

Цитогенетический статус больных раком желудка

БЯХОВА М. М., СЫЧЕВА Л. П., ЖУРКОВ В. С., СЕЛЕЗНЕВА И. И., КОСМЫНИН А. А., ГАБУНИЯ З. Р., ОДИШЕЛИДЗЕ Н. В., БЯХОВ М. Ю., АСТРАХАНЦЕВ А. Ф.

Целью было выявление цитогенетических нарушений, нарушений пролиферативной активности клеток и апоптоза в эксфолиативных клетках буккального и назального эпителия у больных с впервые диагностированным раком желудка. Обследовано 10 пациентов с установленными диагнозами. В группу контроля вошли 30 условно здоровых людей. Показано увеличение доли клеток с цитогенетическими нарушениями в буккальном и назальном эпителии у больных раком желудка 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.

The aim was to identify cytogenetic disorders, proliferative activity and apoptosis in cells exfoliated buccal and nasal epithelium in patients with gastric cancer. The study involved 10 patients with an established diagnosis. The control group included 30 healthy people. It has been revealed that all this parameters were increased in buccal and nasal epithelium in patients with gastric cancer than in healthy people. The detected changes are systemic in nature and reflect the overall condition of the body. Moreover, we show reduction of karyological parameters after radical treatment, which indicates their prognostic significance.

Ключевые слова: злокачественные новообразования, рак желудка, микроядра

Контактная информация:

М. М. Бяхова, Л. П. Сычева, В. С. Журков — ФГБУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А. Н. Сысина Минздравсоцразвития России, г. Москва.

И. И. Селезнева, А. А. Космынин, З. Р. Габуня, Н. В. Одишелидзе, М. Ю. Бяхов, А. Ф. Астраханцев — НУЗ Центральная клиническая больница №2 им. Н. А. Семашко ОАО «РЖД», г. Москва.

Введение

Несмотря на стойкое снижение заболеваемости, рак желудка (РЖ) в структуре онкологических заболеваний прочно занимает второе место. Анализ данных о смертности в 24 экономически развитых странах мира показал, что на долю рака желудка приходится 50% опухолей желудочно-кишечного тракта. По данным ВОЗ и американских статистиков, в мире ежегодно диагностируется 900 тысяч новых случаев рака желудка, чаще регистрируется только рак легкого. У 60-90% больных диагностируют III-IV стадии заболевания, при этом удельный вес IV стадии не имеет тенденции к снижению и составляет 50-60% (Вашакмадзе Л. А. и др.).

Известно, что трансформация клеток и возникновение опухолей вызывается дина-

мическими изменениями клеточного генома, связанного как с герминативными, так и с 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 (Гаркавцева Р. Ф. и др.).

Микроядра (рис. 1) и протрузии (рис. 2), хромосомные aberrации и т.д. относят к маркерам биологического эффекта, свидетельствующим о процессах канцерогенеза, отражающим повреждение генетического материала клеток и приводящим к активации онкогенов (Thomas P. et al., 2009, Bonassi S et al. 2011, Larmarcovai G. et al, 2008).

Микроядра в клетках появляются или вследствие повреждения ДНК, что свидетельствует

