

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 577.171.6:616-006:543.4

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ОЦЕНКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ ЭКСПРЕССИИ ЭСТРОГЕНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ β В СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЯХ ЧЕЛОВЕКА

Т.А. Богуш, А.С. Шатурова, Е.А. Дудко, Э.Э. Жураев, Б.Е. Полоцкий, М.И. Давыдов

(Российский онкологический научный центр им Н.Н. Блохина РАМН; e-mail: labmedchem@mail.ru)

Проведена адаптация условий иммунофлуоресцентного анализа эстрогеновых рецепторов β (ЭР β) с использованием проточной цитофлуориметрии (ПЦФ) и моноклональных антител к ЭР β фирмы "Abcam" (клон 14C8), специфических по отношению к N-терминальному домену белка ЭР β человека. Показана возможность фиксации клеток 4%-м раствором формальдегида и варьирования числа клеток в суспензии, что позволяет исследовать не только образцы опухоли, получаемые во время хирургических операций, но и при эндоскопическом обследовании больных и биопсии опухоли. К использованию в клинической практике рекомендована продолжительность инкубации с первичными антителами в течение ночи (15–20 ч.), а с вторичными – 1,5 ч, что оправдано с точки зрения большей чувствительности метода, сокращения расхода антител и удобства для персонала. Для контроля активности антител в качестве референсной культуры рекомендованы клетки рака молочной железы линии MCF-7 и диапазон концентраций антител 0,06; 1,2 и 2,5 мкг/мл. Для количественной оценки частоты экспрессии ЭР β в солидных опухолях человека обосновано использование антител в области концентраций 1,2; 2,5 и 5 мкг/мл, которая включает область линейной зависимости флуоресцентного специфического окрашивания от концентраций антител и область достижения окрашивания всех клеток в исследуемой клеточной суспензии, а следовательно, и в исследуемой опухоли.

Ключевые слова: эстрогеновые рецепторы β , иммунофлуоресценция, проточная цитофлуориметрия, солидные опухоли человека.

Введение

Стероидные гормоны эстрогены выполняют ряд важнейших функций в организме. В частности, они являются регуляторами роста и дифференцировки клеток, в том числе и злокачественных. Свои биологические свойства эстрогены реализуют посредством эстрогеновых рецепторов (ЭР), которые являются мишенью гормональных противоопухолевых лекарств – антиэстрогенов тамоксифена, ралоксифена и фульвестранта. Поэтому уровень ЭР в опухолевой ткани позволяет не только прогнозировать агрессивность течения заболевания, но и предсказать чувствительность опухоли к гормонотерапии, т.е. является важнейшим прогностическим и предиктивным опухолевым маркером [1, 2].

Начиная с 70-х годов прошлого столетия, таким маркером считались ЭР α , наличие которых в ткани

рака молочной железы является показанием к проведению антиэстрогенной терапии [3]. В 1996 г. был идентифицирован еще один тип эстрогеновых рецепторов – ЭР β [4], при этом стало очевидным, что наличие в опухолевой ткани ЭР α и β является молекулярно-биологической характеристикой солидных опухолей разных локализаций [5, 6]. Тем не менее до настоящего времени в клинической практике обязательным является определение лишь ЭР α и только в ткани рака молочной железы. Важнейшей причиной этого, наряду с прочими, мы считаем отсутствие адекватной количественной методики оценки экспрессии ЭР β . Для определения уровня экспрессии ЭР наиболее часто применяется полуколичественный метод иммуногистохимии [7]. Использование селективных моноклональных антител позволяет с высокой точно-

стью установить наличие ЭР в исследуемой ткани. Однако осуществляемая визуально количественная оценка доли клеток, содержащих рецепторы, является субъективной [8]. В отдельных работах в качестве альтернативы иммуногистохимии для определения ЭР применяют обратнотранскриптазную полимеразную цепную реакцию (ОТ-ПЦР) [9]. Но уровень мРНК (матричной РНК, которая используется при трансляции в качестве матрицы для синтеза белков), обнаруживаемый таким способом, не всегда соответствует уровню рецептора в клетке, так как на формирование белка из мРНК оказывают влияние различные трансляционные факторы, постсинтетическая модификация и белковая деградация [10]. Еще менее количественными являются биохимический метод и вестерн-блоттинг. Первый сводится к определению уровня ЭР в гомогенате клеток на основании связывания рецепторов (и продуктов их деградации) с лигандом [11, 12], а второй – к детекции ЭР по связыванию со специфическими антителами в тотальной белковой фракции, полученной из анализируемых клеток [13].

