

УДК [616.345:616.348]-006.6:574.2

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗВИТИЯ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

© 2005 г. Н. В. Голясная, *Н. К. Жижин, **Е. С. Патлусова

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,

*Государственная медицинская академия ГОУ ВПО,

**Областная детская клиническая больница, г. Пермь

Наибольшая частота заболеваний колоректальным раком (КРР) отмечается в индустриально развитых странах Западной Европы и Северной Америки, а в Южной Азии и экваториальной Африке это заболевание встречается крайне редко [14]. По данным Онкологического научного центра РАМН, в 1960 году было зарегистрировано 5 007 больных с впервые установленным диагнозом КРР, а к 1992 году их число увеличилось более чем в 7 раз и составило 37 999. В России КРР наблюдается значительно чаще в крупных индустриальных центрах, чем в сельской местности [1].

Заболеваемость раком ободочной кишки в Пермской области прослежена нами за 37 лет (с 1965 по 2002 год). Клинико-эпидемиологический показатель заболеваемости КРР за рассматриваемый период вырос более чем в 4 раза — с 4,2 на 100 000 населения в 1965 году до 16,3 в 2002-м. Ежегодный прирост равен 11,4 %. Экологическим фактором, стимулирующим инициацию КРР, считается диета с низким содержанием растительной клетчатки и высоким содержанием жиров. В 5 % случаев заболевание связано с генетическими аномалиями в хромосомах 17 или 18 и в 30 % случаев вызвано соматическими мутациями в генах системы репарации некорректно спаренных оснований ДНК, или мисметч-репарацией [8, 14]. Дефекты мисметч-репарации сопровождаются нарушением механизма контроля цикла клеточного деления, аномальной конфигурацией хромосом и анеуплоидным набором хромосом в клетке.

Принимая во внимание такие известные характеристики дефектных по мисметч-репарации соматических клеток, как резистентность к алкилирующим соединениям [9], высокая частота спонтанных мутаций и аномальные хромосомальные характеристики клеток [10], с целью выявления наследственной формы КРР проведена работа, в которой были поставлены следующие задачи: получить первичные культуры клеток нормальной и трансформированной ткани десяти больных КРР; изучить резистентность клеток к циклофосфамиду (ЦФ), комбинированному действию ультрафиолета (УФ) и 5-бромурацилу (БУДР); провести цитологический анализ клеток нормальной (N) и трансформированной (С) линий; гистологически исследовать образцы тканей больных.

Методы исследования

Для получения первичных культур клеток у каждого из десяти больных КРР брали фрагмент опухолевой или нормальной (на расстоянии 10 см от опухоли) ткани и в стерильных условиях подвергали как механической, так и ферментативной (трипсин 0,25 %) дезагрегации, используя стандартный метод [3, 15]. Получали гистологические препараты нормальной и трансформированной ткани и окрашивали их также стандартными методами [5, 6].

В статье проанализирован клинико-эпидемиологический показатель роста колоректального рака (КРР) в Пермской области за 37 лет. Цитологический и гистологический анализ послеоперационного материала больных с КРР и изучение чувствительности к циклофосфамиду, 5-бромурацилу в сочетании с ультрафиолетовым излучением клеток трансформированной и нормальной ткани толстой кишки позволили предположить, что в одном из десяти случаев возможна генетически обусловленная предрасположенность к развитию КРР.

Ключевые слова: колоректальный рак, хромосомные aberrации, митотическая активность, полиплоидные клетки, циклофосфамид, 5-бромурацил, ультрафиолетовое излучение.

В первом экспериментальном варианте клетки, обработанные БУДР (в конечной концентрации 50 мкг/мл), облучали УФ в течение 20 сек. При облучении они находились на расстоянии 30 см от источника УФ-света. После облучения клетки инкубировали в течение 48 ч при 37 °С. Во втором экспериментальном варианте клетки инкубировали с циклофосфамидом (Sigma, США) — 100 мкг/мл в течение 48 ч при 37 °С. Обработанные колхицином, фиксированные и окрашенные по стандартной методике [3] клетки исследовали под микроскопом при 1000-кратном увеличении. Колонеобразующую активность клеткок оценивали по стандартному методу [11].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением критерия Стьюдента [4].