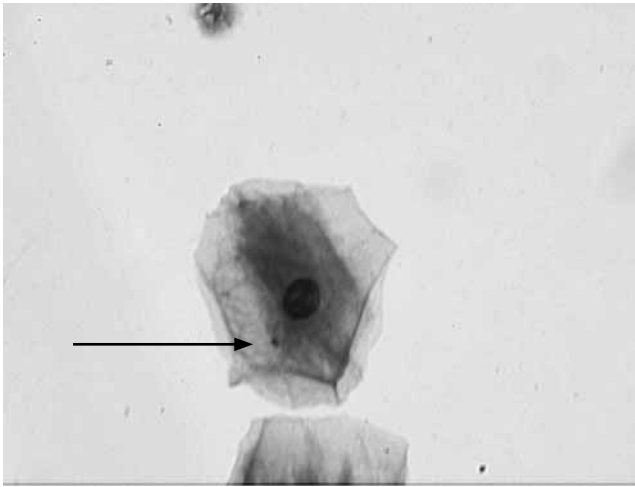
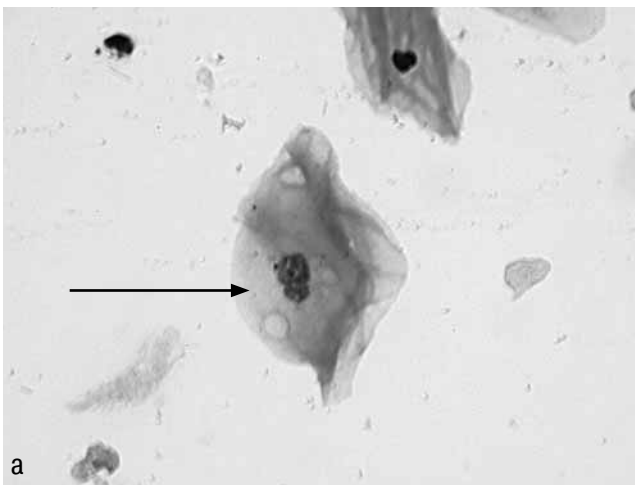
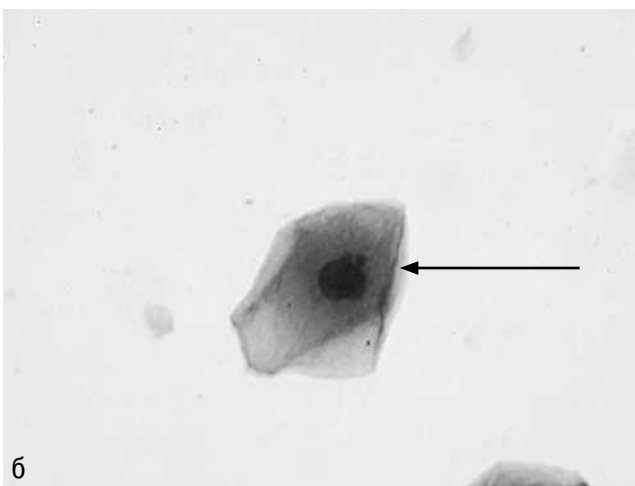


Рис. 1. Микроядро в клетке буккального эпителия



а



б

Рис. 2. Протрузия в клетке буккального эпителия

о хромосомных, а возможно и генных мутациях при нарушении считывания нуклеотидов, или они могут быть результатом повреждения веретена деления и образованы одной или более целыми хромосомами, отставшими в анафазе митоза и не вошедшими в основное ядро (Сычева Л.П., 2007). Появление микроядер может быть обусловлено рядом причин: образом жизни (курением, алкоголем, нарушением микроэлементного состава), факторами окружающей среды (пестицидами, формальдегидами и т.д.), медицинскими процедурами (радио и/или химиотерапией) (Teo T. et al., 2008, Fenech M et al., 2007, 2011, Holland N. et al., 2008, Cerpi M. et al., 2011). Частота встречаемости клеток с микроядрами отражает частоту клеток с измененным кариотипом (Китаева Л.В. в соавт., 2008). Эти генетические повреждения могут являться пусковым механизмом для развития различных хронических заболеваний, нарушения репродуктивного здоровья, а также злокачественных новообразований различных локализаций (Pastor S. et al., 2002, Fenech M., 2008, Larmarcovai G. et al., 2008, Заридзе Д.Г., 2002).

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 желудка.

