

УДК 618.11/19-006.6:576.53.083.3

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭКСПРЕССИИ ЭСТРОГЕНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ БЕТА В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК РАКА ЯИЧНИКОВ И МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Т.А. Богуш^{1*}, А.А. Башарина¹, О.С. Бурова¹, Е.А. Богуш^{1,2}, В.Ю. Кирсанов²,
А.М. Щербakov¹, В.А. Сюваткин¹, О.М. Рябина¹, М.А. Барышникова¹,
В.С. Косоруков¹

(¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; ²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет); *e-mail: tatbogush@mail.ru)

Иммунофлуоресцентным методом, ассоциированным с проточной цитометрией, проведена сравнительная количественная оценка экспрессии эстрогеновых рецепторов бета (ER β) в культурах клеток рака яичников линий COLO-704, OVCAR-3, EFO-21 и SK-OV-3, а также рака молочной железы линии MCF-7. Высокий уровень экспрессии ER β (88–91%) выявлен во всех исследованных клетках, но по интенсивности экспрессии маркера отмечены существенные различия между культурами клеток рака яичников (в OVCAR-3, EFO-21 и SK-OV-3 выше, чем в COLO-704 соответственно в 1,6; 2,3 и в 3,5 раза). Более того, в клетках SK-OV-3, EFO-21 и OVCAR-3 интенсивность экспрессии ER β была значительно выше по сравнению с клетками MCF-7: в 2,7; 1,4 и в 1,9 раз соответственно. Авторы предполагают, что в отличие от рака молочной железы у больных раком яичников именно ER β , а не ER α , могут стать главной мишенью антиэстрогенов. Выявленные различия в экспрессии ER β в ряду широко используемых культур клеток рака яичников позволяют рекомендовать их для дальнейших фундаментальных исследований вклада именно ER β в реализацию биологических эффектов антиэстрогенов.

Ключевые слова: эстрогеновые рецепторы бета, проточная цитометрия, COLO-704, OVCAR-3, EFO-21, SK-OV-3, MCF-7.

Расширение показаний к применению антиэстрогенов – это тренд современной фундаментальной и клинической онкологии. В частности, первый таргетный препарат тамоксифен, который на протяжении более 40 лет является золотым стандартом адъювантной терапии рака молочной железы, в 2018 г. введен в стандарты терапии рака яичников в рекомендациях Европейского общества гинекологической онкологии и Российского общества клинической онкологии [1, 2]. При этом следует подчеркнуть, что в отличие от рака молочной железы, где четко обозначена мишень тамоксифена – эстрогеновые рецепторы альфа (ER α), для рака яичников мишень этого антиэстрогена не определена и препарат рекомендован для лечения больных раком яичников низкой степени злокачественности (RUSSCO).

Однако мишенью антиэстрогенов служат рецепторы и другого типа – эстрогеновые рецепторы бета (ER β), которые также участвуют в важнейших этапах клеточного сигналинга [3, 4], контролируют пролиферативную активность клеток [5] и экспрессируются у больных в ткани рака яичников [6], причем даже более интенсивно по сравнению с ER α [7].

Приведенные данные указывают на необходимость расширения фундаментальных исследований по сравнительному изучению роли ER β в реализации биологических эффектов антиэстрогенов при воздействии на клетки рака не только молочной железы, но и яичников. Однако до настоящего времени в литературе отсутствуют сведения о показателях экспрессии ER β в клетках разных культур рака яич-

ников человека в сравнении с раком молочной железы.

Цель настоящего исследования состояла в том, чтобы дать количественную иммунофлуоресцентную характеристику уровня и интенсивности экспрессии ER β в полученных из международных банков культурах клеток рака яичников линий COLO-704, OVCAR-3, EFO-21 и SK-OV-3 в сравнении с одной из наиболее изученных и часто используемых в фундаментальных исследованиях клеточной линией рака молочной железы MCF-7.

