

УДК 616.24-006.6-073-092.4

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОВЕРКА ГИПОТЕЗЫ О ВОЗМОЖНОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛОКАЛЬНОЙ РАСТРОСТРАНЕННОСТИ ОПУХОЛИ НА МОДЕЛИ РАКА ЛЕГКОГО ЛЬЮИС

Т.А. Богуш¹, М.А. Маяк^{1,2}, Н.С. Сапрыкина¹, А.А. Башарина¹, О.М. Рябинина¹,
А.Н. Гришанина¹, Е.А. Богуш³, А.А. Каменский⁴, В.С. Косоруков¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; ² ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева»; ³ Институт клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); ⁴ ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; e-mail: tatbogush@mail.ru

Иммунофлуоресцентным методом при использовании проточной цитометрии проведена оценка экспрессии опухоль-ассоциированного белка бета-III тубулина (TUBB3) в ткани легкого интактных животных, на 11-е сутки после трансплантации рака легкого Льюис, а также в ткани метастаза опухоли в легком и в визуально «нормальной» окружающей ткани. Показано, что опухоль характеризуется высокой экспрессией TUBB3, при этом экспрессия маркера детектирована и в двух вариантах визуально «нормальной» ткани легкого: ниже, чем в опухоли, но значительно выше, чем в ткани легкого интактных мышей. Выявление TUBB3 за пределами опухолевого очага указывает на вовлеченность в малигнизацию визуально нормальной окружающей ткани органа и подтверждает состоятельность гипотезы о возможности использования опухоль-ассоциированного белка TUBB3 в качестве молекулярного маркера локальной распространенности опухолевого процесса.

Ключевые слова: бета-III тубулин (TUBB3), проточная цитометрия, карцинома легкого Льюис, иммунофлуоресцентный анализ, окружающая опухоль ткань.

Основанием для проведения настоящего исследования стала проверка сформулированной нами гипотезы: в случае выявления опухоль-ассоциированного белка бета-III тубулина (TUBB3) в морфологически «нормальной» ткани, окружающей очаг новообразования, этот опухолевый маркер может служить показателем локальной распространенности опухолевого процесса и таким образом – показателем агрессивности течения болезни.

TUBB3 относится к семейству белков-тубулинов, входящих в состав микротрубочек, и интенсивно изучается в качестве возможного предиктора эффективности противоопухолевых препаратов из группы таксанов [1–5]. Уникальность TUBB3 как потенциального опухоль-ассоциированного маркера заключается в том, что он практически не выявляется в нормальных эпителиальных клетках [6] и лишь с низкой интенсивностью экспрессируется в эндотелиоцитах и макрофагах [7]. В норме значи-

тельная экспрессия TUBB3 выявлена только в клетках мозга [8, 9] и клетках Сертоли [3, 10]. Что касается опухолей, то в ткани практически всех нозологических форм новообразований выявлена высокая экспрессия TUBB3 [11–13], и это делает весьма вероятной эффективность использования этого маркера для молекулярной дифференцировки малигнизированных и нормальных клеток.

В настоящем исследовании объектом молекулярного изучения служила нормальная ткань легкого интактных мышей и животных с трансплантированной опухолью легкого, так как показатели локальной и отдаленной распространенности этого заболевания служат основанием для стадирования болезни и выбора объема хирургического вмешательства и интенсивности терапии у онкологических больных. Важно, что TUBB3 не детектируется в нормальной паренхиме легкого, доля эндотелия и макрофагов по данным морфометрических

измерений в нормальной и опухолевой ткани легкого не превышает 15%, а интенсивность экспрессии TUBB3 в эндотелиальных клетках крайне низкая [14–16].

