной карциномы [83]. Рассматривается также возможность рассматривать в качестве диагностического признака утрату эктопической экспрессии TUBB3 некоторыми опухолями. В частности, показано, что меланоциты, которые в норме синтезируют белок, в ходе клеточного старения или малигнизации утрачивают его. Следовательно, анализ

экспрессии TUBB3 может помочь при дифференциации меланомы и доброкачественного невуса [84].

Мы считаем, что сравнительный количественный анализ экспрессии TUBB3 в ткани опухоли и нормальной окружающей ткани органа может использоваться для молекулярной диагностики локальной распространенности опухолевого процесса или другими словами – для оценки вовлеченности пораженного органа в опухолевую малигнизацию. Правомочность этого представления подтверждена нами при количественной иммунофлуоресцентной оценке с использованием метода проточной цитофлуориметрии экспрессии белка TUBB3 в клетках, полученных из хирургических образцов немелкоклеточного рака легкого и окружающей морфологически нормальной ткани органа [72]. Экспрессия маркера в нормальной ткани легкого, окружающей опухолевый очаг, выявлена менее чем в половине случаев. При этом отмечены значительные различия в уровне экспрессии TUBB3 как в опухолевой, так и в нормальной ткани легкого разных больных, однако во всех исследованных парах «опухоль–норма» уровень маркера в нормальной ткани всегда был ниже, чем в опухоли. По нашему мнению, молекулярная характеристика ткани легкого, окружающей опухолевый очаг, особенно важна при ранних стадиях этого заболевания, когда ставится вопрос об оптимальном радикализме хирургической операции. У таких больных представляет сложность и выбор тактики послеоперационного ведения – динамическое наблюдение или химиотерапия. В этой ситуации дополнительным аргументом может оказаться молекулярная вовлеченность ткани пораженного органа в опухолевый процесс. И в этом смысле уровень экспрессии TUBB3 в нормальной ткани, окружающей очаг немелкоклеточного рака легкого, является важным ориентиром.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

Реактивы: таблетки фосфатно-солевого буфера pH 7.4 (ПанЭко, Россия), раствор Версена (ПанЭко, Россия), формалин (37% водный раствор формальдегида, стабилизированный 8-12% метанолом) (Carl-Roth, Германия), азид натрия (Sigma, США), краситель Hoechst H33258 (Sigma, США), бычий сывороточный альбумин – фракция V (BSA) (Neofroxx, Германия).

Антитела. Для определения TUBB3 использовали первичные мышинные моноклональные антитела (ab7751, клон TU-20, Abcam, Великобритания), специфичные к фрагменту aa 441-448 последовательности белка TUBB3.

В качестве вторичных антител использовались козы антимышинные поликлональные антитела, конъюгированные с красителем DL650 (ab98729, Abcam, Великобритания).

В качестве контроля использовались пробы, окрашенные только вторичными антителами. Рабочие концентрации всех антител получали путём их разведения 1% раствором BSA с добавлением 0,1% раствора азидата натрия в фосфатном буферном растворе (pH 7,4).

Клеточные культуры. В работе использовалась монослойная культура клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7. Опухолевые клетки линии MCF-7 культивировали адгезионным методом в полной питательной среде, содержащей 90% ЕМЕМ («ПанЭко», Россия), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Invitrogen», США), 1% заменимых аминокислот («ПанЭко», Россия), 10 мкг/мл бычьего инсулина («ПанЭко», Россия), 0,3 мг/мл L-глутамина («ПанЭко», Россия) и 100 мкг/мл гентамицина.

Опухолевый материал: хирургические биопсийные образцы немелкоклеточного рака легкого, рака пищевода и окружающей нормальной ткани были получены из торако-абдоминального отдела ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» МЗ РФ.

2.2. Методы

Ранее коллектив лаборатории адаптировал метод проточной цитофлуориметрии, традиционно применяемый в исследованиях биологических жидкостей и клеток *in vitro*, для изучения солидных опухолей человека [85]. Метод позволяет относительно быстро, точно и дешево исследовать экспрессию интересующего белка в большой популяции опухолевых клеток, что в значительной степени решает проблему гетерогенности опухоли. Метод подходит для изучения экспрессии как поверхностных антигенов (Pgp [86], MRP1 [85], CD45 [87]), так и белков, локализованных в цитоплазме (ERCC1 [88,89], эстрогеновые рецепторы

альфа [90] и бета [91], цитокератин, виментин [92], TUBB3 [93]) и даже в клеточном ядре (RRM1 [94], BRCA1 [95]).

2.2.1. Получение одноклеточной суспензии культуры клеток

Для получения суспензии клеток из культурального матрица сливали питательную среду, дважды промывали монослой раствором фосфатного буфера (pH 7,4), добавляли раствор Версена до покрытия клеток тонким слоем жидкости и инкубировали в течение 30 мин. при 37°C. После снятия монослоя рабером клетки переносили в пробирку с фосфатным буферным раствором (pH 7,4) и пипетировали до получения одноклеточной суспензии. Затем клетки отмывали раствором фосфатного буфера и центрифугировали 10 мин. при 3000 об/мин. Полученный осадок ресуспендировали в фосфатном буфере (pH 7,4). Количество клеток подсчитывали в камере Горяева и доводили фосфатным буферным раствором (pH 7,4) с последующей фиксацией клеток 10%-м раствором нейтрального забуференного формалина.

2.2.2. 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.

2.2.3. Иммунофлуоресцентный 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 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 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 (pH 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.

Для исследования экспрессии TUBB3 в каждом образце ткани использовано не менее 3 концентраций моноклональных антител: 0,04; 0,08 и 0,16 мкг/мл. В предварительных экспериментах были определены области линейной зависимости интенсивности флуоресцентного специфического окрашивания клеток от концентраций первичных антител для культуры клеток MCF-7 и одного контрольного хирургического образца, чтобы используемые в дальнейшем концентрации лежали в области левее достижения плато на калибровочной кривой (рис. 1).

Исследовались два показателя экспрессии белка. 1. Доля (%) специфически флуоресцирующих клеток в образце по отношению к образцу этой же суспензии, окрашенной только вторичными антителами. Данный параметр рассчитывался методом, описанным ниже. 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 (см. ниже).

Из рисунков 1А и 1Б видно, что в культуре MCF-7 доля экспрессирующих TUBB3 клеток выше, чем в контрольном хирургическом образце. Концентрация, соответствующая предплатовой области, т.е. максимальному насыщению антигена антителами, в обоих случаях составляет 0,16 мкг/мл. Погрешность измерения на данном диапазоне концентраций остается примерно одинаковой (планки погрешностей на рисунках 1А и 1Б). Для второго анализируемого параметра, $\Delta MF I$, картина несколько иная: параметр $\Delta MF I$ как в культуре, так и в опухолевой суспензии линейно растет на всем диапазоне концентраций (рис. В, Г). Погрешность измерения возрастает с увеличением концентрации антител (планки погрешностей на рисунках В и Г).

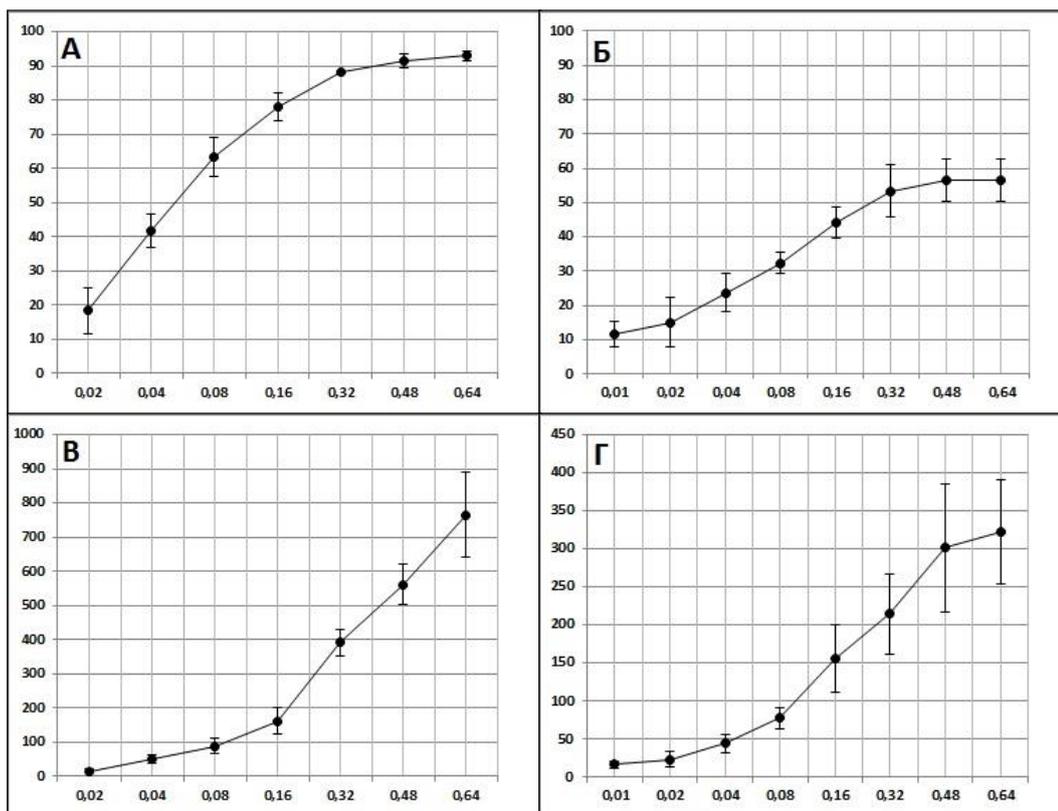


Рисунок 1 – Калибровочные кривые зависимости доли положительно окрашенных клеток (А,Б) и ΔMFI (В,Г) от концентрации первичных антител. По оси абсцисс обозначена концентрация антител ($\mu\text{г/мл}$), по осям ординат – уровень экспрессии белка TUBB3, т.е. доля окрашенных клеток (%) (А,Б) или ΔMFI (В,Г). А. Кривая зависимости доли окрашенных клеток от концентрации первичных антител в культуре MCF-7. Б. Кривая зависимости доли окрашенных клеток от концентрации первичных антител в суспензии опухоли пациента с НМРЛ. В. Кривая зависимости ΔMFI от концентрации первичных антител в культуре MCF-7. Г. Кривая зависимости ΔMFI от концентрации первичных антител в суспензии опухоли пациента с НМРЛ. Точки на графике – средние значения, планки погрешностей – стандартные отклонения.

Мы сочли целесообразным использовать для анализа концентрацию 0,16 $\mu\text{г/мл}$. Учитывая, что у разных пациентов для максимального насыщения может требоваться разная концентрация антител, было решено использовать в анализе еще 2 концентрации: 0,04 и 0,08 $\mu\text{г/мл}$. Чтобы убедиться, что выявленные соотношения сохраняются при разных концентрациях антител, измерения и последующая статистическая обработка результатов проводились для трех концентраций: 0,04; 0,08 и 0,16 $\mu\text{г/мл}$.

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.

2.2.4. Метод проточной цитофлуориметрии

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) с применением программного обеспечения Navios Software. Для возбуждения флуоресценции использовали твердотельные диодные лазеры с длиной волны испускаемого света 405 (фиолетовый), 488 (синий) и 638 (красный) нм. При окрашивании клеток вторичными антителами с красителем DL650 флуоресценцию регистрировали по параметру FL6-A (красный лазер) с напряжением 720В. При окрашивании клеток красителем Hoechst 33258 флуоресценцию регистрировали по параметру FL9-A (фиолетовый лазер) с напряжением 370В.

Для исключения из анализа разрушенных клеток и лейкоцитов в настройках канала регистрации сигнала было установлено значение дискриминатора по параметру малоуглового светорассеяния (forwardscatter, FS) равное 100. Малоугловое светорассеяние представляет собой рассеяние света от поверхности клеток под малыми углами (1-19°) и, как правило, пропорционально диаметру исследуемого объекта. С заданным значением дискриминатора структуры с FS меньше 100 условных единиц исключались из анализа.

Скорость ламинарного потока жидкости в капилляре задали как среднюю. В зависимости от условий эксперимента, число анализируемых событий варьировало от 2000 до 5000.

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.

Исходно результаты анализа каждого образца представлялись в виде частотных гистограмм распределения клеток по интенсивности флуоресценции. По оси абсцисс отложена интенсивность флуоресценции, поделенная на фиксированное число каналов (в нашем случае – 10^4). По оси ординат – число клеток, окрашенных с соответствующей интенсивностью. События, попадающие в низкие каналы (на гистограмме слева), обладают самым слабым сигналом, а события в самых высоких каналах (на гистограмме справа) – самым выраженным сигналом. Пример такой гистограммы приведен на рис. 2.

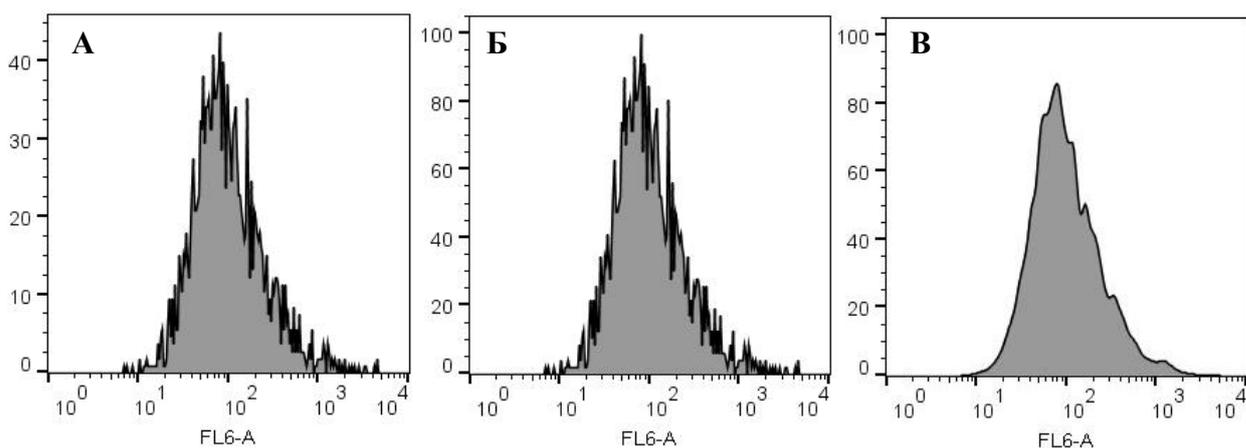


Рисунок 2 – Варианты представления гистограммы интенсивности флуоресценции для одного и того же экспериментального образца. По горизонтальной оси – интенсивность флуоресценции. **А.** Внешний вид гистограммы «по умолчанию». По вертикальной оси – число клеток. **Б.** Нормированная гистограмма: по вертикальной оси – доля клеток, выраженная в % от максимальной высоты пика. Данный тип гистограммы удобен для сравнения популяций, содержащих разное число клеток. **В.** Результат наложения на нормированную гистограмму сглаживающего фильтра.

Интенсивность флуоресценции напрямую отражает степень экспрессии исследуемого маркера в клетках, а гистограмма интенсивности – среднюю интенсивность экспрессии и разброс значений данного показателя в исследуемой популяции.

Для контроля неспецифического связывания антител необходимо сравнение окрашивания обработанных первичными и вторичными антителами клеток с клетками контрольного образца, окрашенного только вторичными антителами. При наложении гистограммы контрольной пробы на гистограмму пробы, окрашенной специфическими антителами, в программе FlowJo оценивалось, идентичны ли эти гистограммы, т.е. есть ли в пробе окрашенные клетки. При этом использовался непараметрический критерий Колмогорова–Смирнова, обладающий высокой чувствительностью и не зависящий от распределения данных.

Для контроля качества отмывки вторичных антител использовался второй контрольный образец, не окрашенный ни первичными, ни вторичными антителами. В случае, если значение средней интенсивности в образце, окрашенном только вторичными антителами сильно превышало значение в неокрашенном образце, качество отмывки считали неудовлетворительным и опыт повторяли.

Как описано выше, исследовалось два показателя экспрессии белка TUBB3: доля специфически флуоресцирующих клеток (уровень экспрессии), выраженная в процентах и $\Delta MF1$ – средняя интенсивность флуоресценции всех клеток в окрашенном образце, нормированная на контроль, окрашенный только вторичными антителами, выраженная в условных единицах. В дальнейшем, для краткости, мы будем обозначать долю окрашенных клеток как **уровень** экспрессии TUBB3, а $\Delta MF1$ как **интенсивность** экспрессии TUBB3.

2.2.5. Вычисление уровня экспрессии TUBB3 на основе непараметрического критерия

Колмогорова–Смирнова

Уровень экспрессии белка, т.е. процент клеток, экспрессирующих маркер, высчитывался при сравнении экспериментального образца с контрольным, т.е. инкубированным только с вторичными антителами.

Вычисление доли положительно окрашенных клеток – одна из важнейших задач проточной цитофлуориметрии. Эта задача становится особенно сложной, если гистограммы опытного и контрольного образцов сильно перекрываются, что наблюдается, в том числе, при анализе хирургических биопсийных образцов.

В литературе описано множество алгоритмов сравнения гистограмм, с помощью которых вычисляется доля положительно окрашенных клеток [96]. Все они имеют свои преимущества и недостатки. В настоящем исследовании мерой доли окрашенных клеток был выбран параметр D_{\max} – максимальное значение модуля разности двух типов распределения, выраженное в процентах. Данный параметр включен в статистику Колмогорова–Смирнова и обозначается в программе FlowJo как «K-S max difference». Поскольку метод не является общепризнанным, следует кратко остановиться на истории его возникновения и примерах использования.

В 1977 году впервые было предложено использовать непараметрический критерий Колмогорова–Смирнова в проточной цитометрии для сравнения гистограмм [97,98]. Как и любой аналогичный критерий, тест Колмогорова–Смирнова позволяет ответить на вопрос, различаются ли две гистограммы между собой. Критерий основан на сравнении двух функций распределения. В ходе ряда преобразований вычисляется эмпирическая величина K , затем данная величина сравнивается с критическим значением, определяемым по специальной таблице исходя из заданного уровня значимости. Если полученное значение больше критического, можно сделать вывод, что две гистограммы различаются между собой, если меньше – не различаются. На одном из промежуточных этапов при вычислении

статистики Колмогорова–Смирнова как раз находится величина D_{\max} – максимальное по модулю значение разности двух функций распределения.

Два года спустя появилось первое свидетельство, что величина D_{\max} является не просто расчетным параметром при вычислении статистики Колмогорова–Смирнова, но и может иметь биологический смысл. Кеннет Олт (Kenneth Ault) разработал методику выявления моноклональных В-лимфоцитов в крови для диагностики лимфопролиферативных заболеваний. Метод основывался на сравнении распределений В-лимфоцитов, имеющих на поверхности легкие цепи иммуноглобулина одного из двух типов: каппа либо лямбда. Для сравнения распределений использовался критерий Колмогорова–Смирнова. В ходе исследования выяснилось, что при смешивании в заданных пропорциях крови здорового человека с кровью пациента с подтвержденным клиническим диагнозом, величина D_{\max} , выраженная в процентах, отражала долю малигнизированных клеток в образце [99].

В 1988 году Рэй Овертон (Rey Overtone) создал методику вычисления доли положительно окрашенных клеток, которая во многом схожа с описанной выше [100]. Данный метод, названный именем своего создателя, получил широкое применение в проточной цитофлуориметрии. Алгоритм расчета доли окрашенных клеток по Овертону встроен в программный пакет FlowJo. Оба метода активно используются по сей день.

Применительно к недавним исследованиям, статистика D_{\max} использовалась, к примеру, для расчета уровня экспрессии белков множественной лекарственной устойчивости и MDR1 и MRP1 в клетках острого миелоидного лейкоза [101], MDR1 и ABCG2 в крови пациентов с системной красной волчанкой [102], молекул МНС II в клетках тимомы [103], циркулирующих дендритных клеток в крови пациентов с болезнью Крона [104].

Помимо статистики Колмогорова–Смирнова и метода Овертона в литературе описано множество статистических методов для сравнения клеточных популяций с близкими параметрами флуоресценции, и до сих пор не существует консенсуса, какой из них является наиболее точным [105]. Однако два первых метода наиболее часто встречаются в публикациях, посвященных анализу данных, полученных с использованием проточной цитофлуориметрии. Выбор статистики D_{\max} , ассоциированной с критерием Колмогорова–Смирнова в нашем исследовании обусловлен простотой использования и высокой точностью. Значения, вычисленные на основании статистики D_{\max} , сравнивались со значениями, полученными с помощью метода Овертона. Для всех исследованных образцов получены сопоставимые результаты, что придает дополнительную уверенность в правильном выборе алгоритма обработки данных.

Рассмотрим подробнее, как рассчитывается величина D_{\max} . В качестве примера возьмем реальную гистограмму экспериментального образца из нашего исследования (рис. 3).

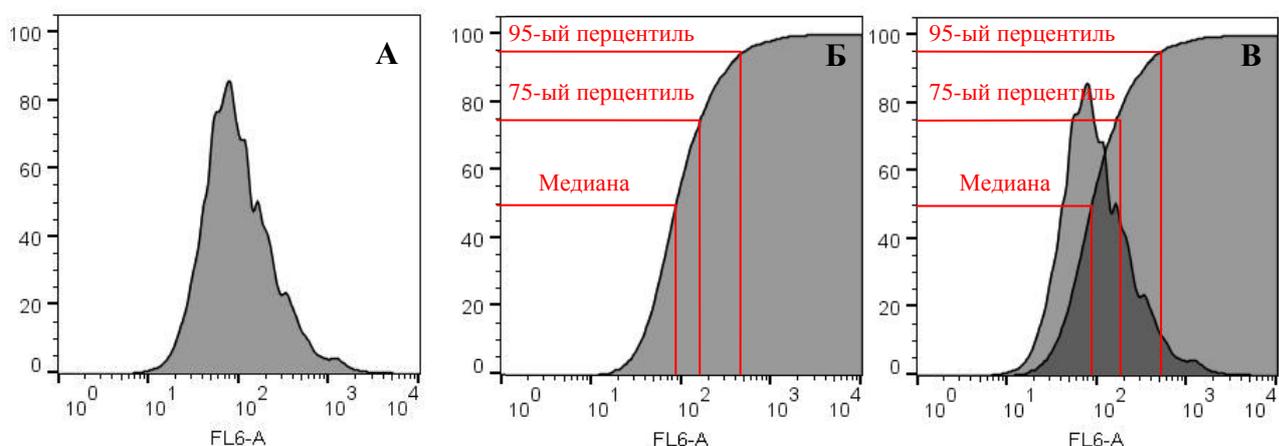


Рисунок 3 – Гистограммы распределения интенсивности клеток в экспериментальном образце. По горизонтальной оси – интенсивность флуоресценции ($\Delta MF1$). **А.** Нормированная гистограмма интенсивности флуоресценции. По вертикальной оси – доля клеток в процентах от максимальной высоты пика. **Б.** График кумулятивной функции распределения (CDF-гистограмма). По вертикальной оси – доля клеток, интенсивность флуоресценции в которых не превышает значения X (в процентах от общего числа клеток).

