

Анализ частоты TCR-мутантных лимфоцитов у больных колоректальным раком до лечения

Орлова Н.В., Смирнова С.Г., Рухадзе Г.О., Ерыгин Д.В., Бердов Б.А.,
Лозебной Н.И., Саенко А.С., Замулаева И.А.

ФГБУ МРНЦ Минздрава России, Обнинск

Проведён сравнительный анализ частоты лимфоцитов, мутантных по локусу Т-клеточного рецептора (TCR), у больных колоректальным раком до лечения и контрольных лиц. Частота мутантных клеток у больных до лечения была статистически значимо выше таковой у контрольных здоровых лиц ($p=0,02$). Показано, что 24% онкологических больных до лечения имеют повышенные частоты мутантных клеток, что сопоставимо с результатами, полученными для ряда опухолей других локализаций. Не выявлено корреляции частоты мутантных клеток со стадией заболевания и локализацией первичного очага. Повышенная частота TCR-мутантных лимфоцитов у части больных колоректальным раком до лечения свидетельствует о возможности применения данного показателя соматического мутагенеза для оценки риска возникновения колоректального рака.

Ключевые слова: колоректальный рак, соматический мутагенез, Т-клеточный рецептор, нестабильность генома.

Введение

Поиск эффективных биомаркеров канцерогенного риска продолжает оставаться актуальной проблемой онкологии на протяжении многих лет. В последнее время значимость этой проблемы не только не уменьшается, но всё больше возрастает в связи с увеличением онкологической заболеваемости во всём мире. Основой для решения этой проблемы являются фундаментальные знания о закономерностях и механизмах канцерогенеза, в том числе ключевого процесса в ходе злокачественной трансформации клеток – соматического мутагенеза. В частности, принято считать, что колоректальный канцерогенез связан с двумя формами нестабильности генома – хромосомной и микросателлитной [12, 16].

Фенотип хромосомной нестабильности, обнаруживаемый в 85% злокачественных новообразований различных отделов толстой кишки, характеризуется анеуплоидией и множественными хромосомными перестройками. Фенотип микросателлитной нестабильности найден примерно в 15% злокачественных новообразований. Он связан с небольшими по размеру, но многочисленными инсерциями и делециями, главным образом, в повторяющихся последовательностях нуклеотидов, при этом опухолевые клетки остаются диплоидными, но имеют множество генных мутаций. Часть опухолей с микросателлитной нестабильностью содержит наследственные мутации в генах репарации не спаренных оснований (синдром Линча), что и является причиной такой нестабильности. У части больных причиной микросателлитной нестабильности является гиперметилирование промоторов соответствующих генов репарации (в основном *MLH1*). Только небольшая часть (около 1%) всех колоректальных раков имеет признаки нестабильности генома обоих типов одновременно.

Орлова Н.В.* – ст. научн. сотр., к.б.н.; Смирнова С.Г. – ст. научн. сотр., к.б.н.; Рухадзе Г.О. – научн. сотр.; Ерыгин Д.В. – ст. научн. сотр., к.м.н.; Бердов Б.А. – зам. директора по научн. работе, д.м.н., профессор; Лозебной Н.И. – аспирант; Замулаева И.А. – зав. лаб., д.б.н., профессор. ФГБУ МРНЦ Минздрава России.

*Контакты: 249036, Калужская обл., Обнинск, ул. Королева, 4. Тел.: (48439) 9-77-81; e-mail: nina.orlov2010@yandex.ru.

Как было показано в 90-е годы прошлого века, мутагенез нормальных соматических клеток (лимфоцитов периферической крови) больных колоректальным раком характеризуется высокой частотой структурных мутаций (хромосомных aberrаций) по сравнению с таковой у здоровых лиц [11, 19]. Кроме того, лимфоциты больных обладают более высокой чувствительностью к разнообразным повреждающим агентам, чем лимфоциты здоровых лиц [9, 19]. Поэтому было сделано предположение о возможности использования частоты структурных мутаций в лимфоцитах в качестве биомаркера канцерогенного риска. Это предположение в дальнейшем было подтверждено в результате проспективных исследований онкологической заболеваемости, включая рак желудочно-кишечного тракта, у лиц с разной частотой структурных мутаций [17].