Материалы и методы

Мы обследовали 10 пациентов с установленным диагнозом — рак желудка I а,б и II а,б стадий. В группу контроля вошли 30 условно здоровых людей, на момент обследования не имевших острой или хронической патологии. Средний возраст пациентов составил 50,2 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 (рис 3) и клеток со сдвоенным ядром) и апоптоз (доля клеток с кариорексисом, кариопикнозом, кариолизисом в эксфолиативных клетках бук-

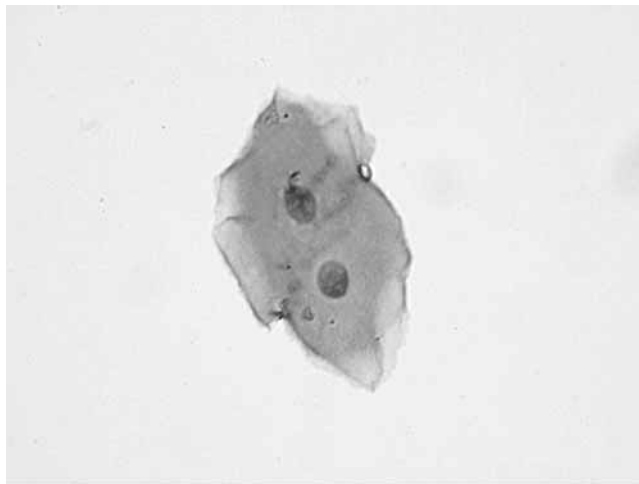


Рис. 3. Двухядерная клетка в буккальном эпителии

кального и назального эпителия). Препараты эпителиальных клеток буккального и назального эпителия готовили и анализировали в соответствии с методическими рекомендациями «Оценки цитологического и цитогенетического

статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека» (2005).

Результаты исследования и их обсуждения

Выявленные результаты представлены в таблице 1. Выявлено статистически достоверное ($p < 0,01$) увеличение в буккальном эпителии цитогенетических показателей: доли клеток с микроядрами в 8,0 раз, протрузиями в 4,3 раза, суммарным показателем (сумма клеток с микроядрами и протрузиями) в 6,2 раза у больных РЖ по сравнению со здоровыми. Отмечается статистически достоверное увеличение доли клеток с показателями, косвенно отражающими пролиферацию: доля клеток с двумя ядрами увеличена в 2,7 раз, сумма всех клеток с двумя и более ядрами приблизительно в 2,4 раза у больных по сравнению со здоровыми. Показатели апоптоза также достоверно увеличиваются у больных по сравнению со здоровыми: доля клеток с кариолизисом в 6,1 раз, апоптотический индекс в 2,6 раз.

Таблица 1. Кариологические показатели буккального эпителия у больных РЖ и здоровых людей

| Показатели | Здоровые | РЖ |
|--|------------------|------------------|
| Цитогенетические показатели (x ср.; ДИ) в % | | |
| Доля клеток с микроядрами | 0,6 (0,19÷1,05) | 4,8 (1,5÷8,0) |
| Доля клеток с протрузиями | 0,75 (0,00÷1,49) | 3,2 (0,2÷6,16) |
| Доля клеток с микроядрами и протрузиями суммарно | 1,3 (0,3÷2,37) | 8,0 (2,2÷13,75) |
| Доля клеток с атипичным ядром | 1,1 (0,29÷1,9) | 0,2 (0÷0,7) |
| Цитогенетические показатели (x ср.; ДИ) в % | | |
| Доля клеток со сдвоенными ядрами | 2,0 (1,1÷2,9) | 3,6 (0÷8,1) |
| Доля клеток с двумя ядрами | 3,37 (1,3÷5,4) | 9,2 (1,6÷16,72) |
| Доля клеток с тремя ядрами | 0,12 (0,0÷0,4) | 0,2 (0÷0,75) |
| Сумма всех клеток с двумя и более ядрами | 5,5 (3,26÷7,7) | 13,0 (2,7÷23,27) |
| Показатели деструкции ядра в % | | |
| Доля клеток с кариопикнозом | 1,2 (0,0÷3,0) | 0,8 (0÷2,1) |
| Доля клеток с кариорексисом | 2,62 (0,02÷5,2) | 2,2 (0÷5,03) |
| Доля клеток с кариолизисом ядра | 2,0 (0,9÷3,09) | 12,2 (0,2÷24,2) |
| Апоптотический индекс | 5,7 (2,2÷9,2) | 15,2 (2,3÷28,14) |

