

А.В. Семёнов, И.Е. Воробцова

Частота хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови больных с солидными опухолями

ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России, Санкт-Петербург

Выполнено исследование по сравнению частоты спонтанных хромосомных aberrаций (ХА) в лимфоцитах периферической крови между группой онкологических пациентов с различными видами солидных опухолей и группой здоровых в онкологическом плане контрольных лиц того же возраста. Установлена достоверно повышенная средняя частота ХА у онкологических больных. Анализ группы больных выявил её неоднородность: у большинства пациентов индивидуальная частота ХА достоверно превышала среднюю частоту ХА в контрольной группе, у некоторых – не отличалась от таковой. Первые были охарактеризованы как группа с «генерализованной» нестабильностью генома. Эта группа отличалась и повышенной радиочувствительностью хромосом лимфоцитов при их облучении *in vivo*.

Ключевые слова: хромосомные aberrации, онкологические пациенты, нестабильность генома

В ряде популяционных исследований показано, что у лиц с высоким уровнем ХА в лимфоцитах периферической крови повышен риск возникновения опухолей различной локализации по сравнению с лицами, характеризующимися низкой частотой ХА [14,20].

Повышенная частота ХА обнаруживается также в лимфоцитах людей с наследственными синдромами генетической нестабильности (синдром Блума, анемия Фанкони, атаксия телангиэктазия) [26], которые характеризуются и высокой частотой возникновения злокачественных опухолей. В последнее время генетическая нестабильность рассматривается в качестве важнейшего фундаментального свойства раковых клеток [4,5]. Она проявляется в виде множественных точковых мутаций, структурных и числовых нарушений кариотипа (хромосомные aberrации, микроядра, анеуплоидия и т.п.), регистрируемых в клетках опухолей. Это наглядно подтверждено результатами молекулярно-генетических и цитогенетических исследований клеток крови и костного мозга при системных гемобластозах. Так, в работах [13,21] продемон-

стрирована повышенная в сравнении с нормой частота структурных нарушений хромосом в лимфоцитах пациентов с различными формами лейкозов до начала их лечения.

Данные литературы о стабильности генома, оцениваемой по частоте спонтанных ХА в лимфоцитах у пациентов с солидными опухолями многочисленны и достаточно противоречивы. Об увеличении количества ХА сообщалось рядом авторов [12,28,29], обнаруживших достоверное увеличение частоты дицентриков, двойных, одиночных фрагментов и микроядер в группе пациентов со злокачественными новообразованиями различной локализации (молочная железа, шейка матки, пищевод, прямая кишка, щитовидная железа и др.). При исследовании больных раком лёгкого и здоровых жителей Кемерово был зафиксирован повышенный уровень ХА (преимущественно за счёт одиночных фрагментов) в лимфоцитах крови больных по сравнению со здоровыми [8]. В работе [6] было установлено статистически значимое превышение частоты ХА в группе онкологических больных по сравнению с группой здоровых работников Сибирского химического комбината. В других работах [19,24] также отмечалась более высокая частота спонтанных ХА в лимфоцитах онкологических больных в сравнении с контрольными лицами того же возраста, однако различие это было статистически недостоверным.

С другой стороны, опубликован ряд исследований [7,18,22], где не было обнаружено увеличения частоты ХА в лимфоцитах онкологических больных до начала их лечения.

Возможно, расхождения в оценке спонтанной частоты ХА в лимфоцитах у пациентов с солидными опухолями связаны с разным представлением в изученных выборках больных с высокой и низкой степенью злокачественности новообразований. Как было показано [11], в группе пациентов с раком мочевого пузыря частота ХА в лимфоцитах оказалась достоверно повышенной по сравнению с контролем. При этом у пациентов с высокой степенью злокачественности опухолей (HG) она была большей, чем у пациентов с низкой степенью злокачественности (LG), хотя эти различия не были статистически достоверными.