Результаты

Первичный гистологический анализ образцов N-тканей не выявил изменений морфологических характеристик клеток. Результаты гистологического анализа опухолевой ткани приведены в табл. 1. Во всех микропрепаратах наблюдается процесс метаплазии, а также имеются признаки дисплазии эпителия толстой кишки: увеличение размеров ядра, появление нуклеол; изменение ядерно-цитоплазматического соотношения; утрата базальной ориентации ядер; нарастание полиморфизма клеток и ядер; повышение митотической активности; появление признаков структурной атипии (сосочковые выросты и крибозы в железистых структурах); нарастание многоядерности эпителиального пласта (рис. 1).

Таблица 1

Результаты гистологического анализа трансформированной ткани больных колоректальным раком

Больной	Морфологические показатели
1	Низкодифференцированная аденокарцинома, диффузный рост с наличием перстневидных клеток, полостей заполненных слизью, крибровые и солидные структуры, расположенные среди плотной волокнистой ткани
2	Низкодифференцированная аденокарцинома, инвазивный рост, наличие большого количества митозов. Массивные некрозы. Опухоль прорастает всю толщу стенки кишки
3	Умеренно дифференцированная аденокарцинома с элементами высокой степени дифференциации с наличием перстневидных клеток и формированием полостей со слизью. Инфильтрирующий рост с началом инвазии в мышечную стенку и хорошо выраженной лимфоцитарной инфильтрацией на границе опухоли и здоровой ткани
4	Умеренно дифференцированная аденокарцинома с элементами слизистого рака
5	Умеренно дифференцированная аденокарцинома с наличием крибровых структур, выраженный клеточный атипизм, наличие митозов атипичного характера. Сигмовидная кишка
6	Умеренно дифференцированная аденокарцинома. Диффузный рост. Наличие митозов, ядрышек в клетках. Опухоль растет и прорастает всю стенку кишки
7	Умеренно дифференцированная аденокарцинома, инфильтрированный рост с некрозом опухолевой ткани. Опухоль прорастает в сосуды
8	Высокодифференцированная аденокарцинома, эпителий кишечника тесно расположен, железы образованы атипичным эпителием, формируют комплексы и поля, тип роста инфильтрирующий. Выражены изменения (некрозы). Ядра разные, хроматин виден, ядра на разном уровне
9	Низкодифференцированная аденокарцинома, наличие большого количества митозов
10	Жировая ткань в виде долек с элементами соединительной ткани

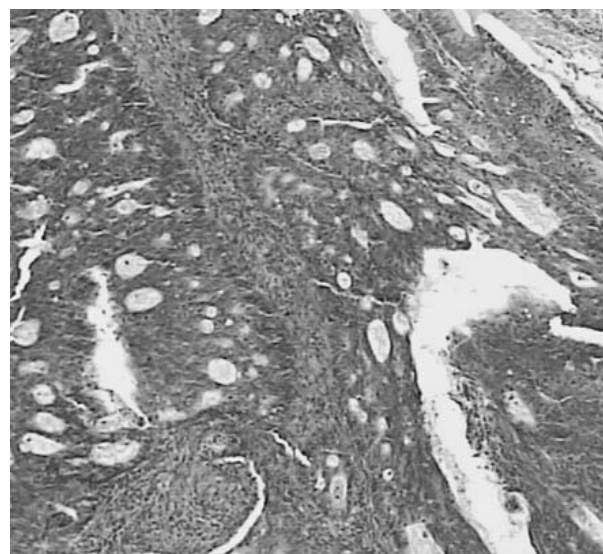


Рис. 1. Умеренно дифференцированная аденокарцинома с элементами высокой степени дифференциации, наличием перстневидных клеток и формированием полостей со слизью. Инфильтрирующий рост с началом инвазии в мышечную стенку и хорошо выраженной лимфоцитарной инфильтрацией на границе опухоли и здоровой ткани (больной 3)

Экспериментальные данные показали, что высокая колонеобразующая активность клеток культуры, полученной из нетрансформированной ткани кишечника, наблюдается у больных 1 и 2 с низкодифференцированной и у больного 8 с высокодифференцированной аденокарциномой (табл. 2). Отличительной особенностью культур N-клеток больных 1 и 2 является усиление колонеобразующей активности при воздействии УФ+БУДР. Согласно гистологическим исследованиям, в ткани низкодифференцированной аденокарциномы больного 2, присутствует большое количество митозов (см. табл. 1).