В то же время в отдельном исследовании соматического мутагенеза у больных колоректальным раком с микросателлитной нестабильностью было установлено отсутствие различий частоты структурных мутаций в лимфоцитах больных и здоровых лиц [14], что неудивительно, учитывая механизмы формирования таких мутаций. Скорее можно предположить, что у таких больных повышается частота генных, а не структурных мутаций, однако ни в этой работе, ни позднее такого анализа не проводилось. Более того, частота генных мутаций в лимфоцитах общей группы больных колоректальным раком также практически не исследована, хотя такая информация представляет несомненный интерес с точки зрения разработки биомаркеров канцерогенного риска. Поэтому целью данной работы является сравнительный анализ частоты генных соматических мутаций в лимфоцитах больных колоректальным раком до лечения и здоровых лиц. Для исследования были выбраны гены Т-клеточного рецептора (T-cell receptor – TCR), которые содержат микросателлитные последовательности, в том числе в кодирующих участках. Кроме того, частота TCR-мутаций является маркером генотоксического действия различных факторов [5, 18] спонтанной [6] и индуцированной [3] генетической нестабильности соматических клеток.

Материалы и методы

Частота TCR-мутантных лимфоцитов была определена у больных раком различных отделов толстой кишки до лечения. Больные находились на лечении в отделении лучевого и хирургического лечения заболеваний абдоминальной области ФГБУ МРНЦ Минздрава России. Было обследовано 55 человек (26 мужчин и 29 женщин) в возрасте от 47 до 88 лет (в среднем 63 года). У 3-х больных установлена I стадия заболевания, у 12-ти – II, у 22-х – III, у 18-ти – IV. 28 пациентов имели диагноз рак прямой кишки, 27 пациентов – рак различных отделов ободочной кишки.

Определение частоты TCR-мутантных клеток проводили по методике, разработанной в начале 90-х годов прошлого века японскими авторами [13] и усовершенствованной нами с целью повышения точности метода [5]. Для идентификации мутантных клеток использовали моноклональные антитела, меченные разными флуорохромами, к CD3, CD4 и HLA-DR (Becton Dickinson Immunocytometry Systems – BDIS, США).

Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (BDIS, США). Компьютерную обработку проводили с использованием программы CellQuestPro (BDIS, США). Частоту мутантных клеток определяли как отношение числа клеток с фенотипом $CD4^+CD3^-HLA-DR^-$ к числу $CD4^+CD3^+$ клеток.

В связи с тем, что частота соматических клеток с мутациями увеличивается с возрастом даже в случае отсутствия генотоксических воздействий, обусловленных неблагоприятными условиями проживания, профессиональным контактом с вредными воздействиями различной природы или другими причинами, в работе выполнен расчёт возрастной нормы частоты TCR-мутантных клеток. Нормальный диапазон частоты TCR-мутантных клеток соответствовал 95%-ному доверительному интервалу, установленному для 455 контрольных здоровых лиц (в возрасте от 14 до 77 лет) с учётом возрастной зависимости, как показано на рис. 1.

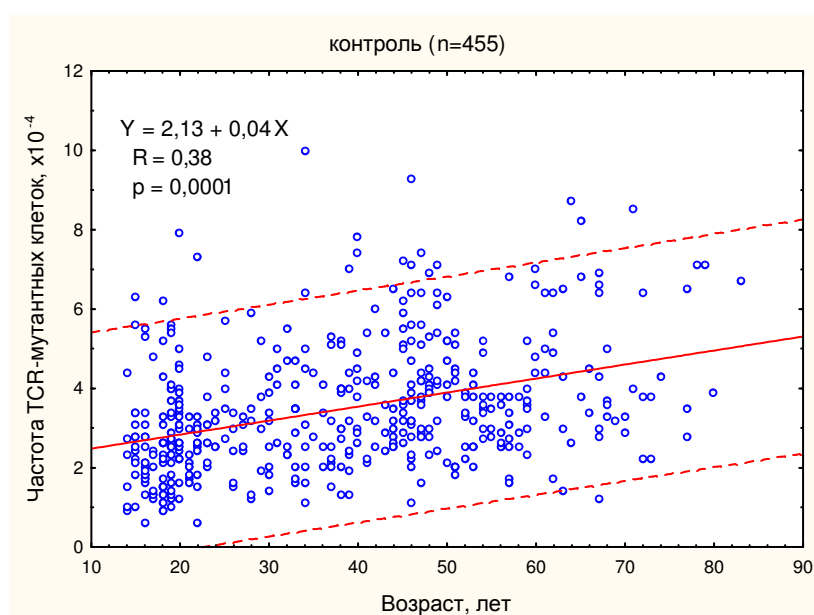


Рис. 1. Зависимость частоты TCR-мутантных клеток от возраста в группе контрольных лиц. Пунктирные линии показывают границы 95%-ного доверительного интервала для частоты мутантных клеток.

