

ГЕН КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ (hTERT) И СОЧЕТАННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ МАТКИ

Л. В. Адамян, Х. З. Гусаева, И. А. Марченко

*Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова,
НИИ Молекулярной Медицины, НИЦ ММА им. И. М. Сеченова, Москва*

Для изучения экспрессии теломеразы (гена *hTERT*) был использован неколичественный метод ОТ-ПЦР (обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции). Были исследованы образцы миомы матки, патологического миометрия (аденомиоз) и патологического эндометрия. Положительный результат ОТ-ПЦР на мРНК β_2 -микроглобулина служил подтверждением успешного проведения реакции и отсутствия неспецифических ингибиторов ПЦР. Экспрессия гена теломеразы не была обнаружена ни в одном образце тканей при сочетанных доброкачественных заболеваниях матки (миома матки, аденомиоз, гиперплазия эндометрия). При раке эндометрия выявлен полноразмерный вариант транскрипта и β -вариант сплайсинга.

Ключевые слова: теломераза, сочетанные доброкачественные заболевания матки.

HUMAN TELOMERASE REVERSE TRANSCRIPTASE (hTERT) AND ASSOCIATED DISEASES OF UTERUS

L. V. Adamyan, H. Z. Gusaeva, I. A. Marchenko

hTERT is a rate-limiting determinant of telomerase activity. We have studied the expression of *hTERT* gene in samples of myoma, of adenomyosis, of simple hyperplasia, of atypical hyperplasia. *hTERT* gene expression was evaluated by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) with microglobulin as an indirect marker of tissues integrity. None of the investigated samples had any *hTERT* gene expression. A sample of endometrial cancer was positive for *hTERT* gene expression.

Key words: telomerase, associated diseases of uterus.

В литературе встречается неоднозначный подход исследователей по поводу формирования на фоне сочетанных доброкачественных процессов в матке онкологического процесса. По мнению ряда исследователей, риск развития рака матки оказывается существенно выше при сочетании заболеваний эндо- и миометрия [1]. В связи с этим поиск новых, доступных высокоинформативных методов ранней диагностики, при сочетанных доброкачественных заболеваниях эндо- и миометрия имеет большое практическое значение.

Фермент, который компенсирует укорочение эукариотических хромосом достраиванием утраченных в ходе репликации теломерных повторов, носит название теломераза [3]. Он активен в период развития зародыша [7, 9], но затем в большинстве соматических клеток происходит репрессия и/или инактивация этого фермента. Реактивация теломеразы наблюдается при малигнизации, и теломеразная активность (ТА) обнаруживается в 85 % образцов, оцененных морфологами как пораженные раком [6]. ТА сохраняется в стволовых клетках, лимфоцитах, семенниках, яичниковых фолликулах, эндометрии, нормальной коже, волосных фолликулах, сосудистых эндотелиальных клетках и др. В эндометрии ТА возрастает по мере прогрессии пролиферативной фазы, достигая пика в позднюю пролиферативную фазу. И наоборот, активность теломеразы уменьшается в секреторную фазу, принимая минимальное значение в позднюю секреторную фазу.

Теломеразную активность демонстрируют только те ткани, в которых обнаруживается полноразмерный вариант транскрипта гена *hTERT* [8].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить экспрессию (активность) гена каталитической субъединицы теломеразы (*hTERT*) при сочетанных доброкачественных заболеваниях эндо- и миометрия.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе предметом исследования служили ткани, удаленные при диагностическом выскабливании слизистой стенки матки, миомэктомии и гистерэктомии у женщин репродуктивного возраста [средний возраст ($42,1 \pm 3,1$) лет] с сочетанными доброкачественными заболеваниями матки [миома матки, аденомиоз и гиперплазия эндометрия (ГПЭ)]. Во всех случаях фаза менструального цикла соответствовала секреторной. В качестве контроля были исследованы три образца рака эндометрия. Оперативные вмешательства произведены у 27 больных, проходивших обследование и лечение в НИЦ АГиП им. В. И. Кулакова в отделении оперативной гинекологии. Исследуемый материал делили на 2 части: одну часть подвергали гистологическому исследованию, вторую помещали в пластиковые пробирки, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C до получения гистологичес-

кого заключения. Положительными контролями обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) служили теломеразопозитивные клеточные линии человека LNCaP (рак предстательной железы) и HeLa (рак шейки матки).

