

А.С. Портянко¹, П.Г. Киселев¹, Г.Е. Тур², Ю.В. Горгун³, А.Б. Межеевский¹,
Н.В. Ивинская¹, А.М. Неровня¹, Т.А. Бич¹, Е.Д. Черствый¹

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ КОМПЬЮТЕРНОЙ
ОБРАБОТКИ ИЗОБРАЖЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ТИРОЗИНИРОВАННОГО
 α -ТУБУЛИНА В КЛЕТКАХ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА**
УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,
УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер»²,
ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»³

Ранее нами было установлено изменение экспрессии именно β_{III} изотипа тубулина в инвазивном фронте колоректального рака. На основании этого факта было высказано предположение о возможных других изменениях в составе микротрубочек в инвазивном фронте.

Целью данного исследования явилось установление различий в экспрессии тирозинированного α -тубулина. Гистологические срезы колоректальных аденокарцином были окрашены с использованием метода двойной иммунофлуоресценции с антителами к цитокератину и Tyr-тубулину. Микрофотографии полученных препаратов были проанализированы с использованием ImageJ. Было обнаружено статистически значимое различие между экспрессией Tyr-тубулина в центральных областях и в инвазивном фронте опухолей.

Ключевые слова: колоректальный рак, тубулин, цитоскелет, инвазия.

A.S. Portyanko, P. G. Kiselyov, G.E. Tur, Yu. V. Gorgun, A.B. Mezheevsky, H.V. Ivinskaya, A.M. Neronnya, T.A. Bich, E.D. Cherstvii

**USE OF METHODS OF COMPUTER PROCESSING OF IMAGES ON THE EXAMPLE
OF DEFINITION OF LEVEL OF THE EXPRESSION OF TIROZINIROVANNOGO
 α -ТУБУЛИНА IN CELLS OF THE COLORECTAL CANCER**

Objective of this research was establishment of distinctions in an expression tirozinirovanny α -тубулина. Histologic cuts kolorektalny the adenokartsiny were painted with use of a method of double immunofluorescence with antibodies to a cytokeratin and Tyr-tubulin. Microphotos of the received preparations were analysed with ImageJ use. Statistically significant distinction between Tyr-tubulin's expression in the central regions and in the invasive front of tumors was revealed.

Key words: colorectal cancer, тубулин, cytoskeleton, invasion.

Оригинальные научные публикации

Иммунные методы окрашивания давно стали стандартом для оценки наличия и локализации того или иного белка в клетках или тканях, что позволяет широко использовать эти методы в диагностических и научных морфологических лабораториях. В последнее время отмечен рост количества публикаций, в которых эти методы используются не только для качественного, но и количественного определения содержания исследуемого вещества. Наиболее подходящим методом для подобных задач является иммунофлуоресценция, поскольку интенсивность свечения флуоресцентной метки имеет прямую зависимость от количества визуализируемого антигена. Другая положительная сторона иммунофлуоресценции заключается в возможности одновременной окраски нескольких антигенов и регистрация свечения соответствующих флуорохромов по отдельным, не перекрывающимся, каналам, что позволяет либо изолированно оценивать экспрессию этих антигенов, либо использовать экспрессию одного антигена в качестве «маски» для выделения интересующего региона экспрессии другого. Однако на всех перечисленных выше этапах единственным способом получения результата является компьютерная обработка и анализ изображения.

Колоректальный рак представляет собой не только одну из самых актуальных проблем современной медицины, но и, благодаря хорошо выявляемому инвазивному фронту, модель для изучения процессов, сопровождающих, инвазивный рост опухоли. Ранее нами было установлено изменение экспрессии другого варианта тубулина, а именно β_{III} изоформа, в инвазивном фронте колоректального рака [8]. На основании этого факта было высказано предположение о возможных других изменениях в составе микротрубочек в инвазивном фронте.

