

# Ocena przydatności metody TRAP do pomiaru aktywności telomerazy w nowotworach skóry psów

MAGDALENA ŻMUDZKA, JACEK MICUŃ, ROMAN LECHOWSKI

Zakład Chorób Wewnętrznych Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW,  
ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

Żmudzka M., Micuń J., Lechowski R.

## Evaluating TRAP assay for telomerase activity measurement in canine skin neoplasm's

### Summary

The aim of the study was to evaluate the TRAP assay method of measuring telomerase activity in canine skin neoplasms. Telomerase activity was measured in 57 samples of tumor tissues from operated dogs. The samples were also subjected to histopathology investigations. Telomerase activity was measured using the Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA diagnostic kit as well as ROCHE – photometric enzyme immunoassay for quantitative determination of telomerase activity, utilizing the telomere repeat amplification protocol (TRAP).

The repetition, sensitivity and specificity of telomerase activity measurements were determined. TRAP assay performed in dogs has high repetition rate within high activity, and lower within small activity. This method is 100% sensitive and 34% specific.

**Keywords:** telomerase, cancer, dog

Nowotwory stanowią jeden z najpoważniejszych problemów medycyny ludzkiej, a w ostatnich latach, w związku ze stale podnoszącą się jakością usług weterynaryjnych, również weterynaryjnej (17, 26). U ludzi najliczniejszą grupą są nowotwory skóry, stanowiące około 30% wszystkich zmian rozrostowych i w związku z tym stanowią przedmiot zainteresowania wielu badaczy w różnych aspektach (8, 14. cyt. 17). W literaturze przeważa pogląd, że również nowotwory skóry u psów stanowią również około 1/3 wszystkich nowotworów (17, 26). Rozpoznanie nowotworów skóry naraża często wielu problemów. Mimo że anatomiczna lokalizacja pozwala na wnikliwe badanie kliniczne, trzeba jednak brać pod uwagę fakt, iż wiele innych chorób skóry może wywoływać podobne zmiany. Metodami wspomagającymi ocenę histopatologiczną w badaniu zmian nowotworowych są badania ich markerów. Mogą nimi być różne składniki komórki np.: białka lub glikoproteiny błony komórkowej, cytoplazmy i jądra komórkowego.

Przedmiotem szczególnego zainteresowania wśród markerów nowotworowych jest telomeraza – enzym odpowiedzialny za wydłużanie telomerów (27) – wyspecjalizowanych kompleksów, zbudowanych z kwasu dezoksyrybonukleinowego i białek towarzyszących, chroniących końce chromosomów (1, 5). Najpowszechniej stosowana do oceny ekspresji telomerazy metoda wykorzystuje aktywność telomerazy jako odwrotnej transkryptazy i jest oparta na wykrywaniu jej

produktów – fragmentów DNA o charakterystycznej sekwencji. Metoda została opracowana przez Kima i wsp. (15) i opublikowana pod nazwą TRAP (telomeric repeat amplification protocol) w 1994 r. Od kilku lat dostępne są także gotowe komercyjne zestawy oparte na metodzie TRAP. Materiałem do badania aktywności telomerazy są wycinki tkanek uzyskane metodą biopsji, śródoperacyjnie lub podczas sekcji wykonanej natychmiast po śmierci oraz płyny zawierające komórki, np. mocz i wypluczyny z pęcherza moczowego (9). TRAP jest bardzo czułą metodą, pozwalającą na badanie próbek zawierających tylko kilka komórek (28). Od momentu opracowania i opublikowania metody TRAP wyraźnie zaznacza się w piśmiennictwie spore zainteresowanie telomerazą (4, 11).

Opublikowano dotychczas szereg artykułów dotyczących pomiarów aktywności telomerazy w tkankach różnych typów nowotworów u ludzi (12, 20, 29). W porównaniu z pracami dotyczącymi aktywności telomerazy u ludzi – niewiele jest doniesień na temat tego zagadnienia u psów. Żadne z opublikowanych dotychczas badań u psów nie miały charakteru metodycznego i tym samym jej oceny w wybranych zmianach nowotworowych skóry u psów.

