

Чумак З.В.<sup>1</sup>, Зелинский А.А.<sup>2</sup>, Шаповал Н.В.<sup>2</sup>, Артеменко В.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Одесский городской центр по проблемам климактерия, Одесса, Украина

<sup>2</sup> Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

Chumak Z.<sup>1</sup>, Zelinsky O.<sup>2</sup>, Shapoval M.<sup>2</sup>, Artyomenko V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Odessa City Centre of Climacteric Problems, Odessa, Ukraine

<sup>2</sup> Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

## О функциональной активности теломеразы в клеточных структурах эндометрия при его различных морфофункциональных состояниях

Functional activity of telomerase in endometrial cellular structures  
in its various morphological-functional states

### Резюме

Изучение активности теломеразы в образцах эндометрия 30 женщин с различными формами гиперплазии и 11 образцов с морфологически неизмененным эндометрием, соответствующего двухфазному менструальному циклу, составивших контрольную группу, показало определенную тенденцию к повышению активности теломеразы в пролиферативном типе эндометрия по отношению к секреторному, что может свидетельствовать о состоянии активации или ингибции теломеразной активности в течение пролиферативных процессов и наличии соответствующего параллелизма между теломеразной активностью и циклическими проявлениями стероидогенеза. Наличие статистически достоверной реактивации теломеразы в клетках эндометрия при атипической комплексной гиперплазии подтверждает у части эндометриальных клеток возможности восстановления длины теломер, что, в свою очередь, определяет способность к клеточному делению на фоне генетических повреждений, потенцирующих малигнизацию.

**Ключевые слова:** теломераза, теломера, гиперплазия эндометрия, неоплазия.

### Abstract

There was conducted the study of telomerase activity in 30 women with hyperplasia of different forms and 11 samples of morphologically unchanged endometrium, which corresponds to two-phase menstrual cycle, that made the control group. There was revealed a certain tendency to increase of telomerase activity in the proliferative type of endometrium in relation to the secretory one, which may indicate the state of activation or inhibition of telomerase activity during proliferative processes, and the presence of appropriate parallelism between telomerase activity and cyclic manifestations of steroidogenesis. The presence of statistically significant reactivation of telomerase in endometrial cells in atypical complex hyperplasia proves the possibility of restoration of telomere length in some endometrial cells, which determines the ability to cell division in genetic damage, potentiating malignancy.

**Keywords:** telomerase, telomeres, endometrial hyperplasia, neoplasia.

## ■ ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наблюдается стойкая тенденция к постоянному росту онкологических заболеваний на фоне уменьшения возраста их манифестации [13]. Внимание многих исследователей привлекает поиск новых доступных высокоинформативных методов ранней диагностики неопластических процессов, которая базируется на современных иммуногистохимических, иммуноцитохимических, молекулярно-генетических методах, гибридизации *in situ*, ПЦР, лазерной микродиссекции, микрочиповыми технологиями и т.д. [1], что является актуальным и может иметь существенную практическую роль в формировании как групп риска развития рака, так и определения перспективы терапевтического или хирургического метода лечения или контроля излеченности [4].

Одной из неотъемлемых черт опухолевого процесса является им-мортализация клеток (преодоление лимита Хейфлика) [4]. Фактором, которому в литературе уделяется много внимания, является активность теломеразы – фермента, достраивающего утраченные в ходе репликации, теломерные повторы [6, 9]. В клетках различного типа уровень теломеразы тщательно регулируется [3, 5], поскольку укорочение теломер и ограничение деления, в результате, приводят к сенесценсу клетки [2].

Теломераза – обратная транскриптаза (TERT), функционирующая в комплексе с теломеразной РНК (TER), содержащей матричный участок для синтеза теломерных повторов, а также с дополнительными компонентами, обеспечивающими активность фермента, с присущими им функциями, которые, до сих пор не установлены [6]. Существует мнение исследователей, что функции теломеразы не ограничены только удлинением теломер [6, 4], она принимает участие в регуляции экспрессии генов, в ответе на повреждение ДНК, уклонении от апоптоза [2, 6, 9].

В период раннего эмбриогенеза активность теломеразы присуща всем клеткам организма, по мере роста она выключается в большей доле клеток. Только клетки с повышенной пролиферативной активностью являются исключением, что позволяет им, с течением времени, не подвергаться большой изменчивости [4]. Теломеразная активность присутствует в эмбриональных, стволовых клетках, лимфоцитах, семенных, сосудистых эндотелиальных клетках, волосных фолликулах [3, 5].