Тубулины, как составные компоненты микротрубочек – компонента цитоскелета, представляют интерес с нескольких позиций. Во-первых, именно эти молекулы – точка приложения многих противоопухолевых антимиотических препаратов, включая производные таксанов и Vinca алкалоидов. Во-вторых, микротрубочки участвуют в формировании веретена деления, интерфазной транспортной системы клетки, а также участвуют в обеспечении миграционной активности. В-третьих, α и β тубулины существуют в виде ряда изоформ, а по числу возможных посттрансляционных модификаций относятся к самым модифицируемым белкам. Изоформы и посттрансляционные модификации тубулинов хорошо описаны, известна их роль в регуляции динамики микротрубочек, однако их биологическая функция в норме и патологии до сих пор остается загадкой.

Гены большинства изоформ α -тубулина кодируют на С-концевой тирозин, перед которым находится глутамат. Тирозин может быть удален карбоксипептидазой, а затем добавлен вновь тубулин-тирозин лигазой. Известно, что субстратом лигазы чаще является свободный тубулин, тогда как карбоксипептидазы – тубулин в составе микротрубочек [9, 10]. Таким образом, детирозинирование Туг-тубулина ведет к образованию Glu-тубулина, а ретирозинирование последнего – Туг-тубулина. Туг-тубулин в больших количествах присутствует в лабильных микротрубочках (интерфазная сеть и митотическое веретено), а Glu-тубулин – в стабильных (аксо-

немы, базальные тельца, центриоли, centrosомы, жгутики и реснички) [3, 5, 6, 7].

Таким образом, целью данного исследования явилось установление различий в экспрессии Туг-тубулина в центре и инвазивном фронте колоректального рака.

Материал и методы

Исследование было проведено на фиксированном в формалине гистологическом операционном материале 36 колоректальных аденокарцином. В качестве первичных использовались моноклональные мышинные антитела к Туг-тубулину (клон TUB-1A2, изотип IgG₃, Sigma-Aldrich), и к цитокератину (клон AE1/3, изотип IgG₁, DAKO, Дания), оба в разведении 1:400. Для визуализации применялись вторичные гусиные антитела к изотипам мышинных антител IgG₃ и IgG₁, конъюгированные с флуорохромами AlexaFluor® 488 и 555 соответственно (Molecular Probes, Invitrogen, США) в разведении 1:200.

Гистологические срезы толщиной 4 мкм монтировались на предметные стекла, обработанные 3-аминопропилтриэтоксисиланом, и после депарафинизирования в ксилоле регидратировались в этаноле. Демаскировка антигенов проводилась в нагреваемой барокамере DAKO Pascal в цитратном буфере (pH 6) в течение 2,5 мин. Неспецифическое связывание блокировалось 1% раствором бычьего сывороточного альбумина в течение 30 мин. Инкубация с коктейлем из первичных антител проводилась в холодильной камере при 4°C в течение 18 ч. Детекция связавшихся антител производилась коктейлем вторичных антител. Для контрокрашивания ядер использовался DAPI. Для проведения отрицательного контрольного окрашивания использовался Isotype Control For Mouse Primary Ab (Molecular Probes, Invitrogen, США). Срезы колоректального рака с интенсивным окрашиванием использовались в качестве положительного контроля. Окрашенные срезы заключались в среду, содержащую антицветящий агент (DAKO, Дания).

Съемка производилась на микроскопе с флуоресцентной осью Leica DM5000 цифровой камерой Leica DFC420c с использованием объектива $\times 20$ по 10 случайных непересекающихся полей зрения из центральной зоны и 10 последовательных непересекающихся полей зрения из инвазивного фронта каждой опухоли. Детекция флуоресценции DAPI (ядра) производилась с использованием куба флуоресцентных фильтров Leica A4, AlexaFluor® 488 (Туг-тубулин) – L5, AlexaFluor® 555 (цитокератин) – Y3. Для исключения систематической ошибки выбора, связанной с влиянием видимой позитивной искомой (в данном случае – на Туг-тубулин) реакции на решение исследователя, выбор поля зрения для съемки производился «вслепую» по каналу L5 (цитокератин) (Рис.1А).

