

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 616.24 – 006.6 – 073 – 092.4

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВО *IN VIVO*
ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ БЕТА-III ТУБУЛИНА
(TUBB3) КАК МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКЁРА МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ
АГРЕССИВНОСТИ ОПУХОЛИ**

Анна Николаевна Гришанина¹, Татьяна Анатольевна Богуш¹, Сергей Андреевич Калюжный¹, Александр Михайлович Щербаков^{1,2}, Елена Александровна Богуш³, Михаил Яковлевич Мельников⁴, Вячеслав Станиславович Косоруков¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, Россия

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Автор, ответственный за переписку: Татьяна Анатольевна Богуш,
tatbogush@mail.ru

Аннотация. Сравнительная иммунофлуоресцентная оценка экспрессии TUBB3 в первичной и метастатической тканях перевиваемых опухолей мышей выявила значительное увеличение уровня и интенсивности экспрессии TUBB3 в высоко метастазирующем раке легкого Льюис по сравнению с опухолью РЛ-67 с меньшей метастатической активностью. Полученные данные являются *in vivo* экспериментальным доказательством вклада опухоль-ассоциированного белка TUBB3 в формирование метастатического потенциала опухоли и указывают на его значимость как прогностического маркёра агрессивности течения болезни.

Ключевые слова: бета-III тубулин (TUBB3), рак легкого Льюис, рак легкого РЛ-67, первичная опухоль, метастазы, иммунофлуоресцентный анализ, проточная цитометрия

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2025-66-5-401-408

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-25-20080, <https://rscf.ru/project/24-25-20080/>).

Для цитирования: Гришанина А.Н., Богуш Т.А., Калюжный С.А., Щербаков А.М., Богуш Е.А., Мельников М.Я., Косоруков В.С. Экспериментальное доказательство прогностической значимости бета-III тубулина (TUBB3) как молекулярного маркёра метастатической активности опухоли // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 66. № 5. С. 401–408.

ORIGINAL ARTICLE

EXPERIMENTAL IN VIVO EVIDENCE OF THE PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF BETA-III TUBULIN (TUBB3) AS A MOLECULAR MARKER OF TUMOR METASTATIC AGGRESSIVENESS

Anna N. Grishanina¹, Tatiana A. Bogush¹, Sergey A. Kaliuzhny¹, Alexander M. Scherbakov^{1,2}, Elena A. Bogush³, Mikhail Ya. Melnikov⁴, Vyacheslav S. Kosorukov¹

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

² Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

³ The State Education Institution of Higher Professional Training The First Sechenov Moscow State Medical University under Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Correspondence author: Tatiana Anatolievna Bogush, tatbogush@mail.ru

Abstract. Comparative immunofluorescence assessment of TUBB3 expression in primary and metastatic tissue of transplanted mouse tumors revealed a significant increase in the level and intensity of TUBB3 expression in highly metastatic Lewis lung cancer compared to the RL-67 tumor with less metastatic activity. The data obtained are *in vivo* experimental evidence of the contribution of tumor-associated protein TUBB3 to the cancer metastatic potential and indicate its significance as a prognostic marker of the aggressiveness of the disease.

Keywords: beta-III tubulin (TUBB3), Lewis lung carcinoma, RL-67 lung carcinoma, primary tumor, metastases, immunofluorescence analysis, flow cytometry

Financial Support. The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation № 24-25-20080, <https://rscf.ru/project/24-25-20080/>.

For citation: Grishanina A.N., Bogush T.A., Kaliuzhny S.A., Scherbakov A.M., Bogush E.A., Melnikov M.Ya., Kosorukov V.S. Experimental in vivo evidence of the prognostic significance of beta-III tubulin (TUBB3) as a molecular marker of tumor metastatic aggressiveness // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Khimiya. 2025. T. 66. № 4. S. 401–408.