Целью настоящей работы явилась разработка иммунофлуоресцентного метода с использованием проточной цитофлуориметрии, пригодного для клинического применения и позволяющего количественное определение частоты экспрессии ЭРβ в исследуемой солидной опухоли.

Материалы и методы

Работа проведена на культуре клеток рака молочной железы человека линии MCF-7. Для получения суспензии клеток MCF-7 из культурального матраца сливали питательную среду, дважды промывали монослой раствором фосфатного буфера (рН 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 раствором фосфатного буфера и пипетировали до получения одноклеточной суспензии. Количество клеток в полученной суспензии подсчитывали в камере Горяева и доводили до необходимой концентрации путем разведения фосфатным буфером. Полученную суспензию фиксировали формальдегидом в фосфатном буферном растворе в конечной концентрации 0,01 или 4%.

Перед проведением иммунофлуоресцентного окрашивания клетки осаждали из суспензии центрифугированием в течение 10 мин при 3000 об/мин., надосадочную жидкость отбирали, к осадку добавляли 1мл 1% раствора Tween 20 (“Sigma”) и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем

для отмывки детергента (в ряде экспериментов отмывку клеток от детергента проводили повторно) в пробирку добавляли 10 мл фосфатного буферного раствора и центрифугировали при 3000 тыс. об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отбирали и к осадку клеток добавляли фосфатный буферный раствор в объеме, достаточном для получения необходимой для работы концентрации клеток, которые подсчитывали в камере Горяева. Инкубацию клеток антителами проводили при 4°C в темноте в пластиковых пробирках для проточного цитофлуориметра в 100 мкл клеточной суспензии заданной концентрации – от 500 тыс. до 1 млн клеток/мл. Продолжительность инкубации с первичными специфическими и соответствующими изотипическими антителами зависела от поставленной задачи и составляла 30 мин, 1,5 ч или 15–20 ч. Затем к суспензии клеток добавляли вторичные антитела и инкубировали в течение 30 мин или 1,5 ч. После окончания инкубации для отмывки свободных антител (однократно или повторно) в каждую пробирку добавляли по 2 мл фосфатного буферного раствора и центрифугировали при 3000 об/мин. в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отбирали и осадок ресуспендировали в 200 мкл фосфатного буферного раствора.

Для определения ЭРβ использовали мышинные моноклональные антитела (“Abcam”, клон 14C8), которые характеризуются специфичностью к N-терминальному домену белка ЭРβ человека. В исследовании использованы следующие концентрации моноклональных антител: 0,3; 0,6; 1,2; 2,5; 5,0; 7,5 и 10 мкг/мл. В качестве изотипического контроля использовали мышинные моноклональные антитела IgG2a (“Abcam”, клон MG2a-53) в эквивалентных специфическим антителам концентрациях. В качестве вторичных антител использовали мышинные поликлональные антитела, меченые FITC (“Sigma”, F2772). При максимальной концентрации первичных антител использовали вторичные антитела в разведении 1:130. При большем разведении первичных антител соответственно увеличивали разведение вторичных антител.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (“Becton Dickinson”) с применением программного обеспечения FACSDiva 6.0. Для возбуждения флуоресценции использовали твердотельный лазер “Coherent Sapphire” с длиной волны испускаемого света 488 нм; регистрацию сигнала проводили по параметру FITC-H, который позволяет регистрировать флуоресценцию клеток, меченых флуорохромом FITC, при напряжении 500 В. Значение порога, отсекающего разрушенные клетки и

лейкоциты, составляло 10000, а скорость ламинарного потока жидкости в капилляре была средней. Число анализируемых событий – от 500 до 5000 в зависимости от условий эксперимента.

Анализ результатов проводили с использованием программного обеспечения FlowJo 7.6 и WinMDI 2.9. При этом количество специфически окрашенных клеток по сравнению с изотипическим контролем рассчитывали с помощью теста Колмогорова–Смирнова, встроенного в программу FlowJo.

Результаты и их обсуждение

Все эксперименты проведены с моноклональными антителами к ЭРβ фирмы “Abcam” (клон 14C8), которые характеризуются специфичностью к N-терминальному домену белка ЭРβ человека.

Учитывая задачу настоящего исследования – разработать метод, пригодный для клинического применения, когда часто возникает необходимость верификации (повторного подтверждения) результатов анализа, а следовательно, существует необходимость в длительном хранении клеточного материала, на первом этапе работы мы оценили возможность изменения условий фиксации клеточного материала в сторону повышения концентрации раствора формальдегида от рекомендованного коммерческим протоколом диапазона 0,01–1% до 4%.