Материалы и методы

Исследование проведено на панели клеточных линий. Клетки рака яичников EFO-21 (ACC 235) и COLO-704 (ACC 198) получены из коллекции Leibniz Institute DSMZ; OVCAR-3 (НТВ-161) и SK-OV-3 (НТВ-77) (Американская коллекция клеточных культур (ATCC)). Клетки культуры сравнения – клетки рака молочной железы линии MCF-7 (НТВ-22) также получены из ATCC. До проведения экспериментов все культуры хранили в криобанке НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Идентичность клеточных линий подтверждали непосредственно перед экспериментами с помощью анализа коротких tandemных повторов (GORDIZ). Клетки MCF-7 и SK-OV-3 культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM; Gibco), клетки EFO-21, COLO-704 и OVCAR-3 – в среде Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640; Gibco). Среды содержали 10% эмбриональной сыворотки телят (HyClone), 50 ед./мл гентамицина (ПанЭко) и 0,1 мг/мл пирувата натрия (Santa Cruz). Условия в инкубаторе (NuAir): температура 37 °С, 5% CO₂, относительная влажность 80–85%. В экспериментах использовали культуры в логарифмической фазе роста. Один миллион клеток каждой культуры высевали на чашки Петри (60 мм, Corning) и через 24 ч фиксировали по протоколу, описанному ранее [8].

Количественная оценка показателей экспрессии ER β в культурах клеток проведена ранее разработанным иммунофлуоресцентным методом, ассоциированным с проточной цитометрией [8]. В работе использованы первичные моноклональные антитела к ER β (клон 14C8, ab288, Великобритания), а также вторичные антитела, конъюгированные с DyLight650 (ab98729, Великобритания). Исследование проведено в области линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации антител вблизи достижения плато. Рабочие концентрации первичных антител к ER β составили 2,5 и 5,0 мкг белка/мл,

вторичных – 0,5 мкг белка/мл. Для удаления из анализа дебриса после завершения инкубации с антителами клетки инкубировали со специфическим красителем ДНК Hoechst 33258 («Sigma-Aldrich», США). В анализ включали только клетки с окрашенными ядрами, клеточные конгломераты выводили из анализа путем дополнительного гейтирования. Флуоресценцию клеток измеряли на проточном цитофлуориметре «Navios» («Beckman Coulter», США).

Для оценки экспрессии ER β в культурах клеток использовали два показателя – интенсивность и уровень экспрессии, рассчитанные с помощью программы FlowJo 10.0.08 («FlowJo LLC», США). Интенсивность экспрессии ER β – среднее геометрическое значение специфической флуоресценции антител в образце. Уровень экспрессии маркера (в процентах) – число специфически флуоресцирующих клеток относительно контроля (инкубация клеток только с вторичными антителами).

Для визуализации распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции использовали гистограммы, построенные в программе WinMDI 2.9.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента, включенного в пакет GraphPad Prism 7.0 («GraphPad Software», США). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Результаты типичного эксперимента, демонстрирующие гистограммы распределения клеток в зависимости от внутриклеточной флуоресценции после инкубации с моноклональными антителами к ER β , представлены на рис. 1. Видно, что все клеточные культуры исследованы в линейном диапазоне зависимости специфической флуоресценции клеток от концентрации специфических антител, так как показатели экспрессии (уровень и интенсивность) увеличивались при росте концентрации антител. Отметим, что при использованной концентрации антител уровень экспрессии маркера достигает плато, так как изменение показателя при увеличении концентрации антител не превышает 10%.

В целом, экспрессия ER β выявлена во всех исследованных культурах клеток, при этом различия в уровне экспрессии маркера между клетками рака молочной железы линии MCF-7 и разными культурами клеток рака яичников были незначительными. Так, уровень экспрессии ER β в клетках MCF-7 составил 88%, а в клетках рака яичников SK-OV-3, OVCAR-3, EFO-21 и COLO-704 – 89, 88, 91 и 90%