Celem niniejszych badań było określenie przydatności metody TRAP do pomiaru aktywności telomerazy w wycinkach zdrowej i nowotworowo zmienionej skóry psów.

## Materiał i metody

Materiałem do badań było 57 wycinków odgraniczonych zmian skórnych stwierdzonych u psów – pacjentów ambulatoryjnych, usuniętych chirurgicznie za zgodą właścicieli. Próbkę do badań pobierane były natychmiast po wycięciu zmiany z zachowaniem zasad aseptyki i dzielone na dwie części. Jeden fragment umieszczany był w buforowanej formalinie w celu późniejszego badania histopatologicznego przeprowadzonego w Zakładzie Patologii Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, drugi, wielkości ziarna owsa, umieszczany był w jałowej próbówce okrągłodennej, natychmiast zamrażany w ciekłym azocie ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

Każdą próbkę poddano badaniu w kierunku stężenia białka standardową metodą z użyciem odczynnika Mikroproteina, firmy Pointe Scientific o nr. kat. P7582-120.

Pomiary aktywności telomerazy dokonywano testem Telo TAGGG telomerase PCR ELISA plus, firmy Roche. Zasada testu wykorzystuje schemat TRAP opracowany przez Kima i wsp. (15).

Badania obejmowały ocenę powtarzalności, reprezentatywności, czułości i swoistości diagnostycznej oznaczeń telomerazy w skórze psów.

Badanie powtarzalności oznaczania aktywności telomerazy w tkance. W celu ustalenia powtarzalności wyników oznaczeń w próbkach o zróżnicowanej aktywności telomerazy przeprowadzono dziesięciokrotne oznaczenie aktywności enzymu w każdej z czterech wybranych próbek. Do badań wybrano próbki o aktywnościach telomerazy: 581, 223, 47, 5 U/g białka.

Badanie reprezentatywności pojedynczego oznaczenia. Do badań reprezentatywności wykorzystano te same próbki, które służyły w ocenie powtarzalności. W tym celu obliczono różnice pomiędzy wielkością wariancji dla par grup oraz oceniono jednoczesny brak różnic między średnimi tych grup. Wyniki opracowano statystycznie testem analizy wariancji (23).

Badanie czułości diagnostycznej oznaczania aktywności telomerazy w tkance. Czułość diagnostyczną metody określono jako odsetek chorych w grupie badanej, którzy za pomocą zastosowanej metody pomiaru aktywności telomerazy zostali poprawnie zidentyfikowani jako chorzy (7). Parametr ten oceniano na podstawie stosunku wyników prawdziwie dodatnich PD (podwyższona aktywność telomerazy w tkance nowotworowej) do sumy wyników prawdziwie dodatnich i fałszywie ujemnych FU (brak aktywności telomerazy w tkance nowotworowej), uzyskane wartości obliczono wg wzoru I wyrażono w procentach (7):

$$\text{Czułość (\%)} = \text{PD}/(\text{PD} + \text{FU}) \times 100\%$$

PD – liczba wyników prawdziwie dodatnich,

FU – liczba wyników fałszywie ujemnych.

Badanie swoistości diagnostycznej oznaczania telomerazy w tkance. Swoistość diagnostyczną metody określono jako odsetek pacjentów zdrowych w grupie badanej, u których za pomocą metody oznaczania aktywności telomerazy wykluczono chorobę (7). Swoistość diagnostyczną oceniano na podstawie stosunku wyników prawdziwie ujemnych PU (brak aktywności telomerazy w tkance histopatologicznie niezmiennionej) do sumy wyników prawdziwie ujemnych i fałszywie dodatnich FD (podwyższona aktyw-

ność telomerazy w tkance histopatologicznie niezmiennionej), uzyskane wartości obliczono wg wzoru i wyrażono w procentach (7):

$$\text{Swoistość (\%)} = \text{PU}/(\text{PU} + \text{FD}) \times 100\%$$

PU – liczba wyników prawdziwie ujemnych,

FD – liczba wyników fałszywie dodatnich.

