

4. Costello LC, Franklin RB, Feng P. Mitochondrial function, zinc, and intermediary metabolism relationships in normal prostate and prostate cancer. *Mitochondrion*. 2005;5: 143-53.
5. Kurhanewicz J, Swanson MG, Nelson SJ, & Vigneron DB Combined magnetic resonance imaging and spectroscopic imaging approach to molecular imaging of prostate cancer. *J Magn Reson Imaging*. 2002; 16(4),451-463.
6. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason MD, Matveev V, Mottet N, van der Kwast TH, Wiegel T, Zattoni F. 2011-2012 EAU Guidelines on Prostate Cancer.
7. Filip G, Claus, Hedvig Hricak, Robert R. Hattery. Pretreatment Evaluation of Prostate Cancer: Role of MR Imaging and 1H MR Spectroscopy. October 2004 *RadioGraphics*, 24, S167-S180.

УДК 616.62-006.6-076:616.631.6

© П.В. Глыбочко, Ю.Г. Аляев, А.З. Винаров, К.А. Поляковский, Н.В. Потолдыкова, А.И. Глухов, Я.Е. Григорьева, 2013

П.В. Глыбочко, Ю.Г. Аляев, А.З. Винаров, К.А. Поляковский,
Н.В. Потолдыкова, А.И. Глухов, Я.Е. Григорьева
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТЕЛОМЕРАЗЫ В КЛЕТОЧНОМ ОСАДКЕ
МОЧИ ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОГО МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ РАКА
МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ**

*ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова» Минздрава России, г. Москва*

Целью нашей работы явилась оценка возможности использования определения активности теломеразы (АТ) в клеточном материале мочи для разработки неинвазивного метода диагностики рака мочевого пузыря (РМП). Исследование проводилось в урологической клинике Первого МГМУ им. И.М.Сеченова и в лаборатории МНИИМЭ, где было обследовано по 32 образца клеточного осадка мочи в до- и послеоперационном периодах и 32 образца опухолевой ткани у пациентов с РМП. Все образцы опухолевой ткани были подвергнуты гистологическому исследованию, диагноз рака подтвержден во всех случаях. Группу контроля составили 10 образцов клеточного осадка мочи и 10 образцов ткани мочевого пузыря у пациентов с гистологически верифицированным хроническим циститом. Клеточный материал осадка мочи получали путем центрифугирования мочи с промыванием осадка в растворе PBS и при последующем замораживании сухого остатка мочи в жидком азоте. В качестве образцов опухолевой ткани использовали операционный материал после трансуретральной резекции стенки мочевого пузыря, открытой резекции стенки мочевого пузыря, цистэктомии. Определение АТ в образцах проводили с помощью следующих методов: модифицированный TRAP-метод; электрофорез. Кроме того, все исследуемые образцы были проанализированы на предмет наличия в них ингибиторов АТ. При подозрении на наличие ингибиторов АТ проводился повторный анализ с разведением лизата для выявления истинных значений АТ. Чувствительность метода составила 96,9%, специфичность – 100%.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, теломераза, активность теломеразы, электрофорез, продукты амплификации теломеразной реакции.

P.V. Glybochko, Yu.G. Alyaev, A.Z. Vinarov, K.A. Polyakovskiy,
N.V. Potoldykova, A.I. Glukhov, Ya.E. Grigoreva
**DETERMINATION OF ACTIVE TELOMERASE IN CELLULAR URINE SEDIMENTS
FOR NONINVASIVE DIAGNOSIS OF BLADDER CANCER**

Our research aimed to evaluate the possibility of use of active telomerase (AT) determination in urine cell sediments for noninvasive diagnosis of bladder cancer (BC). This study was conducted in the urological clinic of the I.M. Sechenov First MSMU and laboratory of Moscow Research Institute of Medical Ecology. During investigation 32 urine sediments before and after the surgical treatment and 32 tissue samples from patients with BC were being examined. All tissue samples were subjected to histological examination, the diagnosis of cancer was confirmed in all cases. The control group consisted of 10 urine sediment samples and 10 bladder tissue samples from patients with histologically verified chronic cystitis. Cellular material was obtained by centrifuging fresh-voided urine, washing it in PBS solution and LN2 freezing the dry urine sediments. Tissue samples were obtained by transurethral resection of bladder wall, accessible resection of urinary bladder wall and cystectomy. All samples were examined for AT presence with TRAP-assay, electrophoresis. Besides, all samples were tested for telomerase inhibitors. In case of inhibitors presence suspicion samples were secondary tested by dilution of examining protein lysates for revelation of true AT values. Sensitivity of this method is 96.9%, specificity - 100%.