В работе изучен рак легкого Льюис, который с середины прошлого века широко используют в качестве экспериментальной модели метастазирования у мышей [19]. Опухоль интенсивно метастазирует гематогенным путем в легкие, метастазы в легких визуализируются в разные сроки после подкожной трансплантации опухоли в зависимости от прививочной дозы клеток, у павших животных – в 100% случаев [18]. Все это позволило реализовать исследования, необходимые для проверки гипотезы о возможности использования TUBB3 как молекулярного маркера локальной распространенности процесса в окружающей «нормальной» ткани органа, пораженного опухолью.

Материалы и методы

Исследование проведено на самцах мышей линии C₅₇BL/6 с массой тела 22–24 г в возрасте 2–3 месяца. Животные, полученные 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. Клетки рака легкого Льюис (1 млн в 0,5 мл питательной среды 199 («ПанЭко», Россия)) вводили подкожно в область подмышечной впадины передней лапы мышей по стандартной методике [19].

Экспрессия TUBB3 оценена в следующих группах сравнения: ткань легкого интактных животных; ткань легкого на 11-е сутки после подкожной трансплантации рака легкого Льюис; ткань метастаза опухоли в легком и окружающая визуально «нормальная» ткань органа на 24-е сутки после подкожной трансплантации опухоли Льюис.

Количественная иммунофлуоресцентная оценка показателей экспрессии TUBB3 проведена с использованием проточной цитометрии. Процесс перевода солидных образцов ткани в одноклеточную суспензию, включая фиксацию 4%-м раствором нейтрального формальдегида, описан нами ранее [20].

Для иммунофлуоресцентного окрашивания использованы первичные кроличьи моноклональные антитела к TUBB3 (клон ER15694, ab52623, Abcam) и вторичные антикроличьи антитела, конъюгированные с флуоресцентным

красителем DyLight 650 (ab98510, «Abcam»). Конечные разведения составили 1:500 и 1:1000 для первичных и вторичных антител соответственно.

Инкубацию клеток с первичными антителами проводили в течение 1,5 ч в темноте при комнатной температуре. После инкубации суспензию клеток отмывали 0,5%-м раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в фосфатном буфере (pH 7,4), добавляли вторичные антитела и инкубировали в течение 1,5 ч при 4 °С. Для выведения из анализа дедбриса 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.

Для контроля активности антител и стандартности условий проведения эксперимента в каждом опыте использовали культуру клеток рака молочной железы человека MCF-7. В каждом эксперименте в группах сравнения проанализировано по 2 тыс. клеток.

Исследованы три показателя экспрессии белка: 1) уровень экспрессии – процентное содержание специфически флуоресцирующих клеток относительно положительного контроля (инкубация клеток только с вторичными антителами); 2) интенсивность экспрессии – средний геометрический показатель флуоресценции клеток за вычетом показателя положительного контроля (усл. ед.); 3) индекс – интегральный показатель, равный произведению интенсивности и уровня экспрессии, деленному на 100 (усл. ед.).

Измерение флуоресценции проведено на проточном цитометре «Navios» («Beckman Coulter», США) с помощью программного обеспечения Navios Software. Обработку результатов проводили 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). Для оценки различий между показателями экспрессии белка TUBB3 в группах сравнения использован U-критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты сравнительной оценки экспрессии TUBB3 в нормальной ткани легкого интактных мышей (1), в визуально «нормальной»

легочной ткани на 11-е сутки после подкожной трансплантации рака легкого Льюис (2), в ткани метастаза опухоли легкого (3) и в «нормальной» ткани, окружающей очаг метастаза рака Льюис в легком, на 24-е сутки после подкожной трансплантации опухоли (4) представлены в таблице. Важно отметить, что для повышения точности количественной оценки различий между показателями экспрессии маркера в каждый эксперимент включали все группы сравнения, как и в случае, представленном на рисунке.