Показано, что такое изменение условий фиксации не влияет на взаимодействие изотипических и специфических антител с клетками MCF-7. Специфическое флуоресцентное окрашивание клеток моноклональными антителами к эстрогеновым рецепторам β было одинаковым и при концентрации моноклональных антител 10 мкг/мл составило 77 и 75% окрашенных клеток при использовании 0,1 и 4% раствора формальдегида соответственно (рис. 1, а, б). В связи с этим мы считаем, что при клинической оценке экспрессии эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека, учитывая лучшую сохранность материала, может быть использована фиксация клеток 4%-м раствором формальдегида.

Вторая проблема, которая возникает при клинической оценке экспрессии опухолевых маркеров, – размер образца исследуемой ткани. В коммерческих протоколах рекомендовано проводить анализ при концентрации клеток в суспензии от 500 тыс./мл до 1 млн/мл. Однако в случае получения минимального объема материала, например при эндоскопическом исследовании и биопсии, выполнить это условие невозможно. Чтобы определить, насколько “критичным” является упомянутое выше требование к concentra-

ции клеточной суспензии, проведено сравнение результатов, полученных при разных концентрациях клеток в суспензии (100, 500 тыс./мл и 1 млн/мл) и разном количестве клеток, анализируемых на проточном цитофлуориметре.

Показано, что при уменьшении количества клеток в исследуемой суспензии от 1 млн до 500 и 100 тыс./мл взаимодействие изотипических и специфических антител с клетками MCF-7 не изменяется (рис. 1, в, г, д). Специфическое флуоресцентное окрашивание клеток моноклональными антителами к эстрогеновым рецепторам β было одинаковым и при концентрации моноклональных антител 10 мкг/мл составило 80, 71 и 78% окрашенных клеток при концентрации клеток в исследуемой суспензии 1 млн/мл, 500 и 100 тыс./мл соответственно. Сходные результаты (70, 69 и 75% специфически окрашенных клеток) получены и при анализе на проточном цитофлуориметре разных количеств клеток – 5 и 3 тыс., а также 1 тыс. (рис. 1, е, ж, з). Представленные данные позволяют сделать вывод о том, что при иммунофлуоресцентном окрашивании уменьшение количества клеток до 100 тыс./мл, так же как и снижение числа клеток, анализируемых на проточном цитофлуориметре до 1 тыс., не изменяет результаты оценки экспрессии эстрогеновых рецепторов β в исследуемой опухоли.

Следующая задача при адаптации любого метода, используемого в клинической практике, – минимизировать продолжительность проведения анализа, сделать анализ менее трудоемким. Согласно коммерческому протоколу окрашивания фирмы “Abcam” для используемых специфических антител, пермеабиллизация клеток осуществляется в аликвотах клеточной суспензии объемом 100 мкл с добавлением 100 мкл 0,5%-го раствора Tween 20. С целью сокращения продолжительности анализа была проведена инкубация всей совокупности анализируемых клеток в одной пробирке с добавлением 1 мл 1%-го раствора Tween 20. Установлено, что такое изменение методики окрашивания не влияет на долю специфически флуоресцирующих клеток в исследуемой суспензии.

Мы провели также исследование по оптимизации кратности отмывок клеток раствором фосфатного буфера (рН 7,4) от свободных антител. Фирма-производитель антител, специфических к ЭРβ, рекомендует трехкратные отмывки клеток после инкубации, как с первичными, так и с вторичными антителами. Однако существуют протоколы иммунофлуоресцентного окрашивания клеток другими первичными антителами, в которых такая рекомендация отсутствует и предлагается проводить отмывку клеток лишь после ин-