Key words: bladder cancer, telomerase, active telomerase, electrophoresis, TRAP.

Рак мочевого пузыря (РМП) – одна из самых распространенных опухолей мочевыводящих путей. В 2006 г. в Европе было диагностировано 104 400 случаев РМП, из которых 82 800 у мужчин и 21 600 у женщин. Это составляет 6,6% от всех злокачественных опухолей у мужчин и 2,1% у женщин. В структуре общей смертности от злокачественных новообразований на долю РМП приходится 3,1% у мужчин и 1,8% у женщин [1]. Основным методом диагностики рака мочевого пузыря остается цистоскопия с последующим взятием материала для гистологиче-

ского исследования. Данная методика является инвазивной и трудоемкой. В связи с этим большой интерес представляет внедрение неинвазивных методов диагностики, в частности исследование онкомаркеров РМП в клеточном материале мочи. В настоящее время активно обсуждается возможность использования фермента теломеразы в качестве универсального онкомаркера. Теломераза – фермент, синтезирующий теломерные повторы ДНК(ТTAGGG) на 3-концах хромосом. Ключевая роль данного фермента в поддержании процесса неограниченного деления клетки

обуславливает высокую чувствительность методов его определения в ткани для диагностики злокачественного поражения.

В большинстве соматических клеток активность теломеразы (АТ) отсутствует. Это приводит к тому, что после определенного числа клеточных делений (примерно 80-100) длина концевых теломерных последовательностей ДНК уменьшается до критического уровня и клетка подвергается апоптозу – запрограммированной клеточной гибели. Реактивация теломеразы наблюдается при малигнизации клетки. Согласно литературным данным, АТ обнаруживается методом TRAP в 90% злокачественных опухолей, в частности при развитии онкопатологий щитовидной железы и желудка [9,10]. Фермент теломераза, восстанавливая утраченные теломеры на концах хромосом, придает клетке способность к неограниченному делению. Многие авторы считают, что информация об активности теломеразы может иметь большое значение в диагностике рака [2, 3, 4]. Возможность использования АТ в диагностических тестах довольно велика, так как позитивный результат может быть получен при наличии в образце всего лишь нескольких теломеразопозитивных опухолевых клеток. При этом важно, что для диагностики могут оказаться пригодными образцы, полученные неинвазивными и минимально инвазивными способами. Например, АТ в случае карциномы мочевого пузыря была обнаружена в эксфолиативных раковых клетках мочи и промывной жидкости [5, 6]. В зарубежной литературе чувствительность определения АТ в клеточном материале мочи у больных с РМП составляла 70 – 94%, специфичность метода 88 – 99% [7]. Предполагают, что кроме диагностических тестов АТ может найти применение и в прогнозировании исхода болезни. Как показывают результаты экспериментов, для некоторых видов опухолей существует корреляция между АТ и определенными клинико-патологическими показателями. Диагностический и прогностический потенциалы теломеразы требуют дальнейшего исследования с привлечением большего числа больных и с более длительными периодами наблюдения. Для этих целей также необходимо усовершенствование методов количественного определения АТ.

Целью нашего исследования стала оценка возможности использования определения активности теломеразы в клеточном осадке мочи для разработки неинвазивного метода диагностики рака мочевого пузыря (РМП).

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: разработка метода получения клеточного осадка мочи для сохранения его нативности и возможности определения в нем активности теломеразы (АТ); исследование АТ в клеточном осадке мочи у пациентов с раком мочевого пузыря в до- и послеоперационном периодах; исследование АТ в опухолевой ткани у пациентов с раком мочевого пузыря; изучение клинической ценности определения АТ в клеточном осадке мочи у пациентов с раком мочевого пузыря.