Во всех перечисленных работах сравнение больных и контрольных доноров проводилось по среднегрупповым значениям частот ХА. При этом количество проанализированных клеток для каждого пациента (от 100 до 300) было недостаточным для достоверной оценки индивидуального спонтанного уровня цитогенетических повреждений.

Более адекватным подходом к оценке стабильности генома клеток является исследование их чувствительности к мутагенным воздействиям [2]. В ряде эпидемиологических исследований было показано, что повышенная мутагенная чувствительность лимфоцитов сопровождается повышенным канцерогенным риском [27].

Целью настоящего исследования стало изучение стабильности генома больных с солидными опухолями по показателям: 1) индивидуальная и среднегрупповая спонтанная частота ХА в лимфоцитах периферической крови; 2) радиочувствительность лимфоцитов, оцененная по частоте индуцированных облучением *in vivo* ХА.

Материалы и методы

Исследование проведено на лимфоцитах 14 пациентов (12 мужчин и 2 женщины в возрасте от 23 до 75 лет), находившихся на лечении в клинике ФГБУ «РНЦРХТ» Минздрава РФ с различными видами опухолей (табл. 1).

Анализ спонтанных и индуцированных облучением *in vivo* ХА у пациентов проводился в рамках работы по сравнению радиочувствительности лимфоцитов при общем фракционированном облучении больных в малых дозах, предшествующем основному противоопухолевому лечению, и при облучении их крови *in vitro* [3,9]. Никто из больных ранее не подвергался лучевой и/или химиотерапии. В качестве контроля была использована выборка ранее обследованных 45 здоровых доноров, соответствующая по возрасту выборке пациентов.

Забор венозной крови для цитогенетического анализа производили до начала лечения в вакутейнеры с гепарином. Куль-

тивирование крови (в течение 48-50 часов) и приготовление препаратов осуществляли по стандартной методике [17] с использованием FPG-окраски, позволяющей различать первые и вторые культуральные митозы. Анализировали от 400 до 1200 метафаз на каждого пациента. В метафазах I-го митоза, содержащих 46 ± 1 центромер, регистрировали все типы ХА, четко обнаруживаемые при рутинном цитогенетическом анализе. Из них в таблицах представлены: дицентрические и кольцевые хромосомы (нестабильные хромосомные обмены – НХО), двойные (ДФ) и одиночные фрагменты (ОФ).

Для оценки достоверности различий между частотами ХА в контрольной и опытной выборке использовали t-критерий Стьюдента. При сравнении индивидуальных значений со средними значениями контрольной группы был использован точный критерий Фишера. При регрессионном анализе зависимости частоты ХА от дозы облучения подбор уравнений производился с использованием компьютерной программы PIRLS (Poisson Iteratively Reweighted Least Squares), использующей метод пуассоновского взвешивания наименьших квадратов.

Результаты и обсуждение

В табл. 2 представлены индивидуальные данные цитогенетического анализа лимфоцитов онкологических больных. Видно, что в исследованной выборке индивидуальный уровень ХА существенно варьирует (от 1,94 до 8,91%).

В табл. 3 представлены среднегрупповые значения частот различных типов ХА в основной и контрольной группах.

У онкологических пациентов достоверно повышена общая частота ХА, а также частоты ДФ и ОФ. Имеется тенденция и к повышению частоты НХО ($p=0,22$).

Чтобы выяснить, какие из обследованных онкологических пациентов характеризуются повышенным уровнем ХА, достоверно отличающимся от контроля, индивидуальные частоты различных типов ХА каждого пациента сравнили с аналогичными средними значениями в контрольной группе. Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 1.
Характеристика обследованных пациентов