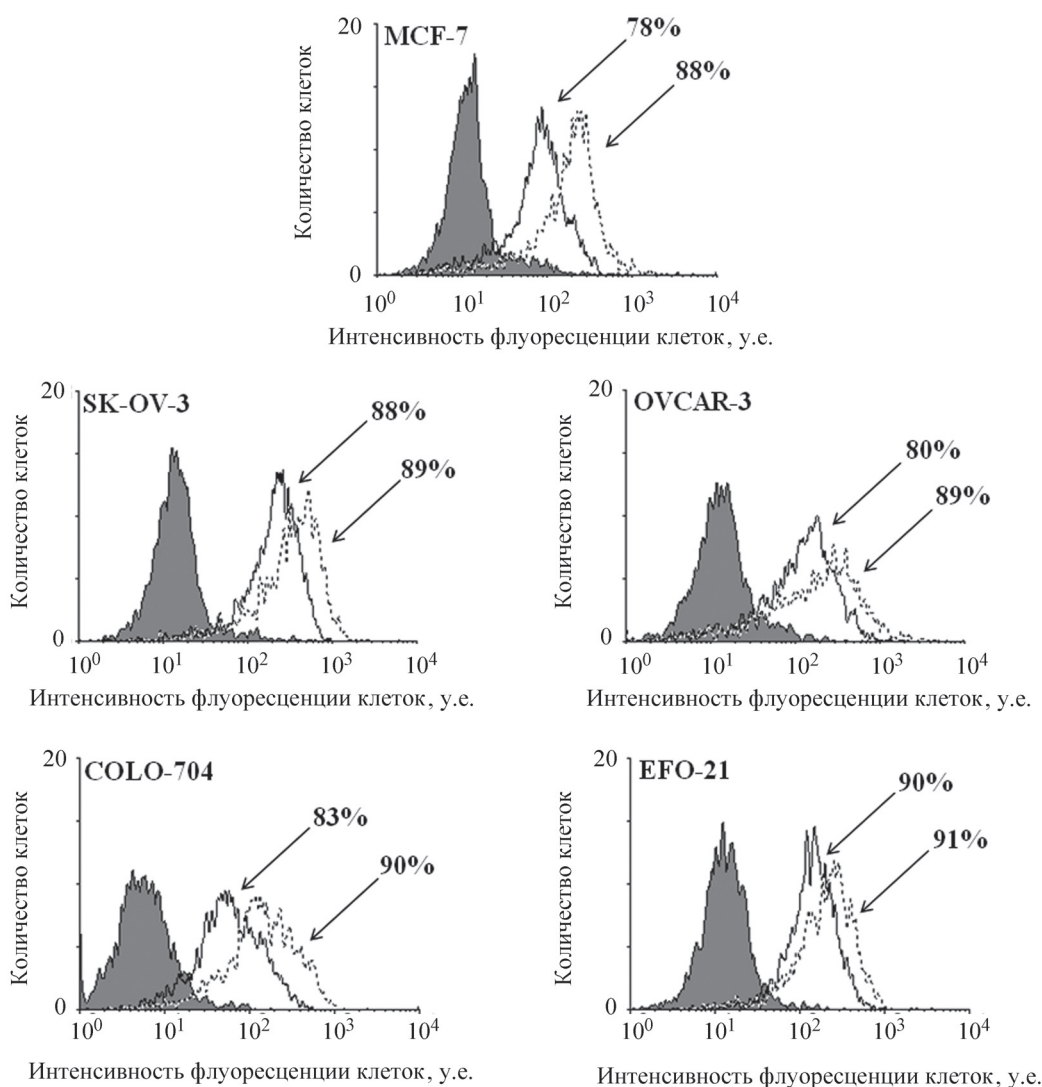


Рис. 1. Уровень и интенсивность экспрессии ER β в клетках культур рака молочной железы MCF-7 и рака яичников SK-OV-3, OVCAR-3, COLO-704, EFO-21 при разных концентрациях специфических моноклональных антител. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции клеток, измеренная в условных единицах в канале FL6, логарифмическая шкала; по оси ординат – количество клеток. Гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции после инкубации только с вторичными антителами (закрашенные, контроль) и с моноклональными антителами к ER β в концентрации 2,5 или 5,0 мкг/мл (сплошная и пунктирные линии границ, соответственно). Стрелками показан уровень экспрессии ER β (%)

соответственно. Таким образом, в клетках всех исследованных культур уровень экспрессии ER β был высоким.