В настоящее время одним из трендов, направленных на повышение эффективности лекарственной терапии опухолей разного генеза, является расширение спектра молекулярных прогностических и предиктивных маркеров опухолей. В этой связи значительный интерес представляет белок микротрубочек бета-III тубулин (TUBB3), который характеризуется тканевой специфичностью. Белок практически не выявляется в нормальных эпителиальных клетках и лишь с низкой интенсивностью экспрессируется в эндотелиоцитах и макрофагах [1, 2]. В норме значительная экспрессия TUBB3 выявлена только в клетках мозга [3, 4] и в клетках Сертоли [5, 6]. Что касается опухолей, то в тка-

ни практически всех нозологических форм новообразований выявляется высокая экспрессия TUBB3 [7–9].

Изучение TUBB3 на культурах клеток опухолей разных локализаций выявило значимые с точки зрения возможного практического применения характеристики этого белка. В частности, показано, что гиперэкспрессия TUBB3 приводит к активации метастатического потенциала и пролиферативной активности клеток, повышает адаптацию клеток к стрессу, индуцирует резистентность к анойкису и к широкому кругу противоопухолевых лекарств, включая классические цитостатики с разным механизмом действия и современные таргетные препараты [10].

Несовпадение данных *in vitro* о вкладе TUBB3 в биологию опухолевой клетки с оценкой клинической значимости TUBB3 как молекулярного маркера агрессивности эпителиальных новообразований в трансляционных исследованиях [10] побудило нас получить доказательство прогностической значимости экспрессии TUBB3 *in vivo* в экспериментах на животных.

Объектом молекулярного изучения явилась опухолевая ткань двух штаммов рака легкого, принципиально различающихся по активности метастазирования в легкие после подкожной трансплантации мышам – высоко метастазирующий рак легкого Льюис и менее агрессивная опухоль РЛ-67 [11]. Для того, чтобы максимально приблизить дизайн опытов на животных к условиям экспериментов *in vitro*, проведено сравнительное молекулярное фенотипирование первичной и метастатической тканей опухоли с использованием количественного иммуофлуоресцентного метода, ассоциированного с точной цитометрией.

Материалы и методы

Исследование проведено на самках мышей линии BDF1 и самцах мышей линии C₅₇BL/6 массой тела 22–24 г в возрасте 2–3 мес. с подкожно трансплантированным по стандартной методике раком легкого Льюис (РЛ Льюис) или РЛ-67 [11].

Животные из разведения мышей экспериментально-биологической лаборатории (виварий) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России содержались на брикетированном корме с постоянным доступом к воде. В ходе работы соблюдены требования этических норм работы с лабораторными животными.

Экспрессия TUBB3 оценена в четырех группах сравнения: первичный подкожный узел РЛ Льюис vs РЛ-67; метастазы в легком на 24-е сут. после подкожной трансплантации РЛ Льюис vs РЛ-67; первичный подкожный узел vs метастазы в легком РЛ Льюис; первичный подкожный узел vs метастазы в легком РЛ-67. Все эксперименты проведены в трех повторах.

Одноклеточную суспензию клеток для проведения иммуофлуоресцентной количественной оценки показателей экспрессии TUBB3 в опухолевой ткани готовили так, как описано ранее [12].

Исследованы три показателя экспрессии белка: (1) уровень экспрессии – количество специфиче-

чески флуоресцирующих клеток (%) относительно положительного контроля (инкубация клеток только с вторичными антителами); (2) интенсивность экспрессии – средняя геометрическая флуоресценция клеток за вычетом показателя положительного контроля (усл. ед); (3) индекс – интегральный показатель, равный произведению интенсивности и уровня экспрессии, деленному на 100 (усл. ед).

Инкубацию клеток с первичными антителами к TUBB3 проводили в течение 1,5 ч в темноте при комнатной температуре. Затем клетки отмывали от свободных антител 0,5%-м раствором бычьего сывороточного альбумина BSA («ПанЭко», Россия) в фосфатном буфере (pH 7,4), добавляли вторичные антитела и инкубировали в течение 1,5 ч при 4 °С. Для выведения из анализа дебриса 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 пробы дважды отмывали раствором BSA, на второй раз оставляя в пробирке 300 мкл жидкости для проточного цитометра.

Измерение флуоресценции проведено на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США) с применением программного обеспечения Navios Software. Обработка результатов проведена в программах FlowJo 10.0.8 (FlowJo, США) и WinMDI 2.9 (WinMDI Software, США).