№	Код пациента	Возраст, годы	Пол	Диагноз
1	Б-3	47	м	Аденокарцинома желудка IV ст., метастазы в печень
2	Б-7	75	ж	Рак почки, метастазы в легкие
3	Б-9	75	м	Рак предстательной железы, метастазы в кости
4	Б-13	70	м	Рак поджелудочной железы
5	Б-14	49	м	Рак сигмовидной кишки, метастазы в лёгкие и печень
6	Б-15	56	м	Рак почки, метастазы в легкие
7	Б-16	59	м	Рак почки, метастазы в кости
8	Б-17	52	м	Рак предстательной железы, метастазы в кости
9	Б-18	23	м	Плоскоклеточный рак лёгкого
10	Б-19	74	м	Рак предстательной железы
11	Б-20	46	ж	Рак молочной железы
12	Б-21	51	м	Рак предстательной железы, метастазы в кости
13	БР-1	72	м	Рак предстательной железы
14	БР-5	61	м	Рак предстательной железы

Таблица 2.
Индивидуальные результаты цитогенетического анализа лимфоцитов обследованных пациентов

Код пациента	Кол-во метафаз	Всего ХА М±SE %	НХО М±SE %	ДФ М±SE %	ОФ М±SE %
Б-3	417	6,24±1,18	0	2,16±0,71	4,08±0,97
Б-7	404	8,91±1,42	0,25±0,25	3,22±0,88	4,95±1,08
Б-9	495	4,65±0,95	0,20±0,20	2,02±0,63	2,22±0,66
Б-13	605	6,61±1,01	0,99±0,40	3,47±0,74	2,15±0,59
Б-14	500	3,40±0,81	0,40±0,28	2,40±0,68	0,40±0,28
Б-15	787	3,05±0,61	0,76±0,31	1,14±0,38	1,14±0,38
Б-16	970	2,89±0,54	0,52±0,23	1,44±0,38	0,62±0,25
Б-17	1000	3,30±0,56	0,30±0,17	1,10±0,33	1,60±0,40
Б-18	1000	2,30±0,47	0,30±0,17	0,80±0,28	0,80±0,28
Б-19	772	1,94±0,50	0,39±0,22	1,17±0,39	0,13±0,13
Б-20	1000	4,60±0,66	0,60±0,24	1,40±0,37	2,10±0,45
Б-21	1200	5,67±0,67	0,50±0,20	2,17±0,42	2,67±0,47
БР-1	1000	5,40±0,71	0,60±0,24	2,40±0,48	2,20±0,46
БР-5	1000	4,80±0,68	0,50±0,22	2,00±0,44	2,00±0,44
Всего	11150	4,31±0,19	0,48±0,07	1,79±0,13	1,78±0,13

Таблица 3.
Сравнение онкологических пациентов и здоровых доноров по частоте ХА

Показатель	Пациенты	Контроль
Количество доноров	14	45
Средний возраст, лет	57,9±4,0	59,6±2,5
Количество проанализированных метафаз	11150	11653
Всего ХА, %	4,31±0,19*	2,20±0,14
НХО %	0,48±0,06	0,37±0,06
ДФ, %	1,79±0,13*	1,12±0,10
ОФ, %	1,78±0,12*	0,51±0,07

Примечания: * — отличия от контроля достоверны, p<0,05

Из таблицы видно, что большинство (11 из 14) пациентов достоверно отличаются от контрольной группы либо по частоте ДФ, либо по частоте ОФ, либо по обоим этим показателям. Повышенная частота ХА в лимфоцитах больных с различными локализациями опухолей позволяет предположить, что у этих пациентов генетическая нестабильность имеет генерализованный характер.

У трёх пациентов (Б-16, Б-18 и Б-19) достоверных отличий частоты цитогенетических повреждений от контрольных значений обнаружено не было. Свойство генетической нестабильности у них, вероятно, имеет локальный характер, то есть ограничивается опухолевыми клетками, а не является генетически нестабильными [4].