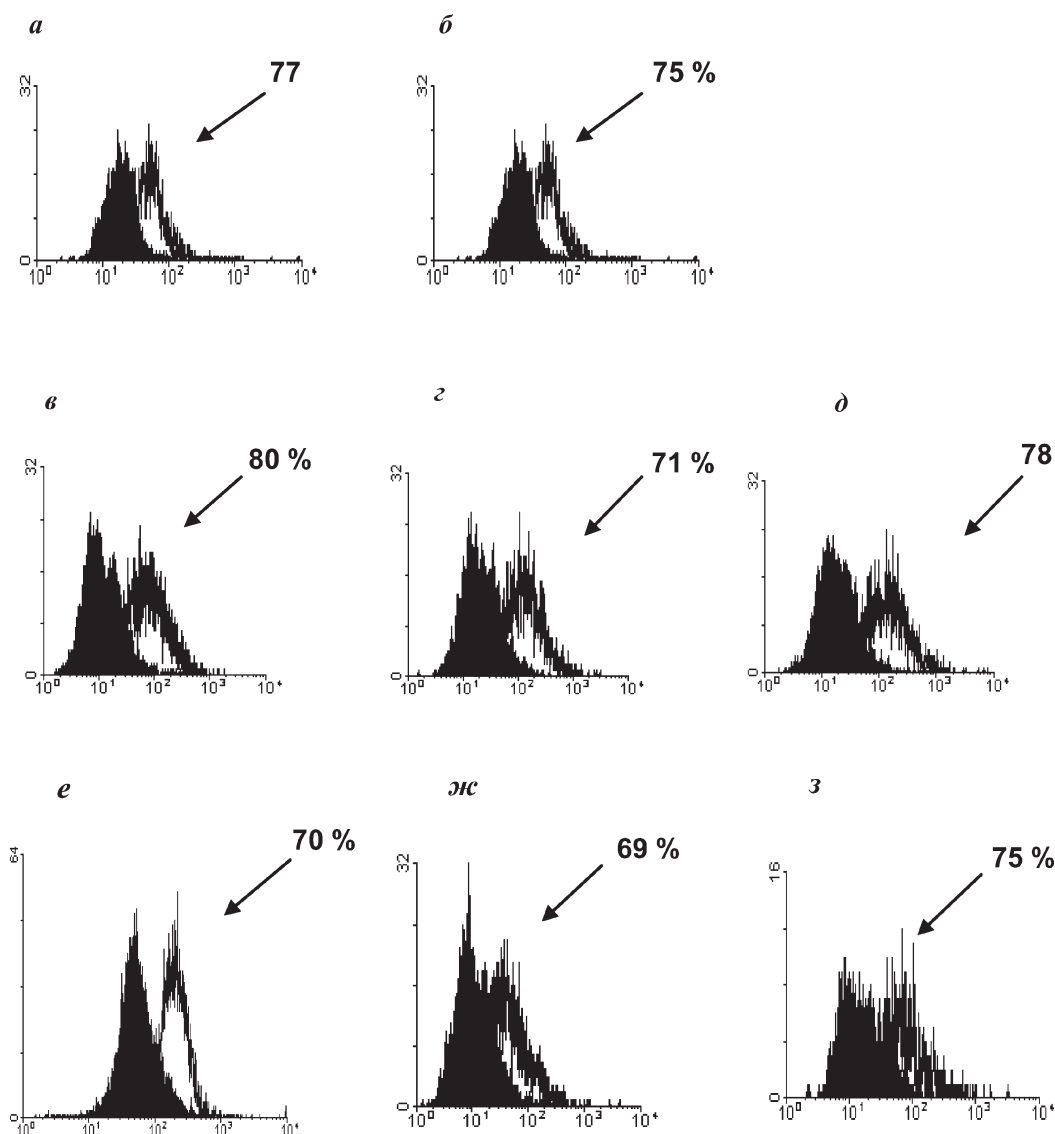


Рис. 1. Зависимость флуоресценции клеток рака молочной железы человека линии MCF-7 от условий иммунофлуоресцентного окрашивания специфическими антителами к ЭРβ. Представлены гистограммы распределения клеток в зависимости от интенсивности специфической флуоресценции после инкубации в течение 30 мин с первичными и вторичными антителами в концентрации 10 мкг/мл. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции (усл.ед.), по оси ординат – количество клеток. Темные гистограммы – изотипическое окрашивание клеток; светлые – специфическое окрашивание. Стрелками на рисунке отмечено количество (%) специфически флуоресцирующих клеток в исследованной суспензии. Фиксация клеток раствором формальдегида: *а* – 0,01%; *б* – 4%. Количество клеток в 1 мл анализируемой суспензии: *в* – 1 млн; *г* – 500 тыс.; *д* – 100 тыс. Количество анализируемых клеток: *е* – 5000; *ж* – 3000; *з* – 1000

кубации с вторичными антителами. В связи с этим мы провели окрашивания ЭРβ согласно указанным методикам, используя фосфатный буфер (рН 7,4) в соотношении 1:20, и сравнили полученные значения доли специфически окрашенных клеток. В результате показана возможность использования следующего “экономичного” режима отмывки суспензии клеток: однократно – десятикратным объемом буфера после пермеабиллизации и двукратно – двадцатикратным объемом буфера после инкубации с вторичными антителами. И наконец, важнейшее требование к мето-

ду диагностики эстрогенового статуса опухоли – количественная характеристика доли клеток в опухолевом узле, экспрессирующих ЭРβ. Получить нужные результаты возможно, если определиться с диапазоном концентраций антител и временем инкубации так, чтобы достичь полного окрашивания всех клеток в исследуемой суспензии. С учетом необходимости снижения стоимости анализа и его трудоемкости эти условия необходимо определять в области минимальной концентрации антител и минимального времени инкубации. Для этого в первую очередь проведен