Статистическая обработка результатов проведена в программе GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, США). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

С учетом того, что в процессе длительного хранения трансплантируемых опухолей и многократных трансплантаций опухолевых клеток животным не исключена возможность изменения их биологических характеристик, на первом этапе исследования проведен анализ метастатической активности исследуемых опухолевых штаммов, точнее, различий между ними. На рис. 1 представлены фотографии легких мышей спустя 24 сут. после подкожной трансплантации 1×10^5 клеток РЛ Льюис (рис. 1-1) или РЛ-67 (рис. 1-2). Видно, что на этот срок наблюдения можно визуально оценить выраженность метастатического поражения легких. Сравнение опухолевых штаммов по этим показателям

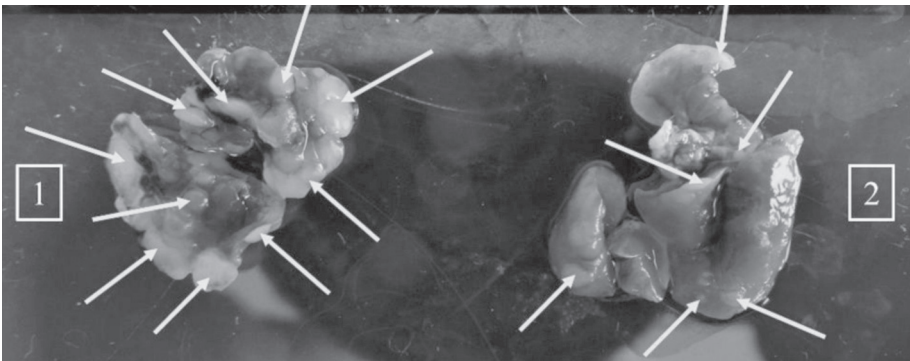


Рис. 1. Визуализация метастатической активности перевиваемых опухолей мышей – рак легкого штаммов Льюис и РЛ-67 (1 и 2 – легкие мыши спустя 24 сут. после подкожной трансплантации 1×10^5 клеток РЛ Льюис и РЛ-67 соответственно; отмеченные стрелками светлые участки ткани – метастазы)

указывает на значительно более выраженный процесс метастатического поражения легких у мышей с трансплантированной опухолью Льюис, чем у мышей с РЛ-67. По существу, это согласуется с ранее описанной характеристикой этих опухолей [11] и подтверждает адекватность экспериментальных моделей, выбранных для проведения настоящего исследования.

Результаты сравнительной оценки количественных показателей экспрессии TUBB3 в ткани первичного узла опухоли Льюис и РЛ-67, а также в ткани метастазов в легком на 24-е сут. после трансплантации опухоли представлены в таблице. Здесь обращает на себя внимание практически полное совпадение всех показателей экспрессии TUBB3 в первичной

Показатели экспрессии TUBB3 в ткани первичной опухоли и метастазов в легком РЛ Льюис и РЛ-67

Группы сравнения	Показатели экспрессии TUBB3		
	уровень, %	интенсивность, усл. ед	индекс, усл. ед
первичный узел vs метастазы в легком			
РЛ Льюис	37±8,1 vs 40±1,2	69,5±5,8 vs 67±20,8	26,1±7,8 vs 27±9,1
РЛ-67	21±4,2 vs 23±4,5	18,2±5,6 vs 27±6,5	4,1±2,4 vs 6,4±2,3
первичный подкожный опухолевый узел			
РЛ Льюис	37±8,1	69,5±5,8	26,1±7,8
РЛ-67	21±4,2	18,2±5,6	4,1±2,4
РЛ Льюис vs РЛ-67	↓ 1.8*	↓ 3.8*	↓ 6.4*
метастазы в легком			
РЛ Льюис	40±1,2	67±20,8	27±9,1
РЛ-67	23±4,5	27±6,5	6,4±2,3
РЛ Льюис vs РЛ-67	↓ 1.7*	↓ 2.5*	↓ 4.2*

* Различия между группами сравнения достоверны ($p < 0,05$).

