©Коллектив авторов, 2014
УДК 61:57.08-616.33/34

Вопросы онкологии, 2014. Том 60, № 1

М.М. Бяхова[1], Л.П. Сычева[1], В.С. Журков В.С.[1], А.Ф. Астраханцев[2], А.Ю. Космынин[2], Н.В. Одишелидзе [2], М.Ю. Бяхов [2]

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ[2]

[1]ФГБУ «НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им А. Н. Сысина» Минздрава России, Москва,
[2]УЗ Центральная клиническая больница № 2 им. Н.А. Семашко ОАО «РЖД», Москва

Целью исследования является анализ кариологических показателей в эксфолиативных клетках у больных раком желудочно-кишечного тракта. Выявлено статистически достоверное (p<0,01) увеличение в буккальном и назальном эпителии всех показателей у больных РЖКТ по сравнению со здоровыми. Данные изменения носят системный характер и отражают общее состояние организма.

Ключевые слова: злокачественные новообразования, желудочно-кишечный тракт, микроядра

В структуре онкологической заболеваемости в РФ колоректальный рак и рак желудка занимают ведущие позиции, в ряде регионов опережая по темпам роста онкопатологию дыхательной системы [5]. Хотя этиология этих злокачественных опухолей остается до конца не выясненной, известно, что трансформация клеток и возникновение этих опухолей вызывается изменениями генома, связанного как с герминативными, так и соматическими мутациями. В связи с этим дальнейший прогресс в борьбе со злокачественными новообразованиями связан как с достижениями в области расшифровки генетического механизма развития опухоли на уровне ДНК, так и с их ранней диагностикой и профилактикой [2].

К маркерам биологического эффекта, свидетельствующеого о процессах канцерогенеза, отражающего повреждение генетического материала клеток и приводящего к активации онкогенов, относятся микроядра и протрузии, хромосомные абберации и т.д. [11,16,18]. Микроядра в клетках появляются или вследствии повреждения ДНК, что свидетельствует о хромосомных, а возможно и генных мутациях при нарушении считывания нуклеотидов, или они могут быть результатом повреждения веретена деления и образованно одной или более целыми хромосомами, отставших в анафазе митоза и не вошедших в основное ядро [8]. Микроядра могут появляться в связи с образом жизни (курение, алкоголь, нарушение микроэлементного состава), факторами окружающей среды (пестициды, формальдегид и т.д), медицинскими процедурами (радио и/или химиотерапией) [11,13,14,19]. Частота встречаемости клеток с микроядрами отражает частоту клеток с измененным кариотипом [6]. Эти генетические повреждения могут являться пусковым механизмом для развития различных хронических заболеваний, нарушения репродуктивного здоровья, а также злокачественных новообразований различных локализаций [3,12,15,17].

Целью нашего исследования было выявление цитогенетических нарушений (микроядер и протрузий), нарушений пролиферативной активности клеток (клетки с двумя ядрами и клетки со сдвоенным ядром) и апоптоза (клетки с кариорексисом, кариопикнозом, кариолизисом) в эксфолиативных клетках буккального и назального эпителия у больных с впервые диагностированным раком желудочно-кишечного тракта до и после радикального хирургического лечения.

Материал и методика

Обследовали 30 пациентов с установленными диагнозами: рак желудка, толстой и прямой кишок Ia,b и IIa,b стадий, до и через 6 мес после радикального оперативного вмешательства. В группу сравнения вошли 30 условно здоровых людей, на момент обследования не имевших острой или хронической патологии. Средний возраст пациентов составил 54,3 года, а средний возраст условно здоровых — 50,6 года. Определяли следующие группы показателей: цитогенетические нарушения (доля клеток с микроядрами и протрузиями), нарушения пролиферативной активности клеток (доля клеток с двумя ядрами и клеток со сдвоенным ядром) и апоптоза (доля клеток с кариорексисом, кариопикнозом, кариолизисом) в эксфолиативных клетках буккального и назального эпителия. Препараты эпителиальных клеток буккального и назального эпителия готовили и анализировали в соответствии с методическими рекомендациями «Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека» [4].

