

УДК 616.006:577.29
©Коллектив авторов

НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА АКТИВНОСТИ ТЕЛОМЕРАЗЫ И ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЕЕ СУБЪЕДИНИЦ *hTERT* И *hTR*

А.И. Глухов^{1,2}, Я.Е. Григорьева¹, С.А. Гордеев¹,
А.З. Винаров¹, Н.В. Потолдыкова¹*

¹Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова Минздрава России,
ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, 119991, Москва; тел.: (499)-317-20-07;
эл. почта: telomeraze@gmail.com

²Центр НБИКС-технологий НИЦ “Курчатовский институт”, Москва

Для разработки методики неинвазивной диагностики рака мочевого пузыря был проведён анализ активности теломеразы в образцах ткани опухоли мочевого пузыря и клеточных осадках мочи пациентов неизотопным методом TRAP (telomerase repeat amplification protocol). Также были измерены уровни относительной экспрессии её каталитической субъединицы *hTERT* и РНК-субъединицы (*hTR*) методом ОТ-ПЦР. Активность теломеразы и экспрессия генов, кодирующих её субъединицы, выявлялась как в ткани опухоли, так и в клеточном осадке мочи каждого пациента. Данные, полученные нами, показывают возможность проведения неинвазивной диагностики рака мочевого пузыря с использованием комбинации указанных методов с чувствительностью и специфичностью в 96 и 100% для анализа АТ и 80 и 100% для анализа экспрессии гена *hTERT*.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, теломераза, каталитическая субъединица теломеразы (*hTERT*), РНК-субъединица теломеразы (*hTR*), диагностика, неинвазивная диагностика.

ВВЕДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря (РМП) встречается в мире с частотой заболеваемости в 15 случаев на 100000 человек. После рака простаты это второе по частоте встречаемости онкозаболевание мочеполовой системы [1]. Более 90% опухолей мочевого пузыря (МП) представлены переходно-клеточными карциномами, 5% – плоскоклеточными карциномами и около 2% – аденокарциномами. РМП – гетерогенное заболевание, где 70% вновь диагностируемых случаев – поверхностные опухоли, а 30% – мышечно-инвазивные. Можно выделить 3 группы факторов, влияющих на возможность возникновения РМП: систематическое воздействие канцерогенов на организм (индустриальные токсины, курение), хронические воспалительные заболевания МП и, в определённой степени, генетическая предрасположенность к онкологическим заболеваниям [2].

Основной симптом РМП – безболезненная макрогематурия или асимптоматическая микрогематурия, а основные методы диагностики – цитологическое исследование мочи и цистоскопия. Цитологическое исследование – неинвазивный метод, но его чувствительность составляет 44%, а специфичность – 98%. Особенно сложно с его помощью распознать низкодифференцированные опухоли [3]. Цистоскопия – малоинвазивный метод, который, тем не менее, требует местной анестезии и часто приводит к побочным эффектам. Тем не менее, этот метод является одним из основных при диагностике РМП, так как доступные неинвазивные методы, разработанные за последние 10 лет, не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью [1, 4, 5]. Из-за высокого риска рецидивирования РМП необходима разработка более эффективных неинвазивных методов диагностики РМП, способных заменить инвазивные и малоинвазивные методы, а также

* - адресат для переписки

необходимые для прогнозирования течения болезни и последующего врачебного наблюдения за пациентами [5, 6]. Временной фактор является важным для диагностики и успешности лечения РМП, поэтому выявление онкомаркёров на ранней стадии заболевания является актуальной задачей современной онкологии [6].

Одно из наиболее характерных свойств опухолевых клеток – это способность к неограниченной пролиферации. Проллиферативный потенциал опухолевых клеток тесно связан с наличием в них активной теломеразы. Теломераза – фермент с обратнотранскриптазной активностью, осуществляющий синтез теломерной ДНК на концах эукариотических хромосом, который использует свой РНК-компонент (*hTR*) в качестве матрицы для синтеза теломерной ДНК [7]. У большинства эукариотов теломерная ДНК состоит из гексануклеотидных повторов TTAGGG [7]. Теломераза активна в эмбриональных клетках, но в процессе последующей дифференцировки происходит репрессия и инактивация фермента. Так, к концу четвёртого месяца развития эмбриона активность теломеразы (АТ) уже не обнаруживается в тканях почек и мозга. В ткани сердца АТ исчезает к 12-й неделе, а в лёгких, печени и селезёнке – к 21-й неделе [8]. Функционально теломераза является холоферментом, состоящим из двух главных субъединиц: РНК-компонента *hTR* и каталитической белковой субъединицы *hTERT*. В большинстве здоровых тканей *hTR* экспрессируется конститутивно, а экспрессия *hTERT*, необходимая для проявления активности теломеразы, индуцирована [9]. Экспрессия *hTERT* непосредственно связана с регуляцией активности фермента, в то время как экспрессия *hTR* осуществляется независимо от АТ [10]. В организме взрослого человека АТ сохраняется в стволовых клетках, лимфоцитах, семенниках (но не в семенной жидкости), фолликулах яичников (но не в зрелых яйцеклетках), эндометрии, коже (индуцируется УФ), волосяных фолликулах и эндотелиальных клетках сосудов [11].

Реактивация теломеразы наблюдается при малигнизации клетки. Согласно литературным данным, АТ обнаруживается методом TRAP в 90% злокачественных опухолей [1]. По разным литературным данным, АТ обнаруживается в 86-100% образцов РМП, в которых диагноз был морфологически подтверждён [12].

В настоящей работе, с целью разработки неинвазивной методики диагностики РМП, были проанализированы уровни экспрессии мРНК *hTERT* и *hTR*, а также был измерен относительный уровень АТ в образцах ткани опухоли и клеточных осадков мочи, полученных от пациентов с данной онкопатологией.

МЕТОДИКА

В работе были исследованы образцы ткани опухоли (операционный материал) и клеточных осадков мочи от 20 пациентов с гистологически подтверждённым диагнозом РМП на первой стадии заболевания (опухоль на стадии T1 по TNM-классификации, распространённая на субэпителиальную соединительную ткань), пять из которых имели метастазы в одном или нескольких регионарных лимфатических узлах (лимфатические узлы малого таза, расположенные ниже бифуркации общих подвздошных артерий) до 2 см в наибольшем измерении (T1N1M0), у 15 пациентов метастазы отсутствовали (T1N0M0). Кроме того, опухоль у 15 пациентов имела высокую степень дифференцировки (G1), у троих – среднюю (G2) и у двоих – слабую (G3). Контрольную группу составили 10 человек с гистологически подтверждённым диагнозом “цистит”. От этих пациентов было получено 10 образцов клеточных осадков мочи. Операционный материал удалось получить только от четырёх пациентов с циститом, так как при этом заболевании операционное вмешательство не требуется. Три образца ткани были получены взятием биопсии при подозрении у этих пациентов диагноза РМП (диагноз не подтвердился). От всех пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Часть образца ткани после операции сразу замораживалась в жидком азоте и далее хранилась при -70°C.