W analizie statystycznej zastosowano test Levene'a jednorodności wariancji dla prób niezależnych, test Kruskala-Wallisa, test Manna-Whitneya, test Spearmana, test Chi-kwadrat oraz dokładny test Fishera.

## Wyniki i omówienie

Wyniki badania powtarzalności oznaczeń aktywności telomerazy w badanej próbce przedstawiono w tab. 1. Uzyskane wartości współczynników zmienności wskazują, że metoda jest wysoce powtarzalna w zakresie wysokich wartości aktywności telomerazy, co kwalifikuje ją jako przydatną do oceny aktywności enzymu w zmianach nowotworowych skóry psów.

W celu potwierdzenia powtarzalności metody postanowiono obliczyć różnice pomiędzy wielkością wariancji dla par grup oraz ocenić jednoczesny brak różnic między średnimi tych grup. Jedynie w przypadku zapaleń stwierdzono istotną różnicę pomiędzy średnimi i bardzo dużą różnicę w wielkości odchylenia standardowego. Pozwala to wnioskować, że metoda jest przydatna do badania zmian rozrostowych. Brak różnicy między wariancjami w przypadku guzów podstawnkomórkowych może wynikać z małej liczebności grupy, lecz również w tym przypadku można uznać metodę za przydatną, ponieważ wartość istotności zbliżała się do granicy wartości pożądanej.

W badaniach reprezentatywności pojedynczego oznaczenia (tab. 2) stwierdzono, że jedynie w przypadku zapaleń występuje istotna różnica pomiędzy średnimi wartościami w grupie i bardzo wysoka różnica w wartości odchylenia standardowego. Brak róż-

**Tab. 1. Wyniki badania powtarzalności i współczynniki zmienności pomiarów aktywności telomerazy**

| Numer badania              | 1 próbka | 2 próbka | 3 próbka | 4 próbka |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|
| 1                          | 581      | 223      | 47       | 5        |
| 2                          | 562      | 212      | 45       | 4        |
| 3                          | 575      | 231      | 49       | 5        |
| 4                          | 600      | 246      | 47       | 3        |
| 5                          | 583      | 211      | 48       | 6        |
| 6                          | 585      | 211      | 45       | 5        |
| 7                          | 578      | 195      | 51       | 5        |
| 8                          | 592      | 198      | 50       | 3        |
| 9                          | 581      | 201      | 49       | 6        |
| 10                         | 597      | 207      | 47       | 5        |
| Średnia arytmetyczna       | 583,4    | 213,5    | 47,8     | 4,7      |
| SD                         | ± 11,09  | ± 15,81  | ± 1,99   | ± 1,06   |
| Współczynnik zmienności V% | 1,9      | 7,4      | 4,1      | 22       |

Tab. 2. Różnice pomiędzy średnimi aktywności telomerazy w badanych grupach zmian skórnych

| Grupa zmian skórnych                              | n  | Średnia arytmetyczna | Odchylenie standardowe | Istotność wariacji | Istotność różnic pomiędzy średnimi |
|---|----|----------------------|------------------------|--------------------|------------------------------------|
| Pomiary wybranej próbki czerniaka                 | 10 | 583,40               | 11,088                 | 0,000**            | 0,238                              |
| Czerniaki   | 9  | 536,00               | 111,125                |                    |                                    |
| Pomiary wybranej próbki guza podstawnokomórkowego | 10 | 213,50               | 15,806                 | 0,086              | 0,234                              |
| Guzy podstawnokomórkowe                           | 5  | 192,60               | 49,783                 |                    |                                    |
| Pomiary wybranej próbki tłuszczaka                | 10 | 4,70                 | 1,059                  | 0,015*             | 0,458                              |
| Tłuszczaki  | 7  | 7,29                 | 8,597                  |                    |                                    |
| Pomiary wybranej próbki zapalenia                 | 10 | 47,80                | 1,989                  | 0,001**            | 0,038*                             |
| Zapalenia   | 7  | 25,57                | 22,112                 |                    |                                    |

Objaśnienie: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; ni – nieistotna

nicy między wariacjami w przypadku guzów podstawnokomórkowych może wynikać z małej liczebności grupy, lecz również w tym przypadku można uznać metodę za przydatną, gdyż wartość istotności zbliżała się do wartości pożądanej.