Выделение РНК проводили по методике, предложенной P. Chomczynski и N. Sacchi (1987) с некоторыми модификациями. Полученные препараты РНК использовали для спектрофотометрии, контрольного электрофореза и для постановки реакции ОТ.

Количественное определение концентрации РНК проводили спектрофотометрически по оптической плотности при длине волны 260 нм (A_{260}) на основе зависимости 1 ОЕ = 40 мкг/мл РНК, где ОЕ — оптическая единица. Степень очистки препаратов РНК от белка определяли по показателю A_{260}/A_{280} .

Качество полученных препаратов РНК оценивали после электрофореза в 1,2%-м агарозном геле и окраски бромистым этидием. При этом регистрировали степень интактности РНК (в препаратах РНК хорошего качества флуоресценция полосы, отвечающей 28S-РНК, должна быть в два раза выше, чем у полосы 18S-РНК), а также контролировали отсутствие примеси ДНК.

Обратную транскрипцию проводили с образцами суммарной РНК, выделенной из замороженных тканей, и РНК, выделенной их культур клеток LNCaP и HeLa.

Реакционная смесь для ОТ объемом 30 мкл содержала: 2 мкг РНК, обратную транскриптазу M-MuLV 40 ЕД («Fermentas», Литва), буфер для ОТ («Fermentas», Литва): 50 мМ Трис-НСI (рН 8,3), 50 мМ КСI, 4 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотрейтол; дезоксинуклеотидтрифосфаты (дНТФ): по 1,0 мМ каждого («Диалат», Россия), 0,2 мкг смеси гексаолигонуклеотидных праймеров («Литех», Россия), ингибитор РНКаз 20 ЕД («Fermentas», Литва). Реакцию ОТ проводили согласно протоколу синтеза кДНК с помощью обратной транскриптазы M-MuLV фирмы «Fermentas».

Использовали 5 мкл полученной кДНК в качестве матрицы при постановке ПЦР с парой праймеров: сенси 5'-GCC TGA GCT GTA CTT TGT CAA-3' и антисенси 5'-CGCAA CAG CTT GTT CTC CAT GT-3', комплементарных нуклеотидам 2164—2620 кДНК *hTERT* и позволяющей детектировать альтернативный сплайсинг пре-мРНК *hTERT*. Реакционная смесь объемом 50 мкл помимо кДНК содержала: ПЦР-буфер («Диалат», Россия): 67 мМ трис-НСI, рН 8,8; 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,01%-й твин-20 («Диалат», Россия), 1,5 мМ MgCl₂ («Диалат», Россия), дНТФ по 0,2 мМ каждого («Диалат», Россия), праймеры по 0,4 мкМ каждого («Литех», Россия), 3,5 мкл диметилсульфоксида, 2,5 ЕД Таq-полимеразы («Диалат», Россия). При постановке ПЦР была использована процедура «горячего старта» (позволяющая увеличить специфичность ПЦР): пробирки со смесью без Таq-полимеразы помещали в амплификатор и прогревали при 94 °С 5 мин, в течение этого времени со 2-й мин добавляли Таq-полимеразу. Режим ПЦР был следующим:

95 °С 1 мин, 55 °С 1 мин, 72 °С 1 мин 30 сек, 33 цикла; 95 °С 1 мин, 55 °С 1 мин, 72 °С 3 мин. Отрицательный результат ОТ-ПЦР с праймерами к гену *hTERT* считался достоверным только при положительном результате ОТ-ПЦР с праймерами к гену β_2 -микроглобулина.