Для группового сравнения частот мутантных клеток у онкологических больных и контрольных лиц из вышеупомянутой базы данных была выбрана контрольная группа сходного возраста ($n=73$).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США) для персонального компьютера. Значимость различий частоты мутантных клеток в двух выборках оценивали по критерию Манна-Уитни. Сравнение доли лиц с повышенными частотами мутантных клеток в двух группах проводили с помощью критерия Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлены гистограммы распределения частоты мутантных клеток у обследованных нами онкологических больных и контрольных лиц сходного возраста. Характер распределения частоты мутантных клеток в группе онкологических больных не соответствовал нормальному ($p < 0,05$ по критерию Shapiro-Wilk's W test). Исходя из этого, использовали непараметрические методы статистической обработки данных. У больных колоректальным раком до лечения частоты TCR-мутантных клеток находились в интервале от $0,8 \times 10^{-4}$ до $30,8 \times 10^{-4}$. Медиана составляла $5,3 \times 10^{-4}$, квартили – $(3,7-7,6) \times 10^{-4}$. Не было обнаружено статистически значимых различий частоты мутантных клеток у мужчин ($n=26$) и женщин ($n=29$): $5,5 \times 10^{-4}$ vs $5,3 \times 10^{-4}$, соответственно ($p=0,9$).

В группе контрольных лиц частота мутантных клеток варьировала от $(1,2$ до $8,7) \times 10^{-4}$. Медиана составляла $4,0 \times 10^{-4}$, квартили – $(3,3-6,4) \times 10^{-4}$.

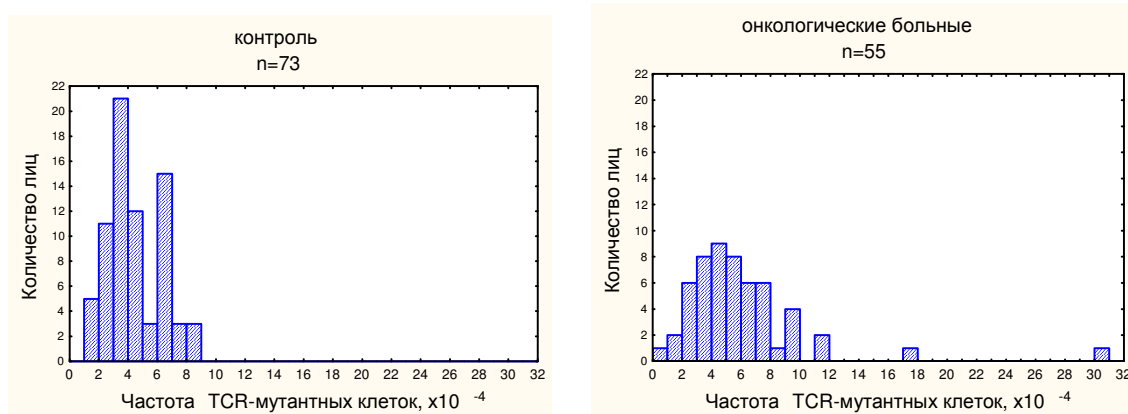


Рис. 2. Гистограмма распределения частоты TCR-мутантных клеток у больных раком толстой кишки до лечения и контрольных здоровых лиц сходного возраста.

По критерию Манна-Уитни частота мутантных клеток у больных до лечения была статистически значимо выше таковой у контрольных лиц ($p=0,02$).

У 24% онкологических больных частота мутантных клеток превышала возрастную норму (95%-ный доверительный интервал, установленный для контрольных лиц с учётом возрастной зависимости). Повышенная частота мутантных клеток встречалась статистически значимо чаще в группе больных, чем здоровых лиц сходного возраста ($p=0,003$). Сходные результаты были получены ранее нами и другими авторами в отношении генных соматических мутаций у онкологических больных с опухолями различных локализаций до лечения [1, 2, 4, 7, 10]. Однако до сих пор были известны лишь единичные данные о частоте генных мутаций в лимфоцитах больных колоректальным раком, полученные к тому же на ограниченной выборке больных [20].

Чтобы выяснить, имеется ли какая-либо связь частоты мутантных клеток со стадией заболевания по системе TNM и локализацией первичного очага все больные были разделены на несколько групп. Результаты, представленные в таблице 1, свидетельствуют об отсутствии значимых различий между выделенными группами как по частоте TCR-мутантных клеток, так и по доле лиц с повышенной частотой таких клеток.