Получение клеточных осадков мочи.

Все процедуры центрифугирования при получении клеточного осадка мочи проводили при комнатной температуре. Для промывки клеточных осадков применяли охлаждённый до +4°C стерильный однократный раствор PBS (0,145 М NaCl, 0,76 М NaH₂PO₄, 2,24 М Na₂HPO₄). Для получения клеточных осадков использовали вторую утреннюю порцию мочи пациента. Каждую пробу в течение 30 мин охлаждали при температуре +4°C. Далее 100 мл каждой пробы равномерно распределяли по культуральным пробиркам на 15 мл и центрифугировали со скоростью 2500 об/мин в течение 10 мин (центрифуга ELM1 CM-6MT, ротор 6М, Латвия). Супернатант отбрасывали и осадки в каждой пробирке ресуспендировали в 1 мл однократного раствора PBS. Далее содержимое всех пробирок равномерно распределяли по двум культуральным пробиркам на 15 мл и центрифугировали в течение 10 мин

при 2500 об/мин, после чего повторяли процедуру промывки осадков в 1 мл однократного раствора PBS. После этого осадок в каждой пробирке ресуспендировали в 1 мл раствора PBS и переносили в две микропробирки на 1,5 мл, затем центрифугировали на микроцентрифуге Eppendorf 5415 (ротор 14000 RPM, Германия) 10 мин при 2500 об/мин. Супернатант отбрасывали, а остаток капель жидкости в пробирке с осадком аккуратно удаляли полоской фильтровальной бумаги ("Whatman", Великобритания). Часть осадка отбирали для подсчёта в нём числа клеток. Подсчёт проводился в камере Горяева с использованием 0,4% раствора красителя Trypan blue Stain ("Sigma", США). Далее осадок клеток замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C.

Определение АТ

Приготовление белковых экстрактов и анализ АТ неизотопной модификацией метода TRAP проводили по описанным ранее методикам [13, 14].

Концентрацию белка в экстрактах клеток и тканей определяли с помощью красителя Coomassie Brilliant Blue G-250 ("Sigma") по методу Брэдфорд [15].

Электрофорез TRAP-продуктов, а также визуализацию и цифровую обработку гелей проводили согласно описанной нами методике [16]. Интенсивность TRAP-продуктов исследуемых проб сравнивали с TRAP-продуктами в контрольном образце, содержащем экстракт (0,04 мкг клеточного белка), полученный из теломеразопозитивных клеток линии K562 (хронический миелоидный лейкоз человека).

Определение относительных уровней экспрессии *hTERT* и *hTR*.

Тотальную клеточную РНК выделяли методом, предложенным Chomczynski, Sacchi [17] с некоторыми модификациями [18].

Анализ экспрессии исследуемых генов проводили с помощью ОТ-ПЦР по ранее описанной нами методике [19].

Таблица 1. Анализ АТ, и относительной экспрессии генов *hTERT* и *hTR* в исследуемых клинических образцах от пациентов с РМП и циститом.

Число образцов	Образцы			
	Ткань (операционный материал)		Клеточный осадок мочи	
	РМП	Цистит	РМП	Цистит
Общее число	20	4	20	10
С АТ	19	0	19	0
Без АТ	1	4	1	10
С экспрессией <i>hTERT</i>	16	0	16	0
Без экспрессии <i>hTERT</i>	4	0	4	0
С экспрессией <i>hTR</i>	20	4	20	10
Без экспрессии <i>hTR</i>	20	4	20	10

Продукты ОТ-ПЦР разделяли электрофорезом в 1,5% агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия. В качестве электрофорезного буфера использовали 1хTBE. Образцы вносили в лунки геля в объёме 10 мкл.

Гели снимали на цифровую фотокамеру Kodak и проводили анализ изображения на компьютере с помощью программы ImageJ 1.47. Уровни экспрессии исследуемых генов нормализовали по отношению к уровню экспрессии конститутивного гена (*β-актина*), который принимали за единицу.

Каждый эксперимент повторяли 3 раза и находили среднее арифметическое значение измеряемых показателей для каждого исследуемого образца. Статистический анализ проводился с помощью программы SPSS Statistics-19. Для обнаружения различий между исследуемыми группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (U-тест). Для оценки связи между значениями измеряемых параметров и наличием РМП у пациентов рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно литературным данным, АТ присутствует в большинстве типов опухолей [16, 19], в том числе и в клетках РМП [12]. В данной работе нами была изучена активность теломеразы, а также экспрессия генов её субъединиц: каталитической субъединицы *hTERT* и РНК-субъединицы *hTR* в клинических образцах, полученных от пациентов с РМП и циститом (ткань опухоли и клеточный осадок мочи).

Как видно из таблицы 1, при анализе операционного материала АТ была обнаружена у 95% пациентов с диагнозом РМП (19 образцов из 20). При анализе образцов клеточного осадка мочи данные по АТ удалось получить также у 95% пациентов с диагнозом РМП (19 образцов из 20).

НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

В исследуемых образцах экспрессия гена *hTERT* обнаруживалась у 80% пациентов как в образцах ткани, так и в клеточном осадке мочи. При этом экспрессия гена *hTR* наблюдалась у 100% пациентов как в исследуемой, так и в контрольной группе пациентов,

что говорит о конститутивной экспрессии гена *hTR* и подтверждает литературные данные [6].

Данные по измеренным значениям относительного уровня АТ, и относительной экспрессии генов *hTERT* и *hTR* в исследуемых образцах представлены в таблице 2.

Таблица 2. Клинико-патологическая характеристика пациентов с РМП и относительные уровни АТ, экспрессии *hTERT* и *hTR* в исследуемых образцах опухолевой ткани и клеточного осадка мочи этих пациентов.

