

УДК 616.006

©Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ТЕЛОМЕРАЗЫ ПРИ ОНКОПАТОЛОГИЯХ ЖЕЛУДКА

Л.В. Свиная^{1,2}, А.И. Глухов^{2,3}, О.В. Зимник¹, И.И. Быков³,
Т.В. Хоробрых³, В.И. Швеи²*

¹Московский НИИ медицинской экологии, Симферопольский бульвар, д. 8,
117149, Москва; тел.: (499)-317-20-07; эл. почта: telomeraza@mail.ru

²Московская государственная академия тонкой химической технологии
им. М.В. Ломоносова

³Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова

С помощью модифицированного метода TRAP (метод определения теломеразной активности, telometric repeat amplification protocol) проведен анализ уровня теломеразной активности (ТА) в образцах тканей от пациентов с аденокарциномой и лимфомой желудка. ТА была обнаружена у 16 из 18 (89%) пациентов с аденокарциномой желудка, а также у пациента с лимфомой желудка, в то время как у пациента без онкопатологии она не детектировалась. Большинство исследуемых образцов характеризуется “высоким” и “очень высоким” уровнями ТА. Теломераза, несомненно, связана с процессом злокачественной трансформации и может являться важным маркером для диагностики рака желудка.

Ключевые слова: аденокарцинома желудка, канцерогенез, теломераза, теломеразная активность (ТА).

ВВЕДЕНИЕ. Рак желудка остается одним из самых распространенных онкологических заболеваний. Среди населения России на сегодняшний день он занимает второе место по смертности после рака легкого. В стране ежегодно насчитывается около 50 тысяч новых случаев этого заболевания, что составляет примерно 11% от всех злокачественных опухолей. Практически во всех странах мира уровень заболеваемости раком желудка у мужчин в два раза выше, чем у женщин. Максимального значения он достигает в Японии [1].

Большинство опухолей, которые развиваются в желудке, относятся к аденокарциномам. Также в желудке могут развиваться и другие виды опухолей: лимфомы, стромальные и карциноидные опухоли [2]. Рак желудка обычно растёт медленно, иногда в течение многих лет, при этом ранние изменения в слизистой оболочке желудка редко сопровождаются симптомами и поэтому часто остаются незамеченными. Поскольку временной фактор является важным для трансформации предракового состояния в злокачественную опухоль, выявление маркеров злокачественной трансформации при новообразованиях желудка является весьма актуальной задачей онкологии.

* - адресат для переписки

Одним из характерных свойств, отличающих раковые клетки от нормальных, является имморта́льность, т.е. способность к неограниченному делению. Данное свойство, в частности, связано с активацией теломеразы, компенсирующей укорочение теломер в опухолевых клетках [3]. Этот фермент осуществляет синтез теломерной ДНК на концах хромосом, используя свой РНК-компонент в качестве матрицы. Теломераза играет ключевую роль в поддержании стабильности генетического аппарата клетки в процессе её деления [4].

Определение активности теломеразы с помощью высокочувствительного метода TRAP продемонстрировало, что в 90% злокачественных опухолей присутствует активная теломераза, в то время как в нормальных соматических клетках она практически не детектируется [5]. На этом основании наличие теломеразы считается специфической особенностью раковых клеток.

По имеющимся данным, теломеразная активность (ТА) обнаруживается в 88% злокачественных опухолей желудка [6, 7]. Поэтому информация об уровне ТА при скрининге рака желудка может иметь большое значение для постановки диагноза. Кроме того, определение ТА при раке желудка играет важную роль в понимании механизмов развития данной онкопатологии на молекулярном уровне, что, в свою очередь, необходимо для последующего создания противоопухолевых препаратов, ингибирующих теломеразу.

В настоящей работе представлены результаты анализа ТА в операционном материале, полученном от пациентов с аденокарциномой и лимфомой желудка, с целью дальнейшего изучения роли теломеразы в процессах развития онкопатологий желудка.