иммунофлуоресцентный анализ ЭРβ по методике, рекомендованной производителями антител. В исследовании использовали три концентрации антител: 5,0; 7,5 и 10 мкг/мл. Время инкубации с первичными и вторичными антителами составило 30 мин. На рис. 2 (кривая 1) показано, что доля специфически окрашенных клеток не изменяется при увеличении концентрации антител от 5 до 10 мкг/мл и находится в диапазоне 78–81%. Отсутствие зависимости специфического окрашивания клеток от концентрации антител свидетельствует о том, что использованные концентрации специфических антител избыточны и возможно их снижение.

Для определения концентрации специфических антител, которая является минимальной, но достаточной для окрашивания всех клеток, экспрессирующих ЭРβ, требовалось найти диапазон концентраций, в котором регистрируется линейное увеличение доли окрашенных клеток и выход показателя на плато. При решении этой задачи также была пролонгирована инкубация с первичными и вторичными антителами до полутора часов.

При использовании стандартной методики (инкубация с первичными и вторичными антителами по 30 мин) уже при концентрации специфических антител 0,3 мкг/мл отмечено, что доля специфически окрашенных клеток составляет 40%. При увеличении концентрации антител вплоть до 5 мкг/мл наблюдался линейный рост этого показателя до 77% и его выход на плато при дальнейшем увеличении концентрации антител до 10 мкг/мл. В области плато значения показателя практически полностью совпали с данными, полученными ранее с использованием коммерческого протокола (рис. 2, кривая 1), при этом максимальное значение доли окрашенных клеток составило 77 и 81% соответственно.

При увеличении времени инкубации с первичными и вторичными антителами до 1,5 ч эффективность выявления клеток, экспрессирующих ЭРβ, повысилась (рис. 2, кривая 3). При начальной концентрации антител 0,3 мкг/мл доля окрашенных клеток увеличилась с 40 до 55%, выход на плато отмечен уже при концентрации антител 2,5 мкг/мл (в сравнении с 30-минутной инкубацией при 5 мкг/мл), а максимальное количество специфически окрашенных клеток повысилось с 77 до 85% (рис. 2, кривые 2, 3). Таким образом, увеличение времени инкубации с первичными и вторичными антителами до 1,5 ч в сравнении с коммерческой рекомендацией 30-минутной инкубации позволяет значительно (с 5 до 2,5 мкг/мл) снизить концентрацию антител, при которой достигается окраши-

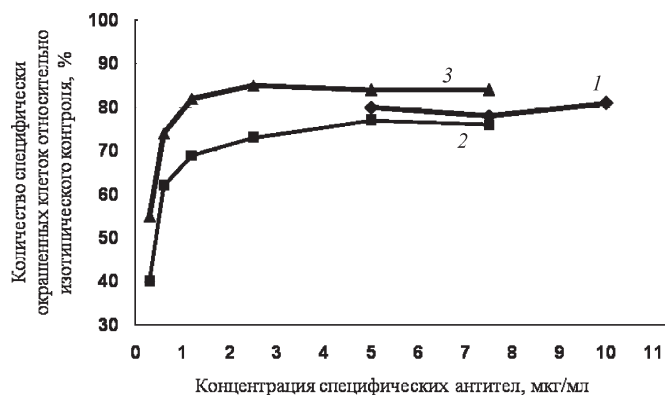


Рис. 2. Зависимость количества специфически окрашенных клеток рака молочной железы человека линии MCF-7 от концентрации антител к ЭРβ и продолжительности инкубации с первичными и вторичными антителами. Продолжительность инкубации клеток с первичными и вторичными антителами: 1 и 2 – 30 и 30 мин; 3 – 1,5 и 1,5 ч. Представлены результаты типичного для конкретных условий эксперимента, который повторен не менее трех раз

вание всех клеток, экспрессирующих ЭРβ. Поскольку для повышения достоверности получаемых данных необходимо использовать как минимум две концентрации антител в области плато, а лучше – добавить третью из области линейной зависимости, различия в количестве используемых антител становятся весьма существенными.

