

## ОПТИМИЗИРОВАННЫЙ МЕТОД ДЕТЕКЦИИ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ДИАГНОСТИКЕ РАКА.

Скворцов Д.А.<sup>1</sup>, Зверева М.Э.<sup>1</sup>, Донцова О.А.<sup>1</sup>,  
Павлова Л.С.<sup>2</sup>, Петренко А.А.<sup>2</sup>, Киселев Ф.Л.<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>- Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра химии природных соединений, <sup>2</sup> - НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва

Теломераза это рибонуклеопротеин, который удлиняет концы хромосом, укорачивающиеся при репликации ДНК - теломеры. Основными компонентами теломеразы являются обратная транскриптаза и матричная РНК. Теломераза активна в большинстве раков (80-90%). Активация теломеразы это потенциальный маркер для ранней диагностики рака. Некоторые раки используют альтернативные механизмы поддержания длины теломер, основанные на рекомбинации. Для разрешения вопроса об использовании теломеразы в качестве диагностического маркера, активация теломеразы должна быть предварительно изучена в опухолях на разных стадиях развития.

Опухоли шейки матки, почек и легкого принадлежат к числу распространенных онкологических заболеваний. Было проведено определение теломеразной активности в ряде поражений шейки матки, почек и легкого. Данные представлены на рисунках 1 и 2.

Серия образцов поражений шейки матки была исследована двумя модификациями ТРАП-теста. Мы сравнили эти две методики и они обладают практически одинаковой чувствительности (рис. 1а и рис. 1б). Количество и размер амплифицированных теломерных повторов (так называемая “лесенка”) варьирует для разных опухолевых образцов. Это может быть связано с разным соотношением числа опухолевых клеток к общему числу стромальных и других неопухолевых клеток в образце, который использовали для анализа.

Для учета без использования дополнительных стадий и контролей влияния содержащихся в экстракте веществ, влияющие на количественную и качественную оценку теломеразной активности, в том числе учесть возможное ингибирование ПЦР мы проводили анализ по нескольким оптимальным по концентрации белка выбранным нами точкам с добавлением 0,5-5 мкг суммарного белка в образце реакционной смеси (т.е. оптимальный диапазон концентраций 10-100 мкг/мл).

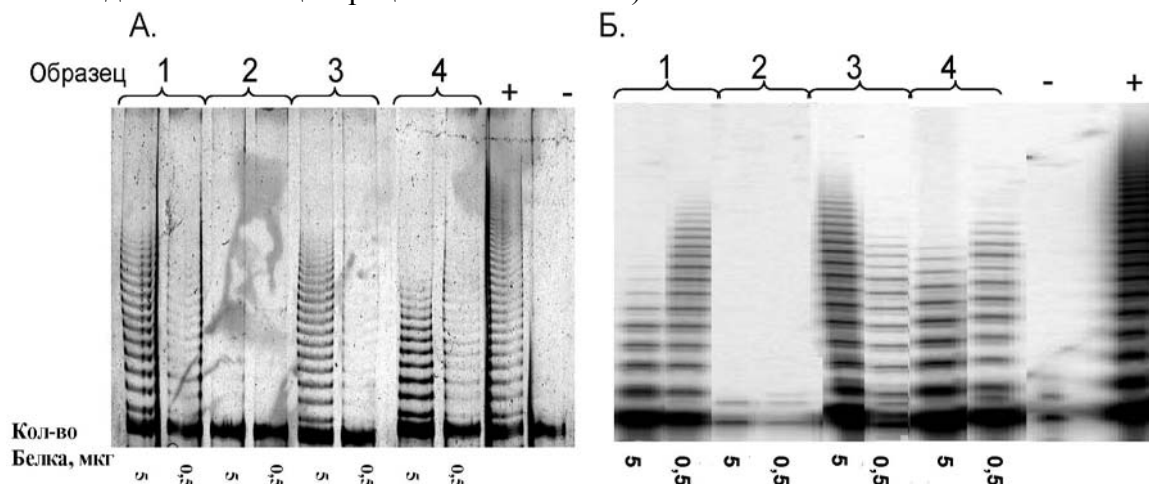


Рис.1. Сравнение серии четырех поражений шейки матки проанализированных в наших условиях на малом геле с окрашиванием Sybr I (Панель А.) и с использованием радиоактивной метки и сиквенсного геля (Панель Б.). 1-4 образцы тканей, “+” – контроль