Эндометрий, как ткань с присущей морфологической пластичностью, наличием пролиферативной и секреторной изменчивости и экспрессирующая теломеразу, привлекает все более пристальное внимание [1, 7, 8, 11]. Результаты работ по изучению активности теломеразы в эндометриальной ткани отличаются весьма широким мозаицизмом.

При малигнизации в 85% образцов тканей, оцененных гистологически, как раковые, наблюдается реактивация теломеразы [4], высокие уровни экспрессии теломеразы также свойственны иммортальным клеткам. В остальных случаях предполагают существование дополнительных механизмов, ограничивающих пролиферативный период жизни определенных типов клеток, не связанных с теломерами [4, 6].

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение активности теломеразы в нормальном и различных типах гиперплазированного эндометрия.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в материале соскобов эндометрия 30 женщин в возрасте от 38 до 53 лет, с патогистологически верифицированным диагнозом гиперплазия эндометрия (ГЭ), с наличием менструального цикла – его секреторной фазе. Параллельно изучено 11 образцов эндометрия, полученного в процессе подготовки к вспомогательным репродуктивным технологиям (контрольная группа). В результате дифференциации пролиферативных процессов были сформированы следующие группы: I группа – простая гиперплазия эндометрия без атипии (ПГ) – 7 образцов эндометриальной ткани; II группа – комплексная гиперплазия без атипии (КГ) – 8 образцов; III группа – простая гиперплазия с атипией (ПГА) – 8 образцов; IV группа – комплексная гиперплазия с атипией – 7 образцов. Контрольное исследование составили группы с морфологически неизмененным эндометрием – 11 образцов, из них: V группа – фаза пролиферации – 6 образцов (НП); VI группа – фаза секреции – 5 образцов (NC).

Относительную активность теломеразы определяли с использованием ПЦР в реальном времени с красителем SYBR Green (RQ-TRAP) по методике Wege и соавторов [10]. Анализ в реакционной смеси с 2 мкл экстрактов тканей, 0,1 мкг прямого праймера, 0,05 мкг обратного праймера и 12,5 мкл мастермикса LightCycler 480 SYBR Green I (Roche Applied Biosystems). Последовательности праймеров были использованы по Kim и соавторам. Для повышения точности исследования в каждом опыте мы использовали от 4 до 6 проб исследуемого клеточного материала и вычисляли их среднюю величину.

Результаты исследования обрабатывали статистически с помощью вариационной статистики с критерием Стьюдента, дисперсионного анализа по Фридману и анализа конкордантности, используя стандартные компьютерные системы.

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведения исследования для интерпретации активности теломеразы, нами был использован метод, основанный на усилении сигнала с помощью ПЦР в реальном времени, что позволило проводить количественную оценку показателей.

Результаты исследований представлены в табл. 1.

Полученные нами данные свидетельствуют об определенной тенденции к повышению активности теломеразы в пролиферативном типе эндометрия –  $1,25 \pm 0,07$  е.а., что может свидетельствовать о возможности интерпретации данных по ее активности применительно к течению пролиферативных процессов в целом. Активность теломеразы в секреторном типе эндометрия снижается и составляет –  $1,18 \pm 0,05$  е.а. Результаты нашей работы совпадают с исследованиями (Адамян Л.В. и соавторов, 2006, Rainer Lehner и соавторов, 2002), и таким образом, можно допустить определенную концепцию факта отражения активации или ингибции теломеразной активности в течение пролиферативных процессов. Вторым, не менее важным заключением, можно считать наличие соответствующего параллелизма между теломеразной активностью и циклическими проявлениями стероидогенеза соответствующего фазам менструального цикла. Представляет существенный факт установленная

Таблица 1

Активность теломеразы в клетках эндометриальной ткани е.а. ( $M \pm m$ )

Группы	Возраст	Активность теломеразы	p
I группа	45,38 $\pm$ 1,66	1,22 $\pm$ 0,10	$p_I-p_{II}>0,05$ $p_I-p_{III}>0,05$ $p_I-p_{IV}<0,05$ $p_I-p_V>0,05$ $p_I-p_{VI}>0,05$
II группа	45,25 $\pm$ 1,69	1,35 $\pm$ 0,07	$p_{II}-p_{III}>0,05$ $p_{II}-p_{IV}<0,05$ $p_{II}-p_V>0,05$ $p_{II}-p_{VI}>0,05$
III группа	46,75 $\pm$ 1,53	1,23 $\pm$ 0,08	$p_{III}-p_{IV}<0,05$ $p_{III}-p_V>0,05$ $p_{III}-p_{VI}>0,05$
IV группа	43,86 $\pm$ 1,94	1,54 $\pm$ 0,05	$p_{IV}-p_V<0,05$ $p_{IV}-p_{VI}<0,05$
V группа	38,67 $\pm$ 0,67	1,25 $\pm$ 0,07	$p_V-p_{VI}>0,05$
VI группа	38,40 $\pm$ 0,93	1,18 $\pm$ 0,05	

статистически достоверная реактивация теломеразы в клетках эндометрия при атипической комплексной гиперплазии – 1,54 $\pm$ 0,05 е.а.