МЕТОДИКА. В качестве объектов исследования были выбраны образцы тканей желудка от 20 пациентов, проходивших обследование и лечение в Факультетской хирургической клинике им. Н.Н. Бурденко ММА им. И.М. Сеченова. Из них 18 пациентов были с аденокарциномой желудка (опухоли локализовались как в теле желудка, так и в его антральной части), один пациент с лимфомой желудка, а также один пациент с язвенной болезнью двенадцатипёрстной кишки и визуально не изменённой слизистой желудка. Все диагнозы были подтверждены результатами гистологического анализа операционного материала. Некоторые характеристики клинических образцов приведены в таблице. До начала обработки и молекулярно-биологического исследования образцы хранили при температуре -70°C .

Замороженные образцы тканей массой 20–50 мг помещали в стеклянные гомогенизаторы и гомогенизировали в лизирующем буфере CHAPS, содержащем 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 0,1 mM PMSF, 5 mM β -меркаптоэтанол, 0,5% CHAPS (3-[(3-холамидопропил)-диметиламмоний]-1-пропансульфонат) и 10% глицерин. Лизирующий буфер добавляли из расчёта 8 мкл на 1 мг ткани. Гомогенизирование проводили на льду в течение 30 минут. При получении экстрактов из опухолевой линии MCF-7 лизирующий буфер брали из расчёта 1 мкл на 10000 клеток, гомогенизацию при этом не проводили. Полученные экстракты центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин при $+4^{\circ}\text{C}$, после чего супернатант переносили в чистые пробирки и быстро замораживали в жидком азоте. Готовые экстракты хранили при -70°C .

Концентрацию белка в полученных экстрактах измеряли по методу Брэдфорд [8] с незначительными модификациями.

Определение активности теломеразы в экстрактах из клеток и тканей проводили с помощью метода TRAP [9], в который внесены некоторые изменения [10]. Элонгацию олигонуклеотидного субстрата (TS-праймер) и последующую амплификацию проводили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 67 mM Tris-HCl (pH 8,8), 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Tween-20, 1,5 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 50 mM каждого dNTP, 0,1 мкг TS-праймера (5'-ATTCGTCGAGCAGAGTT-3'), 1–10 мкл тканевого экстракта, содержащего 0,7 мкг белка.

На стадии ПЦР в реакционную смесь добавляли 0,1 мкг СХ-праймера и 2,5 ед. акт. SmarTaq ДНК-полимеразы (“Диалат”, Москва) Реакционную смесь амплифицировали в течение 35 циклов ПЦР.

Разделение амплифицированных продуктов осуществляли методом электрофореза при неденатурирующих условиях в 10% ПААГ, используя 1× Трис-боратный-ЭДТА буфер. Смесь после стадии ПЦР вносили в лунки геля в объеме 10 мкл. В качестве лидирующего красителя использовали Orange G (“Sigma”, США). Электрофорез проводили в течение 20 мин при 36 В/см. Визуализацию разделённых TRAP-продуктов проводили на УФ-трансиллюминаторе (λ 300 нм) после окрашивания геля в темноте в течение 30 мин в растворе красителя SYBR Gold (“Molecular Probes”, США). Окрашенные гели фотографировали цифровой камерой. Полученные цифровые фотографии оценивали с помощью программы для анализа изображений ImageJ 1.35I (“National Institute of Health”, США), которая позволяет рассчитывать интенсивность свечения пиков (в условных единицах), соответствующих дискретным фрагментам TRAP-продуктов. Суммарная площадь пиков принималась за величину ТА в конкретном образце. Далее рассчитывали относительную ТА, сравнивая с положительным контрольным образцом. Положительным контролем служил экстракт клеток теломеразопозитивной опухолевой линии MCF-7 (карцинома молочной железы) человека. В качестве отрицательного контроля использовали образец, в который вместо клеточного экстракта вносили чистый лизирующий буфер CHAPS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Ранее было показано, что ТА присутствует в большинстве типов опухолей, в том числе и при раке желудка [5]. Этот факт обосновывает необходимость исследования роли теломеразы в процессе злокачественной трансформации при данном типе онкопатологии. Для того чтобы определить, насколько активность теломеразы характерна для злокачественных патологий желудка, был проведен TRAP-анализ экстрактов тканей, полученных от больных с различными стадиями аденокарциномы желудка и от больного с лимфомой желудка. В качестве контроля на отсутствие онкопатологии был выбран пациент с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки в стадии ремиссии.