Результаты и обсуждение

Обнаруженные изменения представлены в табл. 1. Выявлено статистически достоверное (p<0,01) увеличение в буккальном эпителии цитогенетических показателей: доли клеток с микроядрами в 5,8 раз, протрузиями в 2,9 раза,

суммарный показатель (сумма клеток с микроядрами и протрузиями) в 4,4 раз у больных РЖКТ по сравнению со здоровыми лицами, отмечается статистически достоверное увеличение доли клеток с показателями косвенно отражающими пролиферацию (доля клеток со сдвоенными ядрами, доля клеток с двумя ядрами, сумма всех клеток с двумя и более ядрами приблизительно 1,9 раза) у больных по сравнению со здоровыми. Количественные показатели апоптоза также достоверно увеличиваются у больных (доля клеток с кариолизисом в 6,75 раз, апоптический индекс в 3,0 раза) по сравнению со здоровыми (см. табл. 1).

Таблица 1

Кариологические показатели буккального эпителия у больных РЖКТ и здоровых людей

Показатели	здоровые	РЖКТ
Цитогенетические показатели ($x_{ср.;}$ ДИ) в ‰		
Доля клеток с микроядрами	0,6 (0,19÷1,05)	3,5 (2,4÷4,6)*
Доля клеток с протрузиями	0,75 (0,00÷1,49)	2,2 (1,5÷2,9)*
Доля клеток с микроядрами и протрузиями суммарно	1,3 (0,3÷2,37)	5,7 (4,1÷7,39)*
Доля клеток с атипичным ядром	1,1 (0,29÷1,9)	0,7 (0,2÷1,2)
Цитогенетические показатели ($x_{ср.;}$ ДИ) в ‰		
Доля клеток со сдвоенными ядрами	2,0 (1,1÷2,9)	3,8 (2,7÷5,0)*
Доля клеток с двумя ядрами	3,37 (1,3÷5,4)	6,2 (4,2÷8,1)*
Доля клеток с тремя ядрами	0,12 (0,0÷0,4)	0,3 (0,09÷0,5)
Сумма всех клеток с двумя и более ядрами	5,5 (3,26÷7,7)	10,4 (7,5÷13,3)*
Показатели деструкции ядра в %		
Доля клеток с кариопикнозом	1,2 (0,0÷3,0)	1,4 (0,8÷1,9)
Доля клеток с кариорексисом	2,62 (0,02÷5,2)	2,2 (0,9÷3,4)
Доля клеток с кариолизисом ядра	2,0 (0,9÷3,09)	13,5 (6,3÷20,7)*
Апоптотический индекс	5,7 (2,2÷9,2)	17,1 (9,2÷25,01)*

Примечание. *- достоверные отличия между группами по χ^2; P<0,01

Результаты исследования назального эпителия представлены в табл. 2. Отмечено увеличение доли клеток с микроядрами в 2,3 раза, доли клеток с протрузиями в 2,5 раза, суммарного показателя в 2,3 раза у больных по сравнению со здоровыми. Увеличивается доля клеток с показателями косвенно отражающими пролиферацию (доля клеток со сдвоенным ядром в 2,8 раза, доля клеток с двумя ядрами в 1,3 раза, сумма всех клеток с двумя и более ядрами в 1,6 раза) у больных по сравнению со здоровыми. Показатели апоптоза также увличиваются у больных (доля клеток с кариорексисом в 2,6 раза, кариолизисом в 2,0 раза, апоптический индекс 1,9 раза) по сравнению со здоровыми (табл. 2).