Повышенная нестабильность генома, как правило, выражается в увеличении чувствительности клеток к различным мутагенным воздействиям [2]. Поэтому, было интересно проверить, различаются ли по радиочувствительности лимфоциты больных с предположительно «генера-

Таблица 4.
Достоверность различий индивидуальных частот различных типов ХА у онкологических пациентов от средних значений в контрольной группе

Код пациента	Показатели			
	Всего ХА	НХО	ДФ	ОФ
Б-3	p<0,001	-	p<0,05	p<0,001
Б-7	p<0,001	-	p<0,001	p<0,001
Б-9	p<0,01	-	p<0,05	p<0,001
Б-13	p<0,001	p<0,05	p<0,001	p<0,001
Б-14	p=0,06	-	p<0,01	-
Б-15	p=0,1	p=0,07	-	p<0,05
Б-16	p=0,1	-	-	-
Б-17	p<0,05	-	-	p<0,001
Б-18	-	-	-	-
Б-19	-	-	-	-
Б-20	p<0,001	-	-	p<0,001
Б-21	p<0,001	-	p<0,01	p<0,001
БР-1	p<0,001	-	p<0,001	p<0,001
БР-5	p<0,001	-	p<0,05	p<0,001

Примечание: символ «-» означает, что различия не обнаружены даже для 10 % уровня вероятности

лизованной» и «локальной» нестабильностью генома. Это оказалось возможным сделать по результатам наших работ [3,9], где исследовалась радиочувствительность хромосом этих же больных при их общем фракционированном облучении в малых дозах (0,1-1,1 Гр), то есть при облучении лимфоцитов in vivo. По индивидуальным частотам НХО (тип ХА, характерный для радиационного повреждения хромосом) при разных дозах облучения были построены суммарные регрессионные зависимости доза-эффект

для групп с условно «генерализованной» (Б-3, Б-7, Б-9, Б-14, Б-15, Б-17, Б-20, Б-21) и «локальной» (Б-16, Б-18, Б-19) нестабильностью генома. Зависимость доза-эффект удовлетворительно описывалась линейной функцией вида $Y=C+\alpha D$, где Y – частота НХО на 100 клеток, D – доза в Гр. Уравнения дозовой зависимости имели следующий вид: $Y=(0,42\pm 0,08)+(4,18\pm 0,32)\times D$ для группы лиц с «генерализованной» нестабильностью генома и $Y=(0,31\pm 0,09)+(2,97\pm 0,23)\times D$ — для группы с «локальной» нестабильностью.

Линейный коэффициент уравнения регрессии (α) в первой группе оказался достоверно выше, чем во второй ($p<0,05$). Это означает, что стабильность генома, оцененная по радиочувствительности хромосом у пациентов с «генерализованной» нестабильностью генома достоверно снижена.

Таким образом, наряду с повышенной по сравнению с контролем средней частотой ХА в выборке исследованных онкологических больных наблюдается неоднородность по частоте как спонтанных, так и индуцированных ХА в лимфоцитах при их облучении *in vivo*. Повышенный уровень ХА может быть как следствием исходной нестабильности генома у носителей опухоли, так и результатом действия каких-то метаболитов злокачественных клеток на лимфоциты крови.

Заключение

- Результаты данного исследования подтверждают тот факт, что повышенная частота ХА в лимфоцитах периферической крови может служить неспецифическим маркером онкологических заболеваний [1], причиной которых является генетическая нестабильность клеток. Аналогичные выводы сделаны и в тех работах, где для оценки стабильности генома онкологических больных использовали другой цитогенетический показатель – частоту микроядер [1,14,15,23,25,30]. Таким образом, повышенный уровень цитогенетических нарушений в лимфоцитах человека может отражать повышенный риск возникновения у него злокачественных новообразований. В практическом плане это диктует необходимость регулярного медицинского обследования таких людей для возможно более раннего выявления у них онкопатологии.

- Достоверная оценка индивидуальной спонтанной частоты ХА возможна только при анализе большого количества клеток. Как и в случае биологической индикации радиационных воздействий в малых дозах, оно должно быть не менее 500 [10].

- Частота ХА в лимфоцитах у онкологических пациентов до начала лечения может

служить оценкой характера свойственной им генетической нестабильности («генерализованная» или «локальная»). Это может иметь практическое значение при выборе индивидуальных схем противоопухолевого лечения, так как «генерализованная» нестабильность предполагает повышенную радиочувствительность здоровых тканей и, следовательно, больший риск развития побочных эффектов и вторичных опухолей.