Первое, что необходимо отметить, – в нормальной ткани легкого интактных животных выявляется лишь незначительная экспрессия TUBB3. Средний уровень экспрессии маркера, т.е. доля клеток, экспрессирующих TUBB3, в нормальной ткани легкого интактных мышей составила лишь $13,5 \pm 2,9\%$, что соответствует данным литературы о доле в нормальной ткани легкого эндотелиоцитов и макрофагов, экспрессирующих TUBB3 [7, 21]. При этом важным является то, что интенсивность специфической флуоресценции в пересчете на клетку оказалась крайне низкой, что в результате сказалось на величине суммарного показателя экспрессии маркера – индекс экспрессии TUBB3 в нормальной ткани составил только $0,9 \pm 0,6$ усл. ед. Последний факт также согласуется с литературными данными о крайне низкой интенсивности экспрессии TUBB3 в клетках эндотелия и макрофагах [7, 21]. В совокупности эти данные указывают на незначительность вклада экспрес-

сии TUBB3 в нормальной паренхиме в результате оценки TUBB3 как маркера локальной распространенности опухолевого процесса в визуально «нормальной» ткани легкого, окружающей опухольный очаг.

Что касается опухоли, то в метастатической ткани рака легкого Льюис выявлена наиболее высокая, по сравнению с нормальной тканью легкого, экспрессия TUBB3 (таблица). Средний уровень экспрессии маркера в исследованных образцах метастазов превысил значения показателя для нормальной ткани более, чем в 3 раза ($46,0 \pm 8,5\%$ vs $13,5 \pm 2,9\%$), интенсивность экспрессии – в 18 раз ($117,4 \pm 24,7$ усл. ед. vs $6,5 \pm 2,7$ усл. ед.), а интегральный показатель экспрессии TUBB3 – в 60 раз ($54,3 \pm 16,4$ усл. ед. vs $0,9 \pm 0,6$ усл. ед.). Все различия статистически значимы ($p = 0,03$). Эти результаты согласуются с данными литературы о выраженной экспрессии TUBB3 в ткани эпителиальных опухолей разных нозологических форм [2, 7, 11] и указывают на адекватность выбранной экспериментальной модели для решения поставленной задачи.

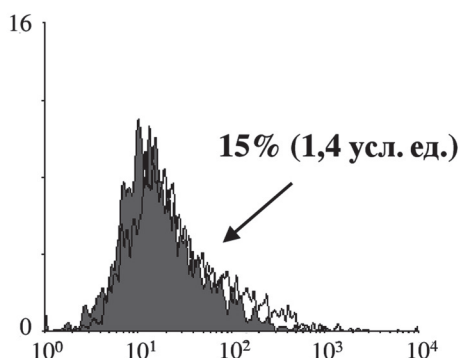
Первым фактом, который подтвердил правомочность использования опухоль-ассоциированного белка TUBB3 как маркера локальной распространенности опухолевого процесса является то, что TUBB3 выявляется в визуально «нормальной» ткани, окружающей метастатический узел в легком (таблица). При этом показатели экспрессии маркера существенно превышают

Показатели экспрессии бета-III тубулина (TUBB3) в нормальной, в визуально «нормальной» легочной ткани и ткани метастаза в легком опухоли Льюис

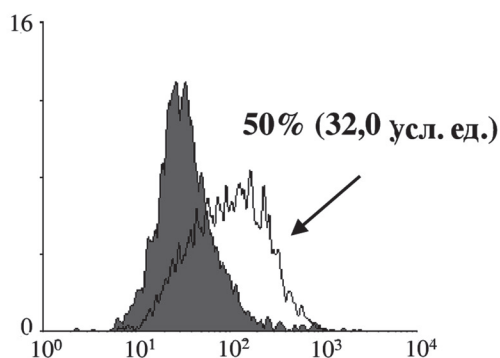
Группы сравнения	Показатели экспрессии TUBB3		
	уровень, %	интенсивность, усл. ед.	индекс, усл. ед.
Нормальная ткань легкого	$13,5 \pm 2,9$	$6,5 \pm 2,7$	$0,9 \pm 0,6$
Метастаз в легком опухоли Льюис	$46,0 \pm 8,5$	$117,4 \pm 24,7$	$54,3 \pm 16,4$
Визуально «нормальная» ткань легкого:			
на 11-е сутки после трансплантации опухоли*	$28,0 \pm 3,6$	$19,5 \pm 2,1$	$5,5 \pm 1,3$
окружающая метастаз ткань легкого на 24-е сутки после трансплантации опухоли*	$27,0 \pm 5,5$	$27,5 \pm 5,1$	$7,5 \pm 2,6$

* Подкожная трансплантация рака легкого Льюис.