Таблица 2

Кариологические показатели в назальном эпителии у больных РЖКТ и здоровых людей

Показатели	здоровые	РЖКТ
Цитогенетические показатели ($x_{ср.;}$ ДИ) в ‰		
Доля клеток с микроядрами	1,8 (0,4÷3,3)	4,2 (2,5÷5,9)*
Доля клеток с протрузиями в ‰	1,2 (0,08÷2,4)	3,0 (1,6÷4,4)*
Доля клеток с микроядрами и протрузиями в ‰	3,12 (0,7÷5,5)	7,2 (4,3÷10,11)*
Доля клеток с атипичным ядром в ‰	0,25 (0,0÷0,8)	0,3 (0,03÷0,6)
Показатели пролиферации ($x_{ср.;}$ ДИ) в %		
Доля клеток со сдвоенными ядрами	0,87 (0,0÷2,0)	2,4 (1,3÷3,5)*
Доля клеток с двумя ядрами	3,2 (0,12÷6,3)	4,05 (2,3÷5,7)*
Доля клеток с тремя ядрами	0,12 (0,0÷0,4)	0,57 (0,06÷1,09)
Сумма всех клеток с двумя и более ядрами	4,25 (0,4÷8,08)	7,05 (4,2÷9,8)*
Показатели деструкции ядра ($x_{ср.;}$ ДИ) в %		
Доля клеток с кариопикнозом	0,5 (0,0÷1,39)	1,3 (0,6÷1,9)*
Доля клеток с кариорексисом	2,12 (0,68÷3,58)	2,5 (1,2÷3,9)
Доля клеток с кариолизисом ядра	10,00 (6,54÷13,46)	19,9 (12,1÷27,7)*
Апоптотический индекс	12,62 (8,45÷16,79)	23,8 (15,5÷32,03)*

Примечание. *- достоверные отличия между группами по χ^2; P<0,01

Через 6 мес после хирургического лечения, эти же пациенты (30 человек) были обследованы повторно. Результаты обследования представлены в табл. 3. Выявлено, что через 6 месяцев, после хирургического лечения имеет место статистически достоверное снижение в буккальном доли клеток с микроядрами в 2,5 раза, доли клеток с микроядрами и протрузиями в 1,6 раза в буккальном эпителии у больных после радикального лечения по сравнению с первичными больными. Доля клеток с кариорексисом ниже в 2,7 раза, доля клеток с кариолизисом в 2,1 раза, апоптического индекса в 2,1 раза в буккальном эпителии у больных после радикального лечения по сравнению с первичными больными (табл. 3).

В назальном эпителии отмечены, схожие изменения показателей. Снижение доли клеток с микроядрами в 3,5 раза, доли клеток с протрузиями в 2,5 раза, доли клеток с микроядрами и протрузиями в 3 раза у больных после радикального лечения по сравнению с первичными больными. Снижение показателей косвенно отражающих пролиферацию: доли клеток со сдвоенными ядрами в 2,4 раза, доли клеток с двумя ядрами в 1,8 раза, суммарного показателя всех клеток с двумя и более ядрами в 2,2 раза у больных после радикального лечения по сравнению с первичными больными. Также показано снижение показателей деструкции ядра в назальном эпителии: доли клеток с кариолизисом в 1,7 раза

Таблица 3

Изменение кариологических показателей у первичных больных и больных после радикального лечения

Показатель	Первичные больные с РЖКТ		Больные после операции	
	Буккальный эпителий	Назальный эпителий	Буккальный эпителий	Назальный эпителий
Цитогенетические показатели ($x_{ср.}$; ДИ) в ‰				
Доля клеток с микроядрами	3,5 (2,4÷4,6)	4,2 (2,5÷5,9)	1,4 (0,25÷2,6)*	1,2 (0,0÷2,8)*
Доля клеток с протрузиями в ‰	2,2 (1,5÷2,9)	3,0 (1,6÷4,4)	2,1 (0,5÷3,7)	1,2 (0,16÷2,2)*
Доля клеток с микроядрами и протрузиями в ‰	5,7 (4,1÷7,39)	7,2 (4,3÷10,11)	3,5 (1,1÷6,0)*	2,4 (0,14÷4,7)*
Доля клеток с атипичным ядром в ‰	0,7 (0,2÷1,2)	0,3 (0,03÷0,6)	0,5 (0,0÷1,6)	0,4 (0,0÷1,0)
Показатели пролиферации ($x_{ср.}$; ДИ) в ‰				
Доля клеток со сдвоенными ядрами	3,8 (2,7÷5,0)	2,4 (1,3÷3,5)	4,2 (1,2÷7,2)	1,0 (0,0÷2,7)*
Доля клеток с двумя ядрами	6,2 (4,2÷8,1)	4,05 (2,3÷5,7)	6,1 (1,6÷10,6)	2,2 (0,0÷5,5)*
Доля клеток с тремя ядрами	0,3 (0,09÷0,5)	0,57 (0,06÷1,09)	0,28 (0,0÷0,7)	0
Сумма всех клеток с двумя и более ядрами	10,4 (7,5÷13,3)	7,05 (4,2÷9,8)	10,7 (3,6÷17,7)	3,2 (0,0÷7,1)*
Показатели деструкции ядра ($x_{ср.}$; ДИ) в %				
Доля клеток с кариопикнозом	1,4 (0,8÷1,9)	1,3 (0,6÷1,9)	1,0 (0,0÷2,3)	1,0 (0,0÷2,5)
Доля клеток с кариорексисом	2,2 (0,9÷3,4)	2,5 (1,2÷3,9)	0,8 (0,02÷1,6)*	1,6 (0,0÷3,2)
Доля клеток с кариолизисом ядра	13,5 (6,3÷20,7)	19,9 (12,1÷27,7)	6,4 (2,1÷10,7)*	11,6 (4,32÷18,9)*
Апоптотический индекс	17,1 (9,2÷25,01)	23,8 (15,5÷32,03)	8,2 (2,9÷13,61)*	14,2 (8,1÷20,3)*