Czułość diagnostyczna metody pomiaru aktywności telomerazy w tkance guzów złośliwych wyniosła 100%. Wynikało to z faktu, iż wszystkie badane nowotwory złośliwe wykazywały aktywność telomerazy w tkance. W przypadku tłuszczaka, będącego nowotworem niezłośliwym, czułość diagnostyczna wyniosła 71,4%, co było związane z brakiem aktywności telomerazy w dwóch jego przypadkach.

Swoistość diagnostyczna pomiaru aktywności telomerazy w przypadku nowotworów złośliwych wyniosła 34%. Było to związane z występowaniem aktywności telomerazy w zmianach niezłośliwych (zapalenie) i 3 przypadkach skóry zdrowej.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że czułość metody wyniosła 100% w przypadku nowotworów złośliwych. W opinii wielu autorów (13, 22, 24, 29), wyniki pomiaru aktywności telomerazy w guzach skóry u ludzi są podobne, jednak różnią się w ocenie czułości metody. Istnieją doniesienia, że czułość metody uzależniona jest od rodzaju badanej tkanki i tak np. w odniesieniu do guzów sutka wynosi około 40%, podczas gdy w nowotworach jajników sięga 100% (19). Chen i wsp. (6), którzy we wszystkich przypadkach raków płaskonabłonkowych rogowaciejących i raków podstawnokomórkowych wykazali u ludzi aktywność telomerazy, czułość metody określili na 100%. Villa i wsp. (31) określili czułość metody w przypadku czerniaków złośliwych u ludzi na 84,6%, zaś Miracco i wsp. (18) również u ludzi, wykazali aktywność telomerazy we wszystkich pierwotnych guzach skóry i tym samym wykazali 100% czułość metody. Spangler i wsp. (28) badając czułość metody oznaczania telomerazy w płynie wysiękowym z opłucnej u psów i kotów z nowotworami stwierdzili, że badanie to nie przewyższa czułości badania cytologicznego (czułość 50%) i jest mniej swoiste (83%). Na tej

podstawie autorzy wysunęli wniosek, że u psów pomiar aktywności telomerazy w płynach ustrojowych, jako jedyny test w ocenie zmian nowotworowych, jest mało przydatny i nie pozwala na jednoznaczne postawienie rozpoznania. Biller i wsp. (3) wykazali wysoką korelację między aktywnością telomerazy w tkance a stopniem złośliwości guza. Cytowani autorzy obliczyli, że zastosowana metoda pomiaru aktywności telomerazy cechowała się 92% czułością. Dotyczyło to zarówno guzów skóry, jak i innych zmian nowotworowych zlokalizowanych w różnych narządach. Próbki tkanki wątrobowej nie wykazującej zmian nowotworowych, a wycinki nowotworu łagodnego – wątrobiaka (*hepatoma*) nie wykazywały aktywności enzymu, podczas gdy w wycinkach z raka z komórek wątroby stwierdzano jej wysoką aktywność (3).

Swoistość metody w badaniach własnych wyniosła 34%. Są to wyniki odmienne od uzyskanych przez Kima i wsp. (15). Autorzy ci wykazali aktywność telomerazy w 90% komórek nowotworowych oraz w 98% komórek macierzystych. Swoistość opracowanej metody cytowani autorzy określili na 100%, nie wykazując w żadnej z próbek pobranych z niezmiennych klinicznie tkanek człowieka aktywności enzymu. W późniejszych badaniach innych naukowców swoistość była już oceniana wyraźnie niżej, w granicach 80-90% (3, 13, 24, 30). Mogło to wynikać z udoskonalenia metody wykrywania aktywności telomerazy w tkankach, co spowodowało obniżenie progu wykrywalności tego enzymu.