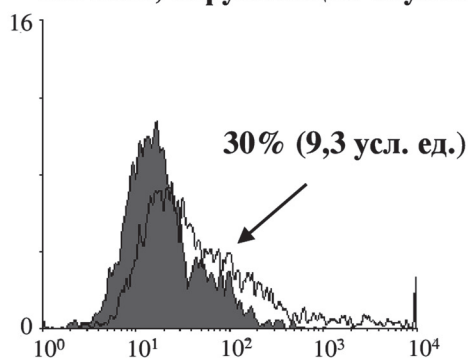
1. Нормальная ткань легкого



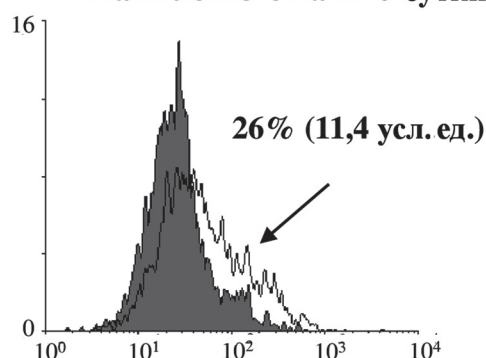
2. Ткань рака легкого Льюис



3. Визуально «нормальная» ткань легкого, окружающая опухоль



4. Визуально «нормальная» ткань легкого на 11-е сутки



Экспрессия бета-III тубулина (TUBB3) в нормальной, в визуально «нормальной» легочной ткани и ткани метастаза в легком опухоли Льюис. По осям абсцисс – интенсивность флуоресценции (усл. ед.), по осям ординат – число клеток; закрашенные гистограммы – после инкубации только с вторичными антителами (контроль), прозрачные – после инкубации с антителами к TUBB3. Цифры на рисунке: % – уровень экспрессии TUBB3; в скобках – индекс экспрессии TUBB3

значения нормальной ткани легкого интактных животных: средний уровень экспрессии TUBB3 – приблизительно в 2 раза ($27,0 \pm 5,5\%$ vs $13,5 \pm 2,9\%$), интенсивность – более чем в 4 раза ($27,5 \pm 5,1$ vs $6,5 \pm 2,7$), а индекс экспрессии – в 8 раз ($7,5 \pm 2,6$ vs $0,9 \pm 0,6$). Все различия статистически значимы ($p = 0,03$).

Второе наблюдение показывает (таблица), что через 11 суток после подкожной трансплантации высокометастазирующей опухоли Льюис в визуально «нормальной» ткани легкого также выявляются клетки, экспрессирующие TUBB3. Показатели экспрессии оказались сходными с визуально «нормальной» тканью легкого, окружающей уже сформировавшийся на 24-е сутки метастатический очаг ($p > 0,05$), и существенно превысили таковые для нормальной ткани легкого интактных мышей. Средний уровень, интен-

сивность и индекс экспрессии TUBB3 в визуально «нормальной» по сравнению с нормальной тканью легкого были выше приблизительно в 2, 3 и 6 раз соответственно. Во всех случаях разница была статистически значимой ($p = 0,03$).