Материал и методы. Нами было обследовано 42 пациента, среди которых было 35(83,3%) мужчин и 7(16,7%) женщин. Возраст мужчин 64(34-84) года, возраст женщин – 59(39-81) лет. Пациенты были распределены на 2 группы в зависимости от гистологического исследования. Первая группа из 32 пациентов с гистологически верифицированным РМП включала в себя 27 мужчин и 5 женщин, средний возраст которых составил 64,5 года. Вторая группа из 10 пациентов с гистологически верифицированным циститом включала 8 мужчин и 2 женщины, средний возраст которых составил 62 года. Клеточный осадок мочи получали путем ее центрифугирования с промыванием осадка в растворе PBS и последующим замораживанием сухого осадка мочи в жидком азоте. В качестве образцов опухолевой ткани использовался операционный материал после трансуретральной резекции стенки мочевого пузыря, открытой резекции стенки мочевого пузыря, цистэктомии. Гистологическое исследование ткани мочевого пузыря проводилось в морфологической лаборатории Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Определение АТ в клеточном осадке мочи и ткани мочевого пузыря проводилось в лаборатории молекулярных основ онкогенеза Курчатовского НБИКС-центра. До начала обработки и молекулярно-биологического исследования образцы хранили при температуре -70°C. С помощью модифицированного неизотопного TRAP-метода [8] проводилось определение АТ.

Результаты и обсуждение. Среди пациентов с гистологически верифицированным РМП в клеточных осадках мочи в предоперационном периоде АТ была выявлена у 31 из 32 (96,9%) пациентов, а в опухолевой ткани – у 32 из 32 (100%) пациентов. Причем средний уровень АТ в образцах ткани был в 2,2 раза выше среднего уровня АТ в клеточном осадке мочи. Также нами проанализированы 32 образца клеточного материала мочи в послеопе-

рационном периоде у пациентов с РМП, АТ в данных образцах не было зарегистрировано. Отмечено статистически значимое преобладание больных РМП при наличии в моче АТ ($p=0,001$). У 10 пациентов с гистологически верифицированным циститом в клеточных осадках мочи и ткани АТ не выявлено. В таблице отражена зависимость уровня АТ в клеточном осадке мочи и ткани от стадии РМП.

Наиболее высокий уровень АТ наблюдался при стадиях 1, 2а, Т2b. Наиболее низкий уровень АТ отмечался в 4-й стадии, что, возможно, связано со снижением уровня пролиферации клеток опухоли на поздних стадиях её развития. Исходя из полученных данных, мы видим отсутствие корреляции между уровнем АТ в клеточном материале мочи и ткани и стадией РМП в связи с недостаточным количеством образцов.

Таблица

Зависимость уровня АТ клеточного материала мочи и ткани от стадии РМП

Стадия РМП	Количество образцов	Средняя АТ в моче, %	Средняя АТ в ткани, %
T1	22	0,36 (0,05-1,3)	1,08 (0,38-4,5)
T2a	2	1,04 (0,98-1,1)	2,17 (1,98-2,37)
T2b	3	0,42 (0,25-0,63)	0,86 (0,64-1,6)
T3a	2	0,13 (0,12-0,13)	0,66 (0,43-0,89)
T3b	2	0,09 (0,09-0,09)	0,66 (0,43-0,89)
T4	1	0,07	0,25

В случае присутствия в исследуемом экстракте АТ продуктов ее деятельности после амплификации разделение методом электрофореза и окраски выглядит как горизонтальные полосы, располагающиеся на равном расстоянии друг от друга.

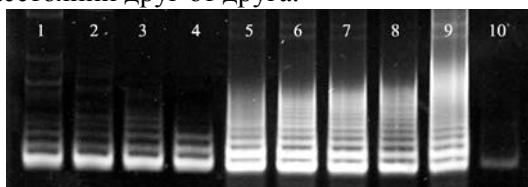


Рис. 1. АТ в клеточном осадке мочи и опухолевой ткани у пациента с РМП

На рис. 1 представлены результаты TRAP-анализа экстрактов, полученных из опухолевой ткани и клеточных осадков мочи от пациента с РМП. Линия 9 соответствует положительному контролю, проба содержит экстракт клеточной линии K562 (хронический миелоидный лейкоз человека). Линия 10 соответствует отрицательному контролю (проба не содержит исследуемого экстракта). АТ в контрольном образце условно принималась за 100%. Необходимо отметить, что АТ в операционном материале (дорожки 5-8) была соизмерима с контрольным образцом. В то же время АТ в клеточном осадке мочи (дорожки 1-4) была значительно ниже. Это говорит о том, что в клеточном осадке мочи присут-

ствует низкое количество теломеразопозитивных клеток или присутствуют ингибиторы, влияющие на эффективность ферментов TRAP-анализа.