W badaniach własnych niska swoistość wynikała z obecności telomerazy w zmianach nienowotworowych oraz skórze zdrowej. W 3 z 9 przypadków skóry klinicznie zdrowej wykazano aktywność telomerazy powyżej zera, jednak wartości te były bardzo niskie i pozostawały daleko poza zakresem wartości stwierdzanych w złośliwych zmianach nowotworowych. Obecność telomerazy w skórze zdrowej mogła być związana z obecnością komórek macierzystych lub, zachowujących się w zakresie aktywności telomerazy podobnie, komórek mieszków włosowych (25).

Analiza czułości i swoistości wykazała, że zastosowana metoda pomiaru aktywności telomerazy w tkance objętej procesem nowotworowym jest bardzo czułym testem, co jest zgodne z doniesieniami innych autorów (3, 15), ale o niezbyt wysokiej swoistości.

Powtarzalność metody poddano ocenie, przeprowadzając po 10 pomiarów aktywności telomerazy w jednej próbce i porównując statystycznie z pomiarami aktywności telomerazy w grupie nowotworów, z któ-

rych wybrano daną próbkę. Do tego badania wybrano po jednej próbce raka podstawnokomórkowego, czerniaka, tłuszczaka i zapalenia wykazujących zróżnicowane wartości aktywności telomerazy. Rozrzut wartości był najniższy w przypadku czerniaka reprezentującego najwyższe wartości ( $V = 1,9\%$ ), zaś najwyższy w przypadku zapalenia, będącego przykładem wartości niskich ( $V = 22\%$ ). Taki wynik potwierdza większą przydatność metody do analizowania wartości dotyczących zmian złośliwych. Porównanie między wariancjami w każdej grupie 10 pomiarów i w grupach odpowiadających im nowotworów oraz porównanie średnich wartości w tych grupach wskazuje, że metoda TRAP jest przydatna do badania aktywności telomerazy w wycinkach tkanek zmienionych nowotworowo. Potwierdzają to wyniki autorów wykorzystujących już wcześniej tę metodę u ludzi (2, 10, 16, 21).

Metoda TRAP jest powtarzalnym i reprezentatywnym badaniem w przypadku złośliwych guzów skóry u psów. Charakteryzuje się także wysoką czułością i niewielką swoistością diagnostyczną.