На рисунке представлены реальные результаты одного из типичных экспериментов по сравнительной оценке экспрессии TUBB3 в нормальной, визуально «нормальной» ткани легкого и в ткани метастаза в легком опухоли Льюис. Отчетливо видна незначительность «фоновой» экспрессии TUBB3, ассоциированной с клетками эндотелия и макрофагами, в нормальной ткани легкого (рисунок, 1), а экспрессия маркера в ткани метастаза, напротив, оказалась высокой (рисунок, 2). В визуально «нормальной» ткани легкого, окружающей метастатический очаг, или в ткани легкого, спустя 11 суток после

трансплантации опухоли, экспрессия TUBB3 ожидаемо оказалась принципиально более низкой, чем в опухоли (соответственно гистограммы 3 и 4 vs 2 на рисунке). Но что наиболее важно – все показатели экспрессии маркера превысили таковые в норме (рисунок, 1). Особенно выразительна разница между интегральным показателем экспрессии TUBB3 в группах сравнения: более чем в 20 раз между нормой и опухолью и в 7–8 раз между нормальной и визуально «нормальными» тканями легкого.

Таким образом, в модельных экспериментах на мышах показано, что в нормальной ткани легкого интактных животных экспрессия опухоль-ассоциированного белка TUBB3 детектируется менее чем в 15% клеток, при этом интенсивность экспрессии в пересчете на клетку крайне низкая. Это указывает на незначительность вклада экспрессии TUBB3, ассоциированного с наличием в паренхиме легких эндотелиоцитов и макрофагов, в результаты детектирования этого белка в визуально «нормальной» ткани легкого, окружающей опухолевый очаг, т.е. в оценку экспрессии TUBB3 в качестве маркера локальной распространенности опухолевого процесса.

Полученные результаты продемонстрировали, что исследованная экспериментальная опухоль (рак легкого Льюис), как и большинство эпителиальных солидных новообразований человека [22], характеризуется высоким уровнем экспрессии TUBB3. Кроме того, высокий метастатический потенциал опухоли Льюис с тропностью к ткани легкого позволил оценить распространенность опухолевого процесса в легком не только за пределами сформированного метастаза, но и в процессе гематогенного метастазирования при отсутствии признаков опухолевого поражения органа на 11-е сутки после подкожной

трансплантации опухоли. В обоих случаях в визуально «нормальной» ткани легкого выявлены клетки, экспрессирующие TUBB3. Показатели экспрессии маркера были значительно ниже по сравнению с тканью метастаза, но существенно выше в сравнении с нормальной тканью легкого.

В совокупности, полученные результаты подтвердили правомочность сформулированной нами гипотезы: выявление опухоль-ассоциированного белка TUBB3 в визуально «нормальной» ткани легкого, окружающей опухолевый очаг, может служить молекулярным маркером наличия малигнизированных клеток за пределами опухолевого образования, т.е. маркером молекулярной вовлеченности в опухолевый процесс морфологически нормальной ткани органа.

Практическая значимость такой оценки безусловна, так как дополнительный показатель, уточняющий локальную распространенность и стадирование заболевания, может служить дополнительным ориентиром при определении тактики послеоперационного ведения пациентов, в частности при решении вопроса о необходимости проведения лекарственной терапии и определении ее интенсивности.

Работа выполнена в рамках программы исследований ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (тема НИР: «Разработка и оценка клинической значимости новой технологии молекулярного прогнозирования резистентности и агрессивности солидных эпителиальных новообразований», рег. № АААА-А20-120020690077-0).