В проведенной нами работе у 16 из 18 пациентов (89%) с аденокарциномой желудка была обнаружена активная теломераза. Полученные нами данные согласуются с результатами, опубликованными другими авторами [6], которые также детектировали ТА у 88% больных с аденокарциномой желудка. Очень высокий уровень ТА был отмечен и у пациента с лимфомой желудка. В образце слизистой тела желудка от пациента с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки и в двух образцах тканей пациентов с аденокарциномой желудка активность теломеразы не детектировалась. Результаты анализа ТА в образцах тканей исследуемых больных представлены на рисунке.

Как видно из рисунка А, при детекции ТА в отрицательном контрольном образце от пациента № 3 характерные дискретные полосы TRAP-продуктов отсутствовали (дорожка 2). Аналогичная картина наблюдалась в образцах от пациентов № 5 и № 6 с аденокарциномой (рис. А, дорожки 3 и 4). Эти результаты практически не отличались от отрицательного контроля TRAP-реакции с добавлением лизирующего буфера CHAPS вместо клеточного экстракта (рис. А, дорожка 1).

Во всех остальных экстрактах наблюдалась характерная “лестница” TRAP-продуктов, причем интенсивность свечения этих полос варьировала среди образцов (рис. А, дорожки 5–11; рис. Б, дорожки 1–10). В связи с этим, для более качественной характеристики полученных результатов, с помощью программы ImageJ 1.35I для каждого из исследуемых образцов была определена интенсивность свечения TRAP-продуктов и рассчитан относительный уровень ТА (см. таблицу). При этом положительным контролем служил экстракт, полученный из клеток линии MCF-7 (карциномы молочной железы), ТА в котором принималась за единицу (рис. Б, дорожка 11).