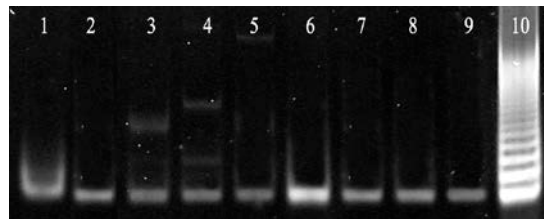


Рис. 2. АТ в клеточном материале мочи и ткани мочевого пузыря в контрольном образце (цистит)

На рис. 2 представлены результаты TRAP-анализа экстрактов, полученных из ткани мочевого пузыря и клеточных осадков мочи от пациента с циститом. Как видно из рисунка, в образцах, в которые был внесён белковый экстракт из образцов клеточного осадка мочи (дорожки 1-4) и ткани МП (дорожки 5-8), отсутствовали характерные дискретные полосы TRAP-продуктов. То есть эти результаты практически не отличались от отрицательного контроля (дорожка 9), в который вместо исследуемого экстракта был внесён 1 мкл лизирующего CHAPS-буфера, что говорит об отсутствии АТ в анализируемых образцах.

Проведенное нами исследование показало, что наличие теломеразы, возможно, напрямую связано с процессом злокачественной трансформации при РМП. АТ была обнаружена в большинстве образцов клеточного осадка мочи и опухолевой ткани, полученного от пациентов с РМП. Отсутствие АТ в одном образце от пациента с исследуемой онкопатологией, вероятнее всего, связано с инактивацией теломеразы в процессе проведения забора образца. 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. Согласно полученным данным определение АТ в клеточном осадке мочи пациентов может стать основой для разработки неинвазивного метода диагностики РМП. Наиболее высокий уровень АТ наблюдался на стадиях 1 и 2а, когда отмечается наиболее активный рост опухоли. Наиболее низкий уровень АТ отмечался на стадии 4, что, возможно, связано со снижением уровня пролиферации клеток опухоли на поздних стадиях ее развития. Таким образом, наличие АТ в клеточном осадке мочи может быть важным маркером РМП на ранних стадиях РМП.

Сведения об авторах статьи:

- Глыбочко П.В.** – профессор, член-корр. РАМН, ректор ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Адрес: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.
- Аляев Ю.Г.** – профессор, член-корр. РАМН, директор НИИ Уронефрологии и репродуктивного здоровья человека, зав. кафедрой урологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Адрес: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8.
- Винаров А.З.** – профессор кафедры урологии лечебного факультета ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Адрес: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.
- Поляковский К.А.** – к.м.н., врач-уролог ЛДО №4 УКБ№2 ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Адрес: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.
- Потолдыкова Н.В.** – аспирант кафедры урологии ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Адрес: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2. E-mail: natalis8282@mail.ru
- Глухов А.И.** – профессор кафедры биологической химии ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Адрес: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.
- Григорьева Я.Е.** – аспирант кафедры биохимии ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Адрес: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глухов, С.С. Теломераза как потенциальный опухолевый маркер в дифференциальной диагностике новообразований щитовидной железы и надпочечников /С.С. Глухов, Л.И.Харнас, Д.В.Ипполитов, И.И.Жуликов [и др.] // *Анналы хирургии.* – 2007. – №6. – С.22-25.
2. Свинаярева, Л.В. Исследование активности теломеразы при онкопатологиях желудка/Л.В. Свинаярева, А.И. Глухов, О.В. Зимник, И.И. Быков [и др.] // *Биомедицинская химия.* – 2010. – Т. 56. – Вып. 5. – С. 602-608.
3. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007;18(3):581-92.
4. Drummond M.W., Hoare S.F., Monaghan A., Graham S.M., Alcorn M.J., Keith W.N., Holyoake T.L., Dysregulated expression of the major telomerase components in leukaemic stem cells // *Leukemia* 19(3). 2005. 381-389.
5. Fletcher T.M. Telomerase: a potential therapeutic target for cancer // *Expert Opin. Ther. Targets.* 9(3). 2005. 457-469.
6. Kleideiter E., Bangerter U., Schwab M., Boukamp P., Koscielniak E., Klotz U., Greil J., Telomeres and telomerase in paediatric patients with T-cell acute lymphoblastic leukaemia (T-ALL) // *Leukemia.* 19(2). 2005. 296-298
7. Kinoshita H., Ogawa O., Kakehi Y., Mishina M., Mitsumori K., Itoh N., Yamada H., Terachi T., Yoshida O. Detection of telomerase activity in exfoliated cells in urine from patients with bladder cancer // *Journal of the National Cancer Institute.* 1997. 89. 724-730.
8. Gelmini S., Crisci A., Salvadori B., Pazzagli M., Selli C., Orlando C. Comparison of telomerase activity in bladder carcinoma and exfoliated cells collected in urine and bladder washings, using a quantitative assay // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2000. Jul. 6(7). 2771-2776.
9. M.A. Sanchini, R.Gunelli, O.Nanni et al. Relevance of urine telomerase in the diagnosis of bladder cancer. *J.A.M.A.* 2005; 294 (16): 2052-2056.
10. Glukhov A.I., Zimnik O.V., Gordeev S.A., Severin S.E. Inhibition of telomerase activity of melanoma cells in vitro by antisense oligonucleotides // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – Vol. 248(2). – P. 368-371.