Случайная величина X (в нашем исследовании это интенсивность флуоресценции в клетке) может быть выражена через кумулятивную функцию распределения (CDF – Cumulative Distribution Function) $F(x)$. Кумулятивная функция распределения случайной величины определяет вероятность P того, что случайная величина принимает значение, меньше x , т.е.

$$F(x) = P(X < x) \quad (1)$$

График кумулятивной функции распределения (он называется также перцентильной кривой или CDF-гистограммой) содержит ту же информацию, что и частотная гистограмма распределения, где по вертикальной оси отложена относительная частота, выраженная в процентах (рис. 3А). Разница состоит в том, что каждое значение Y включает сумму всех предыдущих (лежащих на гистограмме левее) значений. Таким образом, кривая представляет собой постоянно возрастающую функцию в интервале от 0 до 100% (рис. 3Б).

При вычислении значения D_{\max} , программа сравнивает кумулятивные функции распределения опытного и контрольного образцов и находит значение, в котором разница между ними максимальна по формуле:

$$D_{\max} = \max |F_{\text{cont}}(x) - F_{\text{test}}(x)|, \quad (2)$$

где

F_{cont} – кумулятивная функция распределения контрольного образца

F_{test} – кумулятивная функция распределения опытного образца

\max – максимальная по модулю величина разницы.

Графически это выглядит как суперпозиция двух кривых CDF, где значению D_{\max} соответствует величина максимального расхождения кривых. Пример сравнения опытной и контрольной пробы с нахождением параметра D_{\max} приведен на рис. 4.

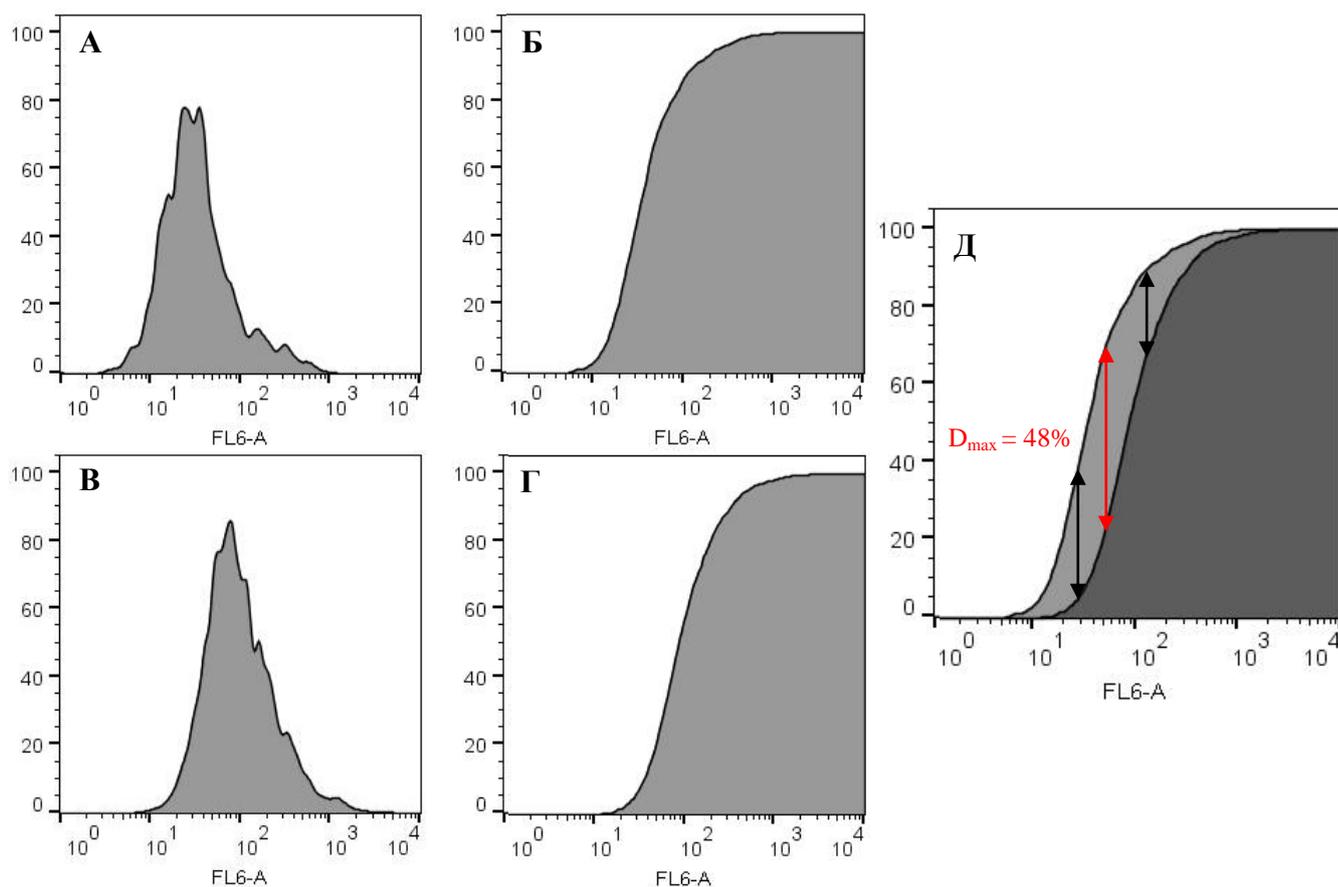


Рисунок 4 – Пример сравнения опытного и контрольного образца путем оценки степени расхождения их кумулятивных функций распределения. **А.** Нормированная частотная гистограмма контрольного образца. **Б.** CDF-гистограмма контрольного образца. **В.** Нормированная частотная гистограмма экспериментального образца. **Г.** CDF-гистограмма экспериментального образца. **Д.** Суперпозиция CDF-гистограмм сравниваемых образцов. D_{max} – величина максимальной разницы двух CDF-гистограмм.

В приведенном примере максимальная разница функций распределения составила 48%, что эквивалентно 48% клеток, экспрессирующих белок.

На рис. 5 приведены примеры гистограмм образцов с разным уровнем экспрессии TUBB3. Несмотря на то, что опытная и контрольная гистограммы часто имеют одинаковую форму и практически перекрываются, метод D_{max} позволяет разделить их с высокой точностью и выявить популяцию положительно окрашенных клеток.

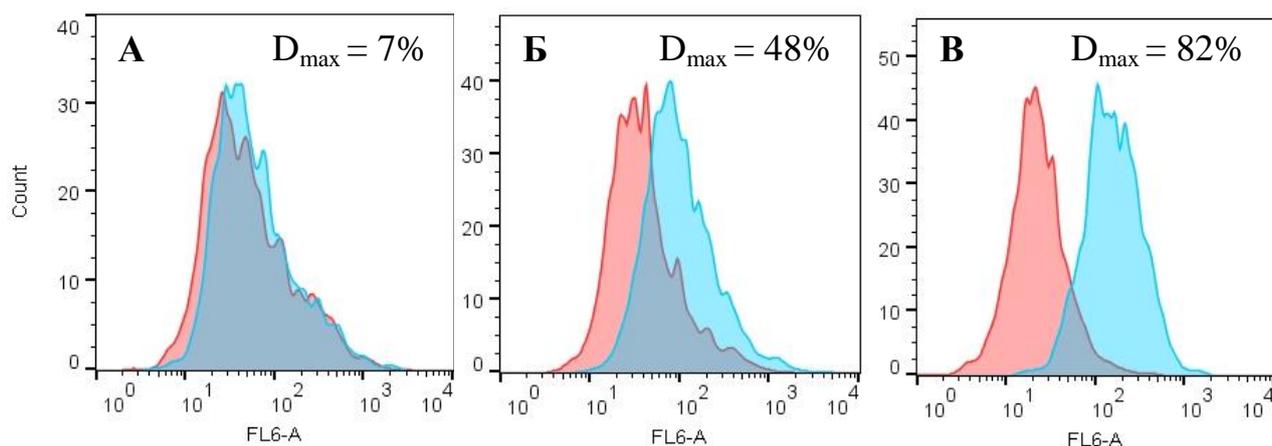


Рисунок 5 – Примеры гистограмм интенсивности флуоресценции в клетках немелкоклеточного рака легкого. Окрашивание антителами к TUBB3. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции (Δ MFI), по оси ординат – количество клеток. Красные гистограммы – клетки после инкубации со вторичными антителами (контроль). Синие – клетки, окрашенные антителами к TUBB3. На гистограммах приводятся расчетные величины D_{\max} , соответствующие уровню экспрессии белка. **А.** Низкая экспрессия TUBB3. **Б.** Высокая экспрессия TUBB3. **В.** Очень высокая экспрессия TUBB3

2.2.6. Статистическая обработка данных, полученных методом проточной цитофлуориметрии

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакетов прикладных программ STATISTICA 12.0 (StatSoft, США) и GraphPad PRIZM 6.0 (GraphPad Software, США). Исследования количественных данных предварялось проверкой распределения на нормальность с помощью критерия Шапиро–Уилка. В отдельных случаях, когда требовалось более точно описать распределение, использовался графический метод, а именно построение квантильных диаграмм (график квантиль-квантиль или кратко – график К-К). С помощью этого метода находилось распределение, наилучшим образом описывающее экспериментальные данные: нормальное, экспоненциальное, экстремальное, распределение Релея, бета-, гамма-, логнормальное или распределение Вейбулла [106]. Проверка соответствия наблюдаемого распределения заданному (отличному от нормального) проводилась с использованием критерия хи-квадрат Пирсона (χ^2).

Для сравнения двух независимых групп количественных признаков использовался критерий Стьюдента (t -тест), если выполнялись следующие условия:

1. Соответствие частотного распределения данных в каждой из сравниваемых групп закону нормального распределения.

2. Отсутствие статистически значимой разницы между дисперсиями сравниваемых групп (однородность дисперсий). Для проверки равенства дисперсий двух выборок использовался критерий Фишера.

3. Наличие достаточно большого числа наблюдений в обеих сравниваемых группах (не меньше 20).

Несоблюдение хотя бы одного из приведенных условий было основанием для выбора непараметрических методов (U-критерий Манна–Уитни или двухвыборочный W-критерий Вилкоксона для связанных групп).

При сравнении трех или более независимых выборок, данные в которых не подчинялись закону нормального распределения, на первом этапе использовался непараметрический критерий Краскела–Уоллиса (H-критерий), предназначенный для проверки нулевых гипотез, согласно которым различные выборки были взяты из одного и того же распределения или из распределений с одинаковыми медианами. Далее, при обнаружении различий, т.е. в случае отклонения нулевой гипотезы, проводилось попарное сравнение групп с использованием либо критерия Ньюмена–Кейлса (в случае выборок равного объема), либо критерия Данна (если объем выборок различался). За пороговый уровень значимости принимали величину $p < 0,05$ [107].

При сравнении трех и более связанных выборок, данные в которых подчинялись закону нормального распределения (в частности это уровень экспрессии TUBB3 в нормальной и опухолевой ткани желудка), на первом этапе во всех группах использовался однофакторный дисперсионный анализ для повторных измерений (Repeated Measures ANOVA). Как и критерий Краскела–Уоллиса, дисперсионный анализ позволяет в целом оценить наличие различий между группами и не позволяет судить о том, какие группы различаются между собой. Поэтому далее проводилось попарное сравнение с использованием одновыборочного (парного) критерия Стьюдента. При этом вводилась поправка на множественные сравнения: новый критический уровень статистической значимости рассчитывался как 0,05, деленное на число попарных сравнений (например, при сравнении попарно трех групп между собой новый критический уровень статистической значимости составляет: $0,05 / 3 = 0,017$) [108].

Сравнение трех и более связанных выборок, данные в которых не подчинялись закону нормального распределения (в частности это параметры экспрессии TUBB3 в опухоли, прилежащей и отдаленной ткани легкого) проводилось по аналогичному алгоритму, но на первом этапе использовался критерий Фридмана, а попарные сравнения осуществлялись с

использованием одновыборочного критерия Вилкоксона. Также вводилась поправка на множественные сравнения.

Анализ выживаемости пациентов проводился методом Каплана–Мейера. Для одно-, двух- и пятилетней выживаемости указывался 95%-ный доверительный интервал. Медиана наблюдения (median follow-up period) вычислялась методом оценки Каплана–Мейера потенциального периода наблюдения (Kaplan-Meier estimate of potential follow-up; КМ-РФ). Данный метод, также называемый обратной функцией Каплана–Мейера, редко встречается в отечественных публикациях, однако рекомендуется к применению рядом экспертов, так как адекватно отражает динамику выбытия пациентов в течение всего периода наблюдения [109].

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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Характеристика группы больных, включенных в исследование

Для того, чтобы иметь возможность экстраполировать полученные результаты на всю популяцию больных НМРЛ, необходимо подтвердить репрезентативность исследуемой выборки. Поэтому на первом этапе работы включенные в исследование больные были всесторонне охарактеризованы по полу, возрасту, статусу курения, стадии, гистологическому типу опухоли. Полностью клинические характеристики пациентов, собранные на основании анализа историй болезни, приведены в таблице 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%)	
Гистологический тип опухоли				
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%)		–	
Статус курения				
курили	71 (71,0%)		2 (9,1%)	
не курили	29 (29,0%)		20 (86,4%)	
Возраст (годы)				
средний; разброс значений	61; 35-82		58; 37-73	
Распределение больных по стадиям				
	I	II	III	IV
Доля пациентов	32 (26,2%)	40 (32,8%)	43 (35,3%)	7 (5,7%)

В исследование включено 122 больных немелкоклеточным раком легкого, оперированных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2009 по 2016 гг. Из них 32 (26,2%) составили пациенты с I стадией заболевания, 40 (32,8%) – со II стадией, 43 (35,3%) – с III стадией и 7 (5,7%) – с IV стадией.

Среди пациентов мужчины встречались приблизительно в пять раз чаще: 100 (81,3%) мужчин против 22 (17,9%) женщин.

Возраст мужчин колебался от 35 до 82 лет (средний возраст: 61 год), возраст женщин – от 37 до 73 (средний возраст: 58 лет).

Преобладающими гистологическими формами были аденокарцинома (81 пациент; 66,4%) и плоскоклеточный рак легкого (34 пациента; 27,9%). У 7 пациентов (5,7%) диагностированы опухоли неустановленного гистогенеза либо крупноклеточный/железисто-плоскоклеточный рак.

Распределение гистологических форм НМРЛ различалось в зависимости от пола пациентов: у мужчин преобладающей формой был плоскоклеточный рак (60/100 пациентов; 60,0%), в то время как у женщин – аденокарцинома (21/22 пациентов; 90,9%).

Статус курения также различался в зависимости от пола: среди мужчин 71 пациент (71,0%) курил, 29 пациентов (29,0%) не курило. Среди женщин преобладали некурящие пациентки: 2 (9,1%) курящих против 20 (86,4%) некурящих.

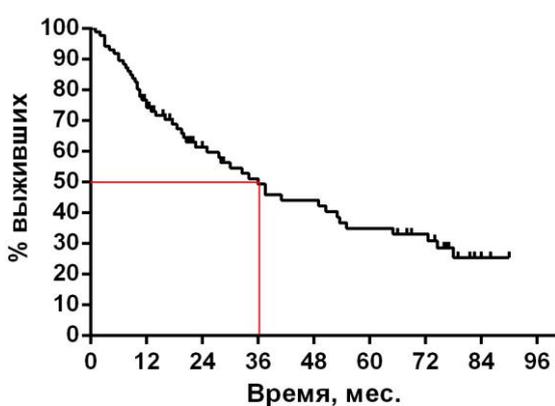
По степени морфологической дифференцировки (G) опухоли включенных в исследование пациентов были распределены следующим образом: высокодифференцированные (G1) опухоли выявлены у 8 больных (6,5%), умеренно дифференцированные (G2) – у 55 (45,1%), низко/недифференцированные (G3/G4) – у 36 (29,5%), неопределенная степень дифференцировки – у 23 (18,9%).

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 [110,111].

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

Согласно нашим данным, медиана выживаемости больных в группе с оцененной выживаемостью составила 36,0 мес. Однолетняя выживаемость составила $74,2 \pm 9,4\%$, трехлетняя – $49,3 \pm 11,8\%$, пятилетняя – $34,8 \pm 11,7\%$. Кривая выживаемости Каплана–Майера приведена на рис. 6. Показатель пятилетней выживаемости оказался ниже описанного в литературе: в анализе отдаленных результатов хирургического лечения 1420 больных немелкоклеточным раком легкого пятилетняя выживаемость достигала 42,0%. [112]. Также, согласно статистическому сборнику «Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году», более 5 лет переживают 42,2% больных от числа стоящих на учете в конце

анализируемого периода [111]. Наблюдаемую низкую общую выживаемость можно объяснить низким удельным весом пациентов с I стадией заболевания – всего 16,2% (14/86), в то время как в приведенном выше исследовании на долю пациентов с I стадией приходилось 38,7% всех больных. Известно, что удовлетворительные отдаленные результаты хирургического лечения удается получить как раз при I стадии: по данным Х.И. Трахтенберга, пятилетняя выживаемость больных раком легкого на I стадии в 1,5 раза выше, чем на II стадии, и в 3 раза выше, чем на IIIA стадии [113]. В приведенном выше исследовании на долю пациентов с I стадией приходилось 38,7% всех больных. В нашем исследовании показатель пятилетней выживаемости сместился в сторону более низких значений по причине малого вклада этой группы, прогностически благоприятной, в общую оценку показателя.



Годы наблюдения	1	2	3	4	5	6	Медиана (мес)
Число больных	86	73	53	37	22	10	78

Рисунок 6 – Общая кривая выживаемости для пациентов всех стадий. N = 86; Медиана = 36,0 мес. По горизонтальной оси отложено время наблюдения (мес.), по вертикальной оси – доля выживших пациентов с учетом цензурирования (%). Красные линии отмечают медиану ожидаемого времени жизни – время после окончания срока госпитализации, до которого доживает 50% больных. В таблице справа приведены данные по динамике смертности и выбытия пациентов из исследования в течение всего срока наблюдения.

Что касается выживаемости больных НМРЛ в зависимости от стадии, то полученные значения полностью соответствуют данным литературы. Для I стадии (n=14) общая пятилетняя выживаемость составила $66,6 \pm 31,3\%$, а медиана выживаемости – 78 месяцев. Для II стадии (n=31) общая пятилетняя выживаемость составила $34,7 \pm 17,0\%$, медиана выживаемости – 49 месяцев. Для III стадии (n=34) общая пятилетняя выживаемость составила $27,1 \pm 16,8\%$, медиана выживаемости – 17,5 месяцев. Среди 4 пациентов с IV

стадией ни один не пережил 5 лет; медиана выживаемости составила 14 месяцев. Кривые выживаемости для каждой стадии НМРЛ представлены на рисунке 7, результаты попарного сравнения выживаемости больных на разных стадиях – в таблице 2.

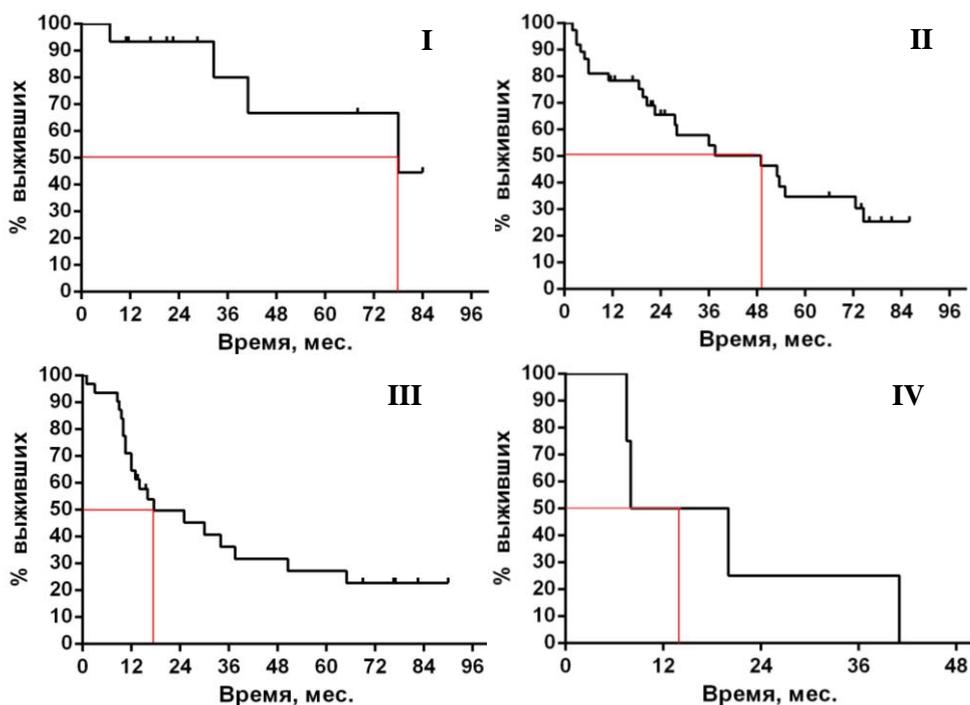


Рисунок 7 – Кривые выживаемости для каждой стадии НМРЛ. I стадия: n = 14, Медиана = 78 мес. II стадия: n = 37, M = 49 мес. III стадия: n = 31, M = 17,5 мес. IV стадия: n = 4, M = 14 мес. Красной линией обозначена медиана общей выживаемости.

Таблица 2 – Результаты попарного сравнения выживаемости больных на разных стадиях.