В связи с небольшим размером исследованной выборки больных высказанные предположения носят предварительный характер.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бяхова М.М., Сычёва Л.П., Журков В.С. и др. Цитогенетический статус больных раком желудочно-кишечного тракта до и после лечения // *Вопр. онкол.* — 2014. — Т. 60. — № 1. — С.56-63.
2. Воробцова И.Е. Генетические и соматические эффекты ионизирующей радиации у человека и животных // *Радиац. биол. радиоэкол.* — 2002. — Т. 42. — № 6. — С. 639-643.
3. Воробцова И.Е., Канаева А.Ю., Тимофеева Н.М. и др. Сравнение цитогенетической реакции лимфоцитов человека на облучение в малых дозах γ -излучения *in vivo* и *in vitro* // *Радиац. биол. радиоэкол.* — 2002. — Т. 42. — № 2. — С. 117-123.
4. Генетика в практике врача / Под ред. В.Н. Горбуновой, О.П. Романенко. — СПб: Фолиант, — 2013. — 456 с.
5. Канцерогенез / Под ред. Д.Г. Заридзе. — М.: Медицина, — 2004. — 574 с.
6. Мансурова Г.Н., Иванова П.В., Литвяков Н.В. и др. Хромосомные aberrации и полиморфизм генов эксцизионной репарации у работников СХК с онкологическими заболеваниями // *Сиб. онколог. журн.* — 2008. — Приложение №1.
7. Мельников А.А., Васильев С.А., Смольникова Е.В. и др. Динамика хромосомных aberrаций и микроядер в лимфоцитах больных злокачественными новообразованиями при нейтронной терапии // *Сиб. онколог. журн.* — 2012. — Т. 52. — № 4. — С. 52-56.
8. Минина В.И. Вклад полиморфизма генов ферментов репарации ДНК в хромосомный мутагенез в лимфоцитах крови человека // *Вестник КемГУ.* — 2013. — Т. 53. — № 1. — С. 34-38.
9. Семёнов А.В., Воробцова И.Е., Жаринов Г.М. Изучение дозовой зависимости выхода дицентриков при общем фракционированном облучении онкологических пациентов до суммарной дозы 1,15 Гр γ -излучения // *Радиац. биол. радиоэкол.* — 2010. Т. 50. — С. 142-147.
10. Снигирёва Г.П., Богомазова А.Н., Новицкая Н.Н. и др. Биологическая индикация радиационного воздействия на организм человека с использованием цитогенетических методов. Методические рекомендации. — Москва. — 2007. — 29 с.
11. Abat D., Demirhan O., Inandikloglu N. et al. Genetic alterations of chromosomes, p53 and p16 genes in low- and high-grade bladder cancer. // *Oncol. Lett.* — 2014. — Vol. 8. — № 1. — P. 25-32.
12. Antoine J.L., Gerber G.B., Leonard A., Richard F., Wambersie A. Chromosome aberration in patients treated with