Таблица 2

Колонеобразующая активность клеток нетрансформированной и трансформированной ткани больных колоректальным раком

Больной	Колонеобразование					
	Нетрансформированная ткань			Трансформированная ткань		
	Контроль	ЦФ	УФ+БУДР	Контроль	ЦФ	УФ+БУДР
1	1±0,5	0	17±0,9	0	0	0
2	23±0	0	12±3,5	217±10	0	243±17
3	0	0	60±15	3,4±0,6	12±6	187,3±23,9
4	0	0	0	3±1,5	0	220±14
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	46
7	0	0	0	0	0	0
8	14,3±0,7	0	0	0	0	97±5
9	0	0	0	0	0	0
10	0	3,4±0,2	263±13	8±0,4	0	288±29

Резистентные к алкилирующему соединению N-клетки получены из нетрансформированной ткани больного 3 с умеренно дифференцированной аденокарциномой. Кроме резистентности к циклофосфамиду культура N-клеток больного 3 обладает резистентностью к воздействию УФ с БУДР, о чем свидетельствует повышение колонеобразующей активности

клеток после комбинированной обработки ультрафиолетовым излучением и БУДР (см. табл. 2).

Совместное действие ультрафиолетового излучения и БУДР усиливает колонеобразующую активность пяти линий клеток, полученных из трансформированных тканей больных 3, 4, 6, 8 и 10. Резистентность к алкилирующему соединению отмечена только в одной культуре клеток — умеренно дифференцированной аденокарциноме (больной 3) с элементами высокой степени дифференциации и присутствием «перстневидных» клеток, выявленных в результате гистологического анализа (см. табл. 2).

В результате цитологического исследования было установлено, что культуры клеток, полученные из не-трансформированной ткани, имеют высокую митотическую активность (табл. 3). Среди геномных аномалий наиболее часто встречается анеуплоидия. Количество метафазных пластинок с набором хромосом от 37 до 47 составляет от 3 до 5 % в культурах N-клеток, полученных от больных с умеренно дифференцированной аденокарциномой с наличием перстневидных клеток (больной 3) и низкодифференцированной аденокарциномой с инвазивным ростом и наличием ядерного полиморфизма (больной 2) (см. табл. 3).

Таблица 3

Результаты цитологического анализа клеток нетрансформированной ткани больных колоректальным раком

Больной	Размер клеток, мкм	Клетки с хромосомными aberrациями, %	Полиплоидные клетки, %	Митотическая активность, %
1	$\varnothing=8,7\pm0,4$ h=20±0	2,7 ± 0,05	2,2 ± 0,1	22,3 ± 0,1
2	$\varnothing=3\pm0,1$	5,2 ± 0,02	3,8 ± 0,2	18,5 ± 0,5
3	$\varnothing=8,8\pm0,4$ h=35,1±0,3	3,1 ± 0,3	5,1 ± 0,4	98,0 ± 5
4	$\varnothing=3\pm0,1$	1,1 ± 0,02	6,2 ± 0,6	13,4 ± 0,7
5	$\varnothing=6\pm0$	7,3 ± 0,7	4,4 ± 0,4	62 ± 3
6	$\varnothing=14,4\pm0,2$	0,8 ± 0,04	3,6 ± 0,3	10,0 ± 0,5
7	$\varnothing=12,6\pm0,6$	4,2 ± 0,02	5,0 ± 0,3	7 ± 0,4
8	$\varnothing=10,5\pm0,5$	2,3 ± 0,1	5,2 ± 0,3	34,3 ± 2
9	$\varnothing=8,2\pm0,4$	0,5 ± 0,5	6,9 ± 0,6	55,2 ± 0,2
10	$\varnothing=7,8\pm0,4$	3,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5	44,8 ± 2,4

Примечание. Ш — диаметр клеток первичной культуры; h — длина клетки первичной культуры.