Примечание. *- достоверные отличия между группами больных и здоровых пациентов при сравнении одного и того же эпителия по ^{2}; $P<0,01$

и апоптический индекс в 1,7 раза, у больных после радикального лечения по сравнению с первичными больными (табл. 3).

Результаты настоящей работы согласуются с данными литературы. Так, в исследованиях O.Torres-Bugarin O et al. [20] и I.H. Yildirim et al. [21] выявлено увеличение количества клеток слизистой оболочки ротовой полости и лимфоцитов периферической крови с микроядрами у больных раком желудка и прямой кишки по сравнению со здоровыми людьми. Подобные изменения отмечены также при раке молочной железы (М.М. Бяхова и др. [1], что свидетельствует о возможном прогностическом значении исследуемых показателей в отношении онкогенных процессов и, в тоже время об их неспецифическом характере для раков разной локализации. Увеличение количества клеток периферической крови с микроядерами в у здоровых людей рядом авторов рассматривается как ранние признаки канцерогенеза. Так, в обзоре S. Bonassi с соавт. [10], охватывающем 20 лабораторий в 10 странах мира с 1980г по 2002 г., показано увеличение риска развитие рака у здоровых людей при увеличении количества клеток с микроядрами, в том числе и при РЖКТ в 1,74 раза.

Изменения доли клеток с цитогенетическими нарушениями отмечаются в клетках буккального, назального эпителиев и в лимфоцитах периферической крови, находящихся вдали от пораженного органа. Возможно, что при онкопатологии происходят определенные инегральные процессы, приводящие к нестабильности генома и увеличению доли генетически измененных клеток в организме в целом, в том числе и вдали от места поражения [8]. В связи с тем, что многие злокачественные новообразования у человека возникают в эпителиальных тканях, а эпителиальные клетки выстилают или покрывают все внутренние и внешние поверхности тела, тем самым защищая организм от различных факторов внешней и внутренней среды, то именно они будут в первую очередь подвергаться действию мутагенов и канцерогенов, и их изменения будут отражать общее состояние организма [7].

Таким образом, показано достоверное увеличение доли клеток с цитогенетическими нарушениями в буккальном и назальном эпителии у больных раком желудочно-кишечного тракта по сравнению со здоровыми. Выявленные изменения носят системный характер и отражают общее состояние организма. Кроме того, показано снижение уровня кариологических показателей после радикального лечения, что свидетельствует об их прогностическом значении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бяхова М.М., Сычева Л.П., Шатровская Е.В. и др. Анализ цитогенетических нарушений, нарушений пролиферации и апоптоза в клетках буккального и назального эпителия больных раком молочной железы // Мат. конф. VII междунар. ежегодная конф. Проблемы диагностики и лечения рака молочной железы Белые ночи. — СПб. 23-25 июня. – С. 20-21.
2. Гарькавцева Р.Ф., Казубская Т.П., Белев Н.Ф. и др. Генетика рака желудочно-кишечного тракта //