Иной оказалась ситуация с показателем интенсивности экспрессии ER β , т.е. с числом рецепторов, экспрессирующихся в каждой опухолевой клетке. На рис. 2 представлен типичный результат одного из трех экспериментов. Видно, что по сравнению с клетками рака молочной железы линии MCF-7 лишь в одной из четырех исследованных культур рака яичников (клетках линии COLO-704) интенсивность экспрессии ER β практически не отличалась от показателя клеток рака молочной железы MCF-7 и была лишь в 1,3 раза ниже. В остальных культурах клеток рака яични-

ков (в 75% случаев) интенсивность экспрессии ER β по сравнению с клетками рака молочной железы MCF-7 оказалась значительно выше: в 2,7; 1,4 и в 1,9 раза соответственно в клетках SK-OV-3, EFO-21 и OVCAR-3.

Результаты трех независимых экспериментов сравнительного анализа интенсивности экспрессии ER β в клетках рака яичников разных линий и рака молочной железы MCF-7 приведены в таблице. Сравнение проведено при двух значениях концентрации первичных моноклональных антител в линейной области зависимости флуоресценции от концентрации антител, при этом в обоих случаях получены практически идентичные результаты: интенсивность экспрессии ER β в трех

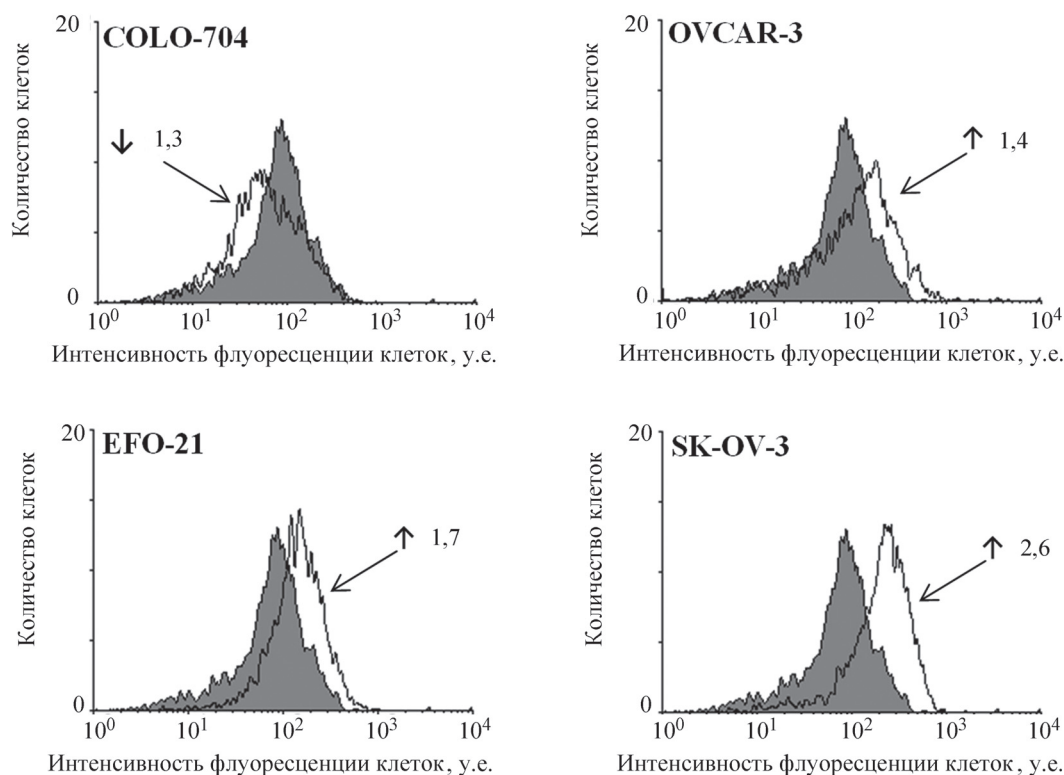


Рис. 2. Интенсивность экспрессии ERβ в клетках культур рака яичников COLO-704, OVCAR-3, EFO-21, SK-OV-3 в сравнении с клетками рака молочной железы MCF-7 при концентрации специфических моноклональных антител 2,5 мкг/мл. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции клеток, измеренная в условных единицах в канале FL6, логарифмическая шкала; по оси ординат – количество клеток. Гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции после инкубации с моноклональными антителами к ERβ: закрашенные – клетки рака молочной железы линии MCF-7; незакрашенные – клетки рака яичников разных линий. Обозначения: ↑ и ↓ – соответственно увеличение и уменьшение интенсивности флуоресценции клеток рака яичников относительно показателя в клетках рака молочной железы MCF-7. Представлены типичные результаты одного из трех экспериментов при использовании концентрации моноклональных антител к ERβ 2,5 мкг/мл