Пациент			Относительный уровень АТ, % ¹	Относительная экспрессия		Число форменных элементов крови в клеточном осадке мочи (в поле зрения)	
№	Диагноз	Вид образца		<i>hTERT</i>	<i>hTR</i>	Лейкоциты	Эритроциты
1	T1N0M0G1	ткань	1,07 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,83 ± 0,01	4	8
		моча	2,38 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,97 ± 0,01		
2	T1N0M0G1	ткань	0	0,08 ± 0,01	0,79 ± 0,01	12	3
		моча	0	0,44 ± 0,01	0,47 ± 0,01		
3	T1N1M0G3	ткань	3,81 ± 0,03	0,67 ± 0,01	0,65 ± 0,01	14	300
		моча	1,08 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,86 ± 0,01		
4	T1N0M0G1	ткань	0,71 ± 0,01	0,44 ± 0,01	1,10 ± 0,03	0	0
		моча	0,50 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,99 ± 0,02		
5	T1N0M0G3	ткань	2,14 ± 0,03	0,57 ± 0,01	1,02 ± 0,02	0	6
		моча	1,25 ± 0,02	0,33 ± 0,01	0,85 ± 0,01		
6	T1N0M0G1	ткань	0,97 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,95 ± 0,01	1	2
		моча	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,97 ± 0,01		
7	T1N0M0G1	ткань	1,10 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,96 ± 0,01	1	25
		моча	0,43 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,68 ± 0,01		
8	T1N1M0G1	ткань	3,40 ± 0,04	0,19 ± 0,01	1,09 ± 0,03	4	1
		моча	0,97 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,85 ± 0,01		
9	T1N0M0G2	ткань	8,20 ± 0,06	0	0,41 ± 0,01	13	12
		моча	1,22 ± 0,03	0	0,68 ± 0,01		
10	T1N1M0G1	ткань	1,98 ± 0,06	0	0,69 ± 0,01	1	2
		моча	0,54 ± 0,01	0	0,74 ± 0,01		
11	T1N0M0G1	ткань	1,68 ± 0,03	0,81 ± 0,01	0,50 ± 0,01	10	16
		моча	0,65 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,69 ± 0,01		
12	T1N0M0G2	ткань	1,38 ± 0,03	0,68 ± 0,01	0,85 ± 0,01	0	0
		моча	0,99 ± 0,01	0,90 ± 0,02	0,89 ± 0,02		
13	T1N0M0G1	ткань	3,29 ± 0,03	0,54 ± 0,01	0,90 ± 0,01	4	1
		моча	1,26 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,85 ± 0,01		
14	T1N0M0G1	ткань	5,14 ± 0,05	0	0,71 ± 0,01	8	30
		моча	3,12 ± 0,04	0	0,89 ± 0,01		
15	T1N1M0G1	ткань	0,79 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,96 ± 0,01	2	30
		моча	0,59 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,85 ± 0,01		
16	T1N0M0G1	ткань	3,31 ± 0,06	0	0,76 ± 0,01	3	4
		моча	2,70 ± 0,03	0	0,91 ± 0,01		
17	T1N0M0G1	ткань	0,98 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,79 ± 0,01	3	13
		моча	0,61 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,85 ± 0,01		
18	T1N0M0G1	ткань	0,84 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,98 ± 0,01	6	0
		моча	0,35 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,87 ± 0,01		
19	T1N0M0G1	ткань	0,62 ± 0,01	0,62 ± 0,01	1,00 ± 0,01	12	0
		моча	0,23 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,90 ± 0,02		
20	T1N1M0G2	ткань	0,69 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,85 ± 0,02	7	0
		моча	0,24 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,87 ± 0,01		

Примечание. Данные представлены в виде средней величины ± стандартное отклонение.

Средние значения параметров, рассчитанные по представленным в таблице 2 данным, а также результаты их статистической обработки приведены в таблице 3. Исходя из них, средние значения относительного уровня АТ и относительной экспрессии гена *hTERT* в образцах ткани примерно в 2 раза выше значений этих параметров в образцах клеточного осадка мочи, полученного от соответствующих пациентов. При этом среднее значение экспрессии гена *hTR* в обоих видах исследуемого клинического материала практически равны.

Нами была предпринята попытка установить наличие корреляции между метастатическим поражением регионарных лимфоузлов (N-категория по TNM-классификации) и степенью дифференцировки опухоли (G-категория) с одной стороны и АТ, экспрессии генов *hTERT* и *hTR*, с другой.

Значение АТ в тканях опухоли сравниваемых групп (N1 и N0) не отличалось. Относительный уровень АТ в клеточном материале мочи в начале метастазирования в регионарные лимфоузлы был в 1,5 раза ниже, чем при его отсутствии. Уровень относительной экспрессии гена *hTERT* в ткани при стадии N1 был в 3,3 раза ниже, чем при стадии N0, а в моче – в 3 раза. При этом нами не было установлено достоверной зависимости исследуемых параметров от значения категорий N и G ни в образцах ткани, ни в клеточном осадке мочи ($r \leq 0,7$, $p \geq 0,05$).

Исходя из рассчитанных параметров относительной экспрессии гена *hTERT*, можно сделать вывод о том, что в начале инвазии опухоли в регионарные лимфоузлы относительный уровень экспрессии снижается примерно в 3 раза как в ткани опухоли, так и в клеточном осадке мочи пациента. Тем не менее, согласно статистическому анализу, нами не было установлено корреляции между данными параметрами ($r \leq 0,7$, $p \geq 0,05$). Корреляция между экспрессией гена *hTERT* и степенью дифференцировки опухоли также не была найдена ($r \leq 0,7$, $p \geq 0,05$).

Средние значения экспрессии гена *hTR* показывают полное отсутствие связи между

наличием инвазии опухоли в регионарные лимфоузлы и степенью дифференцировки опухоли ($r \leq 0,7$, $p \geq 0,05$). Это может быть следствием того, что ген *hTR* в клетках тканей экспрессируется конститутивно.