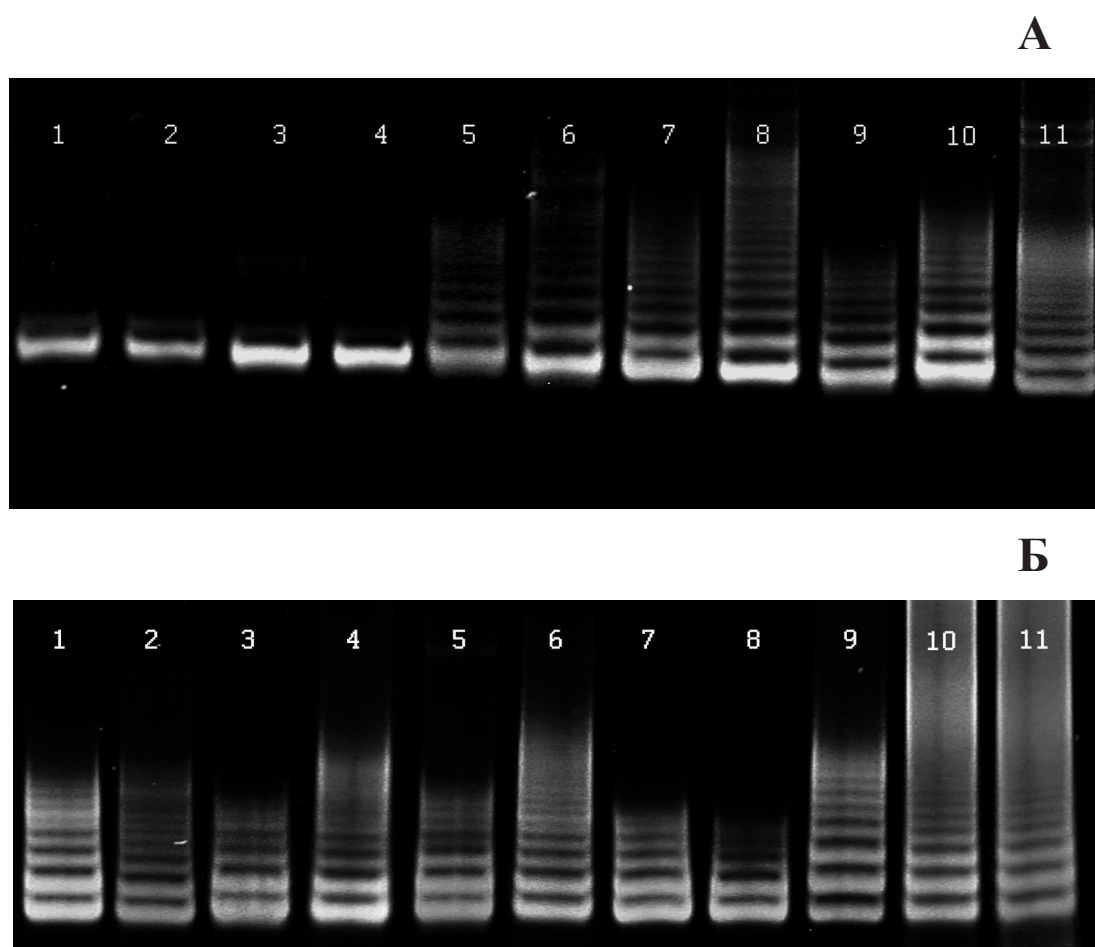


Рисунок.

Результаты анализа активности теломеразы в образцах от пациентов с раком желудка (10% ПААГ, окрашенный SYBR Gold).

А. Анализ ТА в клинических образцах с "низким", "средним" и "высоким" относительным уровнем ТА, а также с отсутствием ТА. Дорожки: 1 - отрицательный контрольный образец (без экстракта), 2 - пациент № 20 (контроль на отсутствие онкопатологии), 3 и 4 - пациенты № 2 и № 5 с аденокарциномой желудка (отсутствие ТА) соответственно, 5 - пациент № 12 с аденокарциномой желудка ("низкий" уровень ТА), 6 - пациент № 8 с аденокарциномой желудка ("средний" уровень ТА), 7-11 - пациенты №№ 18, 19, 16, 13, 15 с аденокарциномой желудка ("высокий" уровень ТА) соответственно.

Б. Анализ ТА в клинических образцах с "очень высоким" относительным уровнем ТА. Дорожки: 1-9 - пациенты №№ 4, 14, 9, 3, 17, 6, 7, 10, 11 с аденокарциномой желудка соответственно, 10 - пациент № 1 с лимфомой желудка, 11 - положительный контрольный образец (экстракт из клеток MCF-7).

В группе с диагнозом перстневидноклеточный рак два пациента характеризовались отсутствием ТА (рис. А, дорожки 3 и 4), что может быть связано с инактивацией теломеразы в процессе проведения операции и забора образца. Например, во время операции при перевязке сосудов на длительное время мог активироваться процесс некроза в тканях, вызывающий ингибирование ТА. С другой стороны, не исключена возможность наличия фиброза в опухоли, что приводит к уменьшению количества живых клеток и снижению ТА. В пользу наших предположений говорит тот факт, что в образцах только этих двух пациентов был существенно снижен уровень экспрессии конститутивного гена β -актина (данные не приведены).

Таблица. Клинико-патологическая характеристика пациентов и относительные уровни ТА в соответствующих образцах.