УДК 616.65-006.6-089.87-036.87-073

© П.В. Глыбочко, Ю.Г. Аляев, С.К. Терновой, Н.А. Григорьев, Е.А. Безруков, С.П. Морозов, Э.Л. Лачинов, Г.А. Мартиросян, 2013

П.В. Глыбочко, Ю.Г. Аляев, С.К. Терновой, Н.А. Григорьев,
Е.А. Безруков, С.П. Морозов, Э.Л. Лачинов, Г.А. Мартиросян
**ДИАГНОСТИКА МЕСТНОГО РЕЦИДИВА РАКА ПРОСТАТЫ ПОСЛЕ
РАДИКАЛЬНОЙ ПРОСТАТЭКТОМИИ: НАТИВНАЯ ЭНДОРЕКТАЛЬНАЯ МРТ
И ЭНДОРЕКТАЛЬНАЯ МРТ С ДИНАМИЧЕСКИМ КОНТРАСТИРОВАНИЕМ**
*ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова» Минздрава России, г. Москва*

Цель данного исследования – оценить чувствительность и специфичность нативного МРТ в сравнении с МРТ с динамическим контрастированием для выявления признаков местного рецидива после радикальной простатэктомии.

Нами проведен анализ 48 пациентов, перенесших радикальную простатэктомию по поводу рака простаты в период 2008-2011 гг. Возникновение рецидива рака простаты у 27 больных заподозрено на основании прогрессивного повышения уровня ПСА выше 0,2 нг/мл. Перед трансректальной биопсией было проведено МРТ (с ректальной катушкой) в сочетании с динамическим контрастированием гадолинием. Полученные при комбинированном МР исследовании результаты расценивались как рецидив при положительном результате биопсии.

Были проанализированы результаты исследования 48 пациентов: 27 с подозрением на рецидив рака простаты; среднее значение ПСА 1,6 (0,2-7,6) нг/мл. У 21 больного не было признаков рецидива заболевания, среднее значение ПСА – менее 0,2 нг/мл. После введения гадолиния у 25 из 27 (92%) пациентов с повышенным уровнем ПСА возникало быстрое и раннее усиление сигнала. Общая чувствительность и специфичность динамического МР-исследования (ректальная катушка, напряженность поля 1,5 Т) составили 93,4%(76-98%) и 100% (84-100%) соответственно, что значительно выше, чем возможности нативного МРТ, где чувствительность составила 48% (28-69%), специфичность – 52% (30-74%). Рецидив заболевания в 23 случаях был доказан морфологически, а в остальных случаях результат оценивался по уровню снижения ПСА после проведенной Ni-Fu терапии (n=4).

При выявлении местных рецидивов после радикальной простатэктомии результаты МРТ с динамическим контрастированием показали более высокую чувствительность и специфичность по сравнению с нативным МР-исследованием.

Ключевые слова: радикальная простатэктомия, магнитно-резонансная томография, местный рецидив рака простаты.