Таблица 1

Частота TCR-мутантных клеток в разных группах онкологических больных

Группы лиц	Число лиц	Частота TCR-мутантных клеток, $\times 10^{-4}$		Доля лиц с повышенными частотами, %
		медиана	квартили	
Контроль	73	4,0	3,3-6,4	5,0
Колоректальный рак (все больные)	55	5,3	3,7-7,6	24,0
T1-T2	15	5,8	4,2-7,8	26,7
T3	22	4,4	3,2-7,0	22,7
T4	18	6,0	4,3-7,6	22,2
N0M0	25	5,7	3,1-6,6	20,0
N+M0	15	5,0	3,6-7,0	20,0
N+M+	13	5,1	4,0-9,0	31,0
Рак прямой кишки	28	5,6	3,7-7,5	25,0
Рак ободочной кишки	27	4,7	3,5-6,5	22,0

Примечание: анализ данных в группе больных на стадии N0M+ не проводился из-за её малочисленности (n=2).

Одно из возможных объяснений повышенной частоты мутантных клеток у онкологических больных до лечения заключается в действии генотоксического фактора (-ов) на организм таких лиц в прошлом. Другая причина может быть связана с наличием у части больных нестабильности генома соматических клеток, обусловленной наследственными или какими-либо иными факторами. Возможно также, что в ответ на наличие опухолевых клеток происходит Т-клеточная активация, приводящая к увеличению частоты мутаций [8]. Наконец, нельзя исключить влияние самого опухолевого процесса (как источника окислительного стресса) на возникновение и элиминацию мутаций. Однако следует отметить, что наши данные об отсутствии увеличения частоты TCR-мутантных лимфоцитов у больных на поздних стадиях заболевания свидетельствуют против последнего предположения, которое довольно активно обсуждается в литературе. Так, в нашем исследовании не установлено различий в частоте мутантных лимфоцитов в группе больных без поражения регионарных лимфатических узлов и отдалённых метастазов (N0M0) по сравнению с остальными больными: 5,7 vs 5,1 ($p=0,67$) соответственно. Хотя, в литературе имеются данные о том, что опухоли с микросателлитной нестабильностью выявляются на более ранних стадиях опухолевого процесса и меньше метастазируют, чем опухоли с хромосомной нестабильностью [15].

Таким образом, в работе показано статистически значимое увеличение частоты TCR-мутантных лимфоцитов у части больных колоректальным раком до лечения по сравнению с таковой у здоровых лиц. Это свидетельствует о возможности применения данного показателя соматического мутагенеза для оценки риска возникновения колоректального рака, однако необходимы дальнейшие исследования для получения прямых доказательств проспективного характера, причём отдельно для опухолей с разными типами нестабильности генома.

Литература

1. **Верещагина А.О., Замулаева И.А., Орлова Н.В. и др.** Частота лимфоцитов, мутантных по генам Т-клеточного рецептора как возможный критерий для формирования группы повышенного риска развития опухолей щитовидной железы у облучённых и необлучённых лиц //Радиационная биология. Радиозэкология. 2005. Т. 45, № 5. С. 581-586.
2. **Замулаева И.А., Смирнова С.Г., Орлова Н.В. и др.** Повышенная частота мутантных по локусам Т-клеточного рецептора и гликофорина А клеток как возможный критерий для формирования группы риска онкологических заболеваний //Российский онкологический журнал. 2001. № 1. С. 23-25.
3. **Замулаева И.А., Орлова Н.В., Смирнова С.Г. и др.** Закономерности соматического мутагенеза у ликвидаторов аварии на ЧАЭС в отдалённые сроки после радиационного воздействия //Радиация и риск. 2006. Т. 15, № 1-2. С. 68-76.
4. **Замулаева И.А., Смирнова С.Г., Орлова Н.В. и др.** Анализ частоты TCR-мутантных лимфоцитов у онкологических больных до и после химиолучевого лечения //Радиация и риск. 2011. Т. 20, № 1. С. 8-18.
5. **Саенко А.С., Замулаева И.А., Смирнова С.Г. и др.** Определение частоты мутаций по локусам гликофорина А и Т-клеточного рецептора: информативность для биологической дозиметрии острого и пролонгированного облучения //Радиационная биология. Радиозэкология. 1998. Т. 38. С. 171-180.
6. **Фогель Ф., Мотульски А.** Генетика человека //Проблемы и подходы /под ред. Алтухова Ю.П., Гиндилиса В.М. М.: Мир, 1990. Т.2. С. 142-277.
7. **Akiyama M., Umeki S., Kusunoki Y. et al.** Somatic-cell mutations as a possible predictor of cancer risk //Health Physics. 1995. V. 68, N 5. P. 643-649.
8. **Albertini R.J.** HPRT mutations in humans: biomarkers for mechanistic studies //Mutat. Res. 2001. V. 489, N 1. P. 1-16.
9. **Baria K., Warren C., Roberts S.A. et al.** Chromosomal radiosensitivity as a marker of predisposition to common cancers? //Br. J. Cancer. 2001. V. 84, N 7. P. 892-896.
10. **Caggana M., Liber H.L., Mauch P.M. et al.** In vivo somatic mutation in the lymphocytes of Hodgkin's disease patients //Environ. Mol. Mutagen. 1991. V. 18, N 1. P. 6-13.
11. **Fireman Z., Shabtai F., Lurie B.** Chromosome sensitivity to bleomycin-induced mutagenesis in lymphocytes from colorectal cancer patients under 40 years of age //Dis. Colon. Rectum. 1994. V. 37, N 12. P. 1317-1320.
12. **Imai K., Yamamoto H.** Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics //Carcinogenesis. 2008. V. 29, N 4. P. 673-680.
13. **Kyoizumi S., Akiyama M., Hirai Y. et al.** Spontaneous loss and alteration of antigen receptor expression in mature CD4+ T cells //J. Exp. Med. 1990. V. 171. P. 1981-1999.
14. **Lindor N.M., Jalal S.M., Van DeWalker T.J. et al.** Search for chromosome instability in lymphocytes with germ-line mutations in DNA mismatch repair genes //Cancer Genet. Cytogenet. 1998. V. 104, N 1. P. 48-51.
15. **Lynch H.T., Drescher K.M., de la Chapelle A.** Immunology and the Lynch Syndrome //Gastroenterology. 2008. V. 134, N 4. P. 1246-1249.
16. **De Miranda N.F., Hes F.J., van Wezel T., Morreau H.** Role of the microenvironment in the tumorigenesis of microsatellite unstable and MUTYH-associated polyposis colorectal cancers //Mutagenesis. 2012. V. 27, N 2. P. 247-253.
17. **Norppa H., Bonassi S., Hansteen I.L. et al.** Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk //Mutat. Res. 2006. V. 600, N 1-2. P. 37-45.