Конфликта интересов нет.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Di Bartolomeo M., Raimondi A., Cecchi F., Catenacci D., Schwartz S., Sellappan S., Tian Y., Miceli R., Pellegrinelli A., Giommoni E., Aitini E., Spada F., Rosati G., Marchet A., Pucci F., Zaniboni A., Tambari S., Pressiani T., Sanna G., Cantore M., Mosconi S., Bolzoni P., Pinto C., Landi L., Soto Parra H.J., Cavanna L., Corallo S., Martinetti A., Hembrough T.A., Pietrantonio F. // *Tumori Journal*. 2020 (DOI: 10.1177/0300891620930803).
2. Lebok P., Öztürk M., Heilenkötter U., Jaenicke F., Müller V., Paluchowski P., Geist S., Wilke C., Burandt E., Lebeau A., Lebeau A., Wilczak W., Krech T., Simon R., Sauter G., Quaas A. // *Oncol. Lett.* 2016. Vol. 11. N 3. P. 1987 (DOI: 10.3892/ol.2016.4206).
3. Мамичев И.А., Бозуш Т.А., Бозуш Е.А., Терентьева Н.С., Полоцкий Б.Е., Давыдов М.М. // *Антибиотики химиотер.* 2018. Т. 63. № 7–8. С. 78.
4. Lipovšek S., Novak T., Janžekovič F., Weiland N., Leitinger G. *PLoS ONE*. 2016. Vol. 11. N 7. P. 1 (DOI: 10.1371/journal.pone.0158598).
5. Sekino Y., Han X., Babasaki T., Miyamoto S., Kitano H., Kobayashi G., Goto K., Inoue S., Hayashi T., Teishima J., Sakamoto N., Sentani K., Oue N., Yasui W., Matsubara A. // *Oncology*. 2020. Vol. 98. N 10. P. 689 (DOI: 10.1159/000506775).
6. Jirásek T., Pisarikova E., Viklicky V., Mandis V. // *Folia Histochem. Cytobiol.* 2007. Vol. 45. N 1. P. 41.
7. Person F., Wilczak W., Hube-Magg C., Burdelski C.,

- Möller-Koop C., Simon R., Noriega M., Sauter G., Steurer S., Burdak-Rothkamm S., Jacobsen F. // *Tumour Biol.* 2017 (DOI: 10.1177/1010428317712166).
8. Katsetos C.D., Herman M.M., Mörk S.J. // *Cell Motil. Cytoskeleton.* 2003. Vol. 55. N 2. P. 77 (DOI: 10.1002/cm.10116).
9. Katsetos C.D., Dráber P. // *Curr. Pharm. Des.* 2012. Vol. 18. N 19. P. 2778 (DOI: 10.2174/138161212800626193).
10. Lewis S.A., Cowan N.J. // *J. Cell Biol.* 1988. Vol. 106. N 6. P. 2023 (DOI: 10.1083/jcb.106.6.2023).
11. Höftmayer D., Öztürk E., Schroeder C., Hube-Magg C., Blessin N.C., Simon R., Lang D.S., Neubauer E., Göbel C., Heinrich M.C., Fraune C., Möller K., Armbrust M., Freytag M., Hinsch A., Lühr C., Noack M., Reischwich V., Weidemann S., Bockhorn M., Perez D., Izbicki J.R., Sauter G., Jacobsen F. // *Oncol. Lett.* 2018. Vol. 16. N 6. P. 7139 (DOI: 10.3892/ol.2018.9502).
12. Nienstedt J.C., Gröbe A., Clauditz T., Simon R., Muenscher A., Knecht R., Sauter G., Moebius C., Blessmann M., Heiland M., Pflug C. // *J. Oral Pathol. Med.* 2017. Vol. 46. N 10. P. 986 (DOI: 10.1111/jop.12607).
13. Powell S., Kaizer A., Koopmeiners J.S., Iwamoto C., Klein M. // *Oncol. Lett.* 2014. Vol. 7. N 2. P. 405 (DOI: 10.3892/ol.2013.1734).
14. Pinkerton K.E., Crapo J.D. // *Toxicology of inhaled materials.* 1985. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. P. 272.
15. Jakobsen J.N., Santoni-Rugiu E. S.J.B. // *Lung Cancer Manag.* 2015. Vol. 4. N 2. P. 97 (DOI: 10.2217/lmt.15.6).
16. Окбах А.А., Голубев О.А., Дорошенко Р.В. // *Проблемы здоровья и экологии.* 2005. Т. 3. № 5. С. 62.
17. Герасимова Г.К., Апрышко Г.Н. // *Экспериментальная онкология на рубеже веков / Под ред. М.И. Давыдова, А.Ю. Барышникова. М., 2003. С. 59.*
18. Козлов А.М., Софьина З.П. // *Бюл. exper. биол. и мед.* 1978. Т. 86. № 12. С. 715.
19. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина, А. Година, А. Кляйна. М., 1980. С. 71.
20. Бозуш Т.А., Башарина А. А., Бозуш Е.А., Гришанина А.Н., Сакаева Д.М., Курсанов В.Ю., Давыдов М.М., Косоруков В.С. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2020. Т. 61. № 6. С. 399.
21. Leandro-García L.J., Leskelä S., Landa I., Montero-Conde C., López-Jiménez E., Letón R., Cascón A., Robledo M., Rodríguez-Antona C. // *Cytoskeleton (Hoboken).* 2010. Vol. 67. N 4. P. 214 (DOI: 10.1002/cm.20436).
22. Mariani M., Shahabi S., Sieber S., Scambia G., Ferlini C. // *Current Molecular Medicine.* 2011. Vol. 11. N 9. P. 726 (DOI:10.2174/156652411798062368).