Выявленное преимущество пролонгирования инкубации клеток с первичными и вторичными антителами дало основание к еще большему увеличению периода инкубации клеток с первичными антителами – до 15–20 ч (инкубация в течение ночи). Данные, приведенные на рис. 3, а, позволяют сравнить результаты окрашивания клеток, инкубированных с первичными антителами в течение полутора часов и в течение ночи. Инкубация с вторичными антителами в обоих случаях длилась 1,5 ч. Видно, что только в диапазоне низких концентраций антител выявляются различия в специфическом окрашивании клеток. Концентрация антител 0,03 мкг/мл является минимальной для выявления клеток, экспрессирующих ЭРβ при 1,5-часовой инкубации, – количество специфически окрашенных клеток составляет 12% (рис. 3, а, кривая 1). При той же концентрации антител, но инкубации в течение ночи, показатель существенно выше – 35% (рис. 3, а, кривая 2). Схожая ситуация наблюдается при концентрации антител 0,06 и 0,12 мкг/мл. Увеличение времени инкубации с первичными антителами от 1,5 до 18 ч приводит к повышению доли специфически окрашенных клеток: в первом случае – от 26 до 46%, во втором – от 35 до 54%. Количественное

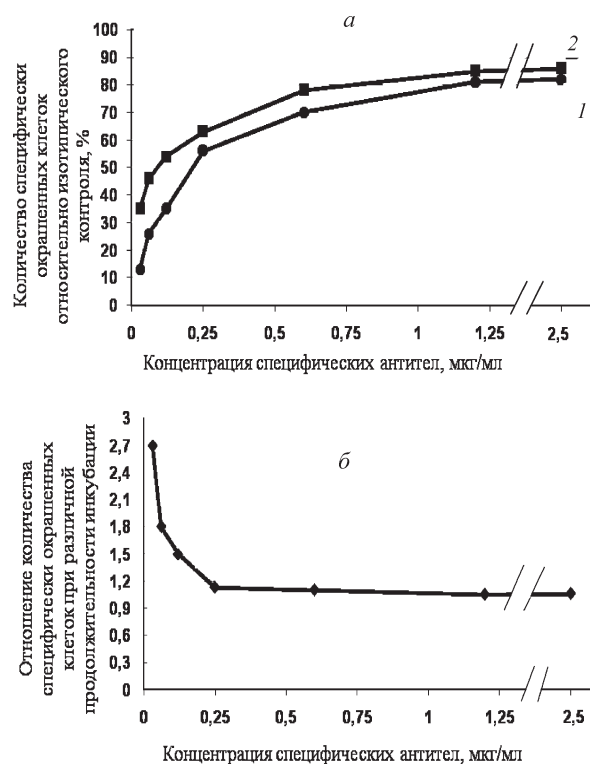


Рис. 3. Зависимость количества специфически окрашенных клеток рака молочной железы линии MCF-7 от концентрации антител к ЭРβ и продолжительности инкубации с первичными антителами. Продолжительность инкубации клеток с первичными антителами: 1 – 1,5 ч, 2 – в течение ночи. Инкубация с вторичными антителами – 1,5 ч

преимущество “ночной” инкубации по сравнению с 1,5-часовой при использовании малых концентраций первичных антител продемонстрировано на рис. 3, б. Доля специфически окрашенных клеток при концентрации 0,03; 0,06 и 0,12 мкг/мл увеличилась в 2,7; 1,8 и 1,5 раза соответственно. При более высоких значениях концентрации антител соотношение доли специфически окрашенных клеток при разных сроках инкубации приближается к 1.

При использовании более высокой концентрации антител (вплоть до 5 мкг/мл) увеличение времени инкубации не влияет на показатель специфически окрашенных клеток как в области линейной зависимости, так и при достижении плато. Таким образом, инкубация клеток с первичными антителами в течение 1,5 ч или ночи позволяет выявлять все клетки, экспрессирующие ЭРβ, при использовании равных концентраций антител – 2,5 и 5 мкг/мл. Тем не менее тот факт, что существует диапазон низких концентраций антител, в котором специфическое окрашивание клеток эффективнее при “ночной” инкубации, чем при 1,5-часовой, свидетельствует о возможно большей

чувствительности метода в условиях более продолжительной инкубации с первичными антителами. Это позволяет рекомендовать для практического использования именно такую (15–20 ч) инкубацию с первичными антителами. К тому же этот режим проведения анализа значительно более удобен для применения в клинических лабораториях.