и метастатической тканях двух исследованных штаммов опухолей. Так, в РЛ Льюис уровень экспрессии маркёра в подкожном опухолевом

узле и в ткани метастазов в легких составил соответственно $37\pm8,1$ и $40\pm1,2\%$, интенсивность – $69,5\pm5,8$ и $67\pm20,8$ усл. ед, индекс

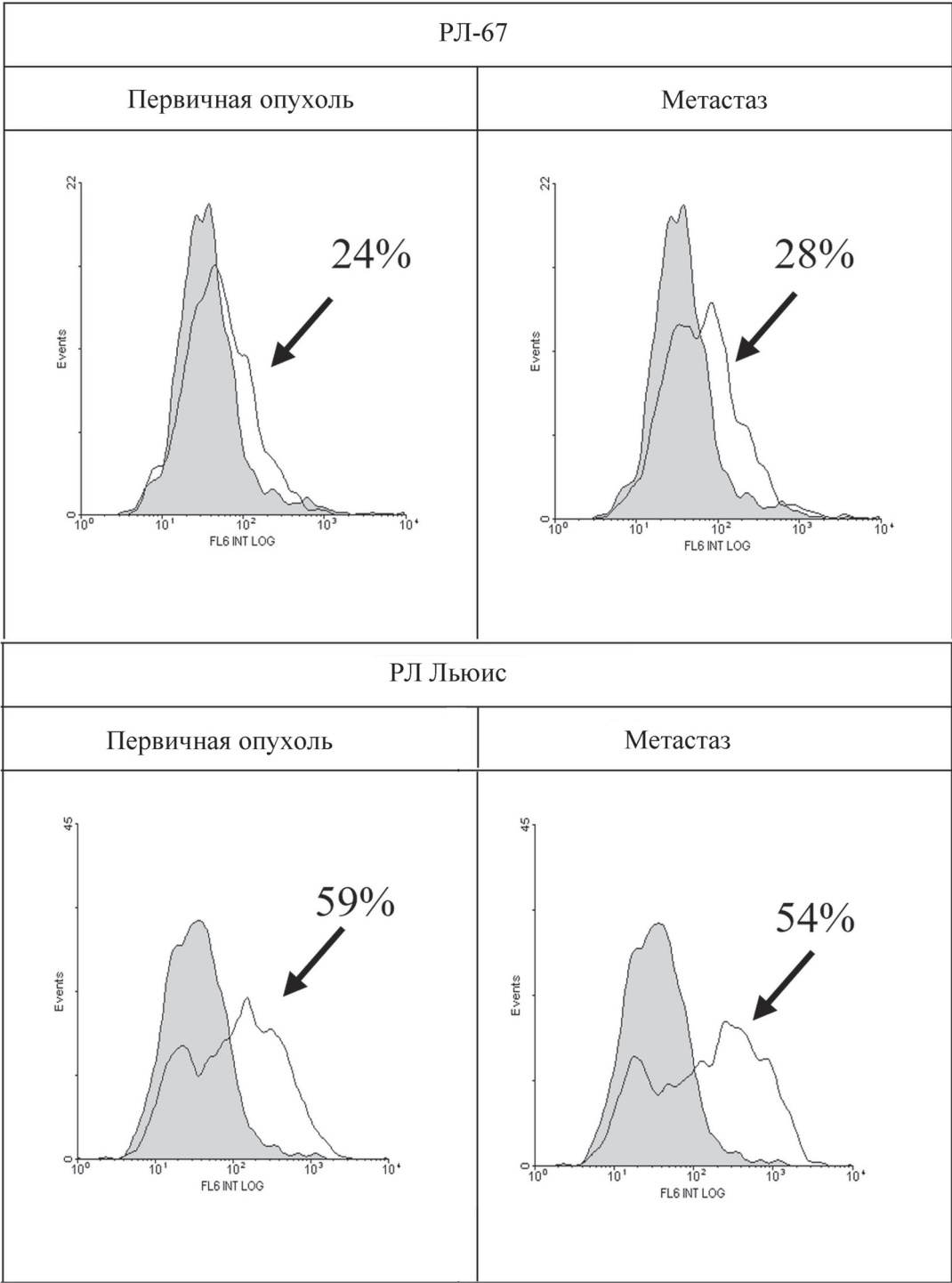


Рис. 2. Сравнительный анализ экспрессии TUBB3 в ткани первичной опухоли и метастазов в легких на 24-е сут. после подкожной трансплантации рака легкого Льюис или РЛ-67 у мышей. Закрашенные гистограммы – после инкубации только с вторичными антителами (контроль), прозрачные – после инкубации с антителами к TUBB3. Цифры на рисунке обозначают уровень экспрессии TUBB3 (%)