В каждом эксперименте полученную кДНК использовали для постановки ПЦР с праймерами к гену β_2 -микроглобулина. Данный ген конститутивно экспрессируется в клетках человека.

В работе использовали следующую пару праймеров: сенси 5'-CAC GTC ATC CAG CAG AGA ATG GAA AGT C-3' и антисенси 5'-TGA CCA AGA TGT TGA ATG TTG GAT AAG AG-3'.

Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала: 5 мкл кДНК, ПЦР-буфер («Диалат», Россия): 67 мМ трис-НСI, рН 8,8; 11,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,01%-й твин-20 («Диалат», Россия), 2 мМ MgCl₂ («Диалат», Россия), дНТФ по 0,16 мМ каждого («Диалат», Россия), праймеры по 0,36 мкМ каждого («Литех», Россия), 2,5 ЕД Таq-полимеразы («Диалат», Россия).

ПЦР проводили в двухтемпературном режиме: 95 °С 4 мин, 69 °С 2 мин 40 с, 1 цикл; 95 °С 50 с, 69 °С 2 мин, 33 цикла; 95 °С 50 с, 69 °С 1 мин 30 с, 72 °С 8 мин, 1 цикл. Размер специфического ПЦР-продукта соответствовал 550 п.о.

Отрицательным контролем ПЦР служила проба, в которую вместо кДНК добавляли стерильную воду.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в 1,7%-м агарозном геле с использованием буфера трис-борат-ЭДТА (ТБЭ): 0,09 М основной трис, 0,09 М борная кислота, 2 мМ ЭДТА в аппарате для горизонтального электрофореза при 50—60 мА, 120 В в течение 40 минут. В гель вносили 10 мкл ПЦР-смеси, смешанной с 1,5 мкл буфера для нанесения. По окончании электрофореза гель визуализировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе после окрашивания высокочувствительным красителем SYBR Green I.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методом не количественной ОТ-ПЦР экспрессия гена *hTERT* не наблюдалась в тканях матки при аденомиозе и миоме матки. В образцах патологического эндометрия, полученных в секреторную фазу менструального цикла, экспрессия гена также не обнаружена (рис. 1).

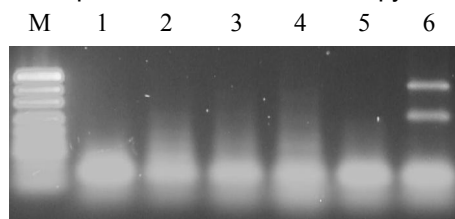


Рис. 1. Электрофорез в 1,7%-м агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР с праймерами к гену *hTERT*; окраска SYBR Green I:

М — маркер молекулярного веса λ UC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23; 1—5 — образцы простой гиперплазии, 6 — рак эндометрия

Экспрессия гена β_2 -микроглобулина обнаружена во всех образцах. Положительный результат ОТ-ПЦР на мРНК β_2 -микроглобулина служит подтверждением успешного проведения реакции ОТ и отсутствия неспецифических ингибиторов ПЦР (рис. 2).

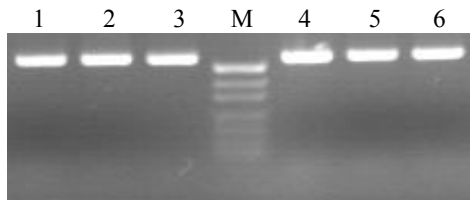


Рис. 2. Электрофорез в 1,7%-м агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР с праймерами к гену β_2 -микроглобулина; окраска SYBR Green I; М — маркер молекулярного веса (pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23); 1—5 — образцы простой гиперплазии; 6 — рак эндометрия

Результат ПЦР с праймерами к гену *hTERT* на культуре клеток LNCaP приведен на рис. 3.



Рис. 3. Электрофорез в 1,7%-м агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР с праймерами к гену *hTERT*; окраска SYBR Green I; М — маркер молекулярного веса pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23; LNCaP — культура клеток LNCaP; К — контроль ПЦР (в ПЦР-смесь не вносили кДНК)

Для интерпретации полученных результатов была исследована экспрессия гена *hTERT* при раке эндометрия: при раке эндометрия наблюдалось присутствие как полноразмерного варианта транскрипта гена *hTERT*, так транскрипта с β -делецией (рис. 1).