Среди aberrаций хроматидного типа в клетках N-типа встречаются дицентрики (рис. 2А) и хромосомы с аномальной конфигурацией (рис. 2Б), которые достаточно часто встречаются в клетках, полученных из С-ткани. Общей характеристикой таких клеток является высокая митотическая активность и большое количество полиплоидных клеток (рис. 3А).

В двух случаях (больные 1 и 3) в цитологических и гистологических препаратах культур С-клеток обнаружены перстневидные клетки. Однако индивидуальные биопараметрические характеристики перстневидных клеток из аденокарцином с различной степенью дифференциации также различны (рис. 3Б, В).

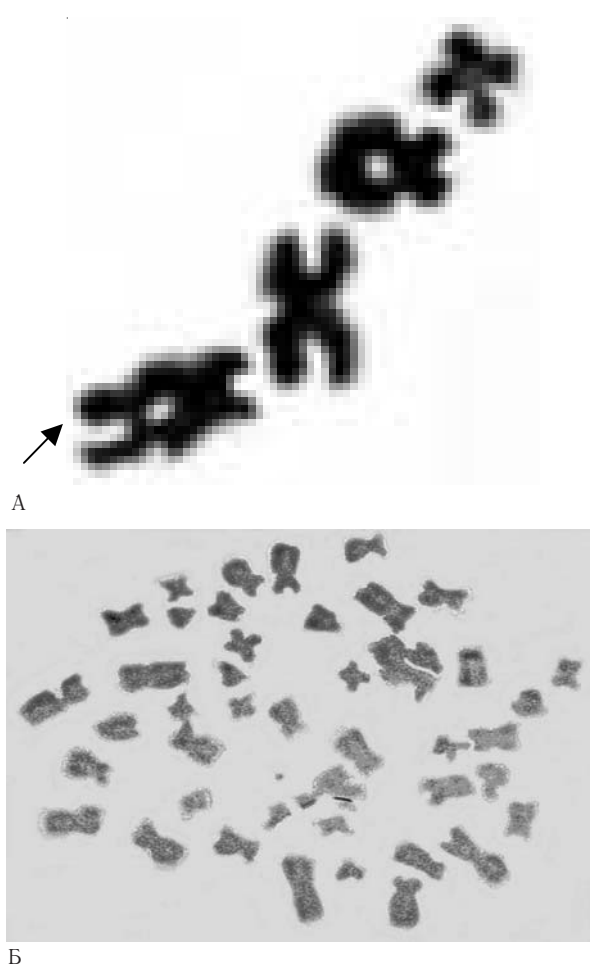


Рис. 2. Хромосомные aberrации в N-клетках: А — дицентрик, Б — хроматидная делеция и хромосома с аномальной конфигурацией

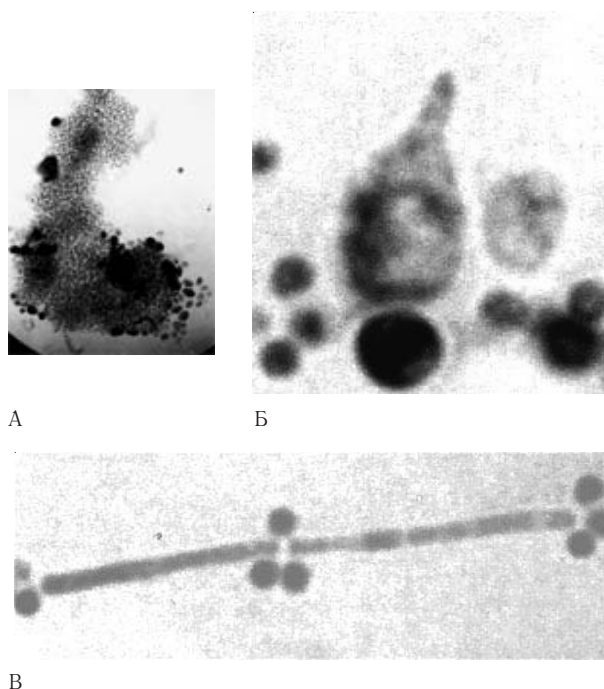


Рис. 3. Культура клеток из трансформированной ткани: А — полиплоидная клетка; Б — перстневидная клетка (больной 1); В — перстневидная клетка (больной 3)

Обсуждение

В течение последних десятилетий увеличился риск генотоксического действия факторов, загрязняющих окружающую среду в индустриально развитых странах. Несмотря на то, что факт загрязнения объектов окружающей среды мутагенами и канцерогенами хорошо доказан, в основном сложно оценить реальное биологическое значение ДНК-повреждающих факторов для здоровья человека, поэтому вопрос генотоксического действия загрязняющих окружающую среду компонентов промышленности остается спорным. Факты свидетельствуют о том, что вещества, обладающие канцерогенной или мутагенной активностью, иначе промоторы процесса канцерогенеза, поступают в организм человека по пищевым цепочкам, с питьевой водой или в процессе профессиональной деятельности [13].