экспрессии – $26,1 \pm 7,8$ и $27 \pm 9,1$ усл.ед. В РЛ-67 уровень экспрессии маркера в аналогичных группах сравнения составил $21 \pm 4,2$ и $23 \pm 4,5\%$, интенсивность $18,2 \pm 5,6$ и $27 \pm 6,5$ усл. ед, индекс экспрессии – $4,1 \pm 2,4$ и $6,4 \pm 2,3$ усл. ед.

В то же время данные иммунофлуоресцентного анализа, представленные в таблице, отражают заметную разницу в экспрессии TUBB3 в группах сравнения опухоль Льюис vs РЛ-67 как в первичном узле, так и в метастазах. В ткани первичного узла высоко метастатического рака легкого Льюис все три показателя экспрессии – уровень, интенсивность и индекс экспрессии – превышают таковые для опухоли РЛ-67 соответственно в 1,8; 3,8 и 6,4 раза.

Аналогичными оказались и результаты сравнительного анализа экспрессии TUBB3 на 24-е сут. после трансплантации опухоли в ткани метастазов двух исследованных штаммов рака легкого. По уровню, интенсивности и индексу экспрессии TUBB3 ткань метастазов в легких опухоли Льюис превысила показатели для опухоли РЛ-67 в 1,7; 2,5 и 4,2 раза соответственно. Необходимо отметить, что различия в экспрессии маркера между двумя штаммами исследованных опухолей как в первичной, так и метастатической ткани, наиболее сильно отразились на показателях интенсивности и индекса экспрессии маркера.

На рис. 2 представлены реальные гистограммы, визуализирующие результаты сравнительной оценки экспрессии TUBB3 в первичной и в метастатической тканях опухоли двух перевиваемых штаммов, различающихся по агрессивности и метастатической активности. Видны идентичность уровня экспрессии TUBB3 в ткани первичной опухоли и метастазов в легких как для РЛ-67 (24% vs 28%), так и для РЛ Льюис (59% vs 54%) и двукратное превышение показателя в ткани рака легкого Льюис по сравнению с РЛ-67 как в первичной (59% vs 24%), так и в метастатической опухоли (54% vs 28%).

Таким образом, модельные эксперименты на мышах показали существенную разницу в экспрессии белка TUBB3 между двумя перевиваемыми штаммами рака легкого с разной интенсивностью метастазирования. Оба штамма продемонстрировали активное метастазирование в легкие на 24-е сут. после подкожной трансплантации, но число метастазов и их размеры на этот срок наблюдения были существенно выше у мышей с раком легкого Льюис по сравнению с опухолью РЛ-67.

Более высокие показатели экспрессии TUBB3 были обнаружены в ткани высоко метастазирующего рака легкого Льюис в сравнении с тканью рака легкого РЛ-67 с меньшей интенсивностью этого процесса. Полученные данные являются экспериментальным доказательством вклада опухоль-ассоциированного белка TUBB3 в формирование метастатического потенциала опухоли и указывают на его значимость как прогностического маркера агрессивности течения болезни.

В совокупности с выявленной на этой же экспериментальной модели информативностью TUBB3 как молекулярного маркера локальной распространённости процесса в морфологически нормальной ткани, окружающей опухолевый очаг [13], полученные в настоящем исследовании данные указывают на уникальность этого опухоль-ассоциированного белка, который требует дальнейшего изучения спектра его клинически значимых характеристик.