Поступила в редакцию 11.03.2021
Получена после доработки 14.03.2021
Принята к публикации 20.03.2021

EXPERIMENTAL VERIFICATION OF THE HYPOTHESIS ON THE LEWIS LUNG CARCINOMA MODEL ABOUT THE POSSIBILITY OF MOLECULAR DIAGNOSTICS OF LOCAL TUMOR SPREAD

T.A. Bogush¹, M.A. Maiak^{1,2}, N.S. Saprykina¹, A.A. Basharina¹, O.M. Ryabinina¹,
A.N. Grishanina¹, E.A. Bogush³, A.A. Kamensky⁴, V.S. Kosorukov¹

(¹ FSBI "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center" of the Ministry of Health of the Russian Federation; ² Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy"; ³ N.V. Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University); ⁴ Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V. Lomonosov Moscow State University (Lomonosov MSU); e-mail: tatbogush@mail.ru)

Expression of tumor-associated protein beta-III tubulin (TUBB3) was evaluated quantitatively by immunofluorescence analysis using flow cytometry in lung tissue of intact animals and on day 11 after the Lewis lung carcinoma transplantation as well in lung metastasis tissue and in visually "normal" surrounding tissue. It was shown that the tumor is characterized by a high TUBB3 expression, while also the expression of the marker was detected in both variants of visually "normal" lung tissue: it was lower than in tumor tissue but significantly higher than in lung tissue of intact animals. The detection of TUBB3 outside the tumor indicates that the tissue appeared to be normal is already involved in malignancy and this supports the hypothesis that tumor-associated protein TUBB3 can be used as a molecular marker of local tumor spread.

Key words: beta-III tubulin (TUBB3), flow cytometry, immunofluorescent analysis, lung cancer, tissue surrounding tumor.

Сведения об авторах: *Богуш Татьяна Анатольевна* – руководитель группы молекулярных маркёров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, докт. биол. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ (tatbogush@mail.ru); *Маяк Маргарита Александровна* – студентка бакалавриата кафедры зоологии факультета зоотехнии и биологии РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, лаб.-иссл. группы молекулярных маркёров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (rita.mayak@yandex.ru); *Сапрыкина Нина Семёновна* – науч. сотр. лаборатории экспериментальной химиотерапии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (labmedchem@mail.ru); *Башарина Анна Александровна* – науч. сотр. группы молекулярных маркёров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (basharinaa@inbox.ru); *Рябинина Ольга Михайловна* – науч. сотр. группы молекулярных маркёров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, канд. биол. наук (labmedchem@mail.ru); *Гришанина Анна Николаевна* – науч. сотр. группы молекулярных маркёров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (labmedchem@mail.ru); *Богуш Елена Александровна* – 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); *Каменский Андрей Александрович* – зав. кафедрой физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. биол. наук, профессор (labmedchem@mail.ru); *Косоруков Вячеслав Станиславович* – директор НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, зав. лабораторией трансгенных препаратов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. биол. наук (labmedchem@mail.ru).