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

Таблица 2. Кариологические показатели в назальном эпителии у больных РЖ и здоровых людей

| Показатели | Здоровые | РЖ |
|--|--------------------|-----------------------|
| Цитогенетические показатели (x ср.; ДИ) в % | | |
| Доля клеток с микроядрами | 1,8 (0,4÷3,3) | 5,2 (0,9÷9,4) |
| Доля клеток с протрузиями в % | 1,2 (0,08÷2,4) | 3,2 (2,16÷4,2) |
| Доля клеток с микроядрами и протрузиями в % | 3,12 (0,7÷5,5) | 8,4 (3,6÷13,2) |
| Доля клеток с атипичным ядром в % | 0,25 (0,0÷0,8) | 0,2 (0÷0,7) |
| Показатели пролиферации (x ср.; ДИ) в % | | |
| Доля клеток со сдвоенными ядрами | 0,87 (0,0÷2,0) | 3,0 (0,6÷5,3) |
| Доля клеток с двумя ядрами | 3,2 (0,12÷6,3) | 5,2 (0÷10,9) |
| Доля клеток с тремя ядрами | 0,12 (0,0÷0,4) | 0,6 (0÷1,7) |
| Сумма всех клеток с двумя и более ядрами | 4,25 (0,4÷8,08) | 8,8 (0,8÷16,9) |
| Показатели деструкции ядра (x ср.; ДИ) в % | | |
| Доля клеток с кариопикнозом | 0,5 (0,0÷1,39) | 1,2 (0÷2,8) |
| Доля клеток с кариорексисом | 2,12 (0,68÷3,58) | 4,0 (0÷9,6) |
| Доля клеток с кариолизисом ядра | 10,00 (6,54÷13,46) | 22,6 (2,6÷42,9) |
| Апоптотический индекс | 12,62 (8,45÷16,79) | 27,8 (5,9÷49,7) |

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

Результаты исследования назального эпителия представлены в таблице 2. Отмечено увеличение доли клеток с микроядрами в 2,9 раз, доли клеток с протрузиями в 2,7 раз, суммарного показателя в 2,7 раз у больных по сравнению со здоровыми. Увеличивается доля клеток с показателями, косвенно отражающими пролиферацию: доля клеток со сдвоенным ядром в 3,4 раза, доля клеток с двумя ядрами в 1,6 раз, сумма всех клеток с двумя и более ядрами в 2,0 раза у больных по сравнению со здоровыми. Показатели апоптоза также увеличиваются у больных по сравнению со здоровыми: доля клеток с кариорексисом в 1,9 раз, кариолизисом в 2,26 раз, апоптотическим индексом в 2,2 раза.

Выявленные изменения подтверждаются рядом исследований. Похожие изменения выявляются в клетках слизистой ротовой полости и лимфоцитов периферической крови в исследованиях Yildirim I.H. et al. (2006 г.) и Torres-Bugarin O et al. (2004). Кроме того, такие же изменения отмечены при раках другой локализации, например, рак молочной

железы (Бяхова М. М. в соавт., 2010). Это 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 микроядрами у здоровых людей рядом авторов рассматривается как ранние признаки канцерогенеза. Так в обзоре Bonassi S. с соавт. (2007), проведенном в 20 лабораториях 10 стран мира с 1980 г. по 2002 г., показано увеличение риска развития рака у здоровых людей при увеличении доли клеток с микроядрами, в том числе и при РЖКТ в 1,74 раза.

Следует отметить, что и вдали от пораженного органа в клетках буккального, назального эпителия и по данным литературы, в лимфоцитах периферической крови выявляются клетки с цитогенетическими поражениями. Возможно, что при онкопатологии происходят определенные интегральные процессы, приводящие к нестабильности генома

и увеличению доли генетически измененных клеток в организме в целом, в том числе и вдали от места поражения (Сычева Л. П., 2007). 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, именно они будут в первую очередь подвергаться действию мутагенов и канцерогенов и их изменения

будут отражать общее состояние организма (Нерсесян А. К., 1996).