- telecobalt therapy for mammary carcinoma // *Radiat. Res.* — 1981. — Vol. 86. — P. 1–7.
13. Aronson M.M., R.C. Miller R.C., Hill B.B. et al. Acute and long term cytogenetic effects of treatment in childhood cancer. Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations // *Mutat. Res.* — 1982. — Vol. 92. — P. 291-307.
 14. Bonassi S., Abbondandolo A., Camurri L. et al. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study // *Gen. Cytogenet.* — 1995. — Vol. 79. — P. 133–135.
 15. Bonassi S., Znaor A., Ceppi M. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predict the risk of cancer humans // *Carcinogenesis.* — 2007. — Vol. 28. — № 3. — P. 625-631.
 16. Bonassi S., El-Zein R., Bolognesi C. et al. Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies // *Mutagen.* — 2011. — Vol. 26. — № 1. — P. 93-100.
 17. Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment // Technical Reports Series № 405. — IAEA. — Vienna. — 2001. — 57 p.
 18. Diener, G. Stephen, Th. Vogl, J. Lissner. The induction of chromosome aberrations during the course of radiation therapy for Morbus Hodgkin // *Radiat. Res.* — 1988. — Vol. 114. — P. 528–536.
 19. Dunst J., Gebracht E. und Neubauer S. Kann man extrem erhöhte Strahlensensitivität von Patienten durch In-vitro-Testung von Lymphozyten erkennen? // *Strahlentherapie und Onkologie.* — 1995. — Vol. 171. — № 10. — P. 581-586.
 20. Hagmar L., Brogger A., Hansteen I.L. et al. Health risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage // *Cancer Res.* — 1994. Vol. 54. — P. 2919-2922.
 21. Honeycomb J. The cytogenetic effects of busulphan therapy on the Ph1-positive cells and lymphocytes from patients with chronic myeloid leukaemia // *Mutat. Res.* — 1981. — Vol. 81. — P. 81-102.
 22. Kleinerman R.A., Littelfield L.G., Tarone R.E et al. Chromosome aberrations in peripheral lymphocytes and radiation dose to active bone marrow in patients treated for cancer of the cervix // *Radiat. Res.* — 1989. — Vol. 119. — P. 176–190.
 23. Larmarcovai G., Bonassi S., Botta A. et al. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of literature // *Mutat. Res.* — 2008. — Vol. 658. — № 3. — P. 215-233.
 24. Scott D., Barber J.B.P., Spreadborough A.R. et al. Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays // *Int. J. Radiat. Biol.* — 1999. — V. 75. — №1. — P. 1-10.
 25. Torres-Bugarin O., Venture-Aguilar A., Zamora-Perez A. et al. Evaluation of cisplatin+5-FU, carboplatin+5-FU and ifosmide+epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa // *Mutat. Res.* — 2003. — Vol. 539 (1-2). — № 5. — P. 177-186.
 26. Wegner R.D. Cytogenetic characterization of human disorders with increased spontaneous and induced chromosomal instability // In: *Eukaryotic Chromosomes.* — Eds. R.C. Sabti, G. Obe. — Narosa Publishing House. — 1991. — P. 126–152.
 27. Wu X., Gu J. and Spitz M.R.. Mutagen sensitivity: a genetic predisposition factor for cancer // *Cancer Res.* — 2007. — Vol. 67. — № 8. — P. 3493-3495.
 28. Venkatachalam P., Solomon F.D.P., Mohankumar M.N. et al. Higher frequency of dicentric and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of cancer patients // *Mutation Research.* — 1999. — Vol. 425. — P. 1-8.
 29. Violot D., M'kacher R., Adadj E. et al. Evidence of increased chromosomal abnormalities in French Polynesian thyroid cancer patients // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2005. — Vol. 32. — P. 74–79.
 30. Yildirim I.H., Yesilada, Yologlu S. Micronucleus Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes and Exfoliated Buccal Cells of Untreated Cancer Patients // *Genetika.* — 2006. — Vol. 42. -№ 5. — P. 705-710.

Поступила в редакцию 23.11.2015 г.

A.V.Semenov, I.E.Vorobtsova

Frequency of chromosomal aberrations in lymphocytes of peripheral blood in patients with solid tumors

Russian Scientific Center of Radiology and Surgical Technologies
St. Petersburg

There was carried out a study to compare the frequency of spontaneous chromosomal aberrations (CA) in lymphocytes of peripheral blood between the group of cancer patients with different types of solid tumors and the group of healthy people of the same age. There was established a significant increase in the average frequency of CA in cancer patients. Analysis of the group of patients has revealed its heterogeneity: in the majority of patients the individual frequency of CA significantly exceeded the average frequency of CA in the control group, in some - did not differ from that. The first patients were described as the group with "generalized" genomic instability. Also this group differed by increased radiosensitivity of lymphocyte chromosomes during their irradiation in vivo.

Key words: chromosomal aberrations, cancer patients, genomic instability