Развивая тему клинического применения разработанной методики, необходимо еще раз остановиться на условиях и алгоритме проведения анализа экспрессии эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека с использованием моноклональных антител фирмы “Abcam” (таблица). Фиксацию и хранение суспензии клеток для возможного повторного исследования целесообразно проводить 4%-м раствором формальдегида. Количество клеток в суспензии при инкубации с антителами может быть уменьшено от 1 млн до 100 тыс. в случае минимального размера исследуемого образца опухоли, получаемого при эндоскопическом исследовании или биопсии опухоли. По этой же причине допустимо варьирование количества клеток, анализируемых на проточном цитофлуориметре, от 5 тыс. до 500, хотя, безусловно, при анализе большего количества клеток вероятность ошибки измерения меньше. Адекватным и уменьшающим время анализа является сокращение числа отмывок клеток за счет увеличения до соотношения 1:10 и 1:20 объема промывочного раствора фосфатного буфера: 1 раз – после пермеабиллизации и 2 раза – после инкубации с антителами. Продолжительность инкубации с первичными антителами в течение 15–20 ч (ночная инкубация), а с вторичными – 1,5 ч, является оптимальной с точки зрения большей чувствительности метода, сокращения расхода антител, а также удобства проведения анализа, учитывая нерегламентированность времени получения опухолевого образца и регламентированность продолжительности ежедневной работы клинических лабораторий.

И наконец, отдельный важный вопрос о концентрациях антител, которые необходимо использовать для получения достоверных количественных данных о доле клеток, экспрессирующих эстрогеновый рецептор β в исследуемой суспензии клеток и, следовательно, – в исследуемом образце опухоли. Мы считаем, что это должен быть диапазон концентраций, в который включены как область линейной зависимости флуоресцентного специфического окрашивания клеток от концентрации антител, так и область плато. Применительно к культуре клеток рака молочной железы линии MCF-7, которая должна использоваться при

Оптимизация условий иммунофлуоресцентного анализа экспрессии эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека с использованием моноклональных антител фирмы “Abcam” (клон 14C8)

Оптимизируемый этап анализа	Протестированные условия	Рекомендуемые условия
Фиксация клеток раствором формальдегида	0,01%	Фиксация 4% раствором формальдегида
	4%	
Количество клеток в 1 мл суспензии при инкубации с антителами	1 млн	От 100 тыс. до 1 млн клеток/мл
	500 тыс.	
	100 тыс.	
Количество клеток, анализируемое на проточном цитофлуориметре	5 тыс.	От 1 до 5 тыс. клеток
	3 тыс.	
	1 тыс.	
Пермеабиллизация клеток 1% раствором Tween 20	В аликвотах суспензии клеток (по 100 мкл)	Пермеабиллизация в общем объеме суспензии клеток
	В общем объеме суспензии клеток	
Количество отмывок клеток от пермеабилзирующего агента фосфатным буфером (pH 7,4) в соотношении 1:10	1	Одна отмывка клеток фосфатным буфером после пермеабиллизации
	2	
Количество отмывок клеток после первичных и вторичных антител фосфатным буфером (pH 7,4) в соотношении 1:20	3+3	2 отмывки клеток фосфатным буфером после инкубации с вторичными антителами
	0+2	
	0+1	
Продолжительность инкубации с первичными и вторичными антителами	30 мин и 30 мин	Инкубация с первичными антителами в течение ночи, инкубация с вторичными – 1,5ч
	1,5 ч и 1,5ч	
	Ночь и 1,5ч	
Количество моноклональных антител к эстрогеновому рецептору β	0,3; 0,6; 1,2; 2,5; 5,0; 7,5 и 10 мкг/мл	Для референсной культуры клеток MCF-7 – 0,6; 1,2 и 2,5; при клинической оценке – 1,2; 2,5 и 5,0 мкг/мл

каждом анализе опухолей человека в качестве референсной культуры для контроля активности антител, эти условия выполняются при концентрациях 0,6; 1,2 и 2,5 мкг/мл. При исследовании экспрессии ЭР β в солидных опухолях человека необходимо использовать более высокие концентрации антител – 1,2; 2,5 и 5 мкг/мл, так как при этом увеличивается вероятность получения “дублирующих” данных (повторов) в области плато, т.е. в области выявления всех клеток, экспрессирующих исследуемый маркер. В отдельных случаях, когда область плато в указанном диапазоне