Полученные нами данные по экспрессии гена *hTERT* в патологическом миометрии согласуются с данными других исследователей.

Данные же по экспрессии гена *hTERT* в нормальном и патологическом эндометрии противоречивы. Такие результаты, возможно, вызваны различием в применяемых методиках, фазах менструального цикла на момент забора ткани и др.

Забор тканей в данном исследовании осуществляли в секреторную фазу, исходя из предположения, что при злокачественной трансформации клетки (при раке эндометрия) идет дисрегуляция (повыше-

ние) экспрессии гена *hTERT* и экспрессия если и зависит от фазы цикла, то в меньшей степени, чем в нормальном эндометрии. В пролиферативную фазу менструального цикла активность теломеразы достигает своего максимума и при получении образцов тканей матки, особенно это относится к ткани эндометрия, в пролиферативную фазу возникали бы трудности в оценке результата, так как по некоторым данным активность теломеразы в позднюю пролиферативную фазу сопоставима с уровнем при раке эндометрия.

Lehner R., et al. (2002) оценивали уровень мРНК *hTERT* в 26 образцах рака эндометрия и 20 образцах доброкачественного эндометрия с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени, уровень мРНК *hTERT* был стандартизован относительно уровня рРНК [11]. Уровень мРНК *hTERT* значительно выше при раке эндометрия 179 пг/нг рРНК, чем в нормальном эндометрии (45 пг/нг).

Dong Y., et al. (2004) методом *in situ* RNA hybridization обнаружили мРНК *hTERT* в 2 из 14 образцов простой гиперплазии, 4 из 8 образцов сложной гиперплазии, 8 из 10 образцов атипичной гиперплазии, 39 из 42 (92,9 %) образцов рака эндометрия. Интенсивность сигнала была выше при раке и атипичной гиперплазии, чем при простой и сложной гиперплазии без атипичии [2].

Mazurek U., et al. (2001), используя метод количественной ОТ-ПЦР, показали, что экспрессия гена *hTERT* незначительно изменяется в зависимости от стадии развития гиперплазии [5]. Уровень экспрессии был выше в образцах сложной гиперплазии и значительно меньше в образцах простой и атипической гиперплазии (близок к 0). А при сложной гиперплазии был сопоставим с уровнем, наблюдаемым в нормальном секреторирующем эндометрии. Экспрессия гена *hTERT* обнаружена в 50 % образцов нормального секреторирующего эндометрия и во всех образцах нормального эндометрия в пролиферативную фазу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей матки, а также раннего выявления онкологического процесса целесообразно измерение экспрессии теломеразы (*hTERT*) — фермента, который определяет пролиферативную активность и immortalность опухолевых клеток, в том числе клеток-мишеней эстрогенов. Отсутствие экспрессии теломеразы свидетельствует о доброкачественном процессе.

2. Данный вид исследования, несмотря на относительно небольшое количество наблюдений, следует использовать как скрининг-метод, особенно у женщин репродуктивного возраста для правильного выбора метода лечения (консервативный или оперативный).

ЛИТЕРАТУРА

1. Самарин Д. М. // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2005. — Т. 4, № 1. — С. 84—87.
2. Dong Y., Li T., Wang Y., et al. Expression of human telomerase reverse transcriptase and c-myc transcripts in endometrial carcinoma and its precursors. — 2004. — № 33 (1). — P. 40—43.
3. Hisatomi H., Nagao K., Kanamaru T., et al. // Int. J. Oncol. — 1999. — № 14. — P. 727—732.
4. Lehner R., Enomoto T., McGregor J. A., et al. // Gynecol Oncol. — 2002. — № 84 (1). — P. 120—125.
5. Mazurek U., Witek A., Olejek A., et al. // Folia Histochemica et Cytobiologica. — 2001. — Vol. 39. — P. 183—184.
6. Nagai N., Oshita T., Mukai K., et al. // International Journal of molecular medicine. — 2002. — Vol. 10. — P. 593—597.
7. Tsujimura A., Kawamura N., Ishimura T., et al. // International Journal of Oncology. — 2002. — Vol. 20 (2). — P. 361—365.
8. Ulaner G. A., Hu J. F., Vu T. H., et al. // Int. J. Cancer. — 2000. — № 85. — P. 330—335.
9. Ulaner G. A., Hu J. F., Vu T. H., et al. // Int. J. Cancer. — 2000. — №85. — P. 330—335.