Группы сравнения	Результаты логрангового теста
I vs II	p=0,0931; CP=0,42; 95% ДИ 0,21–1,12
I vs III	p=0,0193*; CP=0,30; 95% ДИ 1,17–0,85
I vs IV	p=0,0037*; CP=0,17; 95% ДИ 0,01–0,35
II vs III	p=0,2678; CP=0,72; 95% ДИ 0,38–1,30
II vs IV	p=0,0527; CP=0,37; 95% ДИ 0,04–0,99
III vs IV	p=0,2060; CP=0,5121; 95% ДИ 0,10–1,61

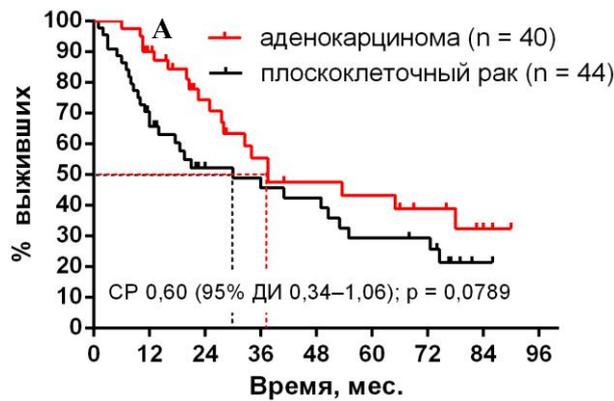
* Статистически значимые различия; CP – соотношение рисков; ДИ – доверительный интервал

К прогностическим факторам выживаемости помимо стадии заболевания относится гистологический тип опухоли. В исследуемой группе пациенты с аденокарциномой (n = 40)

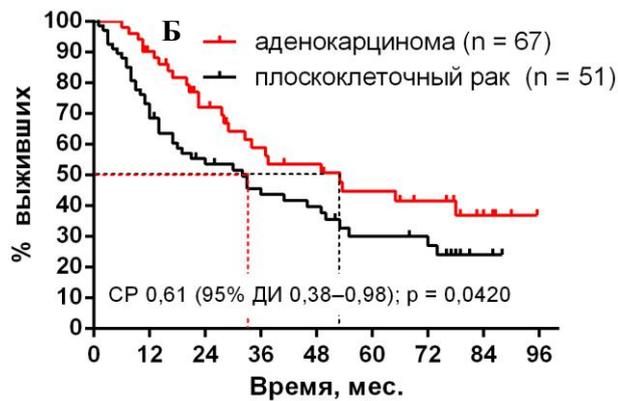
продемонстрировали несколько лучшие показатели выживаемости по сравнению с пациентами, у которых был диагностирован плоскоклеточный рак ($n = 44$). Различия, впрочем, не достигли статистической значимости: $p=0,079$; $CP=0,60$; 95% ДИ 0,34–1,06 (рисунок 7А). Однако при лишь незначительном увеличении объема выборки до 118 человек за счет включения в анализ дополнительных пациентов наблюдаемые различия достигли статистической значимости: $p=0,042$; $CP=0,61$; 95% ДИ 0,38–0,98 (рисунок 7Б).

Еще одним прогностически неблагоприятным фактором НМРЛ является статус курения пациентов. Действительно, анализ выживаемости показал, что у некурящих пациентов ($n = 31$) обнаружена тенденция к улучшению прогноза по сравнению с курящими ($n = 55$). Аналогично предыдущему случаю, результаты не достигли порога статистической значимости: $p=0,353$; $CP=0,76$; 95% ДИ 0,43–1,35 (рисунок 9А). При увеличении объема выборки до 126 пациентов результат не только сохранился, но и перешел с уровня статистической тенденции на уровень статистической значимости: $p=0,041$; $CP=0,61$; 95% ДИ 0,39–0,98 (рисунок 9Б).

Итак, состав исследуемой группы, клинико-морфологические характеристики пациентов и структура выживаемости свидетельствуют в пользу ее репрезентативности. Представленные ниже результаты анализа экспрессии TUBB3 в данной группе могут быть экстраполированы на всю популяцию больных немелкоклеточным раком легкого.

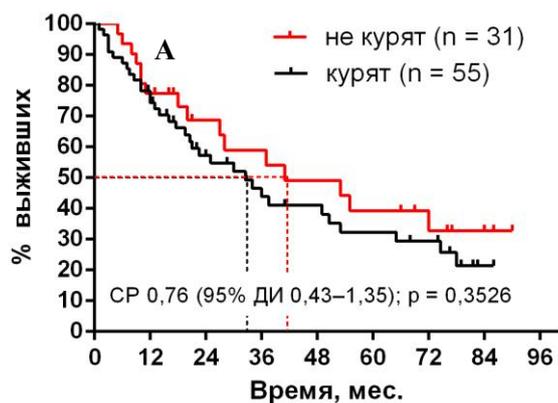


Число больных	Годы наблюдения	1	2	3	4	5	6	Медиана (мес)
	Аденокарцинома	40	34	22	15	12	11	37,5
Плоскоклеточный рак	44	29	17	15	14	10	30,0	

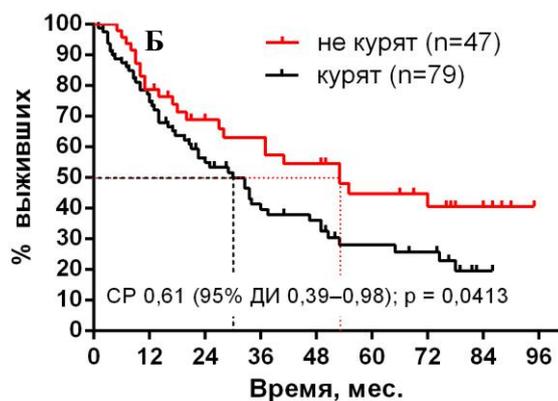


Число больных	Годы наблюдения	1	2	3	4	5	6	Медиана (мес)
	Аденокарцинома	67	47	31	23	21	12	53,0
Плоскоклеточный рак	51	44	31	23	20	16	32,0	

Рисунок 8 – Кривые выживаемости пациентов с НМРЛ с разной гистологической формой опухоли. **А.** Исходная группа (N = 84). Медианы выживаемости: пациентов с аденокарциномой = 37,5 мес., пациентов с плоскоклеточным раком легкого = 30,0 мес. Различия между кривыми выживаемости статистически незначимы ($p = 0,08$). **Б.** Расширенная группа (N = 118). Медианы выживаемости: пациентов с аденокарциномой = 53,0 мес., пациентов с плоскоклеточным раком легкого = 32,0 мес. Различия статистически значимы ($p = 0,04$). Обозначения: *CP* – соотношение рисков, *ДИ* – доверительный интервал.



Число больных	Годы наблюдения	1	2	3	4	5	6	Медиана (мес)
	Не курят		31	25	16	13	11	9
Курят		55	41	24	17	15	12	41,0



Число больных	Годы наблюдения	1	2	3	4	5	6	Медиана (мес)
	Не курят		47	39	25	23	20	14
Курят		79	59	37	30	21	13	30,0

Рисунок 9 – Кривые выживаемости пациентов с НМРЛ в зависимости от статуса курения. **А.** Исходная группа (N = 86). Медианы выживаемости: курящих пациентов = 41,0 мес., некурящих пациентов = 32,5 мес. Различия не достигают порога статистической значимости ($p = 0,35$). **Б.** Расширенная группа (N = 126). Медианы выживаемости: курящих пациентов = 30,0 мес., некурящих пациентов = 53,0 мес. Различия статистически значимы ($p = 0,04$). Обозначения: *CP* – соотношение риска, *ДИ* – доверительный интервал.

3.2. Экспрессия TUBB3 в ткани немелкоклеточного рака легкого

3.2.1. Общая характеристика экспрессии TUBB3 в опухолевой ткани 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. Анализировалось два показателя экспрессии: уровень и интенсивность. Уровень экспрессии представляет собой долю клеток, экспрессирующих маркер, выраженную в процентах. Интенсивность экспрессии отражает среднее количество исследуемого маркера на клетку и рассчитывается как разность среднего геометрического интенсивности флуоресценции в пробе, окрашенной первичными и вторичными антителами и контроле, окрашенном только вторичными антителами.

В таблице 3 приведено распределение значений уровня и интенсивности экспрессии TUBB3 опухолевой ткани легкого. Графически эти данные представлены на рисунке 10. Для исследования экспрессии TUBB3 в каждом образце ткани использовано не менее 3 концентраций моноклональных антител, находящихся в области линейной зависимости интенсивности флуоресцентного специфического окрашивания клеток от концентраций первичных антител (см. раздел «Материалы и методы»).

Таблица 3 – Количественные показатели экспрессии TUBB3 в группе немелкоклеточного рака легкого (n = 126)

Концентрация первичных антител (мкг/мл)	Нормальность распределения	Минимум	Максимум	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
	Уровень экспрессии					
0,04	нет (p = 0,0010)	2	45	16,5	10	27
0,08	да (p = 0,0550)	4	62	28	20	41
0,16	да (p = 0,2680)	10	74	45	32	55
	Интенсивность					
0,04	нет (p < 0,0001)	0	39	39	21	65
0,08	нет (p < 0,0001)	6	440	84	56	131
0,16	нет (p < 0,0001)	9	852	161	102	258

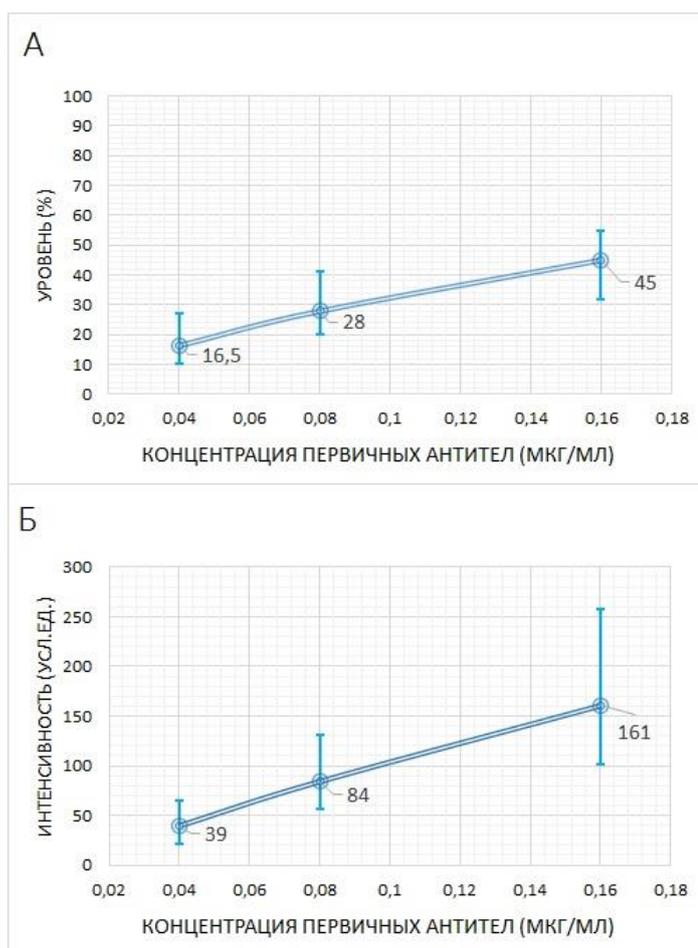


Рисунок 10 – Калибровочные кривые зависимости уровня (А) и интенсивности (Б) экспрессии TUBB3 от концентрации первичных антител. Точки на графике – медианы, планки погрешностей соответствуют нижнему и верхнему квантилю.

Для концентрации первичных антител 0,04 мкг/мл медиана уровня экспрессии составила 16,5%, интерквартильный размах: 10–27%; медиана интенсивности экспрессии составила 39 усл.ед., интерквартильный размах: 21–65 усл. ед.

Для концентрации 0,08 мкг/мл медиана уровня экспрессии составила 28%, интерквартильный размах: 20–41%; медиана интенсивности экспрессии составила 84 усл.ед., интерквартильный размах: 56–131 усл. ед.

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.

Видно, что с повышением концентрации первичных антител уровень и интенсивность экспрессии линейно растут, не достигая стадии насыщения (кривые не выходят на плато).

Наблюдаемый разброс индивидуальных значений уровня экспрессии TUBB3 остается практически неизменным на всем диапазоне концентраций.

Для двух верхних концентраций антител распределение значений уровня экспрессии наилучшим образом описывалось как нормальное, распределение значений интенсивности экспрессии – как логнормальное. Последнее наблюдение согласуется с данными литературы, согласно которым экспрессия большинства генов описывается именно законом логнормального распределения [114]. Квантильные диаграммы и гистограммы распределения приведены на рисунках 11 и 12.

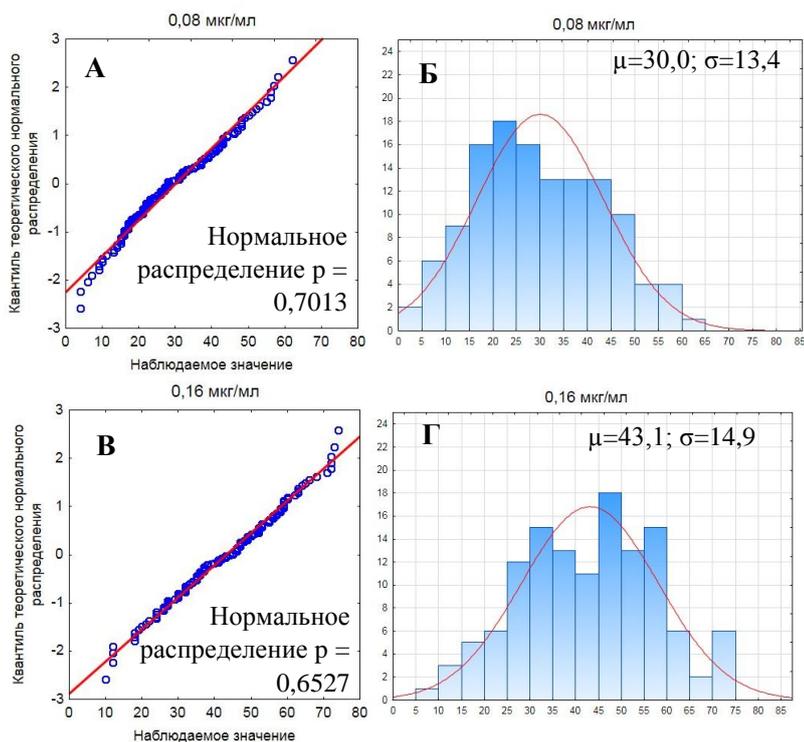


Рисунок 11 – Распределение значений уровня экспрессии TUBB3, полученных с использованием двух концентраций первичных антител: 0,08 (А-Б) и 0,16 (В-Г) мкг/мл. А. Квантильная диаграмма для значений уровня экспрессии TUBB3, концентрация первичных антител 0,08 мкг/мл. Красная линия соответствует нормальному распределению. Внизу на графике приведены результаты проверки нормальности по критерию Шапиро–Уилка. Б. Гистограмма распределения. Линия на рисунке показывает нормальное распределение, наилучшим образом описывающее экспериментальные данные, его параметры приведены на графике. Рисунки В и Г – аналогичный анализ данных для концентрации первичных антител 0,16 мкг/мл. Обозначения: μ – среднее; σ – стандартное отклонение. Большинство значений на графиках А и В попадают на линию регрессии, соответствующую нормальному распределению, а достигнутый уровень значимости в обоих случаях выше 0,05. Следовательно, значения уровня экспрессии распределены нормально.

В дальнейшем для описания результатов использовались значения, полученные для концентрации первичных антител 0,16 мкг/мл. Мы считаем, что именно на этой концентрации достигается субмаксимальное связывание антител с антигеном, при этом до точки выхода кривой насыщения на плато остается достаточно места, чтобы исключить возможность неспецифических взаимодействий. Впрочем, все закономерности, выявленные на концентрации 0,16 мкг/мл, оказались справедливы для меньших концентраций в пределах линейного диапазона: 0,04 и 0,08 мкг/мл.

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

Отдельная проблема, требующая пристального внимания, – определение пороговых значений экспрессии TUBB3 в опухоли, ниже которых ее можно считать негативной. Белок TUBB3 не выявляется в нормальной паренхиме легкого, однако присутствует в эндотелиоцитах и макрофагах [115]. Оба клеточных типа, несомненно, присутствуют в исследуемых суспензионных образцах. Их размер находится выше порога отсека, выставленного в настройках цитофлуориметра. В связи с этим необходимо понимать, какова доля таких клеток в изучаемом образце. Приблизительно установить это значение можно, опираясь на имеющиеся данные гистоморфометрического исследования немелкоклеточного рака легкого [116]. Согласно этим данным, общая доля таких клеток не превышает 5%. Учитывая возможную ошибку измерения, было решено принять примерный пороговый уровень экспрессии TUBB3 равным 15%. Дальнейшее уточнение этого значения – 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%.

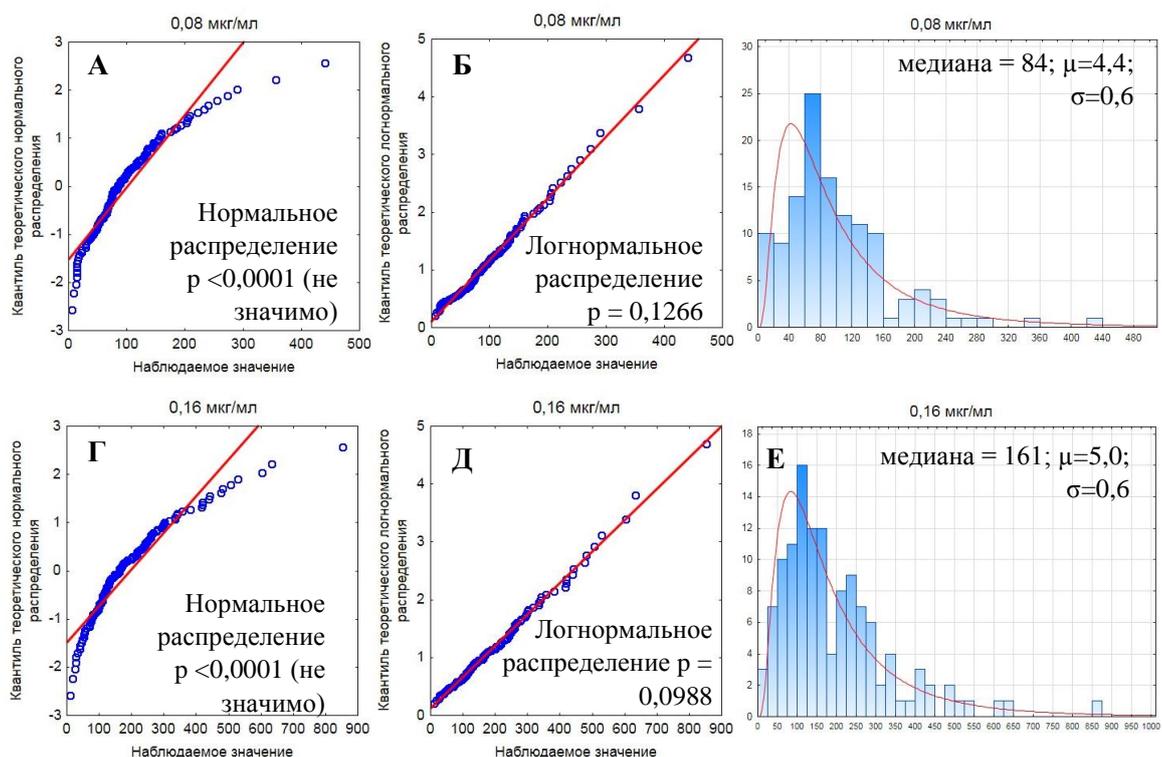


Рисунок 12 – Распределение значений интенсивности экспрессии TUBB3, полученных с использованием двух концентраций первичных антител: 0,08 (А-В) и 0,16 (Г-Е) мкг/мл. А. Квантильная диаграмма для значений интенсивности экспрессии TUBB3, концентрация первичных антител 0,08 мкг/мл. Красная линия соответствует нормальному распределению. Внизу на графике приведены результаты проверки нормальности по критерию Шапиро–Уилка. Б. Квантильная диаграмма для значений интенсивности экспрессии TUBB3. Красная линия соответствует логнормальному распределению. Внизу на графике приведены результаты проверки соответствия наблюдаемого распределения логнормальному распределению с использованием критерия хи-квадрат. В. Гистограмма распределения. Линия на рисунке показывает логнормальное распределение, наилучшим образом описывающее экспериментальные данные, его параметры приведены на графике. Рисунки Г, Д и Е – аналогичный анализ данных для концентрации первичных антител 0,16 мкг/мл. Обозначения: μ – среднее значение натурального логарифма переменной; σ – стандартное отклонение натурального логарифма переменной. Большинство значений на графиках А и Г не попадают на линию регрессии, соответствующую нормальному распределению, а достигнутый уровень значимости в обоих случаях ниже 0,05. Значит, интенсивность экспрессии TUBB3 не подчиняется закону нормального распределения. Для описания этого параметра лучше подходит логнормальное распределение, о чем свидетельствуют квантильные диаграммы Б и Д.

3.2.2. Связь экспрессии TUBB3 в опухоли с клинико-морфологическими характеристиками немелкоклеточного рака легкого

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. Выбор статистического критерия каждый раз определялся распределением значений признака в сравниваемых выборках, числом сравниваемых выборок и их объемом (см. «Материалы и методы»). В результате получены данные, представленные в таблице 4.

Таблица 4. — 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	
Возраст, годы										
≤ 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	
Пол										
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	
Гистологический тип опухоли										
Аденокарцинома	56	47,1	35	46	56	0,29	133,5	223	291	0,00*
Плоскоклеточный рак	63	52,9	32	42	55		89	121	205	
Статус курения										
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	
Степень морфологической дифференцировки (G)										
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	
Стадия заболевания										
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	

* Красным указаны статистически значимые различия

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.

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 $U = 1112$, $Z = 3,36$, $p = 0,0007$).

Для более точного описания найденных различий проведена количественная оценка уровня и интенсивности экспрессии TUBB3 в опухолевой ткани легкого в 2 группах сравнения: аденокарцинома легкого ($n = 56$) и плоскоклеточный рак легкого ($n = 62$). Показано, что доли клеток, экспрессирующих TUBB3 (т.е. уровень экспрессии маркера в ткани), сильно различаются между образцами: от 18 до 71% клеток в группе аденокарциномы и от 10 до 73% в группе плоскоклеточного рака. То же самое справедливо для интенсивности экспрессии: от 9 до 852 усл. ед. в группе аденокарциномы и от 17 до 633 усл. ед. в группе плоскоклеточного рака. Среднее значение уровня экспрессии маркера в группе аденокарциномы составило $44,4 \pm 12,7\%$; в группе плоскоклеточного рака легкого – $41,7 \pm 15,5\%$. Медиана интенсивности в группе аденокарциномы: 223 усл.ед., интерквартильный размах: 134–291 усл. ед.; медиана интенсивности в группе плоскоклеточного рака: 121 усл.ед., интерквартильный размах: 89–205 усл. ед. Все приведенные значения получены с использованием концентрации первичных антител 0,16 мкг/мл.

Различия между двумя группами оказались статистически незначимыми по уровню экспрессии TUBB3 (рисунок 13, А–В), и статистически значимыми по интенсивности экспрессии (рисунок 13, Г–Д). Эффект воспроизводится на всем интервале концентраций первичных антител от 0,04 до 0,16 мкг/мл.

Учитывая экспериментальные данные об эстрогензависимой экспрессии TUBB3 [117] 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 мужчин ($n = 35$) и женщин ($n = 22$) и сравнение интенсивности экспрессии маркера в опухолевой ткани в этих подгруппах не выявили статистически значимых различий (по Манну–Уитни $U = 339$, $Z = -0,56$, $p = 0,5572$) (рисунок 14А).