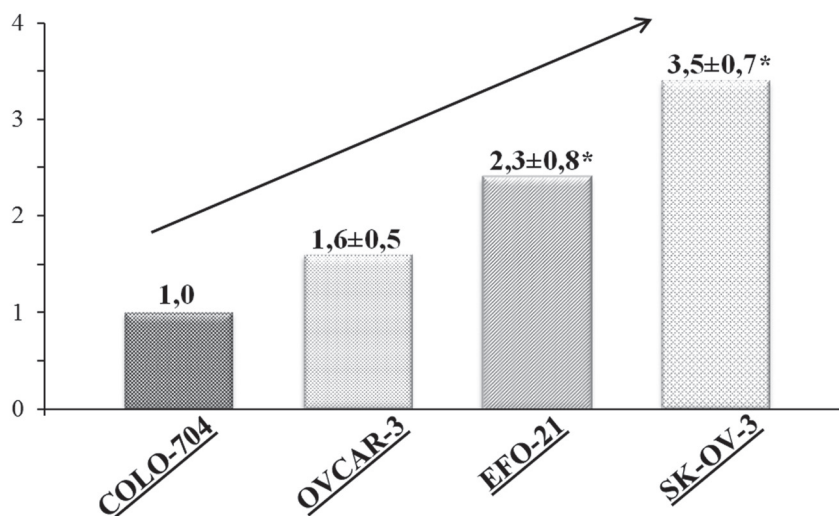


Рис. 3. Различия в интенсивности экспрессии ERβ в клетках культур рака яичников при ранжировании показателей от меньшего к большему (**t*-критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$). По оси абсцисс – названия исследованных культур клеток рака яичников; по оси ординат – отношение интенсивности экспрессии ERβ в исследованных культурах к показателю в клетках COLO-704

Интенсивность экспрессии ERβ в клетках рака яичников по сравнению с клетками рака молочной железы линии MCF-7 при концентрации первичных антител (мкг белка/мл): I – 2,5; II – 5,0

Культура клеток рака яичников	Интенсивность флуоресценции клеток рака яичников относительно показателя клеток рака молочной железы MCF-7	
	I	II
COLO-704	0,74 ± 0,27	0,75 ± 0,23
OVCAR-3	1,37 ± 0,15*	1,35 ± 0,13*
EFO-21	1,70 ± 0,31*	1,64 ± 0,25*
SK-OV-3	2,60 ± 0,56*	2,43 ± 0,42*

* *t*-критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$.

из четырех исследованных культур клеток рака яичников оказалась статистически значимо выше по сравнению с культурой рака молочной железы и лишь в клетках COLO-704 была практически такой же ($p > 0,05$).

Что касается панели исследованных культур клеток рака яичников в целом, то по показателю интенсивности экспрессии ERβ относительно наименьшей интенсивности экспрессии маркера в клетках COLO-704 их можно ранжировать от меньшего к большему следующим образом (рис. 3). Экспрессия ERβ в клетках OVCAR-3 выше, чем в COLO-704 в 1,6 раз; в клетках EFO-21 – в 2,3 раза, а в клетках SK-OV-3 – почти в 3,5 раза. В случае с EFO-21 и SK-OV-3 различия достигают статистической значимости ($p \leq 0,05$).

Таким образом, при сравнительной количественной иммунофлуоресцентной оценке показателей экспрессии ERβ в культурах клеток рака яичников и рака молочной железы, выделенных из интерстициальных жидкостей больных при диссеминации заболевания по полостям (см. раздел «Материалы и методы»), получены следующие результаты.