Анализ активности теломеразы в тканях с простой гиперплазией – 1,22 $\pm$ 0,10 е.а., простой атипической гиперплазией – 1,23 $\pm$ 0,08 е.а. и комплексной гиперплазией без атипии – 1,35 $\pm$ 0,07 е.а. статистических достоверных различий ее активности выявлено не было. Следовательно, реактивация теломеразы в эндометриальных клетках, может подтверждать увеличение длины теломер на данном пролиферативном этапе, и таким образом повышать способность к клеточному делению, с другой стороны подтверждать способность теломеразы к контролю клеточного деления в эндометриальной ткани.

Для получения полной статистической характеристики распределения и визуальной оценки результатов, мы использовали диаграмму размахов (рис. 1).

Как следует из диаграммы, самый минимальный интерквартильный размах у данных получен по комплексной атипической гиперплазии, это свидетельствует о меньшей дисперсии показателя и большей однородности группы в отношении единицы наблюдения. При сопоставлении показателей в зависимости от клинической формы заболевания установлено, что дисперсионный анализ по Фридману подтверждает достоверность наблюдаемых различий ANOVA Chi Sqr. ( $N=5$ ,  $df=5$ )– 11.50289,  $p=04227$  при коэффициенте конкордантности равном 0,46 и среднем ранге 0,33.

Можно предположить, что при атипической комплексной гиперплазии часть эндометриальных клеток путем реактивации теломеразы способствует восстановлению длины теломер, что, в свою очередь, определяет возможность «продления жизни» на фоне установленных ранее дополнительных генетических повреждений, которые могут потенцировать малигнизацию.

Данные, представленные в проведенном исследовании, совпадают с результатами работ (Dong Y. и соавторов, 2004), определившими

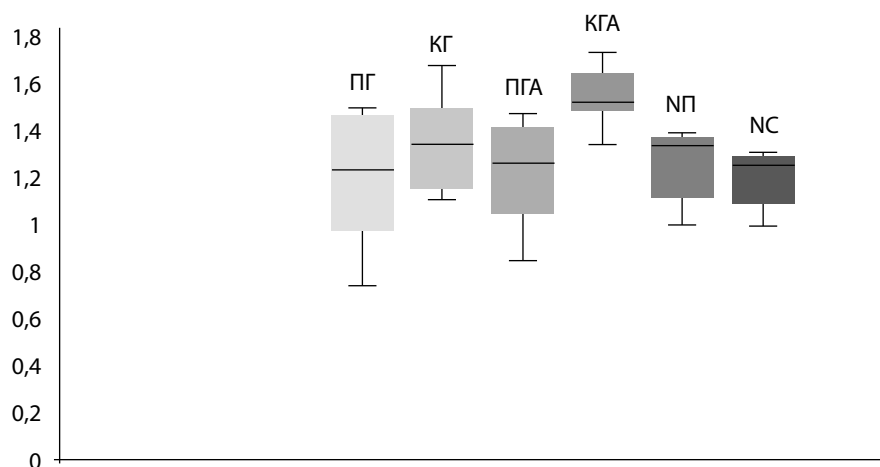


Рис. 1. Распределение показателей активности теломеразы в группах обследования (е.а.)

повышение сигнала мРНК hTERT при раке эндометрия и атипической гиперплазии. С другой стороны, в определенной степени, наши данные противоречат результатам отдельных исследователей, которыми выявлено повышение экспрессии гена hTERT при раке эндометрия и отсутствии изменений при простой и атипической гиперплазии эндометрия (Mazurek с соавторами, 2001). Возможно указанные различия можно объяснить выявлением нами повышения активности теломеразы лишь при комплексной атипической гиперплазии эндометрия, тогда как при простой атипической ГЭ – отличий не наблюдалось.

Согласно данным опубликованных работ, аналогичные результаты были получены и при изучении теломеразной активности при аденокарциноме, пролиферативном, секреторном и атрофическом эндометрии. Авторами также отмечена незначительная теломеразная активность в фазу пролиферации и ее возрастание при карциноме [12].