Результаты TRAP-анализа белковых экстрактов, полученных из образцов ткани и клеточного осадка мочи пациента с РМП, представлены на рисунке 1. Видно, что в отрицательном контрольном образце отсутствуют характерные дискретные полосы TRAP-продуктов (рис. 1, дорожка 10). В остальных дорожках можно наблюдать характерную “лестницу” TRAP-продуктов. При этом интенсивность сигнала в образцах варьирует в зависимости от количества внесённого в пробу белка и вида материала, из которого данный экстракт был получен (образец ткани опухоли или клеточный осадок мочи). Видно что АТ в белковых экстрактах, полученных из образцов клеточного осадка мочи (рис. 1, дорожки 2–5), значительно ниже, чем в белковых экстрактах, полученных из образцов ткани опухоли пациента (рис. 1, дорожки 6–9). Для характеристики полученных результатов с помощью программы ImageJ 1.47 (“Kodak”, США) для каждого из исследуемых образцов была определена интенсивность свечения TRAP-продуктов и рассчитан относительный уровень АТ (см. табл. 2). Для нормализации данных использовали положительный контрольный образец (экстракт клеток опухолевой клеточной линии K562), АТ в котором принималась за единицу. Расчёт показал, что относительный уровень АТ в клетках осадка мочи примерно в 2,2 раза ниже, чем АТ у пациентов с РМП в ткани опухоли, что связано, скорее всего, с низким содержанием теломеразопозитивных клеток в моче и возможным присутствием в ней ингибиторов TRAP-анализа. Таким образом, АТ в клеточном осадке мочи может хорошо детектироваться модифицированным неизотопным методом TRAP. Данный подход может стать основой для разработки неинвазивной диагностики РМП на ранней стадии заболевания.

Таблица 3. Средние значения АТ и относительной экспрессии генов *hTERT* и *hTR* в операционном материале и клеточном осадке мочи пациентов с РМП.

Вид образцов	Средние значения		
	Относительный уровень АТ, %	Относительная экспрессия	
		<i>hTERT</i>	<i>hTR</i>
Образцы ткани от пациентов с РМП (операционный материал)	2,22	0,4	0,84
Образцы клеточного осадка мочи от пациентов с РМП	1,01	0,19	0,85
Корреляция	$r=0,798$	$r=0,536$	$r=0,399$
	$p=0,012$	$p=0,007$	$p=0,776$

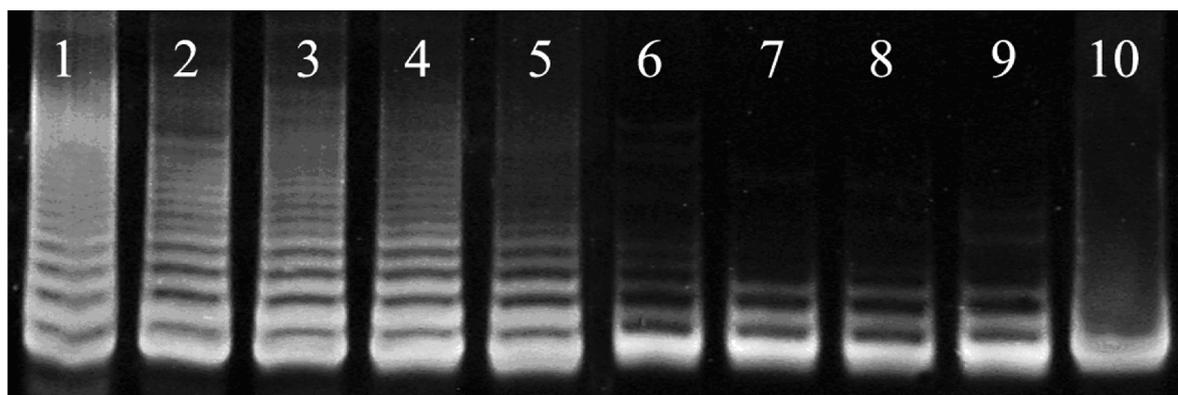


Рисунок 1. Электрофорез TRAP-продуктов. Анализ активности теломеразы в белковых экстрактах, полученных из ткани опухоли (дорожки 2-5) и клеточного осадка мочи (дорожки 6-9) пациента с ранней стадией РМП (10% ПААГ, окрашенный красителем SYBR Gold, фотография в УФ-свете). Реакционные пробы содержали различное количество белка экстракта: 8 мкг (дорожки 2, 6), 4 мкг (3, 7), 2 мкг (4, 8) и 0,7 мкг (5, 9). Дорожка 1 - положительный контроль (внесено 0,04 мкг белка экстракта клеточной линии K562), 10 - отрицательный контрольный образец (TRAP в отсутствии белкового экстракта).

Для проведения контрольных исследований использовали белковые экстракты из образцов ткани и клеточных осадков мочи, полученных от пациентов контрольной группы с диагнозом “цистит”, также анализировали неизотопным методом TRAP. TRAP-анализ экстрактов из образцов ткани и клеточного осадка мочи от пациента с циститом представлен на рисунке 2. Видно, что во всех образцах, в которые был внесён белковый экстракт из образцов ткани МП (рис. 2, дорожки 2, 3) и клеточного осадка мочи (рис. 2, дорожки 4, 5) не наблюдались характерные дискретные полосы TRAP-продуктов, что говорит об отсутствии АТ в образце. Анализ клинического материала

от пациентов с диагнозом “цистит” показал отсутствие АТ как в операционном материале, так и в клеточном осадке мочи всех пациентов. Для подтверждения истинности отрицательных результатов был проведён анализ на наличие ингибиторов в экстрактах образцов (данные не приведены).

Нами была изучена экспрессия генов каталитической субъединицы теломеразы и её РНК-субъединицы в образцах ткани опухоли и клеточного осадка мочи от пациентов с РМП. Уровень экспрессии анализируемых генов был нормализован по отношению к уровню экспрессии конститутивного гена β -актина.