Показано, что ERβ экспрессируются практически во всех клетках исследованных культур, как рака яичников, так и рака молочной железы линии MCF-7, т.е. по этому показателю клетки опухолей разных локализаций не различаются. Однако по интенсивности экспрессии маркера выявлены принципиальные различия как между клетками рака яичников и молочной железы, так и между клетками рака яичников разных линий. Последнее наблюдение совпадает с описанными нами принципиальными различиями между количественными показателями экспрессии маркера в ткани серозного рака яичников разных больных [7, 9]. При этом показано, что не сам факт наличия в опухоли

рецепторов ERβ, а уровень их экспрессии прогнозирует течение серозного рака яичников после завершения первой линии химиотерапии препаратами платины и таксанами. Благоприятным предиктивным маркером служит выявление в опухоли экспрессии ERβ более чем в 40% клеток [7, 10].

Более того, анализ количественных показателей экспрессии ERβ и ERα в ткани опухолей больных раком яичников продемонстрировал более высокий уровень экспрессии ERβ по сравнению с ERα. Это позволило предположить, что у больных раком яичников рецепторы именно ERβ, а не ERα, могут стать главной мишенью воздействия антиэстрогенов [7]. Вероятно, этим можно объяснить упомянутое в рекомендациях RUSSCO отсутствие корреляции эффекта тамоксифена с экспрессией в опухоли ERα [1].

Полученные результаты, а именно, количественные различия в экспрессии ERβ в ряду широко используемых культур клеток рака яичников, позволяют рекомендовать их для дальнейших фундаментальных исследований вклада именно ERβ в реализацию биологических эффектов антиэстрогенов. Это, безусловно, полезно с практической точки зрения, если учесть упомянутое выше введение в клиническую практику антиэстрогенов как нового подхода в терапии рака яичников, с одной стороны, и отсутствие критериев отбора больных для этой терапии, с другой.

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

рованной вакцинотерапии меланомы», рег. № АААА-А20-120022090056-5) и проекта РФФИ № 18-29-09017 (эксперименты с клеточными культурами).

Конфликта интересов нет.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тюляндин С.А., Коломиец Л.А., Морхов К.Ю., Нечушкина В.М., Покатаев И.А., Тюляндина А.С., Урманчеева А.Ф., Хохлова С.В. // Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO #3s2. 2018. Т. 8. С. 145 (DOI: 10.18 027/2224–5057–2018–8–3s2–145–155).
2. Colombo N., Sessa C., du Bois A., Ledermann J., McCluggage W.G., McNeish I., Morice P., Pignata S., Ray-Coquard I., Vergote I., Baert T., Belaroussi I., Dashora A., Olbrecht S., Planchamp F., Querleu D. // *Annals of Oncology*. 2019. Vol. 30. N 5. P. 672 (DOI: 10.1093/annonc/mdz062).
3. Jia M., Dahlman-Wright K., Gustafsson J.Å. // Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism. 2015. Vol. 29. N 4. P. 557 (DOI: 10.1016/j.beem.2015.04.008).
4. Yaşar P., Ayaz G., User S. D., Güpür G., Muyan M. // *Reproductive Medicine and Biology*. 2016. Vol. 16. N 1. P. 4 (DOI: 10.1002/rmb2.12006).
5. Treeck O., Diepolder E., Skrzypczak M., Schüler-Toprak S., Ortman O. // *BMC Cancer*. 2019. Vol. 19. N 1 P. 745 (DOI: 10.1186/s12885-019-5928-2).
6. Chan K.K.L., Siu M.K.Y., Jiang Y.X., Wang J.J., Wang Y., Leung T.H.Y., Liu S.S., Cheung A.N.Y., Ngan H.Y.S. // *BMC Cancer*. 2017. Vol. 17. N 1. P. 606 (DOI: 10.1186/s12885-017-3601-1).
7. Богущ Т.А., Башарина А.А., Богущ Е.А., Рябинина О.М., Тюляндина А.С., Тюляндин С.А. // ДАН. 2018. Т. 482. № 3. С. 340 (DOI: 10.31857/S086956520003105-8) [Bogush T.A., Basharina A.A., Bogush E.A., Ryabinina O.M., Tjulandina A.S., Tjulandin S.A. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2018. Vol. 482. N 1. P. 249 (DOI: 10.1134/S1607672918050058)].
8. Богущ Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А., Жураев Э.Э., Полоцкий Б.Е., Унгиадзе Г.В., Давыдов М.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2011. Т. 52. № 4. С. 305. [Bogush T.A., Shaturova A.S., Dudko E.A., Juraev E.E., Polotsky B.E., Ungiadze G.V., Davydov M.I. // *Mosc. Univ. Chem. Bull.* 2011. Vol. 66. N 4. P. 305].
9. Богущ Т.А., Башарина А.А., Богущ Е.А., Тюляндина А.С., Тюляндин С.А., Давыдов М.М. // *Рос. биотерапевт. журн.* 2017. Т. 16. № 4. С. 34 (DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-34-37).
10. Богущ Т.А., Башарина А.А., Богущ Е.А., Вихлянцева Н.О., Чемерис Г.Ю., Жордания К.И., Тюляндина А.С., Тюляндин С.А. // *Онкогинекология*. 2019. № 1. С. 4.