Для обработки изображений использовался программный пакет ImageJ ver.1.46r. Эпителиальный регион автоматически выделялся по каналу L5 (цитокератин), после чего полученная «обводка» накладывалась на изображение с канала Y3 (Туг-тубулин), где и производились измерения интегрированной плотности. Интенсивность экспрессии определялась как отношение интегрированной плотности к площади региона. Встроенный язык макрокоманд позволил автоматизировать этот процесс.

Таблица. Экспрессия Туг-тубулина в колоректальном раке.

Область	Количество эпителиальных регионов	Среднее	Медиана	Стандартное отклонение	Доверительный интервал	
					-95%	+95%
Центр	7594	24,26	21,45	13,68	13,47	13,90
Инвазивный фронт	9190	19,31	17,42	10,84	10,68	11,00

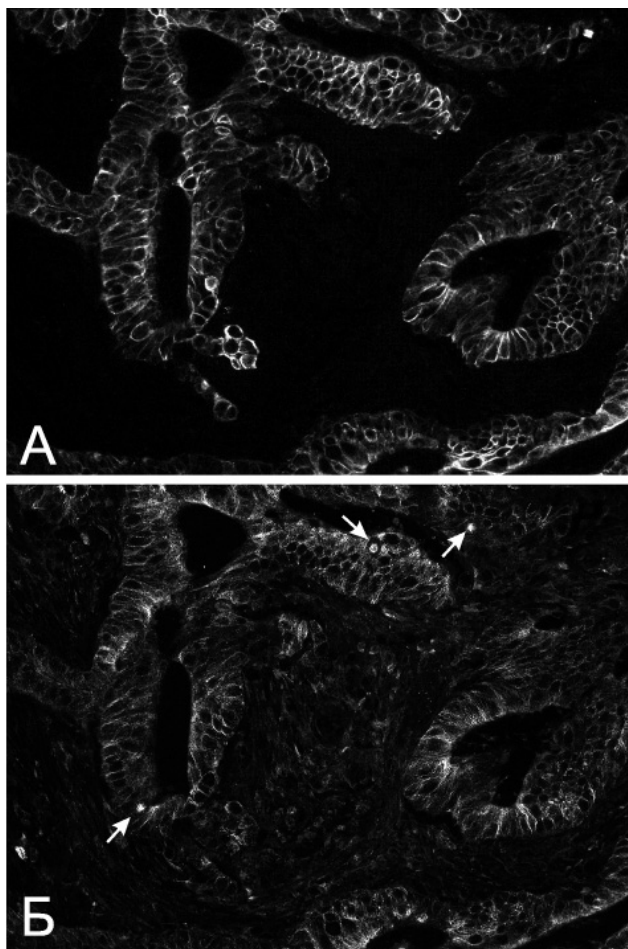


Рис. 1 - Иммунофлуоресцентное окрашивание гистологических срезов КРР с антителами к цитокератину (А) и Туг-тубулину (Б), флуорохром – AlexaFluor® 555 (А) и AlexaFluor® 488 (Б), объектив $\times 20$. Б. Стрелками указаны митотические веретена.

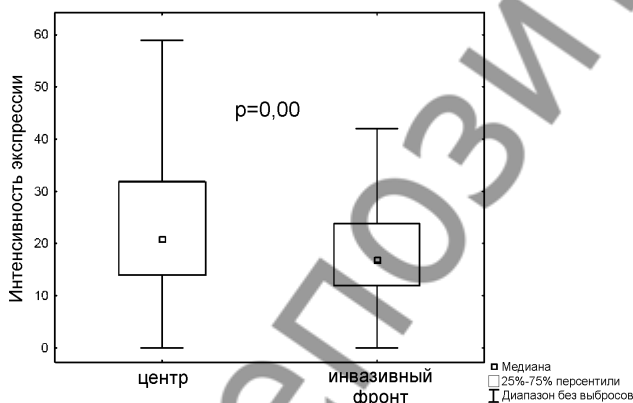


Рис. 2 - График распределения интенсивности экспрессии Туг-тубулина в центре опухолей и в инвазивном фронте.