с экстрактом клеток теломерза-положительной клеточной линии, “-“ – контроль без образца

В тех же условиях были выбраны для анализа несколько опухолей почек и легкого. Данные по тестированию теломеразной активности представлены на рисунке 2.

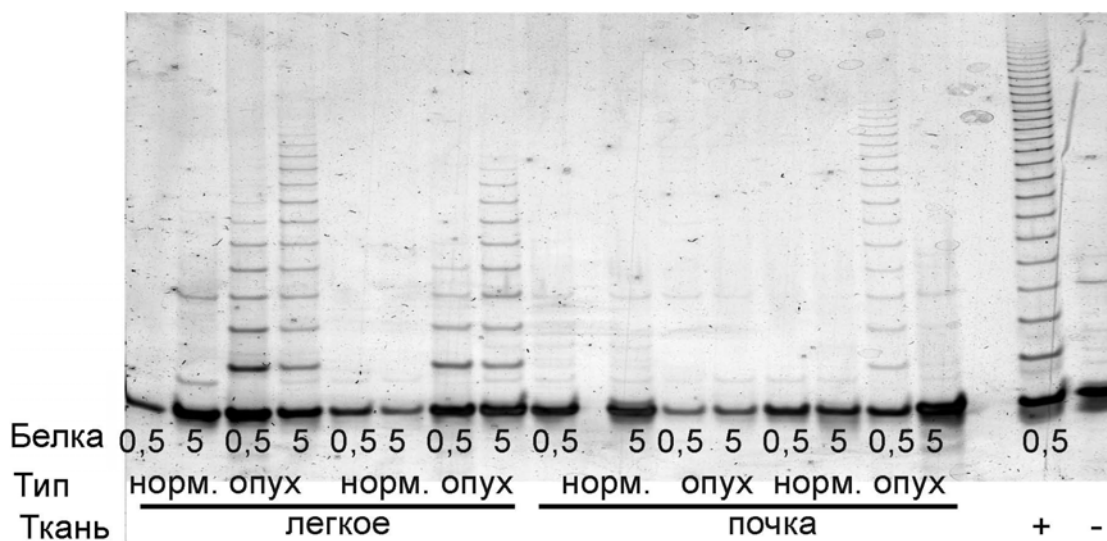


Рис.2. ТРАП-анализ образцов нормальных и опухолевых тканей легкого и почек, “+” – контроль с экстрактом клеток теломерза-положительной клеточной линии, “-“ – контроль без образца.

Для измерения теломеразной активности необходимо: во-первых, получить клеточный экстракт из опухолевого образца при этом сохранив активность теломеразы и во-вторых, провести реакцию удлинения теломерного субстрата. Получение активного клеточного экстракта из опухолевых образцов было оптимизировано нами ранее для образцов рака шейки матки. Сравнение вариантов детекции продуктов удлинения теломеразой субстрата в экстрактах опухолевых поражений было проведено на образцах операционных материалов, могущих содержать различные типы клеток и биологических примесей. Сравнение детекции с помощью окрашивания продуктов реакции флуоресцентным красителем и на основе радиоавтографии показало одинаковую чувствительность обоих подходов (рисунок 1), что свидетельствует о возможности замены радиоавтографии на более безопасную детекцию и использования полученных ранее данных с помощью радиоавтографии как статистической базы для анализа данных метода с окрашиванием Sybr Green. Наличие теломеразной активности при анализе опухолевых образцов почек и легкого, говорит о широкой применимости метода и о возможности переноса методики пробоподготовки, отработанной для одного типа опухолевых поражений к другим.