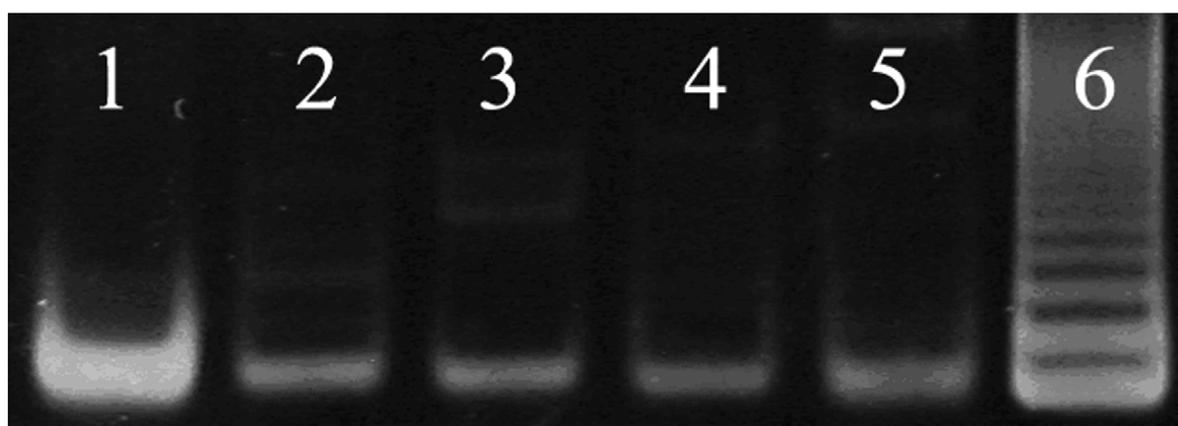


Рисунок 2. Электрофорез продуктов TRAP-анализа активности теломеразы в белковых экстрактах, полученных из клеточного осадка мочи и ткани МП пациента с диагнозом “цистит” (10% ПААГ, окрашенный красителем SYBR Gold, фотография в УФ-свете). Анализ белковых экстрактов из образцов клеточного осадка ткани МП (2, 3) и мочи (дорожки 4, 5). Реакционные пробы содержали различное количество белка экстракта: 4 мкг (2, 4) и 0,7 мкг (3, 5). Дорожка 1 - отрицательный контрольный образец (TRAP в отсутствии белкового экстракта), 6 - положительный контроль (внесено 0,04 мкг белка экстракта клеточной линии K562).

В образцах РМП экспрессировалась полноразмерная мРНК *hTERT* и её сплайсинговый (-β)-вариант. Уровень экспрессии оценивали как сумму уровней экспрессии этих двух вариантов. Экспрессия мРНК *hTERT* детектировалась в 80% исследуемых образцов: как в образцах клеточного осадка мочи, так и в операционном материале.

На рисунке 3 показан пример экспрессии гена каталитической субъединицы теломеразы *hTERT*. Как видно из рисунка 3, *hTERT* экспрессируется как в образце мРНК, полученной из операционного материала пациента с РМП (дорожка 4), так и из мРНК, полученной из клеток осадка мочи (дорожка 3). При этом заметно, что экспрессия *hTERT* в клетках осадка мочи заметно ниже, чем в ткани опухоли. В контрольных образцах, полученных от пациента с циститом (дорожки 1 и 2) экспрессии не наблюдалось как в клеточном осадке мочи (дорожка 1), так и в образце ткани (дорожка 2).

Данные рисунка 4 и таблицы 2 показывают, что экспрессия мРНК гена РНК-субъединицы теломеразы *hTR* наблюдалась во всех исследуемых образцах, то есть в 100% случаев при анализе как клеточных осадков мочи,

так и ткани опухоли. При этом в обоих типах образцов наблюдался примерно одинаковый средний уровень относительной экспрессии гена (0,84 в ткани и 0,85 в клеточном осадке мочи пациентов с РМП). Аналогичный анализ образцов пациентов контрольной группы также показал что экспрессия мРНК *hTR* детектируется в 100% образцов пациентов с циститом: как в клеточном осадке мочи, так и в операционном материале. Средние значения относительных уровней экспрессии мРНК *hTR* в случае цистита составили 0,71 в ткани и 0,69 в моче. Таким образом, уровень экспрессии *hTR* в онкологических образцах в 1,2 и 1,25 раз выше в ткани и моче от пациентов с циститом соответственно.

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке для выявления уровня зависимости между исследуемыми параметрами. Рассчитанные данные корреляции Спирмена представлены в таблице 4.

Исходя из данных, представленных в таблице 4, а также значений коэффициентов корреляции из таблице 3, можно сделать вывод о наличии сильной достоверной корреляции между значениями относительного уровня АТ в образцах опухолевой ткани и клеточных

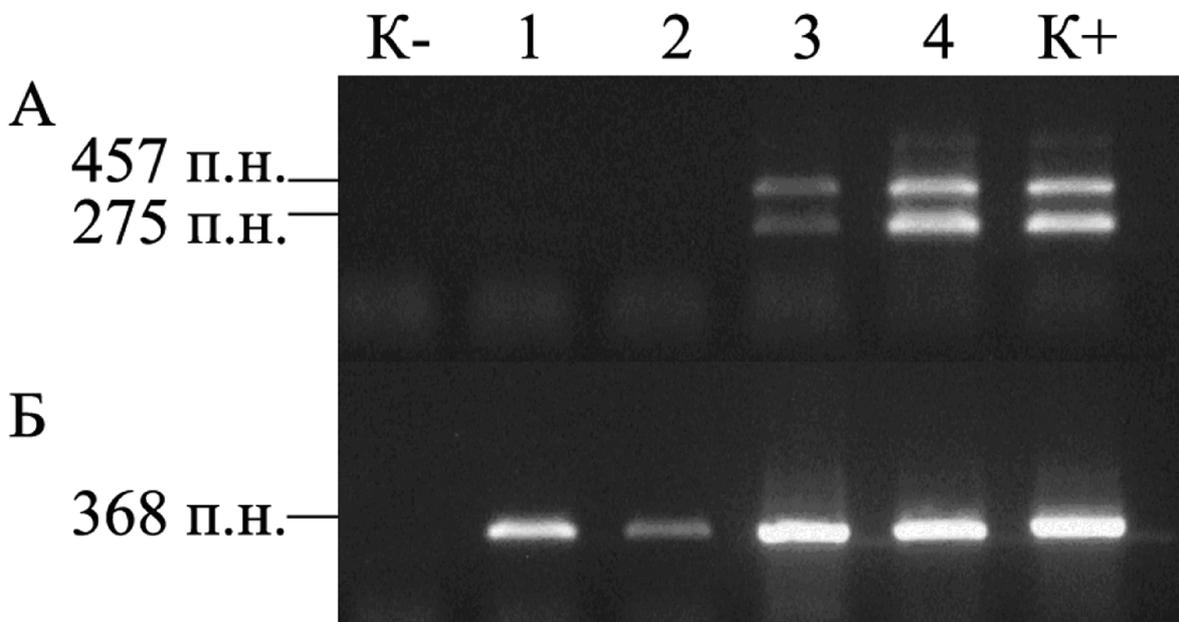


Рисунок 3. Анализ методом ОТ-ПЦР экспрессии гена *hTERT* (А) и β -актина (Б) в клинических образцах, полученных от пациентов с РМП. Электрофорез РНК в 1,5%-м агарозном геле. Окраска бромистым этидием. Цифрами над дорожками указаны клинические образцы, полученные от пациентов с циститом (1 и 2) и с РМП (3 и 4). Нечётные номера дорожек - образцы, полученные из клеточного осадка мочи, чётные - из образцов ткани опухоли соответствующих пациентов. Цифры со стрелками показывают положение и размеры амплифицированных ПЦР-фрагментов, соответствующих различным вариантам сплайсинга пре-РНК *hTERT*: (+ α , + β) - 457 п.н. и (- β) вариант - 275 п.н., 368 п.н. - ПЦР-фрагмент, соответствующий β -актину. К- - отрицательный контрольный образец (ОТ-реакцию проводили в отсутствие мРНК). К+ - положительный контрольный образец, клеточная линия K562 (хронический миелоидный лейкоз человека).