концентраций антител недостижима, анализ должен быть повторен с большими концентрациями антител. Такие варианты, судя по результатам проведенного авторами исследования тридцати образцов немелкоклеточного рака легкого, могут быть только единичными, что подтверждает правильность разработанного алгоритма клинической оценки экспрессии эстрогенового рецептора β в солидных опухолях человека с использованием моноклональных антител фирмы “Abcam” (клон 14C8), специфичных по отношению к N-терминальному домену белка ЭР β человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bundred N.J.* // *Cancer Treat Rev.* 2001. **27**. N 3. P. 137.
2. *Eneman J.D., Wood M.E., Muss H.B.* // *Oncology (Williston Park)*. 2004. **18**. N 14. P. 1733.
3. *Osborne C.K., McGuire W.L.* // *Bull Cancer*. 1979. **66**. N 3. P. 203.
4. *Kuiper G.G., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J.A.* // *Proc Nat. Acad. Sci.* 1996. **93**. N 12. P. 5925.
5. *Богущ Т.А., Дудко Е.А., Беме А.А., Богущ Е.А., Полоцкий Б.Е., Тюляндин С.А., Давыдов М.И.* // *Антибиотики и химиотерапия*. 2009. **54**. № 7–8. С. 41.
6. *Богущ Т.А., Дудко Е.А., Беме А.А., Богущ Е.А., Ким А.И., Полоцкий Б.Е., Тюляндин С.А., Давыдов М.И.* // *Биохимия*. 2010. **75**. № 12. С. 1633.
7. *Leake R., Barnes D., Pinder S., Ellis I., Anderson L., Anderson T., Adamson R., Rhodes T., Miller K., Walker R.* // *J. Clin. Pathol.* 2000. **53**. P. 634.
8. *Parker R., Huntsman D., Lesack D., Cupples J., Grant D., Akbari M., Gilks C.* // *Am. J. Clin. Pathol.* 2002. **117**. P. 723.
9. *Conzen S.* // *Molecular Endocrinology*. 2008. **22**. N 10. P. 2215.
10. *Badve S.* // *Breast Cancer Res Treat.* 2009. **116**. P. 145.
11. *McGuire W., De La Garza M., Chamness G.C.* // *Cancer Research*. 1977. **37**. P. 637.
12. *Clark G.M., Osborne C.K., McGuire W.* // *J. Clin. Oncol.* 1984. **2**. N 10. P. 1102.
13. *Foley E.F., Jazaeri A.A., Shupnik M.A., Jazaeri O., Rice L.W.* // *Cancer Res.* 2000. **60**. N 2. P. 245.

Поступила в редакцию 20.01.10

QUANTITATIVE IMMUNOFLUORESCENCE ESTIMATION OF ESTROGEN RECEPTORS β IN HUMAN SOLID TUMORS BY FLOW CYTOMETRY

T.A. Bogush, A.S. Shaturova, Ye.A. Dudko, E.E. Juraev, B.Ye. Polotsky, M.I. Davydov

(*N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Russian Academy of Medical Sciences*)

The adaptation of immunofluorescence analysis for estrogen receptors β (ER β) quantitative estimation in biopsy specimens of human solid tumors by flow cytometry was performed. The primary monoclonal antibodies specific to the N-terminal domain of human ER β protein (clone 14C8, Abcam) and the secondary FITC-conjugated antibodies (F2772, Sigma) were used in the investigation. We have shown the possibility of cell fixation in 4% formaldehyde solution, that enables long-term storage of tumor cell suspensions and, if necessary, verification of the results. It was shown also the possibility to decrease the cell concentration for the test (from 1×10^6 to $0,5 \times 10^3$ cells/ml) and the cell number for reliable detection of ER β by flow cytometer (from 1×10^4 to 1×10^3 cells). The later allows investigation both surgical and endoscopic biopsy specimens. It was found that the overnight cell incubation with the primary antibodies (15–20 h), and with the secondary antibodies (1.5 h) optimizes the sensitivity of the method (as compared to 1.5 h incubation with each of the antibodies) and thereby let reduce the antibody consumption. That time-schedule of the incubation allows also revealing the all ER β expressing cells in the tumor sample investigated because of reaching the plateau region of the cell fluorescence and optimizing the investigation for the staff. The range of the primary antibody concentrations 1.2, 2.5 and 5.0 $\mu\text{g/ml}$ which covers both the linear and the plateau regions of the specific cell fluorescence in solid human tumor investigated is recommended for clinical testing. Human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 and the range of the primary antibody concentrations 0.06, 1.2 and 2.5 $\mu\text{g/ml}$ is recommended for the regular antibody activity control in clinical using.

Key words: *estrogen receptor β , immunofluorescence, flow cytometry, solid human tumors.*

Сведения об авторах: *Богущ Татьяна Анатольевна* – зав. лаб. медицинской химии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, докт. биол. наук, профессор (324-18-64); *Шатурова Александра Сергеевна* – аспирант РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (a-l-ya@yandex.ru); *Дудко Евгений Александрович* – научный сотрудник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, канд. биол. наук (labmedchem@mail.ru); *Жураев Элер Эргашбоевич* – аспирант РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (8 926 904 07 84); *Полоцкий Борис Евсеевич* – глав. науч. сотр. хирургического торакального отделения РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, докт. мед. наук, профессор (324-26-30); *Давыдов Михаил Иванович* – директор РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, акад. РАН и РАМН, докт. мед. наук, профессор.