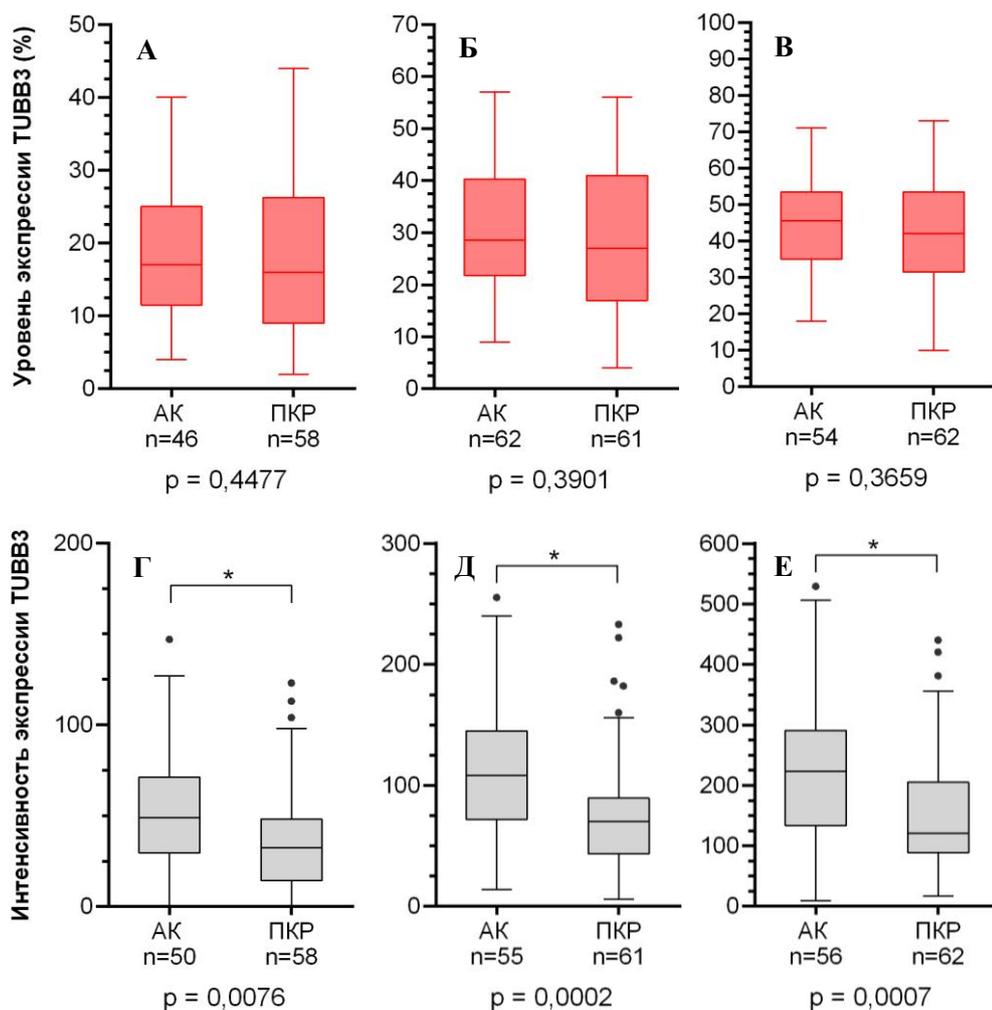


Рисунок 13 – Сравнение аденокарциномы и плоскоклеточного рака легкого по уровню и интенсивности экспрессии TUBB3. **А-В.** По уровню экспрессии TUBB3. Диапазон концентраций первичных антител: 0,04 (**А**); 0,08 (**Б**); 0,16 (**В**) мкг/мл. **Г-Е.** По интенсивности экспрессии TUBB3. Диапазон концентраций первичных антител: 0,04 (**Г**); 0,08 (**Д**); 0,16 (**Е**) мкг/мл. * – различия статистически значимы. АК – аденокарцинома, ПКР – плоскоклеточный рак.

Учитывая экспериментальные данные об эстрогензависимой экспрессии TUBB3 [117] 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 мужчин ($n = 35$) и женщин ($n = 22$) и сравнение интенсивности экспрессии маркера в опухолевой ткани в этих подгруппах не выявили

статистически значимых различий (по Манну–Уитни $U = 339$, $Z = -0,56$, $p = 0,5572$) (рисунок 14А).

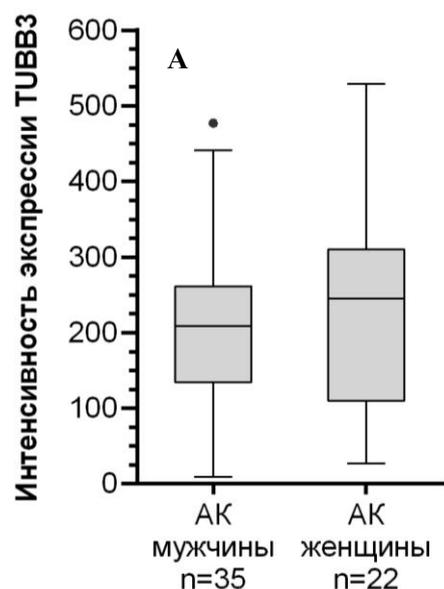
Поскольку группа пациентов с аденокарциномой была представлена как мужчинами, так и женщинами, в то время как группу пациентов с плоскоклеточным раком составили только мужчины, из анализа исключили пациентов женского пола, чтобы нивелировать гендерный фактор (рисунок 14Б). Различие между пациентами с аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого по интенсивности экспрессии TUBB3 сохранилось (по Манну–Уитни $U = 642$, $Z = 2,79$, $p = 0,0053$).

Таким образом, экспрессия TUBB3 в ткани немелкоклеточного рака легкого ассоциирована с гистологическим типом опухоли и не зависит от пола пациентов. Интенсивность экспрессии в среднем выше в клетках аденокарциномы по сравнению с плоскоклеточным раком легкого. При этом сравнение аденокарциномы и плоскоклеточного рака по доле TUBB3-позитивных клеток не выявило статистически значимых отличий.

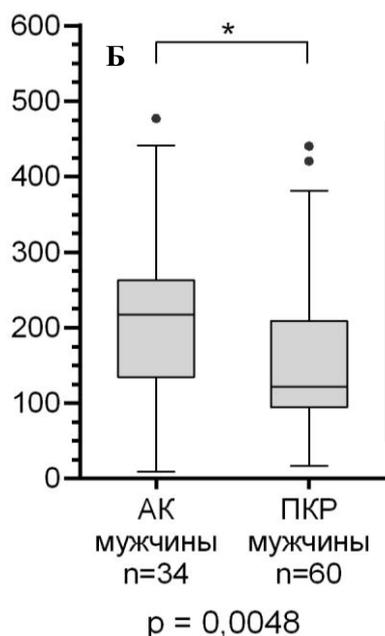
Повышенная экспрессия TUBB3 в ткани аденокарциномы по сравнению с плоскоклеточным раком легкого уже была продемонстрирована в ряде исследований [118] с использованием полуколичественного иммуногистохимического метода. В настоящей работе, выполненной с использованием строго количественного метода проточной 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 плоскоклеточным раком легкого [119]. В нашем исследовании эти данные подтвердились: в исследуемой группе пациенты с аденокарциномой демонстрировали несколько лучшие показатели выживаемости по сравнению с пациентами, у которых был диагностирован плоскоклеточный рак (см. главу 3.1).

В то же время экспрессия опухолевого маркера TUBB3, ассоциированного с рядом неблагоприятных свойств опухоли, более выражена именно в группе пациентов, страдающих аденокарциномой. По-видимому, потенциально онкогенные функции TUBB3 в ткани аденокарциномы маскируются другими, «благоприятными» факторами, совокупность которых в итоге приводит к более благоприятному прогнозу именно при аденокарциноме легкого.



Интенсивность экспрессии TUBB3			
	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
АК ♂ (n=35)	209	135	262
АК ♀ (n=58)	245	109	310
Различия по критерию Манна–Уитни			
$U = 339, Z = -0,56, p = 0,5572$			

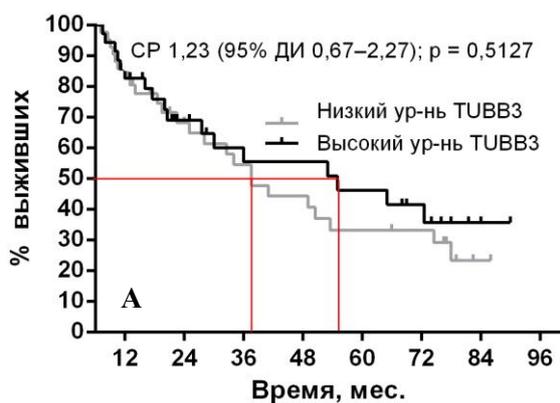


Интенсивность экспрессии TUBB3			
	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
АК ♂ (n=34)	217	134	262
ПКР ♂ (n=60)	122	94	209
Различия по критерию Манна–Уитни			
$U = 642, Z = 2,79, p = 0,0048^*$			

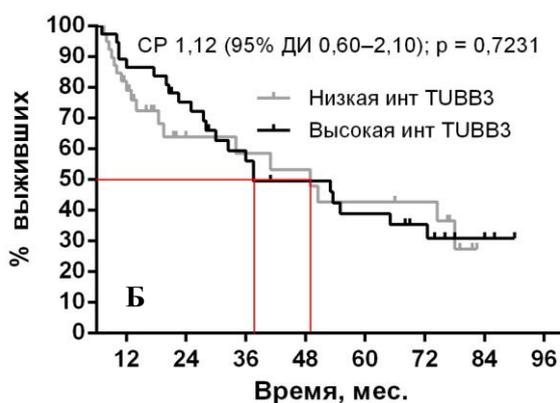
Рисунок 14 – Интенсивность экспрессии TUBB3 в подгруппах пациентов, выделенных по полу и гистологии. **А.** Сравнение интенсивности экспрессии TUBB3 у пациентов с аденокарциномой в зависимости от пола. **Б.** Сравнение интенсивности экспрессии TUBB3 у мужчин в зависимости от гистотипа. В таблицах справа даны значения медианы, верхних и нижних квартилей сравниваемых групп, а также результаты статистического анализа данных с помощью критерия Манна–Уитни. Обозначения: красным* – различия статистически значимы. АК – аденокарцинома, ПКР – плоскоклеточный рак.

3.2.3. Экспрессия TUBB3 в опухолях и выживаемость пациентов

Выживаемость пациентов со злокачественными новообразованиями, в том числе и НМРЛ, является наиболее важным критерием агрессивности заболевания и эффективности лечения. На основании оценки выживаемости возможно определение прогностической роли того или иного клинико-морфологического фактора или молекулярного маркера. Анализ выживаемости включенных в исследование пациентов в зависимости от показателей экспрессии TUBB3 представлен на рис. 15.



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 15 – 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. 9 пациентов, умерших до 6 мес. включительно исключены из исследования. Обозначения: *CP* – соотношение риска, *ДИ* – доверительный интервал. Статистически значимых различий в выживаемости пациентов с высокой и низкой экспрессией TUBB3 не выявлено, кривые выживаемости не расходятся.

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). Структура выживаемости данной группы детально рассмотрена в главе 3.1. 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. Значения показателя \leq медианы принимались за «низкие», $>$ медианы – за высокие. 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 10А). 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 10Б).

Далее выживаемость пациентов с высокой и низкой экспрессией TUBB3 была рассмотрена отдельно для I, II и III стадии НМРЛ.

На первом этапе больные были разделены на две группы по уровню экспрессии TUBB3. Выживаемость пациентов с «высоким» TUBB3 оценивалась по отношению к выживаемости пациентов с «низким» TUBB3 с помощью логрангового критерия. В результате получены следующие значения:

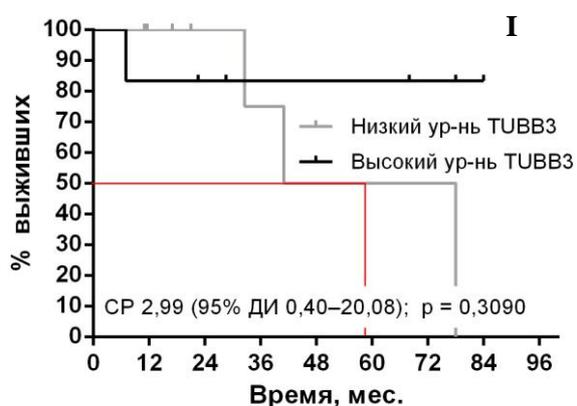
I стадия ($n = 15$) – $p=0,3090$; $CP=2,29$; 95% ДИ 0,40–20,08;

II стадия ($n = 30$) – $p=0,9765$; $CP=1,00$; 95% ДИ 0,37–2,76;

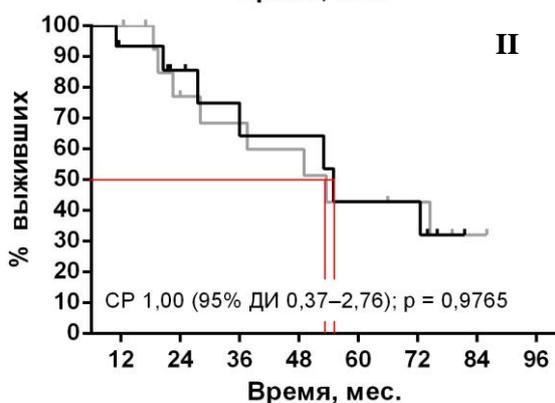
III стадия ($n = 29$) – $p=0,8500$; $CP=0,98$; 95% ДИ 0,40–2,40.

Статистически значимые различия не выявлены ни на одной из стадий (рисунок 16). Тем не менее, отмечено изменение соотношения рисков с увеличением стадии. На I стадии больные с высоким уровнем TUBB3 живут, в среднем, дольше – медиана выживаемости не достигается, в то время как у больных с низким уровнем TUBB3 медиана выживаемости равна 59,5 месяцев, $CP=2,99$. На II стадии медианы выживаемости приблизительно равны: 53,5 месяцев в группе с низким уровнем TUBB3 против 55,0 месяцев в группе с высоким уровнем TUBB3, $CP=1,00$. На III же стадии высокий уровень TUBB3 начинает свидетельствовать об ухудшении прогноза: медиана выживаемости больных с высоким

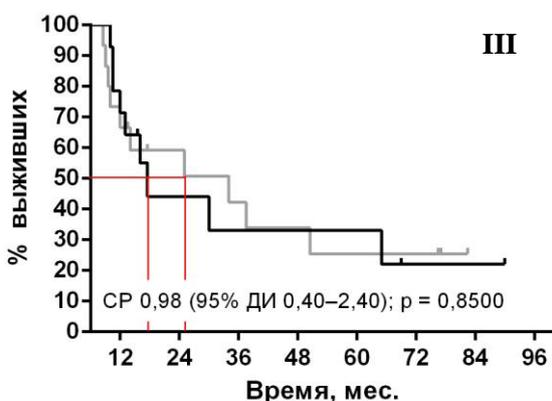
уровнем TUBB3 равна 17,5 месяцев против 34,5 месяцев в группе с низким уровнем TUBB3, $CP=0,98$. Впрочем, наблюдаемые закономерности статистически не значимы и, скорее всего, носят случайный характер.



I стадия (n=15)								
Число больных	Годы наблюдения	1	2	3	4	5	6	Медиана (мес)
	Низкий уровень TUBB3	9	7	5	4	3	3	59,5
	Высокий уровень TUBB3	6	6	5	4	4	3	Не дост.



II стадия (n=30)								
Число больных	Годы наблюдения	1	2	3	4	5	6	Медиана (мес)
	Низкий уровень TUBB3	15	15	10	9	8	7	53,5
	Высокий уровень TUBB3	15	13	10	7	7	6	55,0



III стадия (n=29)								
Число больных	Годы наблюдения	1	2	3	4	5	6	Медиана (мес)
	Низкий уровень TUBB3	15	11	8	6	5	4	34,0
	Высокий уровень TUBB3	14	11	5	4	4	4	17,5

Рисунок 16 – Постадийная оценка выживаемости пациентов в зависимости от уровня экспрессии TUBB3. Разделение на группы с высоким и низким уровнем экспрессии по медиане показателя для I, II и III стадии заболевания. В таблицах справа приведены данные по динамике смертности и выбытия пациентов из исследования в течение всего срока наблюдения. Обозначения: *CP* – соотношение риска, *ДИ* – доверительный интервал. Статистически значимых различий в выживаемости пациентов с высокой и низкой экспрессией TUBB3 не выявлено, кривые выживаемости не расходятся.

На втором этапе аналогично рассмотрена выживаемость пациентов на I, II и III стадиях НМРЛ с разделением больных на две группы по медиане интенсивности экспрессии TUBB3. При сравнении кривых выживаемости с помощью логрангового критерия получены следующие значения:

I стадия (n = 15) – p=0,1687; CP=4,46; 95% ДИ 0,51–67,75;

II стадия (n = 30) – p=0,8736; CP=1,10; 95% ДИ 0,42–2,92;

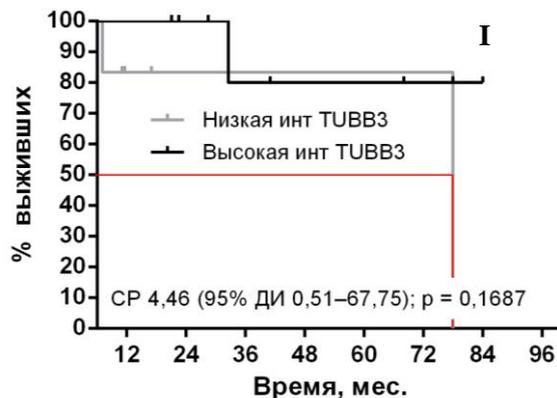
III стадия (n = 28) – p=0,8063; CP=0,89; 95% ДИ 0,35–2,25.

Статистически значимых различий в выживаемости пациентов с высокой и низкой интенсивностью экспрессии не выявлено ни на одной из стадий (рисунок 17). Как и в предыдущем случае, с увеличением стадии меняется соотношение рисков. Приведем значения медиан выживаемости пациентов с высокой и низкой интенсивностью экспрессии TUBB3, соответственно: I стадия – не достигнута против 78 месяцев, CP=4,46; II стадия – 54,5 против 74,5 месяцев, CP=1,10; III стадия – 25,0 против 34,0 месяцев. Несмотря на наблюдаемое расхождение медиан выживаемости в сравниваемых группах, мы склонны считать данный феномен случайным.

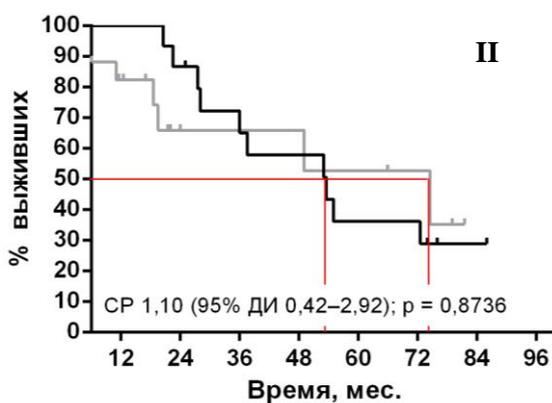
Итак, в исследованной группе больных выживаемость не зависит от экспрессии в опухоли белка TUBB3. Прогностическая роль TUBB3 не подтвердилась ни для общей группы больных, ни при постадийном сравнении выживаемости групп с высокой и низкой экспрессией белка. Однако, учитывая малые объемы выборок при постадийном анализе, нельзя исключать, что полученные предварительные результаты нуждаются в дальнейшем уточнении и экспрессия TUBB3 все же может прогнозировать выживаемость больных на ранних стадиях заболевания.

Указания на это можно найти в литературе: по итогам 4 рандомизированных исследований: ANITA, IALT, CALGB 9633 и JBR.10 – авторы заключают, что на ранних стадиях заболевания TUBB3 может вести себя как прогностический маркер, а на более поздних – как предиктивный [118].

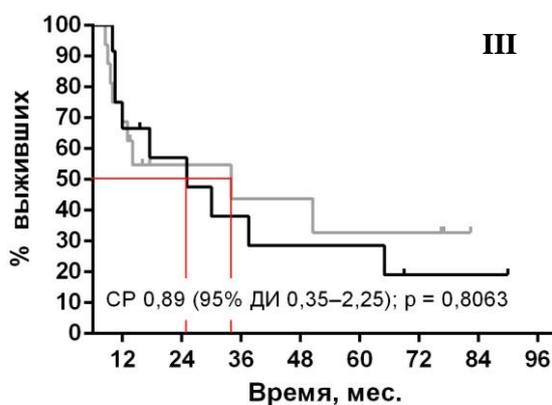
В совокупности с имеющимися данными, полученные нами результаты указывают на невысокую значимость экспрессии белка TUBB3 в опухоли для прогноза выживаемости больных НМРЛ в целом. Что касается прогностической значимости TUBB3 на определенных стадиях заболевания, то для окончательного вывода пока недостаточно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



I стадия (n=15)								
Число больных	Годы наблюдения	1	2	3	4	5	6	Медиана (мес)
	Низкая интенсивность TUBB3	6	3	2	2	2	2	78
	Высокая интенсивность TUBB3	8	8	6	5	4	3	Не дост.



II стадия (n=32)								
Число больных	Годы наблюдения	1	2	3	4	5	6	Медиана (мес)
	Низкая интенсивность TUBB3	17	12	6	6	6	5	74,5
	Высокая интенсивность TUBB3	15	15	14	10	9	6	54,5



III стадия (n=28)								
Число больных	Годы наблюдения	1	2	3	4	5	6	Медиана (мес)
	Низкая интенсивность TUBB3	16	12	6	5	5	4	34,0
	Высокая интенсивность TUBB3	12	9	7	5	4	4	25,0

Рисунок 17 – Постадийная оценка выживаемости пациентов в зависимости от **интенсивности** экспрессии TUBB3. Разделение на группы с высокой и низкой интенсивностью экспрессии по медиане показателя для I, II и III стадии заболевания. В таблицах справа приведены данные по динамике смертности и выбытия пациентов из исследования в течение всего срока наблюдения. Обозначения: *CP* – соотношение риска, *ДИ* – доверительный интервал. Статистически значимых различий в выживаемости пациентов с высокой и низкой экспрессией TUBB3 не выявлено, кривые выживаемости не расходятся.