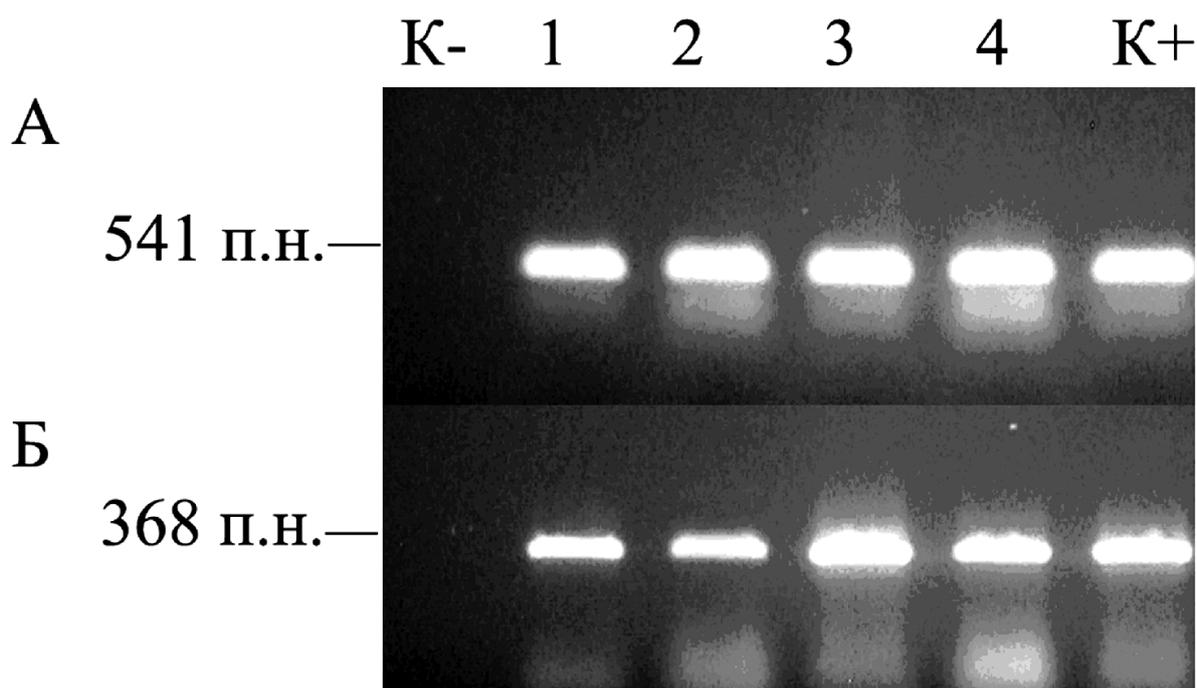


Рисунок 4. Анализ методом ОТ-ПЦР экспрессии гена *hTR* (А) и β -актина (Б) в клинических образцах, полученных от пациентов с РМП. Электрофорез РНК в 1,5%-м агарозном геле. Окраска бромистым этидием. Цифрами над дорожками указаны клинические образцы, полученные от пациентов с циститом (1 и 2) и с РМП (3 и 4). Нечётные номера дорожек - образцы, полученные из клеточного осадка мочи, чётные - из образцов ткани опухоли соответствующих пациентов. Цифры со стрелками показывают положение и размеры амплифицированных ПЦР-фрагментов: 451 п.н. - фрагмент, соответствующий *hTR*, 368 п.н. - фрагмент, соответствующий β -актину. К- - отрицательный контрольный образец (ОТ-реакцию проводили в отсутствие мРНК). К+ - положительный контрольный образец, клеточная линия K562 (хронический миелоидный лейкоз человека).

Таблица 4. Исследование корреляции между значениями АТ и относительной экспрессией генов субъединиц теломеразного комплекса (*hTERT* и *hTR*).

Анализируемый фактор	Вид образца	Относительный уровень АТ		Относительная экспрессия <i>hTERT</i>		Относительная экспрессия <i>hTR</i>	
		ткань	моча	ткань	моча	ткань	моча
Относительный уровень АТ	ткань	-	сильная	слабая	слабая	слабая	слабая
	моча	сильная	-	слабая	слабая	слабая	слабая
Относительная экспрессия <i>hTERT</i>	ткань	слабая	слабая	-	средняя	слабая	слабая
	моча	слабая	слабая	средняя	-	слабая	слабая
Относительная экспрессия <i>hTR</i>	ткань	слабая	слабая	слабая	слабая	-	слабая
	моча	слабая	слабая	слабая	слабая	слабая	-

осадках мочи. Это косвенно свидетельствует в пользу того, что клетки опухоли МП могут быть компонентами клеточного осадка мочи больного РМП. Это предположение подтверждает также наличие средней (удовлетворительной) достоверной корреляции между значениями относительной экспрессии мРНК *hTERT* в ткани опухоли и клеточном осадке мочи пациентов с РМП. Незначительная корреляция была

найдена между экспрессией гена *hTR* в образцах ткани и клеточного осадка мочи, но, согласно U-тесту Манна-Уитни, это значение не является достоверным ($p > 0,05$). Отсутствие корреляции между экспрессией генов *hTERT* и *hTR* в клеточном осадке мочи и ткани показывает наличие у этих генов функций, не связанных друг с другом и с проявлением АТ.

Для того чтобы доказать, что АТ в образцах клеточного осадка мочи пациентов с РМП присутствовала из-за наличия в нём именно клеток опухоли, а не лейкоцитов (включающих лимфоциты) был проведён корреляционный тест Спирмена для этих параметров. Коэффициент ранговой корреляции r составил 0,013, что означает отсутствие взаимосвязи между исследуемыми параметрами. Таким образом, присутствие в клеточном осадке мочи лейкоцитов, включающих лимфоциты, не оказывает влияние на АТ в исследуемом белковом экстракте. Далее была проанализирована зависимость АТ от присутствия эритроцитов в составе клеточного осадка мочи пациентов. Эритроциты содержат в своём составе белок гемоглобин, гем которого может оказывать ингибирующий эффект на эффективность TRAP-анализа. Проведенный корреляционный анализ показал “низкую корреляцию” ($r=0,34$), что означает отсутствие связи между этими параметрами, и, как следствие, отсутствие сильного влияния элементов крови в осадке мочи на результаты

TRAP-анализа. Таким образом, образцы мочи с высоким содержанием крови необязательно исключать из исследования.