Статистический анализ производился с использованием пакета Statistica 10 (StatSoft, Inc.)

Результаты и обсуждение

Экспрессия Туг-тубулина была выявлена во всех случаях, при этом в цитоплазме отчетливо окрашивались нитевидные структуры, являющиеся, вероятно, микротрубочками. Также положительно окрашивались митотические веретена (Рис.1 Б). В таблице представлены результаты количественной

оценки экспрессии Туг-тубулина в центральных областях и в инвазивном фронте опухолей.

Было обнаружено статистически значимое различие между экспрессией Туг-тубулина в этих областях (Рис.2). Про этом мощность исследования составила 1,00.

На данный момент роль тирозинированного тубулина в развитии и прогрессии опухолей изучена недостаточно. *In vitro* установлено влияние Туг-тубулина на возникновение химиорезистентности к паклитакселу в клетках рака молочной железы [1]. В культуре рака толстой кишки показано, что в недифференцированных клетках экспрессия Туг-тубулина значительно выше, чем в дифференцированных [2]. В клетках нейробластомы обнаружена обратная закономерность, чем менее дифференцированная опухоль и хуже прогноз течения заболевания, тем меньше экспрессия Туг-тубулина [4]. Приведенные литературные данные лишь подчеркивают противоречивость имеющейся информации. Полученный нами результат свидетельствует о роли цикла тирозинирование-детирозинирование α -тубулина в инвазивном росте колоректального рака, однако требуются дальнейшие исследования для установления клинической роли установленного феномена.

Использованный подход к анализу изображений позволил получить на небольшой выборке результат большой мощности с низкой α и β ошибками, что может в значительной мере сократить стоимость и время проведения морфологических исследований.

Таким образом, в результате проведенного исследования впервые получены данные о снижении экспрессии тирозинированного α -тубулина в клетках инвазивного фронта колоректального рака. Использование методов компьютерной обработки изображений позволяет достичь высокой мощности исследования.

Работа выполнена при поддержке проектов ISTC №B1636 и ГПНИ №1.2.42.

Литература

1. Banerjee, A. Increased levels of tyrosinated α -, β III-, and β IV-tubulin isotypes in paclitaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 598–601.
2. Carles, G, Braguer D, Dumontet C et al. Differentiation of human colon cancer cells changes the expression of beta-tubulin isotypes and MAPs. *Br J Cancer* 1999; 80: 1162-8.
3. Gundersen, GG, Kalnoski MH, Bulinski JC. Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated α -tubulin are distributed differently in vivo. *Cell* 1984; 38: 779–789.
4. Kato, C, Miyazaki K, Nakagawa A. et al. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *Int J Cancer* 2004;112: 365–75.
5. Kierszenbaum, AL. Intramanchette transport (IMT): managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail. *Mol Reprod Devel* 2002; 63: 1–4.
6. Kreis, TE. Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic. *EMBO J* 1987; 6: 2597–2606.
7. Poole, CA, Zhang ZJ, Ross JM. The differential distribution of acetylated and detyrosinated alpha- tubulin in the microtubular cytoskeleton and primary cilia of hyaline cartilage chondrocytes. *J Anat* 2001; 199: 393–405.
8. Portyanko, A, Kovalev P, Gorgun J, Cherstvoy E. Beta(III)-tubulin at the invasive margin of colorectal cancer: possible link to invasion. *Virchows Arch* 2009; 454: 541–8.
9. Wehland, J, Weber K. Tubulin-tyrosine ligase has a binding site on β -tubulin: a two domain structure of the enzyme. *J Cell Biol* 1987; 104: 1059–1067.
10. Webster, DR, Gundersen GG, Bulinski JC, Borisy GG. Assembly and turnover of detyrosinated tubulin in vivo. *J Cell Biol* 1987; 105: 265–276.

Поступила 8.05.2013 г.