3.2.4. Связь экспрессии TUBB3 в опухоли с инвазивным ростом и регионарным метастазированием

Движение клеток, частными случаями которого являются инвазия и метастазирование, тесно связано с динамикой структур цитоскелета. Принято считать, что ведущую роль в этом процессе играет актин-миозиновый кортекс, однако в последнее время установлена важная роль системы микротрубочек. Именно микротрубочки определяют поляризацию клетки и задают направление движения, инициируют формирование филоподий и стресс-фибрилл [120].

Связь гиперэкспрессии TUBB3 в опухолевых клетках с инвазией в окружающие ткани показана для колоректального рака [12]. Позднее авторы исследования даже предложили использовать TUBB3 в качестве молекулы-мишени для подавления инвазивного роста опухолевых клеток [121].

При анализе историй болезни пациентов мы обратили внимание на такие характеристики, как врастание опухоли в висцеральную плевру и метастазирование в регионарные лимфоузлы. Обе характеристики отражают соответственно инвазивный и метастатический потенциал опухоли.

Была сформулирована гипотеза, согласно которой опухоли с высокой экспрессией TUBB3 обладают повышенным инвазивным и метастатическим потенциалом. Для проверки гипотезы проанализирована связь уровня/интенсивности экспрессии TUBB3 в опухоли со следующими клинико-морфологическими характеристиками: вовлечением висцеральной плевры и лимфогенным метастазированием. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. — Связь экспрессии TUBB3 в опухоли с инвазивным ростом и регионарным метастазированием

	n	%	TUBB3*							
			Доля TUBB3-позитивных клеток (%)			p	Интенсивность флуоресценции			p
			Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль		Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль	
Метастазы в региональные лимфоузлы										
Да	72	58,1	32	46	56	0,50	98	148	278	0,89
Нет	52	41,9	32	38,5	53		110	167	243	
Врастание в висцеральную плевру										
Да	82	68,3	33	45,5	55	0,55	99,5	160	250,5	0,88
Нет	38	31,7	27	45	53		97	161,5	269	

Между группами не выявлено статистически значимых различий. По-видимому, в немелкоклеточном раке легкого TUBB3 не связан с инвазивным и метастатическим потенциалом опухоли.

3.3. Исследование экспрессии TUBB3 в ткани легкого, удаленной от очага первичного поражения

3.3.1. Сравнительная характеристика экспрессии TUBB3 в нормальной и опухолевой ткани легкого

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. Речь идет об уникальной особенности TUBB3: этот белок цитоскелета практически не экспрессируется в большинстве нормальных тканей, однако выявляется в опухолях, в том числе и в НМРЛ. Это роднит данный белок с группой опухолеассоциированных антигенов и открывает перспективы для его использования в диагностике локальной распространенности опухолевого процесса за пределами видимого очага поражения.

В нашем исследовании предпринята попытка определить истинный масштаб опухолевого поражения легкого на основании анализа экспрессии TUBB3 в паренхиме органа, лежащей за пределами опухолевого узла. Это особенно актуально для немелкоклеточного рака легкого – часто метастазирующей опухоли с высоким риском локального и регионарного рецидива.

Итак, нами 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.

При иммунофлуоресцентном окрашивании суспензий использовано три концентрации первичных антител. Далее в тексте описаны значения, полученные для концентрации 0,16 мкг/мл (см. главу 3.2.1).

Полученные значения уровня и интенсивности экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого, отдаленной от первичного очага, сильно варьировали у разных пациентов, в связи с чем для каждого анализируемого критерия: уровня и интенсивности

экспрессии – был проведен анализ распределения с целью определить величину и характер разброса данных. Результаты анализа представлены на рисунке 18.

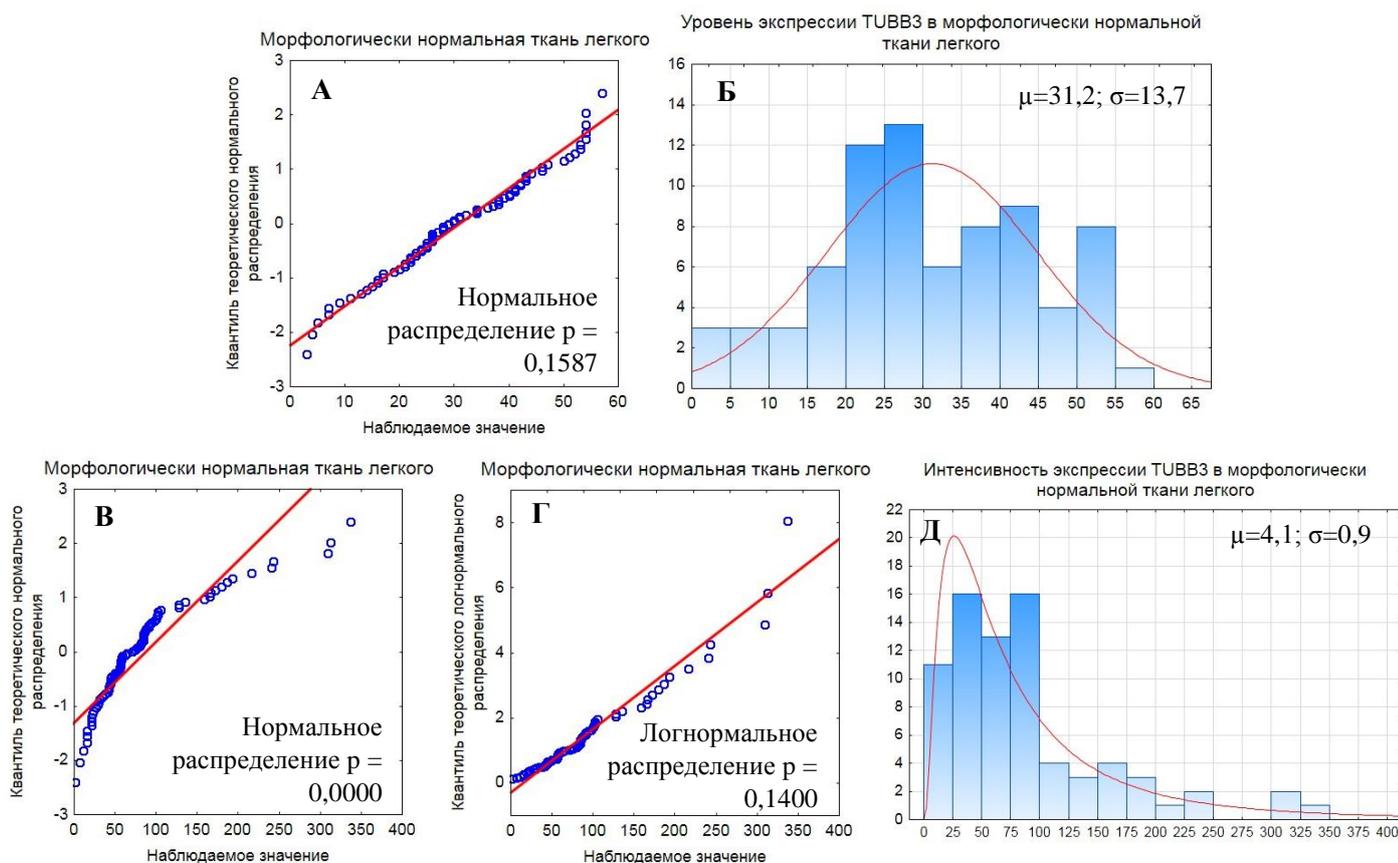


Рисунок 18 – Распределение значений уровня (А, Б) и интенсивности (В-Д) экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого; концентрация первичных антител – 0,16 мкг/мл. А. Квантильная диаграмма для значений уровня экспрессии TUBB3. Красная линия соответствует нормальному распределению. Б. Гистограмма распределения значений уровня экспрессии. Линия на рисунке показывает нормальное распределение, наилучшим образом описывающее экспериментальные данные, его параметры приведены на графике. Обозначения: μ – среднее; σ – стандартное отклонение В. Квантильная диаграмма для значений интенсивности экспрессии TUBB3. Красная линия соответствует нормальному распределению. Г. Квантильная диаграмма для значений интенсивности экспрессии TUBB3. Красная линия соответствует логнормальному распределению. Д. Гистограмма распределения значений интенсивности экспрессии. Линия на рисунке показывает логнормальное распределение, наилучшим образом описывающее экспериментальные данные. Обозначения: μ – среднее значение натурального логарифма переменной; σ – стандартное отклонение натурального логарифма переменной.

Для того чтобы точно установить характер распределения значений использовался метод квантильных диаграмм (подробнее – см. главу «материалы и методы» и главу 3.2.1). На рисунке 13А видно, что распределение значений уровня экспрессии соответствует нормальному: большинство значений на графике попадают на линию регрессии, соответствующую нормальному распределению, а достигнутый уровень значимости выше 0,05 ($p=0,1587$ по критерию Шапиро–Уилка).

Гистограмма распределения значений уровня экспрессии приведена на рис. 13Б. Показатель варьирует от 0 до 57%. Средний уровень экспрессии составляет $31,2 \pm 13,7\%$ и, поскольку распределение нормальное, практически совпадает с медианой: 29,0% (интерквартильный размах: 22–42%).

Иначе распределены значения интенсивности экспрессии: в исследованной группе они не подчиняются закону нормального распределения: на рис. 13В видно, что большинство значений не попадают на линию регрессии, соответствующую нормальному распределению, а достигнутый уровень значимости ниже 0,05 ($p=0,0000$ по критерию Шапиро–Уилка). Распределение наилучшим образом описывается как логнормальное ($p=0,1400$ по критерию хи-квадрат Пирсона) (рис. 13Г).

Гистограмма распределения значений интенсивности экспрессии TUBB3 и кривая теоретического логнормального распределения с параметрами $\mu=4,1$; $\sigma=0,9$ приведены на рисунке 13Д. Для удобства в дальнейшем вместо логарифмических параметров для описания данного распределения будут использоваться привычные минимум, максимум, медиана и интерквартильный размах. Итак, интенсивность экспрессии TUBB3 варьирует от 0 до 337 усл. ед., медиана интенсивности составляет 67,5 усл. ед., интерквартильный размах: 42,0–101,5 усл.ед.

На основании одного лишь анализа распределения можно сделать несколько предварительных выводов, важных для последующих исследований:

Во-первых, экспрессия TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого варьирует в широких пределах. На каждый исследованный образец приходится от 0 до 57% клеток, экспрессирующих маркер. С учетом выбранного порогового значения уровня экспрессии TUBB3 (см. главу 3.2.1.) можно предварительно заключить, что в 87% (67/77) исследованных образцов нормальной ткани обнаружены клетки, экспрессирующие TUBB3. Неожиданным оказался сам факт обнаружения клеток, экспрессирующих TUBB3, в таком большом количестве образцов морфологически нормальной ткани.

Во-вторых, распределения уровня и интенсивности экспрессии TUBB3 в ткани легкого унимодальны, т.е. содержат один ярко выраженный пик, соответствующий наиболее

часто встречающемуся значению. Значит, исследуемая группа однородна, в ее составе нельзя выделить самостоятельную подгруппу, резко отличающуюся по экспрессии TUBB3. Это несколько затрудняет классификацию пациентов на подгруппы с высокой и низкой экспрессией маркера. Поэтому в дальнейшем, при необходимости такого разделения, мерой разделения служила медиана показателя (уровня либо интенсивности).

В-третьих, логнормальность распределения интенсивности TUBB3 вынуждает в дальнейшем при статистической обработке данных использовать непараметрические критерии.

Далее было проведено сравнение интенсивности и уровня экспрессии TUBB3 в опухолевой и «нормальной» ткани легкого с целью ответить на вопрос: как изменяется экспрессия маркера в ткани легкого при удалении от опухолевого узла? Образцы были разделены на три группы:

1. «Норма» – ткань без признаков злокачественного роста, максимально отдаленная от опухолевого узла и лежащая вблизи края резекции.

2. «Норма вблизи опухоли» – морфологически нормальная ткань на границе с опухолью.

3. «Опухоль» – фрагмент опухолевого узла.

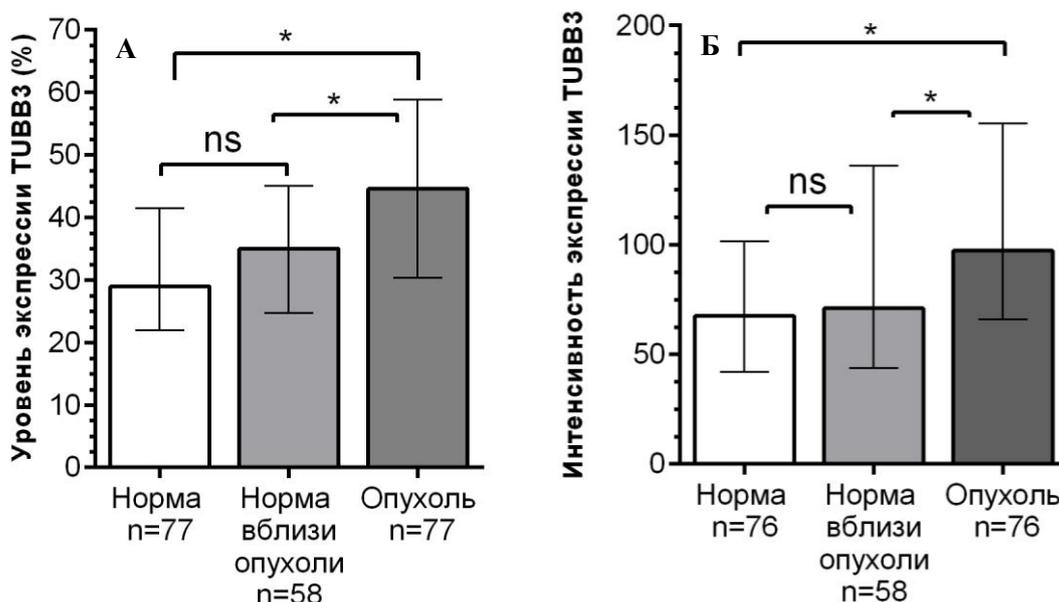
Значения показателей интенсивности и уровня экспрессии в трех группах сравнения приведены в таблице 6. На первый взгляд кажется, что в ряду «норма» → «норма вблизи опухоли» → «опухоль» параметры экспрессии растут, т.е. существует положительный градиент доли TUBB3-позитивных клеток и средней интенсивности экспрессии по мере приближения к опухоли.

Таблица 6 – Количественные показатели экспрессии TUBB3 в ткани немелкоклеточного рака легкого (*опухоль*), а также в морфологически нормальной ткани легкого, прилежащей к опухоли (*норма вблизи опухоли*) и отдаленной морфологически нормальной ткани легкого (*норма*)

	Уровень экспрессии TUBB3 (%)			Интенсивность экспрессии TUBB3		
	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
Норма (n=77)	29	22	42	68	42	102
Норма вблизи опухоли (n=58)	35	25	45	71	44	136
Опухоль (n=77)	47	35	55	98	66	155

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 19.

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.



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

Рисунок 19. – Сравнение показателей уровня (А) и интенсивности (Б) экспрессии TUBB3 в клетках опухоли и в клетках морфологически нормальной ткани легкого. Концентрация первичных антител – 0,16 мкг/мл. Доверительные интервалы показывают интерквартильный размах. Для попарных сравнений использовался одновыборочный критерий Вилкоксона с поправкой на множественные сравнения (критический уровень значимости $p = 0,05/3 = 0,017$). 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.

Полученные данные позволяют заключить, что:

1) в морфологически нормальной ткани органа, пораженного опухолевым процессом, выявляется специфический молекулярный опухолевый маркер TUBB3, который, согласно данным литературы, экспрессируется только в опухолевых, но не в нормальных клетках респираторного эпителия;

2) экспрессия маркера на отдалении от опухолевого узла ниже, чем в самом узле;

3) по мере удаления от опухолевого узла экспрессия маркера, по-видимому, не меняется.

Поскольку межгрупповое сравнение средних показателей экспрессии TUBB3 не дает информации об индивидуальных различиях для каждого больного, были построены гистограммы разброса значений уровня и интенсивности экспрессии TUBB3 в опухолевой и отдаленной нормальной ткани легкого (рис. 20).

Положение каждой точки на гистограмме соответствует отношению экспрессии белка в нормальной и опухолевой ткани каждого конкретного больного. У подавляющего большинства больных (64/77) в опухоли выявлялось 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.

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», которое является основой для формирования множественных зачатков новообразования [122].

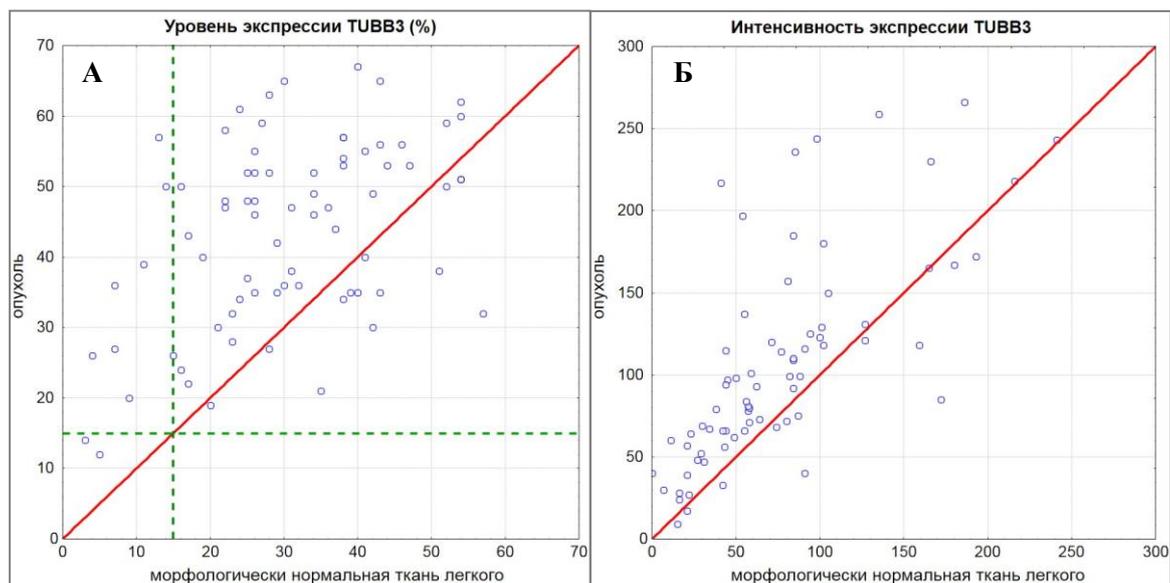


Рисунок 20 – Диаграммы разброса, отображающие уровень (А) и интенсивность (Б) экспрессии TUBB3 в клетках опухолевого очага и в клетках максимально удаленного от него морфологически нормального участка легкого. Каждая точка на графиках соответствует одному больному. По оси абсцисс – значения показателя в морфологически нормальном участке легкого, по оси ординат – в опухоли. Красная диагональ (функция $Y=X$) делит каждый график на две половины: выше диагонали лежат случаи, когда в опухоли экспрессируется больше TUBB3, чем в норме, ниже – наоборот. **А.** Соотношение уровня экспрессии, т.е. доли TUBB3-позитивных клеток (%) в опухоли и морфологически нормальной ткани. **Б.** Соотношение интенсивности экспрессии TUBB3 в опухоли и морфологически нормальной ткани. В подавляющем большинстве случаев уровень и интенсивность экспрессии TUBB3 в опухоли выше, чем в нормальной ткани (значения, лежащие выше диагонали). Зеленым пунктиром на первом графике отмечены границы порогового уровня (<15% клеток). N = 77.

Концепция «опухолевого поля» (англ. cancerization field, field cancerization) впервые была предложена для рака ротовой полости [123]. Идея заключается в том, что при системном воздействии канцерогенного фактора или факторов: табачного дыма, ВПЧ-инфекции и др. на некоторую анатомическую область, в выстилающем ее эпителии появляются множественные предраковые очаги. Такие структуры могут выявляться только на молекулярном уровне, когда в визуально нормальных клетках обнаруживаются мутации

p53, вирусная ДНК, потеря гетерозиготности, микросателлитная нестабильность и пр. «Опухолевые поля» позднее были описаны в легком, пищеводе, вульве, матке, анусе, толстой кишке, молочной железе, мочевом пузыре, коже, глотке и гортани [124]. В частности, для немелкоклеточного рака легкого было показано, что даже вблизи края резекции в визуально нормальной ткани легкого у 9 и 18% больных НМРЛ обнаруживаются мутации *p53* и *K-ras*, соответственно, что свидетельствует о системном поражении органа [125].

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 [126]. Принципиальная возможность экзосомной передачи белка TUBB3 продемонстрирована для рака яичников [127], не исключено, что это справедливо и для рака легкого.

Экспрессия TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого слабо различается либо вообще не различается в зависимости от расстояния до опухолевого узла. Для уточнения этого вопроса требуются дальнейшие исследования с увеличением объема выборки. Если подтвердится, что экспрессия TUBB3 происходит равномерно во всем органе, охваченным опухолевым процессом, более вероятно системное поражение, т.е. наличие множественных фокусов клеток, синтезирующих исследуемый белок. В противном случае, если подтвердится наличие положительного градиента экспрессии TUBB3 в паренхиме легкого по мере приближения к опухоли, это будет скорее свидетельствовать в пользу гипотезы о миграции опухолевых клеток или передаче экзосом из первичного очага.

Независимо от причин описанного феномена, гетерогенность экспрессии TUBB3 за пределами первичной опухоли указывает на информативность количественной оценки маркера для молекулярной диагностики локальной распространенности заболевания. Более того, исследование TUBB3 может стать важным молекулярным дополнением к морфологическому исследованию лимфатических узлов при стадировании опухолевого процесса, которое определяет радикализм операции и тактику послеоперационного ведения больных НМРЛ. Большинство торакальных хирургов в настоящее время придерживаются тактики максимального радикализма операции. В то же время обоснованность такого подхода в отношении ранних стадий заболевания остается дискуссионной. 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. К примеру, в группе радикально оперированных больных НМРЛ с pN1, не получавших послеоперационную химио- или лучевую терапию, 5-летний риск локального рецидива составил 38,6% [128]. В другом исследовании уже на T1-3 N2 пациентах риск локорегионарного рецидива превышал 31% [129]. Применение лучевой терапии обеспечивает локальный контроль и позволяет снизить частоту локорегионарных рецидивов в 4 раза [130].

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.

3.3.2. Связь экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого с клинико-морфологическими характеристиками заболевания

Итак, впервые на большом клиническом материале показано присутствие опухолеассоциированного белка TUBB3 в ткани, лишенной признаков злокачественного роста.

Для понимания природы этого феномена и его связи с патогенезом немелкоклеточного рака легкого был проведен анализ ассоциации экспрессии TUBB3 в «нормальной» ткани легкого с клинико-морфологическими характеристиками заболевания (n = 77), которые коррелируют с течением болезни. Дизайн исследования был аналогичен описанному в главе 3.2.2: больные были разделены на группы по стадии, полу, гистологическому типу и т.д. Группы сравнивались между собой по уровню и интенсивности экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого, максимально отдаленной от опухолевого узла. Полученные данные приведены в таблице 7.