Противоречивость полученных результатов в нормальном и гиперпластическом эндометрии может быть вызвана различием в применяемых методиках. Детализация механизмов активации теломеразы затруднена, поскольку основные процессы изучаются в основном на клеточных линиях, что затрудняет трактовку механизмов, происходящих *in vivo* [3, 6].

## ■ ВЫВОДЫ

Установление статистически достоверного параллелизма между процессами реактивации теломеразы в клетках эндометрия при комплексной атипической гиперплазии и существование у 85% опухолей теломеразной активности определяет констатацию факта ее активности как раннего маркера неоплазии и повышения ее уровня при комплексной атипической гиперплазии эндометрия, что свидетельствует об усилении пролиферативной способности клеток, которую можно рассматривать как предиктор онкологического прогноза. Маркер

активности теломеразы следует учитывать при выборе тактики и объема хирургического лечения, а динамику ее активности для оценки эффективности консервативной терапии.

Перспективы дальнейших разработок связаны с развитием данной проблемы, с проведением сравнительных исследований по диагностической точности различных методов, целью которых является конкретизация использования их в клинической практике, а также поиск комплекса маркеров, определяющих риск малигнизации.

## ■ ЛИТЕРАТУРА

1. Adamyan L.V., Gusaeva H.Z., Marchenko I.A. (2009) Gen kataliticheskoy subedinice telomerase (Htert) i sochetaniye sabolevaniya matki [Human telomerase reverse transcriptase (Htert) and associated diseases of uterus]. *Westnik WolGMU*, vol. 1, no 29, pp. 84–87.
2. Berestyanaya A.N., Grodzinsky D.M. (2012) Rol' telomere v processe kletchnogo starenia [The role of telomere in the senescence of cell]. *Sci. Bull. Uzhgorod Univ. (Ser. Biol)*, vol. 33, pp. 5–15.
3. Zvereva M.I., Shcherbakova D.M., Dontsova O.A. (2010) Telomerasa: struktura, funktsii i puti regulatsii aktivnosti [Telomerase: Structure, Functions, and Activity Regulation]. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*, vol. 50, pp. 155–202.
4. Yegorov Y.E. (2010) Telomwri, telomerase, kancerogenesis i mera sdorovya [Telomeres, telomerase, oncogenesis and measure of health]. *Klinicheskaya onkohematologiya*, vol. 3, no 2, pp. 184–197.
5. Skvortsov D.A., Zvereva M.I., Shpanchenko O.V. (2011) Telomerasa: metody opredeleniya aktivnosti [Telomerase: Methods for determining the activity]. *Acta Nature*, vol. 1, no 4(8), pp. 51–72.
6. Rubtsova M.P., Vasilkova D.P., Malyavko A.N. (2012) Funktsii telomerazy: udlineniye telomer i ne tolko [The functions of telomerase: telomere elongation and not only] *Acta Nature*, vol. 4, no 2(12), pp. 44–61.
7. Esra A.Akbay, Cristina M. Contreras, Samanthi A. Perera (2008) Differential Roles of Telomere Attrition in Type I and II Endometrial Carcinogenesis. *The American Journal of Pathology*, vol. 173, no 2, pp. 536–544.
8. Yvette P. Geels, Louis J.M. van der Putten. (2015) Immunohistochemical and genetic profile of endometrioid endometrial carcinoma arising from atrophic endometrium. *Gynecologic Oncology*, no 137(2), March, pp. 2–7.
9. Pat. Monaghan (2014) Organismal stress, telomeres and life histories. *The Journal of Experimental Biology*, no 217, pp. 57–66.
10. Henning Wege, Michael S. Chui, Hai T. Le. (2003) SYBR Green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity. *Nucleic Acids Res*, vol. 31(2), Jan 15, pp. 31–32.
11. Weimin Kong, Nenan Lv, Weiya Z. (2015) Knockdown of hTERT end Treatment with BIBR1532 Inhibit Cell Proliferation and Invasion in Endometrial Cancer Cells. *J Cancer*, vol. 6(12), pp. 1337–1345.
12. Rainer Lehner, Takayuki Enomoto, James A. (2002). Quantitative Analysis of Telomerase hTERT mRNA and Telomerase Activity in Endometrioid Adenocarcinoma and in Normal Endometrium. *Gynecologic Oncology*, no 84, pp. 120–125.
13. World Health Organization. Cancer. Fact sheet. Updated February. 2017.

Поступила / Received: 06.02.2017

Контакты / Contacts: chumak-doc@rambler.ru