### Piśmiennictwo

- Ahmed A., Tollefsbol T.: Telomeres and telomerase: basic science implications for aging. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2001, 49, 1105-1109.
- Argyle D. J., McKeivitt T. P., Paoloni M., Long S., Gault E. A., Nasir L.: Targeting telomerase in canine cancer. *Genes, Dogs, and Cancer: 3<sup>rd</sup> Annual Canine Cancer Conf. California 2003*, s. 55-59.
- Biller B., Kitchell B.: Evaluation of an assay for detecting telomerase activity in neoplastic tissues of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1998, 59, 234-237.
- Blasco M. A.: Mouse models to study the role of telomeres in cancer, aging and DNA repair. *Europ. J. Cancer* 2000, 38, 2222-2228.
- Chan S., Blackburn E.: Telomeres and telomerase. *Phil. Trans. R. Soc Lond. B.* 2004, 359, 109-121.
- Chen J., Greider C.: Telomerase RNA structure and function: implications for dyskeratosis congenital. *Trends Biochem. Sci.* 2004, 29, 183-192.
- Dembińska-Kieć A., Naskalski J.: Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. *Volume 2*, Wrocław 1998, s. 73-79.
- Diepgen T. L., Mahler V.: The epidemiology of skin cancer. *Bri. J. Dermatol.* 2002, 146, 1-6.
- Fedrige R., Gunelli R., Nanni O., Bacci F., Amadori D., Calistri D.: Telomerase activity detected by quantitative assay in bladder carcinoma and exfoliated cells in urine. *Neoplasia* 2001, 3, 446-450.
- Hahn W. C., Meyerson M.: Telomerase activation, cellular immortalisation and cancer. *Ann Med.* 2001, 33, 123-129.
- Harley C. B., Villeponteau B.: Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr. Biol.* 1998, 8, 178-181.
- Hiyama E., Gollahon L., Kataoka T.: Telomerase activity in human breast tumors. *J. Natl Cancer* 1996, 88, 1161-1172.
- Hu S., Chan H.: Telomerase expression in benign and malignant skin neoplasm: comparison of three major subunits. *J. Formos. Med. Assoc.* 2002, 101, 593-597.
- Katalinic A., Kunze U., Schäfer T.: Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br. J. Dermatol.* 2003, 149, 1200-1206.
- Kim N. W., Piatyszek M. A., Prowse K. R., Harley C. B., West M. D., Ho P. L., Coviello G. M., Wright W. E., Weinrich S. L., Shay J. W.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994, 266, 2011-2015.
- Kitchell B., Biller B. J., Cadile C. D., Balkin R. G.: Telomerase and canine cancer; genes, dogs, and cancer: Emerging concepts in molecular diagnosis and therapy. *Conf. California 2002*, s. 267-280.
- Malicka E., Piusiński W., Senddecka H., Bielecki W., Osińska B., Lenartowicz-Kubrat Z.: Nowotwory psów stwierdzone w badaniach anatomopatologicznych w latach 1985-1993. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 103-106.
- Miracco C.: Detection of telomerase activity and correlation with mitotic and apoptotic indices, Ki67 and expression of cyclin D1 and A in cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer* 2000, 88, 411-416.
- Murakami Y., Teteyama S., Rungsipat A., Uchida K., Yamaguchi R.: Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and P53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. *J. Vet. Med. Sci.* 2000, 62, 743-750.
- Nasir L., Devlin T., McKeivitt T., Rutteman G., Argyle D.: Telomere lengths and telomerase activity in dog tissues: a potential model to study human telomere and telomerase biology. *Neoplasia* 2001, 3, 351-359.
- Novak K. D.: Telomeres and telomerases in cancer. *AACR Special Conf. San Francisco, 7-11.12.2002*, s. 32-39.
- Ogoshi M., Le T., Shay J. W., Taylor R. S.: In situ hybridization analysis of the expression of human telomerase RNA in normal and pathologic conditions of the skin. *J. Inv. Derm.* 1998, 110, 818-823.
- Olech W., Wieczorek M.: Zastosowanie metod statystyki w doświadczeniach zootechnicznych. *Wyd. SGGW, Warszawa 2002*, s. 47.
- Parris C., Jezzard S.: Telomerase activity in melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br. J. Cancer* 1999, 79, 47-53.
- Ramirez R.: Telomerase activity concentrates in the mitotically active segments of human hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* 1997, 108, 113-117.
- Senddecka H., Malicka E., Piusiński W., Bielecki W., Krawiec M., Osińska B., Sobczak M.: Nowotwory u zwierząt w badaniach diagnostycznych Zakładu Anatomii Patologicznej Wydziału Weterynaryjnego w Warszawie w latach 1987-1996. *I Konf. Nauk.: Onkologia weterynaryjna. Postępy w diagnostyce i terapii. Olsztyn 4-5.09.1997*, s. 67-70.
- Shay J. W., Zou Y., Hiyama E., Wright W. E.: Telomerase and cancer. *Hum. Mol. Genet.* 2001, 10, 677-685.
- Spangler E., Rogers K., Thomas J., Pusteyovsky D., Boyd S., Shippen D.: Telomerase enzyme activity as a diagnostic tool to distinguish effusions of malignant and benign origin. *J. Vet. Med.* 2000, 14, 146-150.
- Sulaimon S., Kitchell B., Ehrhart E.: Immunohistochemical detection of melanoma-specific antigens in spontaneous canine melanoma. *J. Comp. Pathol.* 2002, 127, 162-168.
- Ueda M., Bito T.: Telomerase activity in human skin and skin tumor. *J. Dermatol. Sci.* 2000, 13, 345-349.
- Villa R.: Telomerase activity by transcription and alternative splicing of telomerase reverse transcriptase in human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 2001, 116, 867-873.

Adres autora: dr Magdalena Żmudzka, ul. Niemirowska 1 m. 27, 02-921 Warszawa; e-mail: madzia.zuk@wp.pl