Таблица 7. Связь экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого с клинико-морфологическими характеристиками немелкоклеточного рака

Характеристика	n	%	TUBB3*							
			Доля TUBB3-положительных клеток (%)			p	Интенсивность флуоресценции			p
			Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль		Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль	
Возраст, годы										
≤ 60	31	41,8	17	26	37	0,02*	34	62	102	0,60
> 60	43	58,2	24	34	43		43	77	312	
Пол										
Мужчины	68	90,7	22	30	43	0,57	41	64	165	0,46
Женщины	7	9,3	21	25	39		38	71	98	
Гистологический тип опухоли										
Аденокарцинома	31	44,3	22	31	41	0,98	41	64	165	0,62
Плоскоклеточный рак	39	55,7	22	28	43		38	71	98	
Статус курения										
Курят	45	71,4	22,5	30	41,5	0,61	43,5	80	102	0,48
Не курят	18	28,6	16,5	25	40		38	57,5	135	
Степень морфологической дифференцировки (G)										
G1	9	15,5	22	26	47	0,92	37	57	82,5	0,73
G2	30	51,7	20,5	30,5	42		35	74	102	
G3	19	32,8	16	32	44		42	78,5	133	
Стадия заболевания										
I	12	17,6	15	30,5	41	0,92	27	72	170	0,02*
II	32	47,1	21	28	42,5		59	89	153	
III	24	35,3	23,5	28,5	42		31	54,5	75,5	

* Красным указаны статистически значимые различия

Статистически значимые различия выявлены в группах, разделенных по возрасту и стадии заболевания.

Разница между группами, разделенными по медиане возраста (60 лет) зафиксирована для уровня, но не интенсивности экспрессии TUBB3 ($p=0,0184$): у пациентов старше 60 лет доля TUBB3-положительных клеток в легком выше, чем у более молодых пациентов.

Статистически значимая разница также выявлена между группами, разделенными по стадии заболевания ($p=0,0149$). Причем наблюдаемая закономерность кажется нам парадоксальной: с увеличением стадии уменьшается средняя интенсивность экспрессии маркера в ткани. Доля TUBB3-положительных клеток (т.е. уровень экспрессии) при этом от стадии не зависит и остается приблизительно одинаковой ($p=0,9238$). Попытка объяснить этот феномен приведена ниже, в главе 3.3.3.

В остальном между группами, выделенными по полу и статусу курения пациентов, по степени морфологической дифференцировки и гистологическому типу опухоли не было выявлено различий по уровню и интенсивности экспрессии TUBB3.

Любопытно отсутствие связи TUBB3 с курением. Экспериментально показано, что воздействие экстракта табачного дыма на клеточные культуры аденокарциномы легкого A549 и бронхиального эпителия BEAS-2B активирует синтез транскрипционного фактора NIF-1 α [129]. NIF-1 α , в свою очередь, способен активировать экспрессию *TUBB3* (см. обзор литературы). Можно было бы предположить, что у курящих пациентов экспрессия TUBB3 в ткани легкого будет выше, чем у некурящих. Тем не менее, в исследованной выборке больных не удалось выявить такой связи ни для опухолевой (см. главу 3.2.2.), ни для морфологически нормальной ткани легкого.

Выше мы предположили, что присутствие TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого может отражать наличие «опухолевого поля», т.е. множественных фокусов трансформированных клеток по всему органу, не выявляемых под микроскопом и появившихся в результате системного канцерогенного воздействия. Если экспрессия TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого действительно связана с наличием системного поражения органа, то табачный дым вряд ли является единственным повреждающим фактором, так как обнаружить связь экспрессии белка с курением не удалось. Существует ли канцероген, индуцирующий в клетках экспрессию TUBB3 и какова его природа, еще предстоит выяснить.

3.3.3. Связь экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого с инвазивным и метастатическим потенциалом опухоли

В главе 3.2.4 было показано, что экспрессия TUBB3 в опухоли не связана с регионарным метастазированием и прорастанием опухоли в висцеральную плевру – показателями агрессивности опухоли и ее метастатического потенциала. Обнаружив TUBB3-позитивные клетки за пределами опухолевого очага, мы предположили, что выраженная экспрессия TUBB3 в морфологически нормальной ткани может отражать агрессивность первичной опухоли. Для проверки этого предположения была проанализирована связь уровня/интенсивности экспрессии TUBB3 с вышеупомянутыми показателями. Результаты приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Связь экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого с инвазивным ростом и регионарным метастазированием

	n	%	TUBB3							
			Доля TUBB3-позитивных клеток (%)			p	Интенсивность флуоресценции			p
			Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль		Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль	
Метастазы в региональные лимфоузлы										
Да	49	65,3	20,5	26	37,5	0,04*	32,5	58	96	0,02*
Нет	26	34,7	25	40	46		56,5	86	199	
Врастание в висцеральную плевру										
Да	53	70,7	23,5	31	43	0,10	46,5	82	127	0,06
Нет	22	29,3	17	24,5	39		21	56,5	86,5	

* Красным указаны статистически значимые различия

Видно, что экспрессия TUBB3 не различается в группах, разделенных по поражению висцеральной плевры. Что же касается показателя регионарного метастазирования, то результат оказался противоположным ожидаемому: у больных с метастазами в регионарные лимфоузлы наблюдаемые уровень ($p=0,0421$) и интенсивность экспрессии TUBB3 ($p=0,0158$) оказались в среднем ниже, чем у больных без метастазов. С этим связана и наблюдаемая обратная зависимость интенсивности экспрессии TUBB3 от стадии заболевания (см. главу 3.3.2). Известно, что степень поражения регионарных лимфоузлов является ведущим фактором при стадировании НМРЛ. Обратная зависимость между выраженностью экспрессии TUBB3 и регионарным метастазированием приводит к наблюдаемой обратной зависимости между экспрессией TUBB3 и стадией заболевания.

Таким образом, уровень и интенсивность экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого не связаны с агрессивностью НМРЛ. Более того, экспрессия TUBB3 ниже у больных с регионарными метастазами. Причины этого феномена не ясны и требуют дополнительного изучения.

3.3.4. Экспрессия TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого и выживаемость пациентов

С целью установить наличие или отсутствие связи между экспрессией TUBB3 в морфологически нормальном легком и общей выживаемостью, была отобрана группа больных с измеренными параметрами экспрессии TUBB3 в легком и прослеженных после

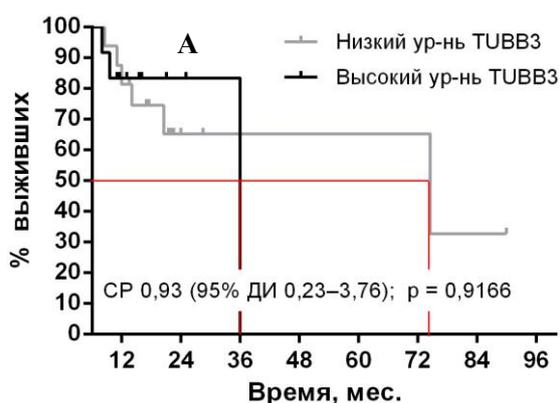
выписки из стационара. Анализ выживаемости в зависимости от показателей экспрессии TUBB3 в «нормальном» легком представлен на рис. 21.

В исследование вошли 33 пациента. Медиана наблюдения составила 21,0 месяцев (макс. – 74,5 месяцев). Используемая концентрация первичных антител – 0,16 мкг/мл. 4 пациента, умерших до 6 месяцев включительно после окончания срока госпитализации исключены из исследования.

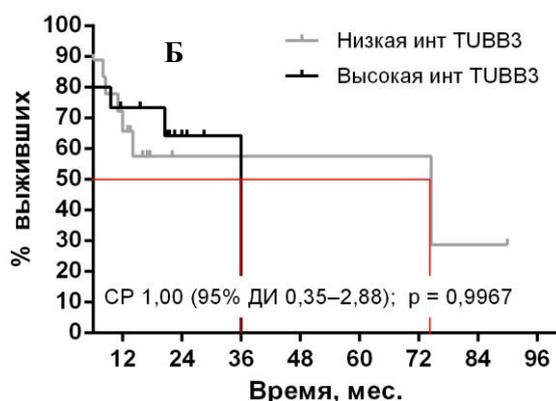
Аналогично главе 3.2.3, мерой разделения экспрессии TUBB3 на высокую и низкую служила медиана либо уровня, либо интенсивности экспрессии TUBB3 по группе. Медиана уровня экспрессии составила 30% TUBB3-позитивных клеток; медиана интенсивности экспрессии – 59 усл. ед.

Показано отсутствие статистически значимых различий в выживаемости пациентов с высоким и низким уровнем экспрессии TUBB3: $p=0,9166$; $CP=0,93$; 95% ДИ 0,23–3,76 (рисунок 17А). Также отсутствовали различия в выживаемости пациентов с высокой и низкой интенсивностью экспрессии TUBB3: $p=0,9967$; $CP=1,00$; 95% ДИ 0,35–2,88 (рисунок 17Б).

Можно заключить, что в исследованной выборке выживаемость больных немелкоклеточным раком легкого не зависит от экспрессии белка TUBB3 в ткани органа. Однако малый объем выборки ($n=33$) не позволяет вынести окончательный вердикт о прогностической роли TUBB3. По причине ограниченного числа исследованных пациентов не удалось провести постадийный анализ выживаемости. Считаем, что исследования прогностической роли TUBB3 в морфологически нормальной ткани необходимо продолжить.



Число больных	Годы наблюдения	1	2	3	Медиана (мес)
	Низкий уровень TUBB3		16	14	4
Высокий уровень TUBB3		12	8	3	36,0



Число больных	Годы наблюдения	1	2	3	Медиана (мес)
	Низкая интенсивность TUBB3		18	11	3
Высокая интенсивность TUBB3		15	11	4	36,0

Рисунок 21 – Оценка выживаемости пациентов ($n = 33$) в зависимости от экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого. **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. 4 пациента, умерших до 6 мес. включительно исключены из исследования. Обозначения: *CP* – соотношение риска, *ДИ* – доверительный интервал. Статистически значимых различий в выживаемости пациентов с высокой и низкой экспрессией TUBB3 не выявлено, кривые выживаемости не расходятся.

3.4. 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, имеющая крайне неблагоприятный прогноз. Даже после радикальной операции у 20% больных диагностируются локальные рецидивы опухоли [130, 132].

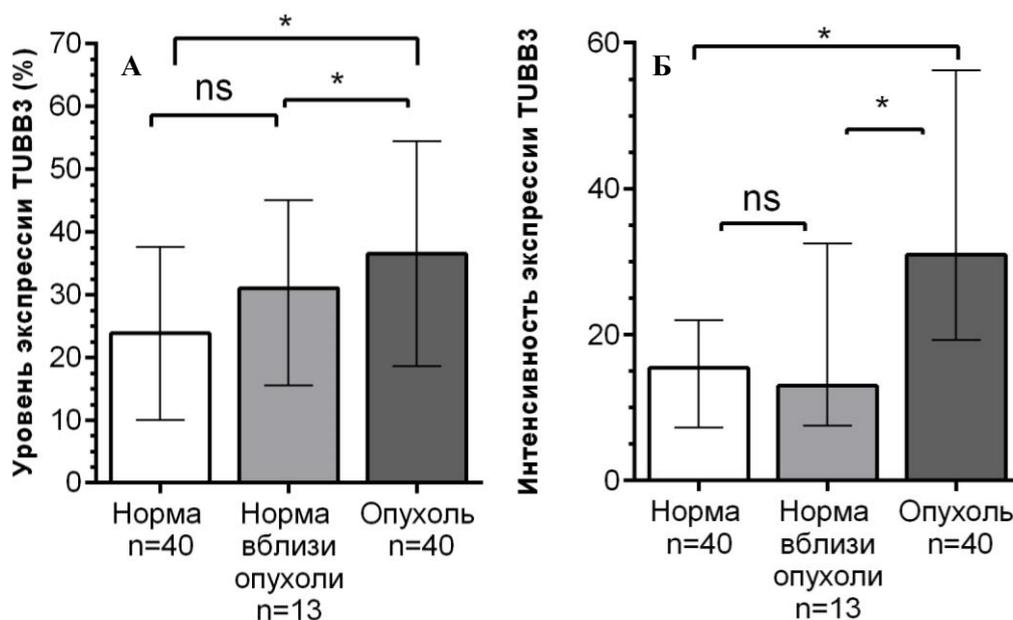
Исследовались образцы рака пищевода и нормальной слизистой органа 40 радикально оперированных больных. Был получен материал опухолевой и «нормальной» ткани, максимально удаленной от первичного очага. Дополнительно у 13 пациентов получен материал слизистой пищевода, непосредственно прилежащей к опухоли. Результаты исследования экспрессии TUBB3 приведены в таблице 9.

Таблица 9 – Количественные показатели экспрессии TUBB3 в нормальной и опухолевой ткани пищевода

	Уровень экспрессии TUBB3 (%)			Интенсивность экспрессии TUBB3		
	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
Норма (n=40)	21	13	31,5	15,5	7	22
Норма вблизи опухоли (n=13)	31	15,5	45	13	7,5	32,5
Опухоль (n=40)	36	22	51	31	19	56

Из таблицы видно, что белок TUBB3 присутствует в морфологически нормальной слизистой пищевода. При этом в ряду «норма» → «норма вблизи опухоли» → «опухоль» уровень экспрессии растет, т.е. существует положительный градиент доли TUBB3-позитивных клеток по мере приближения 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 22.



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

Рисунок 22 – Сравнение показателей уровня (А) и интенсивности (Б) экспрессии TUBB3 в клетках опухоли и в клетках морфологически нормальной ткани пищевода. Доверительные интервалы показывают интерквартильный размах. Для попарных сравнений использовался одновыборочный критерий Вилкоксона с поправкой на множественные сравнения (критический уровень значимости $p = 0,05/3 = 0,017$). Обозначения: *Норма* – интактный участок пищевода, максимально отдаленный от опухоли; *Норма вблизи опухоли* – непосредственно прилежащий 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.

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.

Картина аналогична полученной в главе 3.3.1 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.

Поскольку межгрупповое сравнение средних показателей экспрессии TUBB3 не дает информации об индивидуальных различиях для каждого больного, были построены гистограммы разброса значений уровня и интенсивности экспрессии TUBB3 в опухолевой и отдаленной нормальной ткани легкого (рис.23).

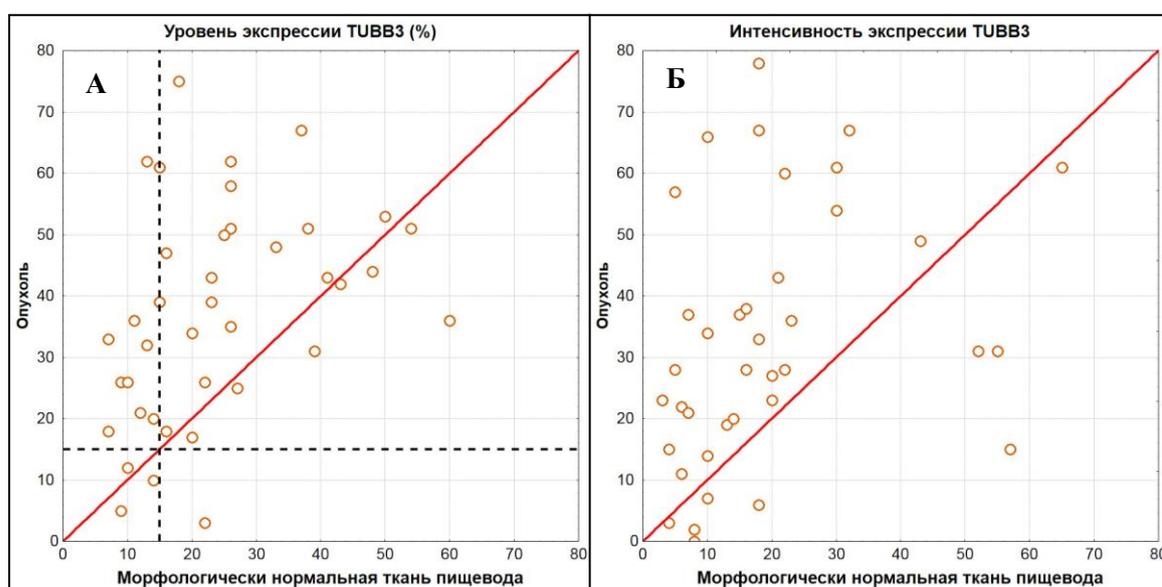


Рисунок 23 – Диаграммы рассеяния, отображающие уровень (А) и интенсивность (Б) экспрессии TUBB3 в клетках опухолевого очага и в клетках максимально удаленного от него морфологически нормального участка пищевода. Каждая точка на графиках соответствует одному больному. По оси абсцисс – значения показателя в морфологически нормальном участке пищевода, по оси ординат – в опухоли. Красная диагональ (функция $Y=X$) делит каждый график на две половины: выше диагонали лежат случаи, когда в опухоли экспрессируется больше TUBB3, чем в норме, ниже – наоборот. **А.** Соотношение уровня экспрессии, т.е. доли TUBB3-позитивных клеток (%) в опухоли и морфологически нормальной ткани. **Б.** Соотношение интенсивности экспрессии TUBB3 в опухоли и морфологически нормальной ткани. В большинстве случаев уровень и интенсивность экспрессии TUBB3 в опухоли выше, чем в нормальной ткани. $N = 40$.

Видно, что в подавляющем большинстве случаев уровень и интенсивность экспрессии TUBB3 в опухоли выше, чем в нормальной ткани.

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.

Глава 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бета-тубулины – семейство белков, входящих в состав микротрубочек: у позвоночных известно как минимум 9 изоформ бета-тубулина, которые кодируются разными генами, расположенными на разных хромосомах, и имеют тканеспецифичные паттерны экспрессии.

Функциональное значение наблюдаемого разнообразия бета-тубулинов еще предстоит определить, однако вероятно, что в том числе благодаря ему в одном организме поддерживается многообразие клеточных типов по форме, подвижности и скорости пролиферации. Более того, в разных участках одной клетки зачастую представлены разные модификации и изоформы тубулина, соотношение которых может меняться в зависимости от фазы клеточного цикла. Нарушение работы этой сложной системы может привести к широкому спектру патологических изменений клеточной локомоции, пролиферации, секреции, формы и размера клеток.

Многие опухоли характеризуются измененным профилем экспрессии тубулинов. Не исключено, что экспрессия определенных изоформ этого белка дает опухолевой клетке селективные преимущества, стимулирует потерю связи с микроокружением, инвазию, метастазирование, устойчивость к гипоксии и цитотоксическим воздействиям.

На сегодняшний день из всей группы наиболее полно изучен β_{III} -тубулин (TUBB3), причем именно в клинически-прикладном контексте, поскольку этот белок регистрируется в широком спектре опухолей разных локализаций и традиционно считается фактором, отвечающим за развитие резистентности опухолей к препаратам из группы таксанов.

За последние годы появились данные, свидетельствующие о том, что TUBB3 в опухолевой клетке не только определяет ее устойчивость к таксанам, но также обеспечивает выживание в неблагоприятном микроокружении и увеличивает метастатический потенциал опухоли.

Также TUBB3 не экспрессируется в эпителиальных тканях. В норме его экспрессия регистрируется только в нейронах, меланоцитах, эндотелиоцитах, макрофагах. Это в перспективе позволит применять анализ экспрессии TUBB3 для выявления малигнизированных клеток в визуально доброкачественной ткани и диагностики местной распространенности злокачественного процесса.

В связи с этим особенно актуально изучение экспрессии TUBB3 как непосредственно в опухолях, так и в окружающих опухоль тканях с целью не только выявить его роль в развитии заболевания, но и проследить, насколько далеко распространяется опухолевый процесс за пределы непосредственно опухолевого узла.

Объектом представленного исследования выбран немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) – наиболее распространенное в мире злокачественное новообразование. Известно, что в данной опухоли часто экспрессируется TUBB3, и что его экспрессия связана с развитием устойчивости опухоли к терапии с включением таксанов. Существует ряд свидетельств, что высокий уровень TUBB3 связан с неблагоприятным прогнозом общей выживаемости пациентов. Однако имеющиеся данные фрагментарны и противоречивы [55]. Практически ничего не известно о характере экспрессии TUBB3 за пределами первичной опухоли у больных немелкоклеточным раком легкого.

В свете этих данных особенно перспективным видится изучение опухолеассоциированного маркера TUBB3 у больных немелкоклеточным раком легкого – маркера, который, в зависимости от постановки задачи, может быть прогностическим, предиктивным или диагностическим.

На первом этапе исследования была изучена прогностическая роль TUBB3. Сначала был проведен анализ историй болезни пациентов, включенных в исследование, с целью оценить, насколько выборка репрезентативна и какие клинико-морфологические характеристики имеют в ней прогностическую ценность.

Выяснилось, что состав группы больных НМРЛ по полу, возрасту, статусу курения, стадии, гистологическому типу и выживаемости сопоставим с данными литературы по эпидемиологии и структуре этого заболевания в России и мире. Единственное несоответствие с данными литературы – малая доля пациентов с I стадией заболевания, всего 16,2% против описанных в литературе 39% [111].

При анализе выживаемости больных выяснилось, что гистологический тип плоскоклеточного рака и курение являются прогностически неблагоприятными факторами, что полностью соответствует данным литературы. Также закономерной оказалась выживаемость больных в зависимости от стадии: чем выше стадия заболевания, тем ниже общая выживаемость.

Далее был проведен анализ экспрессии TUBB3 в опухолевых образцах пациентов, включенных в исследование. Была выявлена значительная гетерогенность показателя уровня экспрессии: от 10% до 74% TUBB3-позитивных клеток в опухоли со средним значением $43,1 \pm 14,9\%$. На основании анализа данных литературы были приблизительно определены пороговые значения экспрессии TUBB3 в опухоли, ниже которых ее можно считать негативной. Известно, что белок TUBB3 не выявляется в нормальной паренхиме легкого, однако присутствует в эндотелиоцитах и макрофагах [115]. Согласно данным литературы, доля таких клеток не превышает 5% [116]. Учитывая возможную ошибку измерения, было

решено принять пороговый уровень экспрессии TUBB3 равным 15%. Следует подчеркнуть, что это значение является приблизительным и в будущем может быть изменено как в большую, так и в меньшую сторону. С учетом выбранного порогового значения уровня экспрессии TUBB3, положительная экспрессия белка зарегистрирована в 97% исследованных образцов.