УДК [616-092:612.017.1]-008.64-084

ПРОФИЛАКТИКА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ У ДЕТЕЙ С ВТОРИЧНЫМ ИММУНОДЕФИЦИТОМ В НЕБЛАГОПОЛУЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ РЕГИОНАХ

М. В. Кудин, С. А. Сергеева*, А. В. Скрипкин, Ю. Н. Федоров,

Вольская ЦРБ, Научно-производственная фирма «Материя Медика Холдинг», Москва*

Профилактическое лечение Анафероном детским в организованных коллективах способствовало снижению общей заболеваемости детей, заболеваемости острыми респираторно-вирусными инфекциями (ОРВИ) с сокращением сроков продолжительности лихорадки, синдромов интоксикации и катаральных синдромов. Аллергических и других реакций, связанных с применением препарата, не обнаружено.

Ключевые слова: Анаферон детский, ОРВИ, ротавирусная инфекция, аденовирусная инфекция.

PREVENTION OF MORBIDITY IN CHILDREN WITH SECONDARY IMMUNODEFICIENCY IN ENVIRONMENTALLY UNFAVORABLE REGION

M. V. Kudin, S. A. Sergeeva, A. V. Skripkin, U. N. Fedorov

Preventive treatment with Anaferon for children in day care institutions promoted a reduction in general morbidity and the rate of acute respiratory viral infection with reducing the duration of fever, syndrome of intoxication and catarrhal syndrome. No allergic or other reactions associated with administration of this drug were discovered.

Key words: (oral anti-interferon gamma antibodies), , rotavirus, adenovirus.

Инфекции верхних дыхательных путей у длительно и часто болеющих детей являются серьезной проблемой для здравоохранения в связи с наносимым экономическим ущербом как отдельным лицам, так и обществу в целом. Российскими экспертами средние затраты только во время одной эпидемии гриппа оцениваются в сумму 50 миллиардов рублей.

Согласно научно-практической программе по острым респираторным заболеваниям у детей, разработанной Союзом педиатров России, острые респираторные заболевания (ОРЗ) — этиологически разнородная группа инфекционных болезней, вызываемых как вирусами, в основном респираторными, так и пневмотропными бактериями. При вирусологическом исследовании диагноз ОРВИ уместно расшифровывать с указанием на грипп, аденовирусную, ротавирусную, РС-вирусную или иную инфекцию.

Организм ребенка наиболее подвержен воздействию неблагоприятных факторов внешней среды [5, 10]. В условии воздействия экотопогенов на организм детей, проживающих в регионе с развитой цементной индустрией, нами проведено исследование содержания в сыворотке крови растворимых антигенов sCD₄ и sICAM-1 и цитокинов IL-2, IL-6, IL-10, TNF α , выявлено преобладание иммунного воспаления за счет гиперпродукции TNF α , IL-6 и активации хелперов sCD₄, что указывает на наличие вторичного иммунодефицита у детей [3, 9]. В связи с этим особую актуальность приобретают вопросы профилактического лечения вторичных иммунодефицитов у детей.

Стремительно расширяющийся набор лекарственных препаратов, используемых при ОРЗ (жаропонижающих, отхаркивающих, антибиотиков, противовирусных, иммуномодуляторов), создает объективные трудности в выборе практическим врачом адекватной терапии [2, 4, 6].