Для Пермской области актуальным остается химическое и радиационное загрязнение объектов окружающей среды. На ее территории расположены крупные предприятия химической промышленности, кроме того, проведено 10 ядерных взрывов: 7 для оптимизации извлечения нефти и 3 для соединения рек севера области (1971 — 1972 гг.). В результате в области через 30 лет отмечен рост онкологической заболеваемости. Доминируют поражения легких, желудка, молочной железы. В структуре онкологической заболеваемости Пермской области КРР занимает третье место.

Неоднозначность проблемы влияния экологических факторов на здоровье человека проявляется в вопросах наследственной предрасположенности к различным видам карцином, которые в 15 % случаев связаны с генетическими дефектами [14]. Одним из примеров наследственной предрасположенности к онкологическим заболеваниям является колоректальный рак [8], который с разной частотой развивается при возникновении предраковых заболеваний (семейные синдромы Гарднера, Тюрко, Пейтца — Егерса и др.), а также при заболеваниях неполипозного характера (неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, дивертикулез, инфекционные колиты, наследственный неполипозный колоректальный рак) [2, 7, 8].

В случае наследственно детерминированной предрасположенности к КРР мутантные гены мисметч-репарации в соматических клетках человека стимулируют нестабильность микросателлитной последовательности и формируют мутаторный фенотип клеток. Клетки с мутаторным фенотипом характеризуются высокой частотой генетических изменений [12, 16].

Результаты проведенной работы показали, что наличие митозов в гистологических препаратах, высокая митотическая активность клеток в культуре, наличие анеуплоидных и полиплоидных клеток и присутствие хромосомных aberrаций являются общими характеристиками для клеток, резистентных к УФ и БУДР. Резистентность к УФ и БУДР пяти из десяти первичных культур С-клеток может быть обусловлена дефектами

мисметч-репарации. Наличие колонеобразующей активности клеток контрольного варианта этих культур подтверждает сделанное предположение. Резистентность как к УФ и БУДР, так и к циклофосфамиду позволяет допустить функционирование генов мутаторов мисметч-репарации (одна линия клеток из пяти).

Резистентность клеток нетрансформированной ткани к продуктам реакции алкилирования оснований ДНК циклофосфамидом или к таким индуцированным УФ и БУДР повреждениям ДНК, как циклобутановые пиримидиновые димеры, (6-4) фотопродукты, тимингликоль, формилурацил, одно-, двунитевые разрывы и другие, дает основание предположить, что факторами, стимулирующими канцерогенез, могут быть соединения, алкилирующие или окисляющие основания ДНК. Данные высокой частоты клеток с хромосомными aberrациями, анеуплоидным набором хромосом в культурах клеток нетрансформированной ткани больного 3, резистентной к комбинированному действию УФ и БУДР и циклофосфамиду, подтверждают предположение.

Сопоставление полученных экспериментальных данных с известными фактами нарушения механизма контроля цикла клеточного деления, аномальной конфигурацией хромосом, трисомией и анеуплоидностью клеток эукариот, дефектных по мисметч-репарации, позволило предположить, что в одном из десяти случаев КРР клетки здоровой ткани кишечника, характеризующиеся высокой частотой спонтанных хромосомных aberrаций, могут иметь дефект системы мисметч-репарации. Согласно полученным данным, степень дифференциации аденокарциномы не отражает принадлежности к наследственно детерминированному типу заболевания, так как пять аденокарцином отличаются по степени дифференциации — низко-, умеренно-, высокодифференцированная (1, 3 и 1 случай соответственно). Основными факторами, стимулирующими процесс мутагенеза в этих клетках, являются алкилирующие соединения и окислители, которые могут быть не только эндогенного, но и экзогенного происхождения.