В ходе анализа связи экспрессии TUBB3 с клинико-морфологическими характеристиками заболевания продемонстрирована связь интенсивности экспрессии маркера с гистологическим типом опухоли: в ткани аденокарциномы среднее значение показателя было выше, чем в ткани плоскоклеточного рака легкого. Этот результат может показаться парадоксальным: в более прогностически благоприятной группе выше экспрессия прогностически неблагоприятного маркера. Можно заключить, что потенциально туморогенные функции TUBB3 в ткани аденокарциномы маскируются другими, «благоприятными» факторами, совокупность которых в итоге приводит к более благоприятному прогнозу именно при аденокарциноме легкого.

Метастатический потенциал опухоли – характеристика, важная не только для прогноза заболевания, но и для понимания биологии опухоли. В литературе имеются указания на то, что экспрессия TUBB3 в опухоли может способствовать миграции клеток и выживанию их во враждебном микроокружении (см. главу «Обзор литературы»). Мы проанализировали связь экспрессии TUBB3 в опухоли со следующими клинико-морфологическими характеристиками: прорастанием опухоли в висцеральную плевру и регионарным метастазированием. Между группами не выявлено статистически значимых различий. По-видимому, в немелкоклеточном раке легкого TUBB3 не связан с инвазивным и метастатическим потенциалом опухоли.

При анализе выживаемости больных с высокой и низкой экспрессией TUBB3 в исследованной группе было показано отсутствие статистически значимых отличий. Прогностическая роль TUBB3 не подтвердилась ни для общей группы больных, ни при поэтапном сравнении выживаемости групп с высокой и низкой экспрессией белка.

На первый взгляд, по первой части работы можно сделать вывод о несостоятельности TUBB3 как прогностического маркера немелкоклеточного рака легкого. Несмотря на хорошо задокументированные молекулярные особенности белка, связанные с опухолевым ростом, метастазированием и резистентностью к некоторым терапевтическим агентам, в общей группе больных НМРЛ данный белок не связан ни напрямую с выживаемостью, ни с факторами, прогнозирующими выживаемость, в том числе с инвазивным и метастатическим потенциалом опухоли.

Однако, учитывая малые объемы выборок при поэтапном анализе, нельзя исключать, что полученные предварительные результаты нуждаются в дальнейшем уточнении, и экспрессия TUBB3 все же может прогнозировать выживаемость больных на ранних стадиях заболевания. Указания на это можно найти в литературе: по итогам 4 рандомизированных исследований: ANITA, IALT, CALGB 9633 и JBR.10 – авторы заключают, что на ранних стадиях заболевания TUBB3 может вести себя как прогностический маркер, а на более поздних – как предиктивный [118].

В совокупности с имеющимися данными, полученные нами 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.

На следующем этапе исследования был проведен сравнительный анализ экспрессии TUBB3 в опухолевой и морфологически нормальной ткани легкого. О характере экспрессии TUBB3 за пределами первичной опухоли у больных немелкоклеточным раком легкого известно крайне мало. То же самое можно сказать о практически любом злокачественном новообразовании. Сравнительная молекулярная диагностика опухолевого узла и окружающей нормальной ткани опухоли – молодое направление в онкологии. Отдельные исследования, касающиеся экспрессии того или иного фактора в ткани, расположенной вблизи опухоли, встречаются в литературе [134,135,136,137,138], однако, по нашему мнению, эта тема все еще недостаточно освещена. Часто окружающая опухоль ткань рассматривается как истинно нормальная, особенно если в ходе микроскопического исследования в ней не обнаруживаются признаков опухолевого поражения. Между тем такая ткань может быть трансформирована на молекулярном уровне. Об этом свидетельствует недавнее масштабное исследование, в котором сравнены транскриптомы опухолевой и прилегающей к опухоли ткани 8 видов злокачественных новообразований, а также нормальных тканей соответствующих органов, полученные от пациентов, оперированных по поводу неонкологических заболеваний (n=6506) [139]. Выяснилось, что молекулярно эти ткани сильно различаются между собой. Ряд сигнальных путей активен только в прилегающей к опухоли ткани, но не работает в опухолевых и нормальной тканях. Также было выявлено 18 генов, активных только вблизи опухоли. Авторы исследования делают вывод, что опухоль порождает сеть сложных взаимодействий с окружающей тканью и трансформирует ее, и это, по-видимому, является фундаментальным свойством всех злокачественных новообразований.

В нашем исследовании впервые показано, что в морфологически нормальной ткани органа, пораженного опухолевым процессом, выявляется специфический молекулярный опухолевый маркер TUBB3. Экспрессия белка в морфологически нормальной ткани легкого всегда ниже, чем непосредственно в опухоли, однако варьирует в широких пределах: на каждый исследованный образец приходится от 0 до 57% клеток, экспрессирующих маркер.

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», которое является основой для формирования множественных зачатков новообразования [122].

Концепция «опухолевого поля» (англ. cancerization field, field cancerization) впервые была предложена для рака ротовой полости [123]. Идея заключается в том, что при системном воздействии канцерогенного фактора или факторов: табачного дыма, ВПЧ-инфекции и др. на некоторую анатомическую область, в выстилающем ее эпителии появляются множественные предраковые очаги. Такие структуры могут выявляться только на молекулярном уровне. «Опухолевые поля» позднее были описаны в легком, пищеводе, вульве, матке, анусе, толстой кишке, молочной железе, мочевом пузыре, коже, глотке и гортани [124]. В частности, для немелкоклеточного рака легкого было показано, что даже вблизи края резекции в визуально нормальной ткани легкого у 9 и 18% больных НМРЛ обнаруживаются мутации *p53* и *K-ras*, соответственно, что свидетельствует о системном поражении органа [125].

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 [127]. Принципиальная возможность экзосомной передачи белка TUBB3 продемонстрирована для рака яичников [126], не исключено, что это справедливо и для рака легкого.

Экспрессия TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого, по-видимому, слабо различается, либо вообще не различается в зависимости от расстояния до опухолевого узла.

Для уточнения этого вопроса требуются дальнейшие исследования с увеличением объема выборки. Если подтвердится, что экспрессия TUBB3 происходит равномерно во всем органе, охваченным опухолевым процессом, более вероятно системное поражение, т.е. наличие множественных фокусов клеток, синтезирующих исследуемый белок. В противном случае, если подтвердится наличие положительного градиента экспрессии TUBB3 в паренхиме легкого по мере приближения к опухоли, это будет скорее свидетельствовать в пользу гипотезы о миграции опухолевых клеток или передаче экзосом из первичного очага.

Независимо от причин описанного феномена, гетерогенность экспрессии TUBB3 за пределами первичной опухоли указывает на информативность количественной оценки маркера для молекулярной диагностики локальной распространенности заболевания. Более того, исследование TUBB3 может стать важным молекулярным дополнением к морфологическому исследованию лимфатических узлов при стадировании опухолевого процесса, которое определяет радикализм операции и тактику послеоперационного ведения больных НМРЛ.

Большинство торакальных хирургов в настоящее время придерживаются тактики максимального радикализма операции. В то же время обоснованность такого подхода в отношении ранних стадий заболевания остается дискуссионной. 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. К примеру, в группе радикально оперированных больных НМРЛ с pN1, не получавших послеоперационную химио- или лучевую терапию, 5-летний риск локального рецидива составил 38,6% [122]. В другом исследовании уже на T1-3 N2 пациентах риск локорегионарного рецидива превышал 31% [123]. Применение лучевой терапии обеспечивает локальный контроль и позволяет снизить частоту локорегионарных рецидивов в 4 раза [124].

При анализе связи экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого с клинико-морфологическими проявлениями болезни выявлены следующие закономерности.

Во-первых, любопытно отсутствие связи TUBB3 с курением. Экспериментально показано, что воздействие экстракта табачного дыма на клеточные культуры аденокарциномы легкого A549 и бронхиального эпителия BEAS-2B активирует синтез транскрипционного фактора HIF-1 α [125]. HIF-1 α , в свою очередь, способен активировать экспрессию TUBB3 (см. обзор литературы). Можно было бы предположить, что у курящих пациентов экспрессия TUBB3 в ткани легкого будет выше, чем у некурящих. Тем не менее, в исследованной выборке больных не удалось выявить такой связи ни для опухолевой (см. главу 3.2.2.), ни для морфологически нормальной ткани легкого. Выше мы предположили, что присутствие TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого может отражать наличие «опухолевого поля», т.е. множественных фокусов трансформированных клеток по всему органу, не выявляемых под микроскопом и появившихся в результате системного канцерогенного воздействия. Если экспрессия TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого действительно связана с наличием системного поражения органа, то табачный дым вряд ли является единственным повреждающим фактором, так как обнаружить связь экспрессии белка с курением не удалось. Существует ли канцероген, индуцирующий в клетках экспрессию TUBB3 и какова его природа, еще предстоит выяснить.

Во-вторых, у больных с метастазами в регионарные лимфоузлы, наблюдаемые уровень и интенсивность экспрессии TUBB3 оказались в среднем ниже, чем у больных без метастазов. Соответственно экспрессия TUBB3 в «нормальной» ткани легкого была выше на начальных стадиях НМРЛ по сравнению с более продвинутыми стадиями. Причины этого феномена не ясны и требуют дополнительного изучения.

Что касается прогностической роли экспрессии TUBB3 в легком за пределами опухолевого поражения, то малый объем исследованной выборки не позволяет сделать каких-то определенных выводов. Предварительно можно заключить, что данный фактор не связан с выживаемостью пациентов.

Резюмируя, можно заключить, что 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. Учитывая важность описанного феномена мы посчитали необходимым «верифицировать» этот факт на примере другой опухоли, для которой также характерен возврат болезни после радикального хирургического лечения. В качестве объекта исследования был выбран рак пищевода.

Паттерн экспрессии TUBB3 в пищеводе, пораженном опухолью, оказался сходен с описанным при НМРЛ: TUBB3 выявляется в морфологически нормальной ткани органа, экспрессия маркера всегда ниже, чем непосредственно в опухоли и, по-видимому, не меняется в зависимости от расстояния до опухолевого узла.

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.

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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jordan, M.A. Microtubules as a target for anticancer drugs / M.A. Jordan, L. Wilson // *Nature Reviews Cancer*. — 2004. — Vol. 4. — №4. — P. 253-265.
2. David-Pfeuty, T. Guanosinetriphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly / T. David-Pfeuty, H.P. Erickson, D. Pantaloni // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. — 1977. — Vol. 74. — №12. — P. 5372-5376.
3. Rezanina, V. Microtubule assembly of isotypically purified tubulin and its mixtures / V. Rezanina, O. Azarenko, M.A. Jordan et al. // *Biophysical Journal* — 2008. — Vol. 95. — №4. — P. 1993-2008.
4. Ludueña, R.F. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications / R.F. Ludueña // *International Review of Cytology*. — 1998. — Vol. 178. — P. 207-275.
5. Gadadhar, S. The tubulin code at a glance / S. Gadadhar, S. Bodakuntla, K. Natarajan et al. // *Journal of Cell Science*. — 2017. — Vol. 130. — №8 — P. 1347-1353.
6. Ludueña, R.F. A hypothesis on the origin and evolution of tubulin / R.F. Ludueña // *International Review of Cell and Molecular Biology*. — 2013. — Vol. 302. — P. 41-185.
7. Ono, S. Ancient linkage groups and frozen accidents / S. Ono // *Nature*. — 1973. — Vol. 244 (5414). — P. 259-262.
8. Katsetos, C.D. Class III beta-tubulin in human development and cancer / C.D. Katsetos, M.M. Herman, S.J. Mörk // *Cell Motility and the Cytoskeleton*. — 2003. — Vol.55 — №2. — P. 77-96.
9. Panda, D. Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition / D. Panda, H. P. Miller, A. Banerjee et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. — 1994. — Vol.91 — №24. — P. 11358-11362.
10. Jiang, Y.Q. Differential regulation of beta III and other tubulin genes during peripheral and central neuron development / Y.Q. Jiang, M.M. Oblinger // *Journal of Cell Science*. — 1992. — Vol. 103 (Pt 3). — P. 643-651.
11. Dráberová, E. Class III β -tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes: implications for phenotypic identity / E. Dráberová, L. Del Valle, J. Gordon et al. // *Journal of neuropathology and experimental neurology*. — 2008. — Vol. 67. — №4. — P. 341-354.
12. Portyanko, A. Beta(III)-tubulin at the invasive margin of colorectal cancer: possible link to invasion / A. Portyanko, P. Kovalev, J. Gorgun, E. Cherstvoy // *Virchows Archiv*. — 2009. — Vol. 454. — №5. — P. 541-548.

13. Jouhilahti, E.M. Class III beta-tubulin is a component of the mitotic spindle in multiple cell types / E.M. Jouhilahti, S. Peltonen, J. Peltonen // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. — 2008. — Vol. 56. — №12. — P. 1113-1119.
14. Guo, J. The beta isoforms of tubulin in neuronal differentiation / J. Guo, C. Walss-Bass, R.F. Ludueña // *Cytoskeleton*. — 2010. — Vol. 67 — № 7. — P. 431-441.
15. Fanara, P. et al. Stabilization of hyperdynamic microtubules is neuroprotective in amyotrophic lateral sclerosis / P. Fanara, J. Banerjee, R.V. Hueck et al. // *Journal of Biological Chemistry*. — 2007. — Vol. 282. — №32. — P. 23465-23472.
16. Gan, P.P. Class III beta-tubulin mediates sensitivity to chemotherapeutic drugs in non small cell lung cancer / P.P. Gan, E. Pasquier, M. Kavallaris // *Cancer Research*. — 2007. — Vol. 67. — №19. — P. 9356-9363.
17. Davies, K.J. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase / K.J. Davies, J.H. Doroshow // *Journal of Biological Chemistry*. — 1986. — Vol. 261. — №7. — P. 3060-3067.
18. Sheldon, K.L. Phosphorylation of voltage-dependent anion channel by serine/threonine kinases governs its interaction with tubulin / K.L. Sheldon, E.N. Maldonado, J.J. Lemasters et al. // *PLoS One*. — 2011. — №6 (10). — e25539.
19. Rostovsteva, T.K. Membrane lipid composition regulates tubulin interaction with mitochondrial voltage-dependent anion channel / T.K. Rostovsteva, P.A. Gurnev, M.Y. Chen, S.M. Bezrukov // *Biological Chemistry*. — 2012. — Vol. 287. — P. 29589-29598.
20. Cicchillitti, L. Proteomic characterization of cytoskeletal and mitochondrial class III beta-tubulin / L. Cicchillitti, R. Penci, M. Di Michele et al. // *Molecular Cancer Therapeutics*. — 2008. — Vol. 7. — №7. — P. 2070-2079.
21. McCarroll, J.A. TUBB3/ β III-tubulin acts through the PTEN/AKT signaling axis to promote tumorigenesis and anoikis resistance in non-small cell lung cancer / J.A. McCarroll, P.P. Gan, R.B. Erlich et al. // *Cancer Research*. — 2015. — Vol. 75. — №2. — P. 415—425.
22. Jordan, A. Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle / A. Jordan, J.A. Hadfield, N.J. Lawrence et al. // *Medicinal Research Reviews*. — 1998. — Vol. 18. — №4. — P. 259-296.
23. Karki, R. β III-Tubulin: biomarker of taxane resistance or drug target? / R. Karki, M. Mariani, M. Andreoli et al. // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. — 2013. — Vol. 17. — № 4 — P. 461-472.
24. Freedman, H. Identification and characterization of an intermediate taxol binding site within microtubule nanopores and a mechanism for tubulin isotype binding selectivity / H.

Freedman, J.T. Huzil, T. Luchko et al. // *Journal of Chemical Information and Modeling*. — 2009. — Vol. 49. — №2. — P. 424-436.

25. Andreoli, M. Identification of the first inhibitor of the GBP1:PIM1 interaction. Implications for the development of a new class of anticancer agents against paclitaxel resistant cancer cells / M. Andreoli, M. Persico, A. Kumar et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. — 2014. — Vol. 57. — №19. — P. 7916-7932.

26. Raspaglio G., Filippetti F., Prislei S. et al. Hypoxia induces class III beta-tubulin gene expression by HIF-1 alpha binding to its 3' flanking region. *Gene* 2008; 409: 1-2: 100—108.

27. Raspaglio, G. HuR regulates beta-tubulin isotype expression in ovarian cancer / G. Raspaglio, I. De Maria, F. Filippetti et al. // *Cancer Research*. — 2010. — Vol. 70. — №14. — P. 5891-5900.

28. Mozzetti, S. Gli family transcription factors are drivers of paclitaxel resistance in ovarian cancer / S. Mozzetti, E. Martinelli, G. Raspaglio et al. // *Biochemical Pharmacology*. — 2012. — Vol. 84. — №11. — P. 1409-1418.

29. Saussède-Aim, J. Beta3-tubulin is induced by estradiol in human breast carcinoma cells through an estrogen-receptor dependent pathway / J. Saussède-Aim, E.L. Matera, C. Ferlini et al. // *Cell Motility and the Cytoskeleton*. — 2009. — Vol. 66. — №7. — P. 378-388.

30. De Gendt, K. Expression of Tubb3, a beta-tubulin isotype, is regulated by androgens in mouse and rat Sertoli cells / K. De Gendt, E. Denoet, A. Willems et al. // *Biology of Reproduction*. — 2011. — Vol. 85 — №5. — P. 934-945.

31. Mariani, M. Gender influences the class III and V β -tubulin ability to predict poor outcome in colorectal cancer / M. Mariani, G.F. Zannoni, S. Sioletic et al. // *Clinical Cancer Research*. — 2012. — Vol. 18. — №10. — P. 2964-2975.

32. Terry, S. Increased expression of class III beta-tubulin in castration-resistant human prostate cancer / S. Terry, G. Ploussard, Y. Allory et al. // *British Journal of Cancer*. — 2009. — Vol. 101. — №6. — P. 951-956.

33. Shibasaki, M. Transcriptional and post-transcriptional regulation of β III-tubulin protein expression in relation with cell cycle-dependent regulation of tumor cells / M. Shibasaki, C. Maesawa, K. Akasaka // *International Journal of Oncology*. — 2012. — Vol. 40 — №3. — P. 695-702.

34. Mariani, M. Class III β -tubulin in normal and cancer tissues / M. Mariani, R. Karki, M. Spennato et al. // *Gene*. — 2015. — Vol. 563. — №2. — P. 109-114.

35. Tischfield, M.A. Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance / M.A. Tischfield, H.N. Baris, C. Wu // *Cell*. — 2010. — Vol. 140. — №1. — P. 74-87.
36. Katsetos, C.D. Tubulins as therapeutic targets in cancer: from bench to bedside / C.D. Katsetos, P. Dráber // *Current Pharmaceutical Design*. — 2012. — Vol. 18. — №19. — P. 2778-2792.
37. Lewis, S.A. Complex regulation and functional versatility of mammalian alpha- and beta-tubulin isotypes during the differentiation of testis and muscle cells / S.A. Lewis, N.J. Cowan // *Journal of Cell Biology*. — 1988. — Vol. 106. — №6. — P. 2023-2033.
38. Peknicova, J. Differential subcellular distribution of tubulin epitopes in boar spermatozoa: recognition of class III-tubulin epitope in sperm tail / J. Peknicova, A. Kubatova, V. Sulimenko et al. // *Biology of reproduction*. — 2001. — Vol. 65. — №3. — P. 672-679.
39. Locher, H. TUBB3: Neuronal Marker or Melanocyte Mimic? / H. Locher, J.H. Frijns, M.A. Huisman, S.M. de Sousa Lopes // *Cell Transplantation*. — 2014. — Vol. 23. — №11. — P. 1471-1473.
40. Yu, H. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles / H. Yu, D. Fang, S.M. Kumar et al. // *American Journal of Pathology*. — 2006. — Vol. 168. — № 6. — P. 1879-1888.
41. Katsetos, C.D. Localization of the neuronal class III beta-tubulin in oligodendrogliomas: comparison with Ki-67 proliferative index and 1p/19q status / C.D. Katsetos, L. Del Valle, J.F. Geddes et al. // *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. — 2002. — Vol. 61. — №4. — P. 307-320.
42. Katsetos, C.D. On the neuronal/neuroblastic nature of medulloblastomas: a tribute to Pio del Rio Hortega and Moises Polak / C.D. Katsetos, L. Del Valle, A. Legido et al. // *Acta Neuropathologica*. — 2003. — Vol. 105. — №1. — P. 1-13.
43. Packer, R.J. Prognostic importance of cellular differentiation in medulloblastoma of childhood / R.J. Packer, L.N. Sutton, L.B. Rorke et al. // *Journal of Neurosurgery*. — 1984. — Vol. 61. — №2 — P. 296-301.
44. Ikota, H. Systematic immunohistochemical profiling of 378 brain tumors with 37 antibodies using tissue microarray technology / H. Ikota, S. Kinjo, H. Yokoo et al. // *Acta Neuropathologica*. — 2006. — Vol. 111. — №5. — P. 475-482.
45. Katsetos, C.D. Aberrant localization of the neuronal class III beta-tubulin in astrocytomas / C.D. Katsetos, L. Del Valle, J.F. Geddes // *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. — 2001. — Vol. 125. — №5. — P. 613-624.

46. Katsetos, C.D. Targeting β III-tubulin in glioblastoma multiforme: from cell biology and histopathology to cancer therapeutics / C.D. Katsetos, P. Draber, M. Kavallaris // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. — 2011. — Vol. 11. — №8. — P. 719-728.
47. Jirásek, T. Expression of class III beta-tubulin in malignant epithelial tumours: an immunohistochemical study using TU-20 and TuJ-1 antibodies / T. Jirásek, E. Pisarikova, V. Viklicky et al. // *Folia Histochemica et Cytobiologica*. — 2007. — Vol. 45. — №1 — P. 41-45.
48. Kavallaris, M. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes / M. Kavallaris, D.Y. Kuo, C.A. Burkhart et al. // *Journal of Clinical Investigation*. — 1997. — Vol. 100. — №5. — P.1282-1293.
49. Mozzetti, S. Class III beta-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients / S. Mozzetti, C. Ferlini, P. Concolino et al. // *Clinical Cancer Research*. — 2005. — Vol. 11. — №1. — P. 298-305.
50. Ferrandina, G. Class III -Tubulin Overexpression Is a Marker of Poor Clinical Outcome in Advanced Ovarian Cancer Patients / G. Ferrandina, G.F. Zannoni, E. Martinelli et al. // *Clinical Cancer Research*. — 2006. — Vol. 12. — №9. — P. 2774-2779.
51. Su, D. Stathmin and tubulin expression and survival of ovarian cancer patients receiving platinum treatment with and without paclitaxel / D. Su, S.M. Smith, M. Preti et al. // *Cancer*. — 2009. — Vol. 115. — №11. — P. 2453-2463.
52. Umezu, T. Taxol resistance among the different histological subtypes of ovarian cancer may be associated with the expression of class III beta-tubulin / T. Umezu, K. Shibata, H. Kajiyama et al. // *International Journal of Gynecological Pathology*. — 2008. — Vol. 27. — №2. — P. 207-212.
53. Aoki, D. Overexpression of class III beta-tubulin predicts good response to taxane-based chemotherapy in ovarian clear cell adenocarcinoma / D. Aoki, Y. Oda, S. Hattori et al. // *Clinical Cancer Research*. — 2009. — Vol.15. — №4. — P. 1473-1480.
54. Jakobsen, J.N. Longitudinal assessment of TUBB3 expression in non-small cell lung cancer patients / J.N. Jakobsen, E. Santoni-Rugiu, J.B. Sørensen // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. — 2014. — Vol. 73. — №1. — P. 43-51.
55. Jakobsen, J.N. Use of TUBB3 for patient stratification and prognosis in lung cancer / J.N. Jakobsen, E. Santoni-Rugiu, J.B. Sørensen // *Lung Cancer Management*. — 2015. — Vol. 4. — №2. — P. 97-110.
56. Lebok, P. High levels of class III β -tubulin expression are associated with aggressive tumor features in breast cancer / P. Lebok, M. Öztürk, U. Heilenkötter et al. // *Oncology Letters*. — 2016. — Vol. 11. — №3. — P. 1987-1994.