Практическая колопроктология. – PROCTOLOG. RU
3. Заридзе Д. Г. Эпидемиология, механизмы канцерогенеза и профилактика рака // Арх. Пат. — 2002. — Вып. 2. — С. 53—61.
4. Методические рекомендации. — Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека. — М. – 2005. – 37 с.
5. Китаев А.В, Немытин Ю.В., Петров В.П. и др. Внутриполостная гиперетермическая химотерапия в лечении злокачественных новообразований органов брюшной полости // Альманах. Злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта. – Oncology.ru – С. 67-77.
6. Китаева Л.В., Михайлова И.А., Семов Д.М. и др. Мукоциты с микроядрами и обсемененность кокковыми формами Helicobacter Pylori в слизистой оболочке желудка человека // Цитология. –2008. — Т. 50. — № 2. – С. 160-164.
7. Нерсесян А.К. Микроядерный тест в эксфолиативных клетках человека как метод изучения действия мутагенов/канцерогенов. // Цитология и генетика . — 1996. – Т. 30. — № 5. – С. 91-96.
8. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека. // Мед. генет. – 2007. – Т. 6. — №11. – С. 3-10.
9. Bonassi S., El-Zein R., Bolognesi C. et al. Micronuclei frequency in prenanal blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies // Mutgenesis. – 2011. – Vol. 26. – P. 93-100.
10. Bonassi S., Znaor A., Ceppi M. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lemphocytes predicts the risk of cancerin humans // Carcinogenesis. – 2007. – Vol. 28. – P. 625-631.
11. Ceppi M., Gallo F., Bonassi S. Study design and statistical analysis of data in human population studies with the micronuclius assay // Mutagenesis. — 2011. — Vol. 26. – P. 247-252.
12. Fenech M. Micronucleus assay determibation of chromosomal level DNA damage // Methods Mol. Biol. – 2008. – Vol. 410. – P. 185-216.
13. Fenech M, Bolognesi C., Kirsgh-Volders M et al. Harmonisation of the micronucleus assay in human buccal cell – a Human Micronucleus (HUNN) project initiative commencing in 2007 // Mutagenesis. – 2007. -Vol. 22. – P. 3-4.
14. Holland N., Bolognesi C., Kirsch-Volders M. et al. The micronucltus assay in human buccal cell as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and khowledge gaps // Mutat Res. – 2008. –Vol. 659. – P. 93-108.
15. Larmarcovai G, Bonassi S, Botta A. et al. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of literature // Mutat Res. – 2008. – Vol. 658. – P. 215-233.
16. Larmarcovai G., Ceppi M., Botta A. et al. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis // Mutat Res. – 2008. – Vol. 659. –P. 274-283.
17. Pastor S. Creus A., Xamena N. et al. Occupational exposure to Pesticides and cytogenetic damage: result of a Hungarian population study using the micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells // Environment. Molec. Mutagen. – 2007. — Vol.40. – P. 101-109.
18. Thomas P., Holland N., Bolognesi C. et all. Buccal micronucleus cytome assay // Nat Protoc. – 2009. – Vol. 4. – P. 825-837.
19. Teo T., Fenech M. The interactive effect of alcohol and folic acid on genome staility in human WIL2-NS cells measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay // Mutat Res. – 2008. – Vol. 657. — №1. – P.32-38.
20. Torres-Bugarin O. Venture-Aguilar A., Zamora-Perez A. et all 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. – P. 177-186.
21. Yildirim I.H., yesilada, Yologlu S. Micronucleus fregguency in peripheral blood lympocytes and exfoliated buccal cells of untreated cancer patients // Genetika. – 2006. – Vol. 42 – P. 705-710.

Поступила в редакцию 30.09.2013 г.

M.M. Byakhova[1], L.P. Sycheva[1], V.S. Zhurkov[1], A.F. Astrakhantsev[2], A.Yu. Kosmynin[2], N.V. Odishelidze[2], M.Yu. Byakhov[2]

Cytogenetic status of patients with cancer of the gastrointestinal tract before and after treatment

[1]A.N. Sysin Research Institute of Human Ecology and Environmental Hygiene
[2]N.A. Semashko Central Clinical Hospital № 2, Moscow

Aim of this study was to analyze the karyological indicators in exfoliated cells in patients with cancer of the gastrointestinal tract. There was revealed statistically significant (p <0,01) increase of all parameters in buccal and nasal epithelium in such kind of patients compared to healthy persons. These changes were systemic in nature and reflected the general state of the organism.