Пациент №	TNM-стадия	Относительный уровень ТА, % от положительного контроля	Уровень ТА	Диагноз
1	-	133±2,5	++++	Лимфома
2	T1N0M0	-	-	Перстневидноклеточный рак, инфильтративно-язвенная форма
3	T1N1M0	103,3±4,7	++++	
4	T1N0M0	102±6,3	++++	
5	T2N0M0	-	-	
6	T2N0M0	104±3,1	++++	
7	T3N2M0	107,4±8,5	++++	
8	T2N0M0	43,3±4,2	++	Низкодифференцированная аденокарцинома, инфильтративно-язвенная форма
9	T2N1M0	103,3±9,3	++++	
10	T3N0M0	111,7±11,5	++++	
11	T4N3M0	167±10,1	++++	
12	T2N0M0	19,9±3,8	+	Умереннодифференцированная аденокарцинома, инфильтративно-язвенная форма
13	T2N1M0	95,9±2,1	+++	
14	T2N1M0	103±7,3	++++	
15	T3N0M0	98,5±5,6	+++	
16	T4N2M0	81,3±4,3	+++	
17	T4N1M0	103,7±9,7	++++	
18	T1N0M0	54,5±3,1	+++	Высокодифференцированная аденокарцинома, инфильтративно-язвенная форма
19	T2N1M0	80,9±8,3	+++	
20	-	-	-	Язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки в стадии ремиссии

Примечание. ++++ - "очень высокий", +++ - "высокий", ++ - "средний", + - "низкий" уровни ТА.

У остальных пациентов данной группы (рис. Б, дорожки 1, 4, 6, 7) на всех TNM-стадиях заболевания был отмечен очень высокий относительный уровень ТА (выше, чем в положительном контрольном образце). Полученные данные можно объяснить тем, что перстневидноклеточный рак представляет собой аденокарциному с очень низкой дифференцировкой клеток и является самой агрессивной разновидностью рака желудка.

В группе больных с низкодифференцированной аденокарциномой ТА была выявлена во всех образцах тканей, полученных от пациентов, причем наблюдалась зависимость между относительным уровнем ТА и TNM-стадией заболевания.

ТЕЛОМЕРАЗЫ ПРИ ОНКОПАТОЛОГИЯХ ЖЕЛУДКА

Так, наименьшее значение относительной ТА наблюдалось у пациента №8 (стадия T2N0M0), а наибольшее – у пациента № 11 (стадия T4N3M0). Следует отметить, что у всех пациентов данной группы уровень ТА был достаточно высоким: у одного пациента интенсивность свечения TRAP-продуктов составляла 43,3% от интенсивности свечения в положительном контрольном образце (рис. А, дорожка 6), а у трех пациентов она была выше, чем в положительном контроле (рис. Б, дорожки 3, 8, 9).

При исследовании группы с диагнозом умереннодифференцированная аденокарцинома ТА также была выявлена у всех пациентов. Пациент №12 характеризовался низким уровнем ТА (рис. А, дорожка 5), а у остальных больных в данной группе уровень ТА в исследуемых образцах был соизмерим с таковым в положительном контрольном образце (рис. А, дорожки 9, 10, 11) или превышал его (рис. Б, дорожки 2 и 5).

Два образца от пациентов № 18 и № 19 с диагнозом высокодифференцированная аденокарцинома тоже характеризовались высоким уровнем ТА (рис. А, дорожки 7 и 8).

Очень высокий относительный уровень ТА был обнаружен у пациента №1 с лимфомой желудка (рис. Б, дорожка 10). Данный факт, вероятно, связан с особенностями формирования и протекания этой формы онкопатологии. Увеличение ТА может быть вызвано наличием в исследуемом образце ткани большого количества пролиферирующих лимфоцитов.