Для оценки диагностической значимости исследованных онкомаркёров (АТ, экспрессия генов *hTERT* и *hTR* в ткани опухоли и в клеточном осадке мочи) при разработке неинвазивной диагностики РМП, был проведён ROC-анализ и рассчитаны следующие показатели: чувствительность и специфичность. В качестве контрольной группы были выбраны 10 пациентов с неонкологической патологией МП циститом. Были построены характеристические кривые и рассчитана площадь под кривой (AUC), позволяющая определить предсказательную способность тестов (их диагностическую эффективность). Чувствительность и специфичность для проведённых тестов составила 96 и 100% соответственно для АТ, 80 и 100% для онкомаркёра *hTERT* и 100 и 0% для *hTR*. Результаты данного анализа представлены в таблице 5, ROC-кривая представлена на рисунке 5.

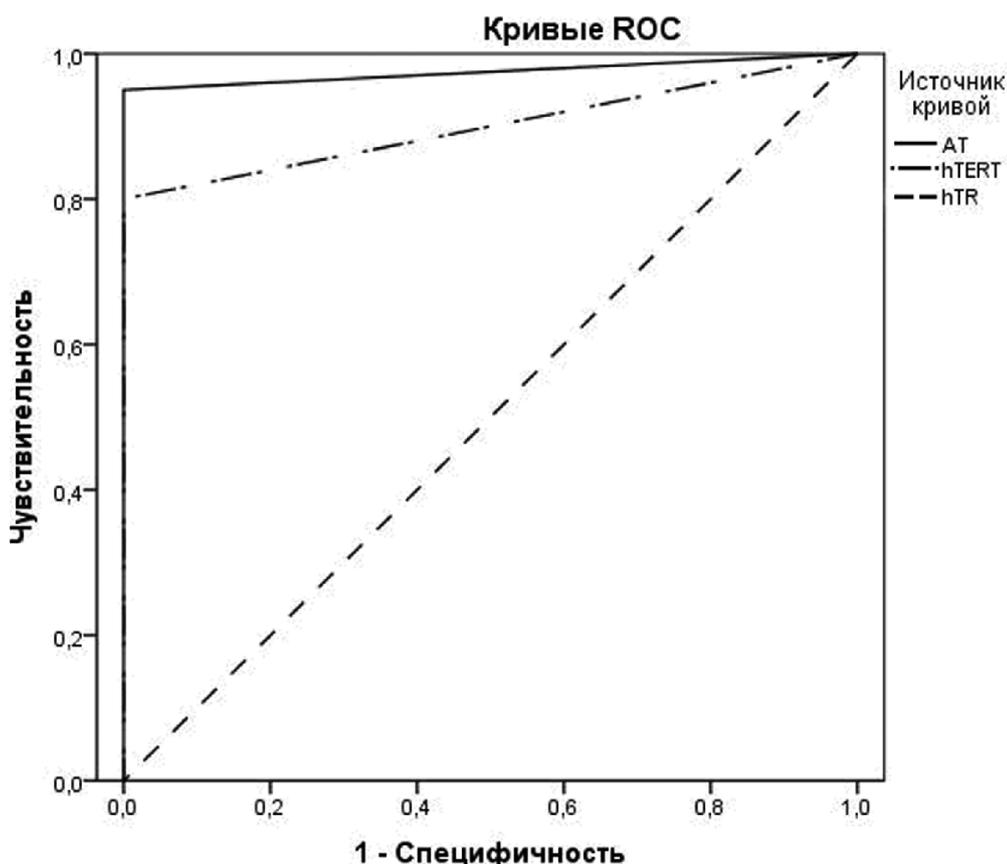


Рисунок 5. Характеристическая (ROC) кривая чувствительности и специфичности определения АТ, а также экспрессии генов *hTERT* и *hTR* при анализе образцов от пациентов с РМП. Непрерывная линия - ROC-кривая для оценки относительной активности теломеразы. Пунктирная линия - ROC-кривая для оценки относительной экспрессии гена *hTERT*. Пунктирная линия с точкой - ROC-кривая для оценки относительной экспрессии гена *hTR*.

НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Таблица 5. Диагностическая значимость анализа АТ и экспрессии генов *hTERT* и *hTR* при анализе образцов от пациентов с РМП.

Анализируемый параметр	Вид образца	Чувствительность, %	Специфичность, %	AUC
Относительная АТ, %	ткань	96	100	0,975
	моча	96	100	0,975
Относительная экспрессия гена <i>hTERT</i>	ткань	80	100	0,9
	моча	80	100	0,9
Относительная экспрессия гена <i>hTR</i>	ткань	100	0	0,5
	моча	100	0	0,5

Данные таблицы 5 и рисунка 5 показывают, что определение АТ в клеточном осадке мочи – наиболее чувствительный тест, который может лечь в основу неинвазивной методики диагностики РМП. Чувствительность этого теста составила 96%, при 100% специфичности при AUC – 0,975, что говорит о том, что анализ активности теломеразы в клеточном осадке мочи является наиболее оптимальным качественным тестом для анализа онкомаркера РМП. В то же время анализ экспрессии гена *hTERT* также показал хорошие значения чувствительности, составившей 80% при 100% специфичности и AUC равной 0,9. Это также доказывает высокую диагностическую значимость данного параметра, но уступающую АТ. Таким образом, определение АТ имеет более высокую диагностическую значимость при разработке методики неинвазивной диагностики РМП.