Список литературы

1. Воробьев Г. И. Диагностика и лечение рака толстой кишки / Г. И. Воробьев, Т. С. Одарюк, Ю. А. Шельгин // Рус. мед. журнал. — 1998. — Т. 6, № 19. — С. 94—98.
2. Капуллер Л. Л. Опухоли кишечника / Л. Л. Капуллер, П. Ф. Калитеевский // Патологоанатомическая диагностика опухолей человека. — М.: Медицина, 1993. — Т. 2. — С. 46—69.
3. Клаус Дж. Лимфоциты. Методы / Дж. Клаус. — М.: Мир, 1990. — 396 с.
4. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. — М.: Высшая школа, 1990. — 344 с.
5. Меркулов Г. А. Курс гистологической и патологоанатомической техники / Г. А. Меркулов. — Л.: Медгиз, 1963. — 339 с.
6. Саркисов Д. С. Руководство по микроскопической технике / Д. С. Саркисов, Ю. П. Перов. — М.: Медгиз, 1996. — 544 с.

7. Шулепова Ю. О. Скрининг колоректального рака / Ю. О. Шулепова // РЖГГК. — 2002. — № 4. — С. 64—65.

8. Aaltonen L. A. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer / L. A. Aaltonen, P. Peltomäki, F. S. Leach et al. // Science. — 1993. — Vol. 260. — P. 812—816.

9. Aebi S. Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells / S. Aebi, D. Fink, R. Gordon, H. K. Kim et al. // Clin. Cancer Res. 1997. — Vol. 3, N 10. — P. 1763—1767.

10. Bhattacharya N. P. Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines / N. P. Bhattacharya, A. Skandalis, A. Ganesh et al. // Proc. Natl. Acad. Sci USA. — 1994. — Vol. 91. — P. 6319—6323.

11. Brennan J. K. Exceptional responsiveness of certain human myeloid leukemia cells to colony-stimulating activity / J. K. Brennan, J. F. Di Persio, C. N. Abboud, M. A. Lichtman // Blood. — 1979. — Vol. 54. — P. 1230—1239.

12. Cheng K. C. Genomic instability and tumour progression: mechanistic considerations / K. C. Cheng, L. A. Loeb // Advances in cancer research / Ed.: Woude V.G.F., Klein G. — San Diego: Academ. Press Inc., 1993. — Vol. 60. — P. 121—156.

13. Cooper C. S. Chemical carcinogenesis and mutagenesis / C. S. Cooper, P. L. Crover. — Berlin, KC: Springer-Verlag, 1990. — 348 p.

14. Fishel R. Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer / R. Fishel, R. D. Kolodner // Cur. Opin. Genet. Develop. — 1995. — N 5. — P. 382—395.

15. Mather J. P. Mammalian cell culture. (The use of

serum-free hormone — supplemented media) / J. P. Mather. — N. Y.; London: Plenum Press, 1984. — P. 113—115.

16. Radman M. DNA methylation, mismatch correction and genetic stability / M. Radman, R. E. Wagner, R. W. Glickman, M. Meselson // Progress in environmental mutagenesis / Ed.: Alacevic M. — Amsterdam: Elsevier/North Hol. Biom. Press, 1984. — P. 121—130.

ECOLOGICAL AND GENETIC ASPECTS OF COLORECTAL CANCER DEVELOPMENT

N. V. Golyasnaya, *N. K. Zhizhin, **E. S. Patlusova

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
Ural Branch RAS,*

**State Medical Academy,*

***Regional Children's Clinical Hospital, Perm*

In the article, the clinical-epidemiological index of a colorectal cancer (CRC) increase in the Perm region during 37 years has been analyzed. A cytological and histological analysis of postoperative materials from patients with CRC and study of sensitivity to cyclophosphamide, 5-bromuracil in combination with ultraviolet radiation of cells of rectum normal and transformed tissue allowed to suppose that in one of ten cases, genetically caused predisposition to CRC development is possible.

Key words: colorectal cancer, chromosome aberrations, mitotic activity, polyploid cells, cyclophosphamide, 5-bromuracil, ultraviolet radiation.