18. **Saenko A.S., Zamulaeva I.A., Smirnova S.G. et al.** Determination of somatic mutant frequencies at glyco-phorin A and T-cell receptor loci for biodosimetry of acute and prolonged irradiation //Applied Radiation and Isotopes. 2000. V. 52, N 5. P. 1145-1148.
19. **Saxena A.K., Agarwal C.S., Kumar M. et al.** Spontaneous unusual expression of frequency of chromosome aberrations and common fragile in human lymphocytes of colorectal cancer patients induced by Aphidicolin //J. Exp. Ther. Oncol. 2007. V. 6, N 2. P. 175-179.
20. **Uematsu K., Yasuda J., Sekine T. et al.** A new T-lymphocyte cloning assay for detection of in vivo muta-tions in the human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene //Environ. Mol. Mutagen. 1997. V. 30, N 1. P. 31-39.

Analysis of TCR-mutant lymphocyte frequency in patients with colorectal cancers

**Orlova N.V., Smirnova S.G., Rukhadze G.O., Erygin D.V., Berdov B.A.,
Lozebnoy N.I., Saenko A.S., Zamulaeva I.A.**

Medical Radiological Research Center of the Russian Ministry of Health, Obninsk

Comparative analysis of frequency of lymphocytes, bearing mutations at T-cell receptor locus (TCR), in patients with colorectal cancers was conducted. Frequency of mutant cells in patients prior to the treatment was significantly higher than that in control healthy persons ($p=0.02$). It was shown that 24% of patients before the treatment had increased level of mutant cells, it is comparable with the level in patients bearing malignant tumors of other localizations. No association of mutant cells frequency with stage of the disease and the localization of the primary tumor was found. The increased level of TCR-mutant lymphocytes in some patients with colorectal cancer before the treatment is supposed to be considered as prognostic marker of colorectal cancer risk.

Keywords: *colorectal cancer, somatic mutagenesis, T-cell receptor, genome instability.*

Orlova N.V.* – Senior Researcher, C. Sc., Biol.; **Smirnova S.G.** – Senior Researcher, C. Sc., Biol.; **Rukhadze G.O.** – Research Assistant; **Erygin D.V.** – Senior Researcher, C. Sc., Med.; **Berdov B.A.** – Deputy Director, MD, Prof; **Lozebnoy N.I.** – Postgraduate Student; **Zamulaeva I.A.** – Head of Lab., D.Sc., Biol., Prof. MRRC.

*Contacts: 4 Korolyov str., Obninsk, Kaluga region, Russia, 249036. Tel.: (48439) 9-77-81; e-mail: nina.orlov2010@yandex.ru.