Качественный анализ экспрессии гена *hTR* показал 100% чувствительность, при этом его специфичность составила 0%. Как видно из рисунка 5, ROC-кривая анализа экспрессии гена *hTR* (пунктирная линия) полностью сливается с опорной диагональю и AUC для данного теста составляет 0,5. Ген *hTR* экспрессируется в клетках конститутивно и имеет в организме функции, связанные не только с теломеразной активностью [10]. В то же время, согласно литературным данным, несмотря на наличие экспрессии гена *hTR* как в здоровых, так и в опухолевых клетках, уровень его экспрессии в последних повышен [6]. Таким образом, для разработки диагностического теста для диагностики РМП с использованием экспрессии *hTR* необходимо использовать не качественный, а очень чувствительный количественный анализ уровня экспрессии этого гена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование, описанное в данной статье, подтверждает положение о том, что теломераза напрямую связана с процессами злокачественной

трансформации в клетках ткани МП. Согласно полученным данным, значения АТ в клеточном осадке мочи и в ткани опухоли имеют прямую сильную статистически значимую корреляцию ($r=0,798$, $p=0,012$). При этом экспрессия её каталитической субъединицы в образцах ткани также была прямо достоверно статистически значимо связана ($r=0,596$, $p=0,007$) с экспрессией данного гена в образцах клеточного осадка мочи. Это доказывает присутствие клеток опухоли МП в моче пациентов с РМП. АТ была обнаружена в большинстве образцов ткани опухоли (96%) и клеточных осадков мочи (96%) пациентов с ранней стадией РМП, экспрессия гена *hTERT* в 80% и 80% соответственно. В то же время в клеточных осадках мочи пациентов с циститом АТ и экспрессия гена *hTERT* отсутствовала, что доказывает высокую специфичность данных методов анализа. Экспрессия РНК-субъединицы теломеразы гена *hTR* детектировалась как в образцах ткани и мочи пациентов исследуемой группы, так и в аналогичных образцах от контрольной группы (пациентов с циститом), при этом относительный уровень экспрессии гена в образцах, полученных от пациентов с РМП был в 1,8 раза выше аналогичного параметра у больных контрольной группы. Таким образом, ген экспрессировался конститутивно и качественный анализ этого параметра не может являться диагностическим тестом для определения.

Разрабатываемый в данном исследовании метод имеет значения чувствительности и специфичности, превосходящие аналогичные параметры для цитологического исследования мочи, которое применяется в настоящее время как неинвазивный тест при диагностике РМП. Таким образом, исследование АТ в комплексе с экспрессией гена *hTERT* может быть внедрено в практику и заменить собой низкочувствительное цитологическое исследование.

В дальнейшем предполагается продолжить исследования пациентов с ранней стадией РМП на более широкой выборке и провести сравнение

АТ в ткани и клеточном осадке мочи на более поздних стадиях заболевания. Также необходимо существенно расширить контрольную группу пациентов с различными неонкологическими заболеваниями МП.

Для разработки методики неинвазивной диагностики рака мочевого пузыря был проведён анализ активности теломеразы в образцах ткани опухоли мочевого пузыря и клеточных осадках мочи пациентов неизотопным методом TRAP (telomerase repeat amplification protocol. Также были измерены уровни относительной экспрессии её каталитической субъединицы hTERT и РНК-субъединицы hTR) методом ОТ-ПЦР. При этом активность теломеразы и экспрессия генов её субъединиц выявлялась как в ткани опухоли, так и в клеточном осадке мочи каждого пациента. Данные, полученные нами, показывают возможность проведения неинвазивной диагностики рака мочевого пузыря с использованием комбинации указанных методов с чувствительностью и специфичностью в 96 и 100% для анализа АТ и 80 и 100% для анализа экспрессии гена hTERT.

ЛИТЕРАТУРА

- Muller M. (2002) *Oncogene*, **21**, 650–655.
- Kaufman D.S., Shipley W.U., Feldman A.S. (2009) *Lancet*, **374**(9685), 239–249.
- Parker J., Spiess P.E. (2011) *Scien. World J.*, **11**, 1103–1112.
- Sanchini M.A., Bravaccini S. et al. (2004) *Neoplasia*, **6**(3), 234–239.
- Lamarca A., Barriuso J. (2012) *Adv. Urol.*, 2012, 693631.
- Weikert S., Krause H. et al. (2005) *Int. J. Cancer*, **117**, 274–280.
- Chiodi I., Mondello C. (2012) *Front. Oncol.*, 2012, 133.
- Ulaner G.A., Giudice L.C. (1997) *Mol. Hum. Reprod.*, **3**(9), 769–773.
- Shay J.W., Sung B.J., Cho Y.S. et al. (1997) *Eur. J. Cancer*, **3**, 787–791.
- Kedde M., le Sage C., Duursma A. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 40503–40514.
- Mergny J.L., Riou J.F., Mailliet P. et al. (2002) *Nucl. Acids Res.*, **4**, 839–865.
- Мукер А.К., Коффу Д.С. (1997) *Биохимия*, **62**, 1574–1557.
- Kim N.W., Piatyszc M.A., Prowse K.R. et al. (1994) *Science*, **266**(5193), 2011–2015.
- Glukhov A.I., Zimnik O.V., Gordeev S.A., Severin S.E. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **248**(2), 368–371.
- Bradford M. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
- Свинарёва Л.В., Глухов А.И., Зимник О.В., Быков И.И., Хоробрых Т.В., Швец В.И. (2010) *Биомед. химия*, **56**, 602–608.
- Chotczynski P., Sacchi N. (1987) *Anal. Biochem.*, **162**, 156–159.
- Глухов А.И., Высоцкая О.В., Свинарёва Л.В., Зимник О.В., Быков И.И., Хоробрых Т.В. (2011) *Мол. медицина*, №1, 35–40.
- Глухов А.И., Харнас С.С., Инполитов Л.И., Жуликов Д.В., Бочков И.И., Марченко И.А. (2007) *Анналы хирургии*, **6**, 22–25.

Поступила: 03. 04. 2013.

DEVELOPMENT OF NONINVASIVE BLADDER CANCER DIAGNOSIS ON BASIS OF TELOMERASE AND IT'S SUBUNITS hTERT AND hTR DETECTION

A.I. Glukhov^{1,2}, Y.E. Grigorieva¹, S.A. Gordeev¹, A.Z. Vinarov¹, N.V. Potoldykova¹

¹Sechenov First Moscow State Medical University,
8 Trubetskaya str., Moscow, 119991 Russia; tel.: (499)-317-20-07; e-mail: telomerase@gmail.com
²Kurchatov NBIC Centre, NRC "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

Telomerase activity (TA) and expression of genes coding it's subunits (hTERT and hTR) have been examined in tumor tissue and urine sediment samples taken from patients with bladder cancer (BC) using the modified TRAP assay (in the case of telomerase detection) and RT-PCR (in the case of hTERT and hTR expression). Results obtained in this study demonstrate possibility of noninvasive diagnosis of BC with sensitivity of 96% and specificity of 100% in the case of telomerase detection and with sensitivity of 80% and specificity of 100% in the case of hTERT detection in urine sediment samples.

Key words: bladder cancer (BC), telomerase, catalytic subunit of telomerase (hTERT), RNA-subunit of telomerase (hTR), diagnosis, noninvasive diagnosis.