Поступила в редакцию 10.11.2019

Получена после доработки 12.12.2019

Принята к публикации 14.04.2020

COMPARATIVE IMMUNOFLUORESCENT ANALYSIS OF ESTROGEN RECEPTOR BETA EXPRESSION IN OVARIAN AND BREAST CANCER CELL LINES

T.A. Bogush^{1*}, A.A. Basharina¹, O.S. Burova¹, E.A. Bogush^{1,2}, V.Yu. Kirsanov², A.M. Scherbakov¹, V.A. Syuvatkin¹, O.M. Ryabinina¹, M.A. Baryshnikova¹, V.S. Kosorukov¹

(¹FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation; ²FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University); *e-mail: tatbogush@mail.ru)

Comparative quantitative evaluation of estrogen receptors beta (ER β) expression was performed by immunofluorescence method using flow cytometry in ovarian cancer cell lines COLO-704, OVCAR-3, EFO-21 and SK-OV-3 as well as breast cancer cell line MCF-7. High level of ER β expression (88%–91%) was revealed in all cell cultures investigated, and significant differences were observed in marker expression intensity between ovarian cancer cell cultures (in OVCAR-3, EFO-21 and SK-OV-3 are higher compared with COLO-704 cells in 1,6; 2,3 and 3,5 times, respectively). Moreover, the intensity of ER β expression was significantly higher in SK-OV-3, EFO-21 and OVCAR-3 than in MCF-7 cells: in 2,7; 1,4 and 1,9 times, respectively. The authors suggest that in contrast to breast cancer patients, ER β and not ER α can be the main target for antiestrogens in ovarian cancer patients. The revealed differences in ER β expression in a number of widely used

ovarian cancer cell cultures let us recommend them for further fundamental researches of ER β to study the biological effects of antiestrogens.

Key words: estrogen receptors beta, flow cytometry, COLO-704, OVCAR-3, EFO-21, SK-OV-3, MCF-7.

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 (tatbogush@mail.ru); *Башарина Анна Александровна* – мл. науч. сотр. группы молекулярных маркёров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (basharinaa@inbox.ru); *Бурова Ольга Семёновна* – ст. науч. сотр. лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. биол. наук (labmedchem@mail.ru); *Богуш Елена Александровна* – ст. науч. сотр. отделения хирургического № 2 ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, ассистент кафедры онкологии лечебного факультета ФGAOY BO Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru); *Кирсанов Владислав Юрьевич* – доцент кафедры онкологии лечебного факультета ФGAOY BO Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru); *Щербakov Александр Михайлович* – зав. лабораторией онкопротеомики ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. биол. наук (labmedchem@mail.ru); *Сюваткин Вячеслав Александрович* – лаборант-исследователь группы молекулярных маркёров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (labmedchem@mail.ru); *Рябинина Ольга Михайловна* – науч. сотр. группы молекулярных маркёров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. биол. наук (labmedchem@mail.ru); *Барышниковна Мария Анатольевна* – зав. лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. фарм. наук (labmedchem@mail.ru); *Косоруков Вячеслав Станиславович* – зав. лабораторией трансгенных препаратов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. биол. наук (labmedchem@mail.ru).