На основании показателей относительного уровня ТА нами условно были выделены пациенты с “низким”, “средним”, “высоким” и “очень высоким” относительным уровнем ТА (см. рис. А и Б, а также таблицу). Как видно из данных таблицы, наибольшее число теломеразопозитивных пациентов обладало “очень высоким” уровнем ТА (59%). “Высокий” уровень ТА наблюдался у пяти пациентов (29%), “средний” уровень ТА был выявлен у одного пациента (6%) и, наконец, “низким” уровнем ТА также характеризовался один пациент (6%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Проведённое нами исследование показало, что наличие теломеразы, по-видимому, напрямую связано с процессом злокачественной трансформации при патологиях желудка. ТА была обнаружена в большинстве образцов клинического материала, полученного от пациентов с аденокарциномой желудка, а также от пациента с лимфомой желудка. Отсутствие ТА в двух образцах от больных с исследуемой онкопатологией, вероятнее всего, связано с инактивацией теломеразы в процессе проведения операции и забора образца или развития фиброза.

Следует отметить, что диагностический и прогностический потенциал теломеразы достаточно велик, но требует дальнейшего исследования с привлечением большего числа больных, а также увеличения периода наблюдения за ними.

ВЫВОДЫ.

1. Определён уровень теломеразной активности в образцах клинического материала, полученного от больных со злокачественными патологиями желудка.
2. Активность теломеразы выявлена у 16 из 18 (89% случаев) пациентов с аденокарциномой желудка и у пациента с лимфомой желудка.
3. Показано, что образцы злокачественных новообразований желудка характеризуются в основном “очень высоким” и “высоким” уровнями теломеразной активности, а это говорит о том, что теломераза, несомненно, участвует в процессе канцерогенеза и является важным маркером злокачественной трансформации при раке желудка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yokozaki H., Yasui W., Tahara E. (2001) Int. Rev. Cytol., **204**, 49-65.
2. Layke J.C., Lopez P.P. (2004) Amer. family physician, **69**(5), 1136-1139.
3. Shay J.W., Bacchetti S. (1997) Eur. J. Cancer, **5**, 787-789.

4. Greider C.W., Blackburn E.H. (1996) *Scientific American*, **274**, 92-97.
5. Shay J.W., Wright W.E. (1996) *Curr. Opin. Oncol.*, **8**, 66-71.
6. Mao L., Elnaggar A.K., Fan Y.H., Lee J.S., Lippman S.M., Kayser S., Lotan R., Hong W.K. (1996) *Cancer Res.*, **56**, 5600-5604.
7. Zhan W., Ma J., Peng J., Gao J., Cai S., Wang J., Zheng Z., Wang L. (1999) *World J. Gastroenterol.*, **5**(4), 316-319.
8. Bradford M. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
9. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R. (1994) *Science*, **266**, 2011-2015.
10. Glukhov A.I., Zimnik O.V., Gordeev S.A., Severin S.E. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **248**, 368-371.

Поступила: 19. 11. 2009.

DETECTION OF TELOMERASE ACTIVITY IN GASTRIC CANCER

L.V. Svinareva^{1,2}, A.I. Glukhov^{1,3}, O.V. Zimnik¹, I.I. Bykov³, T.V. Khorobrykh³, V.I. Shvets²

¹Moscow Scientific Research Institute of Medical Ecology, Sympheropolsky blvd, d.8, Moscow, 117149 Russia, tel. (499)-317-20-07, telomeraza@mail.ru

²M.V. Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology

³I.M. Sechenov Moscow Medical Academy

Telomerase activity (TA) was examined in gastric adenocarcinomas and gastric lymphoma using a modified TRAP assay. TA was present in 16 of 18 (89%) gastric adenocarcinomas and in gastric lymphoma, whereas no TA was detected in normal tissue. Almost all samples had "high" and "very high" TA levels. Telomerase is undoubtedly associated with the process of malignant transformation and therefore can be an important marker for diagnostics of gastric cancer.

Key words: gastric adenocarcinoma, cancerogenesis, telomerase, telomerase activity (TA).