57. Kanojia, D. β III-Tubulin Regulates Breast Cancer Metastases to the Brain / D. Kanojia, R.A. Morshed, L. Zhang et al. // *Molecular Cancer Therapeutics*. — 2015. — Vol. 14. — №5. — P. 1152-1161.
58. Urano, N. Clinical significance of class III beta-tubulin expression and its predictive value for resistance to docetaxel-based chemotherapy in gastric cancer // N. Urano, Y. Fujiwara, Y. Doki et al. // *International Journal of Oncology*. — 2006. — Vol. 28. — №2. — P. 375-381.
59. Gao, J. Thymidine Phosphorylase/ β -tubulin III expressions predict the response in Chinese advanced gastric cancer patients receiving first-line capecitabine plus paclitaxel / J. Gao, M. Lu, J.W. Yu et al. // *BMC Cancer*. — 2011. — Vol. 11: 177.
60. Jirásek, T. Expression of class III beta-tubulin in colorectal carcinomas: an immunohistochemical study using TU-20 & TuJ-1 antibody / T. Jirásek, S. Cipro, A. Musilová et al. // *The Indian Journal of Medical Research*. — 2009. — Vol. 129. — №1. — P. 89-94.
61. Sun, H. Expressions of TUBB3 and gamma-synuclein in colorectal adenocarcinoma and their clinical significance / H. Sun, L. Shi, X. He, S. Zheng // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. — 2015. — Vol. 95. — №16. — P. 1242-1244.
62. Портянко, А.С. Ремоделирование цитоскелета в патогенезе и прогрессии аденокарциномы и хронических воспалительных заболеваний толстой кишки: дис. ...д-ра. биол. наук: 14.03.02 / Портянко Анна Сергеевна. — Минск, 2016. — 212 с.
63. Egevad, L. Beta-tubulin III expression in prostate cancer / L. Egevad, A. Valdman, N.P. Wiklund et al. // *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*. — 2010. — Vol. 44. — №6. — P. 371-377.
64. Ploussard, G. Class III beta-tubulin expression predicts prostate tumor aggressiveness and patient response to docetaxel-based chemotherapy / G. Ploussard, S. Terry, P. Maillé et al. // *Cancer Research*. — 2010. — Vol. 70. — №22. — P. 9253-9264.
65. Hinsch, A. β III-tubulin overexpression is linked to aggressive tumor features and genetic instability in urinary bladder cancer / A. Hinsch, A. Chaker, C. Burdelski et al. // *Human Pathology*. — 2017. — Vol. 61. — P. 210-220.
66. Quaas, A. β III-tubulin overexpression is linked to aggressive tumor features and shortened survival in clear cell renal cell carcinoma / A. Quaas, A.H. Rahvar, C. Burdelski // *World Journal of Urology*. — 2015. — Vol. 33. — №10. — P.1561-1569.
67. Ferrandina, G. Expression of class III beta tubulin in cervical cancer patients administered preoperative radiochemotherapy: correlation with response to treatment and clinical outcome / G. Ferrandina, E. Martinelli, G.F. Zannoni et al. // *Gynecologic oncology*. — 2007. — Vol. 104. — №2. — P. 326-330.

68. Koh, Y. Class III beta-tubulin, but not ERCC1, is a strong predictive and prognostic marker in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma / Y. Koh, T.M. Kim, Y.K. Jeon et al. // *Annals of Oncology*. — Vol. 2009. — Vol. 20. — №8. — P. 1414-1419.
69. Kaira, K. Expression of Excision Repair Cross-Complementation Group 1, Breast Cancer Susceptibility 1, and β III-Tubulin in Thymic Epithelial Tumors / K. Kaira, M. Serizawa, Y. Koh et al. // *Journal of Thoracic Oncology*. — 2011. — Vol. 6. — №3. — P. 606-613.
70. Akasaka, K. Loss of class III beta-tubulin induced by histone deacetylation is associated with chemosensitivity to paclitaxel in malignant melanoma cells / K. Akasaka, C. Maesawa, M. Shibasaki et al. // *Journal of Investigative Dermatology*. — 2009. — Vol. 129. — №6. — P. 1516-1526.
71. Miyamoto, A. Immunohistochemical study of HER2 and TUBB3 proteins in extramammary Paget disease / A. Miyamoto, K. Akasaka, H. Oikawa et al. // *American Journal of Dermatopathology*. — 2010. — Vol. 32. — №6. — P. 578-585.
72. Ishida, M. Aberrant expression of class III beta-tubulin in basal cell carcinoma of the skin / M. Ishida, R. Kushima, H. Okabe // *Oncology reports*. — 2009. — Vol. 22. — №4. — P. 733-737.
73. Powell, S. High expression of class III β tubulin in small cell lung carcinoma / S. Powell, A. Kaizer, J.S. Koopmeiners et al. // *Oncology Letters*. — 2013. — Vol. 7. — №2. — P. 405-410.
74. Ting, S. ERCC1, MLH1, MSH2, MSH6, and betaIII-tubulin: resistance proteins associated with response and outcome to platinum-based chemotherapy in malignant pleural mesothelioma / S. Ting, F.D. Mairinger, T. Hager et al. // *Clinical Lung Cancer*. — 2013. — Vol. 14. — №5. — P. 558-567.
75. Yoon, S.O. Class III beta-tubulin shows unique expression patterns in a variety of neoplastic and non-neoplastic lymphoproliferative disorders / S.O. Yoon, W.Y. Kim, H. Go et al. // *The American journal of surgical pathology*. — 2010. — Vol. 34. — №5. — P. 645-655.
76. Okuda, K. Expression of excision repair cross-complementation group 1 and class III beta-tubulin predict survival after chemotherapy for completely resected non-small cell lung cancer / K. Okuda, H. Sasaki, C. Dumontet et al. // *Lung Cancer*. — 2008. — Vol. 62. — №1. — P. 105-112.
77. Kang, C.H. The prognostic significance of ERCC1, BRCA1, XRCC1, and beta III-tubulin expression in patients with non-small cell lung cancer treated by platinum- and taxane-based neoadjuvant chemotherapy and surgical resection / C.H. Kang, B.G. Jang, D.W. Kim et al. // *Lung Cancer*. — 2010. — Vol. 68. — №3. — P. 478-483.

78. Azuma, K. Expression of ERCC1 and class III β -tubulin in non-small cell lung cancer patients treated with carboplatin and paclitaxel / K. Azuma, T. Sasada, A. Kawahara et al. // *Lung Cancer*. — 2009. — Vol. 64. — №3. — P. 326-333.
79. Ikeda, S. Expression of ERCC1 and class IIIbeta tubulin for predicting effect of carboplatin/paclitaxel in patients with advanced inoperable non-small cell lung cancer / S. Ikeda, K. Takabe, K. Suzuki // *Pathology International*. — 2009. — Vol. 59. — №12. — P. 863-867.
80. Zhang, Q. A prospective study of biomarker-guided chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer / Q. Zhang, X. Zhu, L. Zhang et al. // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. — 2014. — Vol. 74. — №4. — P. 839-846.
81. Chen, X. Measuring β -tubulin III, Bcl-2, and ERCC1 improves pathological complete remission predictive accuracy in breast cancer / X. Chen, J. Wu, H. Lu et al. // *Cancer Science*. — 2012. — Vol. 103. — №2. — P. 262-268.
82. L.J. Leandro-García. Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isotypes / L.J. Leandro-García, S. Leskelä, I. Landa et al. // *Cytoskeleton*. — 2010. — Vol. 67. — №4. — P. 214-223.
83. И.А. Мамичев. 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 и др. // *Российский биотерапевтический журнал*. — 2016. — Т. 15. — №2. — С. 16-18.
84. Xu, Y.C. RRM1, TUBB3, TOP2A, CYP19A1, CYP2D6: Difference between mRNA and protein expression in predicting prognosis of breast cancer patients / Y.C. Xu, F.C. Zhang, J.J. Li et al. // *Oncology Reports*. — 2015. — Т. 34. — №4. — С. 1883-1894.
85. Способ иммунофлуоресцентного анализа маркеров множественной лекарственной резистентности в солидных опухолях человека // Патент России № 2413948. 2011. Бюл. № 7. / Богущ Т.А., Дудко Е.А., Тихомиров М.В. [и др.].
86. Богущ, Т.А. Количественное иммунофлуоресцентное определение экспрессии Pgp в солидных опухолях человека с использованием метода проточной цитофлуориметрии / Т.А. Богущ, М.В. Тихомиров, Е.А. Дудко и др. // *Вестник Московского Университета, серия 2. Химия*. — 2012. — Т. 53. — №3. — С. 207-215.
87. Богущ, Т.А. Молекулярные особенности асцитных клеток рака яичников, выявляемые при иммунофлуоресцентном анализе с привлечением проточной цитофлуориметрии / Т.А. Богущ, С.А. Калюжный, Е.А. Дудко и др. // *Вестник Московского Университета, серия 2. Химия*. — 2016. — Т. 57. — №5. — С.330-335.

88. Способ иммунофлуоресцентного анализа белка эксцизионной репарации ERCC1 в солидных опухолях человека // Патент России № 2563116. 2015. Бюл. №26 / Богуш Т.А., Дудко Е.А., Калюжный С.А. [и др.].
89. Богуш, Т.А. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии ERCC1, маркера репарации повреждений ДНК, в образцах опухолей, заключенных в парафиновые блоки / Т.А. Богуш, Е.А. Дудко, А.Н. Гришанина и др. // Доклады академии наук. — 2017. — Т. 472. — №2. — С. 215-218.
90. Богуш, Т.А. Анализ информативности методов иммуногистохимии и проточной цитофлуориметрии при оценке экспрессии эстрогеновых рецепторов альфа / Т.А. Богуш, Е.А. Дудко, М.В. Родионова и др. // Доклады Академии Наук. — 2015. — Т. 465. — №2. — С. 235-240.
91. Способ иммунофлуоресцентного анализа эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека // Патент России № 2429481. 2011. Бюл. №26 / Богуш Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А. [и др.].
92. Дудко, Е.А. Эпителиально-мезенхимальный переход в серозном раке яичников / Е.А. Дудко, А.А. Арефьева, С.А. Калюжный и др. // Российский биотерапевтический журнал. — 2017. — Т.16. — №1. — С.33.
93. Давыдов, М.М. Количественная оценка экспрессии TUBB3 в ткани аденокарциномы и плоскоклеточного рака лёгкого / М.М. Давыдов, И.А. Мамичев, Т.А. Богуш и др. // Российский биотерапевтический журнал. — 2016. — Т.15. — №3. — С.95-98.
94. Калюжный, С.А. Количественный иммунофлуоресцентный анализ белка RRM1 в ткани рака яичников методом проточной цитофлуориметрии / С.А. Калюжный, Е.А. Дудко, В.Т. Заркуа и др. / Российский биотерапевтический журнал. — 2016. — Т.15. — №3. — С.87-89
95. Богуш, Т.А. Количественная оценка уровня экспрессии белка BRCA1 в ткани рака молочной железы с использованием метода проточной цитофлуориметрии / Т.А. Богуш, Е.А. Дудко, Е.А. Шестакова и др. // Российский биотерапевтический журнал. — 2016. — Т.15. — №4. — С. 42-45.
96. Bagwell, B. A journey through flow cytometric immunofluorescence analyses – Finding accurate and robust algorithms that estimate positive fraction distributions / B. Bagwell // Clinical Immunology Newsletter. — 1996. — Vol.16. — №33. — P. 33-37.
97. Lampariello, F. On the use of the Kolmogorov-Smirnov statistical test for immunofluorescence histogram comparison / F. Lampariello // Cytometry. — 2000. — Vol. 39. — №3. — P.179-188.

98. Young, I.T. Proof without prejudice: Use of Komogorov-Smirnov test for the analysis of histograms from flow systems and other sources/ I.T. Young // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. — 1977. — Vol. 25. — №7. — P. 935-941.
99. Ault, K. Detection of small numbers of monoclonal B lymphocytes in the blood of patients with lymphoma / K. Ault // *New England Journal of Medicine*. — 1979. — Vol. 300. — P. 1401-1405.
100. Overton, R.W. Modified histogram subtraction technique for analysis of flow cytometry data / R.W. Overton // *Cytometry*. — 1988. — Vol. 9. — P. 619-626.
101. Leith, C. P. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study / C.P. Leith, K.J. Kopecky, I.M. Chen, L. Eijdemis et al. // *Blood* — 1999. — Vol. 94. — P.1086-1099.
102. Lu, M.C. Increased multidrug resistance-associated protein activity in mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus / M.C. Lu, Lai N.S., K.J. Li, S.C. Hsieh et al. // *Clinical and Experimental Rheumatology*. — 2008. — Vol. 26. — №4. — P. 638-645.
103. Inoue, M. Impaired expression of MHC class II molecules in response to interferon-gamma (IFN-gamma) on human thymoma neoplastic epithelial cells / M. Inoue, M. Okumura, S. Miyoshi, et al. // *Clinical and Experimental Immunology*. — 1999. — Vol. 117. — №7. — P. 1-7.
104. Peake, S.T. Homing marker expression on circulating dendritic cells correlates with different phenotypes of Crohn's disease / S.T. Peake, D. Bernardo, S.C. Knight, A.L. Hart. // *Journal of Crohn's and Colitis*. — 2012. — Vol.7. — №7. — P.594-596.
105. Wood, J.C.S. Non-Parametric Comparison of Single Parameter Histograms / J.C.S. Wood // *Current Protocols in Cytometry* — 2018. — Vol. 83. — P. 10.20.1-10.20.20.
106. Гржибовский А.М. Типы данных, проверка распределения и описательная статистика / А.М. Гржибовский // *Экология человека*. — 2008. — № 1. — С. 52—58.
107. Гржибовский А.М. Анализ трех и более независимых групп количественных данных / А.М. Гржибовский // *Экология человека*. — 2008. — № 3. — С. 50—58
108. Унгурияну, Т.Н. Краткие рекомендации по описанию, статистическому анализу и представлению данных в научных публикациях / Т.Н. Унгурияну, А.М. Гржибовский // *Экология человека*. — 2011. — № 5. — С. 55-60.
109. Schemper, M. A note on quantifying follow-up in studies of failure time. / M. Schemper, T.L. Smith // *Controlled Clinical Trials*. — 1996. — Vol. 17. — №4. — P.343-346.
110. Трахтенберг, А.Х. Рак легкого. / А.Х. Трахтенберг, К.И. Колбанов. — Москва. : Геотар Медиа. — 2012. — 160 с.

111. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. — Москва. : ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России. — 2018. — 96 с.
112. Колбанов, К.И. Хирургическое лечение больных резектабельным немелкоклеточным раком легкого / К.И. Колбанов, А.Х. Трахтенберг, О.В. Пикин и др. // Исследования и Практика в Медицине. — 2014. — Т.1. — №1. — С.16-23.
113. Трахтенберг, А.Х. Рак легкого. / А.Х. Трахтенберг. — Москва. : Медицина. — 1987. — 304 с.
114. Beal, J. Biochemical complexity drives log-normal variation in genetic expression / J. Beal // Engineering Biology. — 2017. — Vol.1. — №1. — С. 55–60.
115. Person, F. Prevalence of β III-tubulin (TUBB3) expression in human normal tissues and cancers / F. Person, W. Wilczak, C. Hube-Maqq et al. // Tumor Biology. — 2017. — Vol.39. — №10. — P. 1-11.
116. Окбах, А.А. Морфометрические характеристики немелкоклеточного рака легкого у мужчин / А.А. Окбах, О.А. Голубев, Р.В. Дорошенко и др. // Проблемы здоровья и экологии. — 2005. — Т.5. — №3. — С.62-65.
117. Saussede-Aim, J. Beta3-tubulin is induced by estradiol in human breast carcinoma cells through an estrogen-receptor dependent pathway / J. Saussede-Aim, E.L. Matera, C. Ferlini et al. // Cell Motility and the Cytoskeleton. — 2009. — Vol. 66. — №7. — P. 378-388.
118. Reiman, T. 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 / T. Reiman, R. Lai, A.S. Veillard et al. // Annals of Oncology. — 2012. — Vol. 23. — №1. — P. 86-93.
119. Hirsch, F.R. The prognostic and predictive role of histology in advanced non-small cell lung cancer: a literature review / F.R.Hirsch, A. Spreafico, S. Novello et al. // Journal of Thoracic Oncology. — 2008. — Vol.3 — №12. — P. 1468-1481.
120. Akhshi, T.K. Microtubules and actin crosstalk in cell migration and division / T.K. Akhshi, D. Wernike, A. Piekny // Cytoskeleton. — 2014. — Vol. 71. — № 1. — P. 1-23.
121. Портянко, А.С. β III-тубулин — потенциальная мишень для подавления инвазивной активности злокачественных эпителиальных опухолей / А.С. Портянко, С.Т. Акалович, Т.М. Дорошенко // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2015. — Т.78. — №8. — С. 25-28.

122. Garcia, S.B. Field cancerization, clonality, and epithelial stem cells: the spread of mutated clones in epithelial sheets / S.B. Garcia, H.S. Park, M. Novelli, N.A. Wright // *Journal of Pathology* — 1999. — Vol. 187. — P. 61-81.
123. Slaughter, D.P. «Field cancerization» in oral stratified squamous epithelium / D.P. Slaughter, H.W. Southwick, W. Smejkal // *Cancer*. — 1953. — Vol. 6. — P. 963-968.
124. Hockel, M. The hydra phenomenon of cancer: why tumors recur locally after microscopically complete resection / M. Hockel, N. Dornhofer // *Cancer Research*. — 2005. — Vol. 65. — P. 2997-3002.
125. Jassem, J. P53 and K-ras mutations are frequent events in microscopically negative surgical margins from patients with nonsmall cell lung carcinoma / J. Jassem, E. Jassem, J. Jakobkiewicz-Banecka et al. // *Cancer*. — 2004. — Vol. 100. — P. 1951-1960.
126. Krasilnikov, M. A. Exosomes and Development of Tumor Cell Resistant Phenotype // M. A. Krasilnikov, A.M. Scherbakov, S.E. Semina // *Siberian journal of oncology*. — 2018. — Vol. 17. — №2. — P. 49-59.
127. Liang, B. Characterization and proteomic analysis of ovarian cancer-derived exosomes / B. Liang, P. Peng, S. Chen et al. // *J. Proteomics*. — 2013. — Vol. 80. — P. 171-182.
128. Varlotto, J.M. Local and distal failure rates and pattern of recurrence in stage II-N1 surgically-resected non-small-cell carcinoma of the lungs / J.M. Varlotto, L.N. Medford-Davis, J. Flickinger et al. // *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. — 2009. — Vol.75. — №3. — P. 36.
129. Feng, W. Patterns of local-regional failure in completely resected stage IIIa (N2) non-small cell lung cancer cases: implications for postoperative radiation therapy clinical target volume design / W. Feng, X. Fu, X. Cai et al. // *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. — 2001. — V.88. — №5. — P. 1100-1107.
130. Троценко, С.Д. Послеоперационная лучевая терапия немелкоклеточного рака легкого в режиме среднего фракционирования: дис. ...канд. мед. наук: 14.01.13 / Троценко Сергей Дмитриевич — М., 2016 — 133 с.
131. Daijo, H. Cigarette smoke reversibly activates hypoxia-inducible factor 1 in a reactive oxygen species-dependent manner / H. Daijo, Y. Hoshino, S. Kai et al. // *Scientific Reports*. — 2016. — Vol. 6. — №34424. — P. 1-12.
132. Щербаков, А.М. Современные тенденции паллиативного лечения больных раком пищевода / А.М. Щербаков, Н.Н. Симонов, С.В. Канаев // *Практическая онкология*. — 2003. — Т.4. — № 2. — С. 91-98.

133. Скворцов, М. Б. Рак пищевода: хирургическое лечение / М. Б. Скворцов // Сибирский медицинский журнал — 2011. — № 4. — С. 21-30.
134. Yang, Q. Expression of Rac-1 related to tumor depth, lymph node metastasis and patient prognosis in esophageal squamous cell carcinoma / Q. Yang, G.Y. Luo, Y. Li et al. // Medical Oncology — 2013. — Vol. 30. — №4. — P. 689.
135. Lee, H.Y. High KLF4 level in normal tissue predicts poor survival in colorectal cancer patients / H.Y. Lee, J.B. Ahn, S.Y. Rha et al. // World J Surg Oncol. — 2014. — Vol. 12. — P. 232.
136. Боброва, Т.С. Исследование опухоли-ассоциированных белков в тканях и сыворотках крови больных карциномами молочной железы / Т.С. Боброва, Ю.В. Чуев // Медицинская иммунология. — 2006. — Т. 8. — № 5-6. — С. 645-652.
137. Dahl, E. Molecular profiling of laser-microdissected matched tumor and normal breast tissue identifies karyopherin alpha2 as a potential novel prognostic marker in breast cancer / E. Dahl, G. Kristiansen, K. Gottlob et al. // Clinical Cancer Research. — 2006. — Vol. 12. — P. 3950-3960.
138. Хышиктуев, Б.С. Фосфолипидный состав различных участков пораженного органа при раке легкого / Б.С. Хышиктуев, Ю.Р. Агапова, И.В. Жилин, В.Н. Иванов // Вопросы медицинской химии. — 1999. — Т. 44. — №4. — С. 350-354.
139. Aran, D. Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes / D. Aran, R. Camarda, J. Odegaard et al. // Nature Communications. — 2017. — Vol. 8. — №1. — P. 1077.