Таким образом, показано достоверное увеличение доли клеток с цитогенетическими нарушениями в буккальном и назальном эпителии у больных раком желудка 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. // Материалы конференции. VII международная ежегодная конференция «Проблемы диагностики и лечения рака молочной железы» Белые ночи». Санкт-Петербург 23-25 июня. — С. 20-21.
2. Вашакмадзе Л. А., Бутенко А. В. Место циторедуктивных операций в лечении больных раком желудка IV стадии. // Альманах Злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта. — oncology.ru
3. Гарькавцева Р. Ф., Казубская Т. П., Белев Н. Ф. и др. Генетика рака желудочно-кишечного тракта. // Практическая колопроктология. — PROCTOLOG.RU
4. Заридзе Д. Г. Эпидемиология, механизмы канцерогенеза и профилактика рака // Архив патологии. — 2002. — № 2. — С. 53-61.
5. Методические рекомендации. Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека. — М. — 2005. — С. 37.
6. Нерсесян А. К. Микроядерный тест в эксфолиативных клетках человека как метод изучения действия мутагенов/канцерогенов. // Цитология и генетика. — 1996. — Т30. = № 5. — С. 91-96.
7. Китаев А. В., Немытин Ю. В., Петров В. П. и др. Внутриволостная гипертермическая химиотерапия в лечении злокачественных новообразований органов брюшной полости. // Альманах. Злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта. — oncology.ru — С. 67-77.
8. 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. — Том 50, № 2. — 2008. — С. 160-164.
9. Сычева Л. П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека. // Медицинская генетика. — 2007. — Т 6, № 11 (65). — С. 3-10.
10. Bonassi S., El-Zein R., Bolognesi C. et al. Micronuclei frequency in prenatal blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. // Mutagenesis. — 2011. — Vol. 26, № 1. — P. 93-100.
11. Bonassi S., Znaor A., Ceppi M. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. // Carcinogenesis. — 2007. — Vol. 28, № 3. — P. 625-631.
12. Ceppi M., Gallo F., Bonassi S. Study design and statistical analysis of data in human population studies with the micronucleus assay. // Mutagenesis. 2011. Vol. 26, № 1. — P. 247-252.
13. Fenech M. Micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. // Methods Mol. Biol. — 2008. — Vol. 410. — P. 185-216.
14. Fenech M., Bolognesi C., Kirsch-Volders M. et al. Harmonisation of the micronucleus assay in human buccal cell — a Human

- Micronucleus (HUNN) project initiative commencing in 2007. // *Mutagenesis*. — Vol. 22. — P. 3-4.
15. Holland N., Bolognesi C., Kirsch-Volders M. et al. The micronucleus assay in human buccal cell as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. // *Mutat Res.* — 2008. — Vol. 659, № 1-2. — P. 93-108.
16. 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.
17. 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, № 3. — P. 274-283.
18. 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. // *Environmental and molecular mutagenesis*. — 2007. — Vol. 40. — P. 101-109.
19. Thomas P., Holland N., Bolognesi C. et al. Buccal micronucleus cytome assay. // *Nat Protoc.* — 2009. — Vol. 4, № 6. — P. 825-837.
20. Teo T., Fenech M. The interactive effect of alcohol and folic acid on genome stability in human WIL2-NS cells measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. // *Mutat Res.* — 2008. — № 12.
21. Torres-Bugarin O., Venture-Aguilar A., Zamora-Perez A. et al. Evaluation of cisplatin +5-FU, carboplatin+5-FU, and ifosmide+epirubicin regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. // *Mutat Res.* — 2003. — Vol. 5, № 539 (1-2). — P. 177-186.
22. Yildirim I. H., Yesilada E., Yologlu S. Micronucleus Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes and Exfoliated Buccal Cells of Untreated Cancer Patients // *Genetika*. — 2006/V/42, № 5. — P. 705-710.