В этой связи необходимо подчеркнуть важность именно количественных оценок показателей экспрессии TUBB3 не только на экспериментальных моделях, но и при молекулярной диагностике солидных опухолей человека. Считаем, что в этом случае методом выбора является прецизионная проточная цитометрия, которая неизменно используется в фундаментальных молекулярных исследованиях на культурах клеток [10] и при иммунофенотипировании крови в клинике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fan Y., Fan X., Yan H., et al. // Cell Death Dis. 2022. Vol. 13. N 2. P. 157. (DOI: 10.1038/s41419-021-04210-9).
2. Liu Z., Li S., Dong J., Miao Y. // J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2021. Vol. 40. N 2. P. 23. (DOI: 10.1615/JEnviron-PatholToxicolOncol.2021036821).
3. Xie X., Laster K.V., Li J., et al. // Cell. Mol. Life Sci. 2023. Vol. 80. N 9. P. 272. Published (DOI: 10.1007/s00018-023-04931-4).
4. Raspaglio G., De Maria I., Filippetti F., et al. // Cancer Res. 2010. Vol. 70. N 14. P. 5891. (DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4656).
5. Pamula M.C., Ti S.C., Kapoor T.M. // J. Cell Biol. 2016. Vol. 213. N 4. P. 425. (DOI: 10.1083/jcb.201603050).
6. Lebok P., Öztürk M., Heilenkötter U., et al. // Oncol Lett. 2016. Vol. 11. N 3. P. 1987. (DOI: 10.3892/ol.2016.4206).
7. Parker A.L., Turner N., McCarroll J.A., Kavallaris M. //

- Carcinogenesis. 2016. Vol. 37. N 8. P. 787. (DOI: 10.1093/carcin/bgw058).
8. McCarroll J.A., Gan P.P., Erlich R.B., et al. // *Cancer Res.* 2015. Vol. 75. N 2. P. 415. (DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2740).
9. Cao R., Jin W., Shan Y., et al. // *Mar Drugs.* 2018. Vol. 16. N 3. P. 85. (DOI: 10.3390/md16030085).
10. Bogush T.A., Lee A., Kalyuzhny S.A. et al. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2024. Vol. 79. N 6. P. 435. (DOI: 10.3103/S0027131424700457).
11. Софьина З.П. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США // под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина, А. Голдина, А. Кляйна. М., 1980. 296 с.
12. Bogush T.A., Basharina A.A., Bogush E.A. et al. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2020. Vol. 75. N. 6. P. 315. (DOI: 10.3103/S0027131420060036).
13. Bogush, T.A., Maiak, M.A., Saprykina, N.S. et al. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2021. Vol. 76. P. 248. (DOI: 10.3103/S0027131421040039).

Информация об авторах

Анна Николаевна Гришанина – науч. сотр. группы молекулярного прогноза опухолей лаборатории молекулярно-генетической диагностики и персонализированной медицины НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (a.grishanina@rnc.ru, ORCID: 0000-0002-4277-9222);

Татьяна Анатольевна Богуш – руководитель группы молекулярного прогноза опухолей лаборатории молекулярно-генетической диагностики и персонализированной медицины НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ, докт. биол. наук, профессор (tatbogush@mail.ru, ORCID: 0000-0002-7673-4284);

Сергей Андреевич Калюжный – мл. науч. сотр. группы молекулярного прогноза опухолей лаборатории молекулярно-генетической диагностики и персонализированной медицины НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (labmedchem@mail.ru, ORCID: 0000-0002-8701-7707);

Александр Михайлович Щербаков – зав. лабораторией онкопротеомики отдела экспериментальной биологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, ст. науч. сотр. лаборатории химической трансформации антибиотиков НИИНА им. Г.Ф. Гаузе, канд. биол. наук (alex.scherbakov.2010@ya.ru, ORCID: 0000-0002-2974-9555);

Елена Александровна Богуш – ассистент кафедры онкологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru, ORCID: 0000-0001-5601-3669);

Михаил Яковлевич Мельников – зав. кафедрой химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, профессор, докт. хим. наук (melnikov46@mail.ru, ORCID: 0000-0002-9712-8929);

Вячеслав Станиславович Косоруков – директор НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, зав. лабораторией молекулярно-генетической диагностики и персонализированной медицины ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. биол. наук (labmedchem@mail.ru, ORCID: 0000-0002-8462-2178).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней.

Эксперименты с животными проводились в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>).

Статья поступила в редакцию 10.02.2025;
одобрена после рецензирования 16.03.2025;
принята к публикации 25.03.2025.