

УДК: 616.831-006.484:576.312.32.38:575:615.15:616.155.32

О.В. Коваленко**ЧАСТОТА АБЕРАЦІЙ ХРОМОСОМ В КУЛЬТУРІ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ НА ПУХЛИНИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ПРИ ДІЇ МІТОМІЦИНУ***Київський національний університет ім. Т. Г. Шевченка*

Коваленко О.В. Частота аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові хворих на пухлини головного мозку при дії мітоміцину // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 3. – С. 51-55.

В статті приведені результати аналізу частоти аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові хворих на пухлини головного мозку при дії мітоміцину. Автор підкреслює, що отримані дані відносно кількості анеуплоїдних клітин у хворих з доброякісними та злоякісними пухлинами достовірно відрізняються, що не суперечить даним, отриманим іншими дослідниками.

Ключові слова: аберації хромосом, периферична кров, пухлина головного мозку, мітоміцин

Коваленко О.В. Частота аберацій хромосом в культурі лимфоцитов периферической крови больных с опухолями головного мозга при действии митомитина // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 3. – С. 51-55.

В статье приведены результаты анализа частоты аберацій хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови больных с опухолями головного мозга при действии митомитина. Автор подчеркивает, что полученные данные относительно количества анеуплоидных клеток у больных с доброкачественными и злокачественными опухолями достоверно отличаются, что не противоречит данным, полученным другими исследователями.

Ключевые слова: аберации хромосомы, периферическая кровь, опухоль головного мозга, митомитин

Kovalenko O. V. Frequency of chromosome aberrations in the culture of lymphocytes in peripheral blood of patients with brain tumors under the action of mitomycin // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 3. – С. 51-55.

The article presents the results of the analysis of frequency of chromosome aberrations in the culture of lymphocytes in peripheral blood of patients with brain tumors under the action of mitomycin. The author emphasizes that the obtained data concerning the number of aneuploid cells in patients with benign and malignant tumors significantly differ, that does not contradict the data obtained by other researchers.

Key words: chromosome aberrations, peripheral blood, brain tumor, mitomycin

Постановка проблеми. Однією з найбільш актуальних проблем сучасності є забруднення навколишнього середовища мутагенними факторами, які обумовлюють цілу низку несприятливих генетичних наслідків. До недавнього часу найбільш вивченим фактором була радіація. Однак, людина стикається з багатьма хімічними сполуками, широким розповсюдженням в промисловості, сільському господарстві, медицині та побуті. Зростання хімічної промисловості у всіх країнах світу призводить до постійного збільшення частоти контактів людини з чужорідними ксенобіотиками. Достеменно відомо, що багатьом хімічним сполукам притаманна мутагенна дія, яка не поступається дії іонізуючого опромінення, а в деяких випадках – перевищує останню. Потенційна небезпека багатьох хімічних мутагенів обтяжується тією обставиною, що як і для радіаційного впливу, гранично допустимі концентрації (ГДК) для них не існують, тобто поріг дії практично відсутній. Крім того, в навколишньому середовищі присутня значна кількість токсичних речовин, які не можуть викликати мутації, але суттєво посилюють генотоксичну дію інших хімічних речовин.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. З літературних джерел відомо, що більшість злоякісних пухлин у людини (приблизно 80 %) викликані хімічними канцерогенами, до яких відносяться і деякі генетично активні пестициди і, зокрема, – стійкі хлороганічні сполуки (L. Goldman, A. Sandberg). Існує декілька типів цитогенетичних порушень, роль яких у канцерогенезі активно обговорюється в наш час. Це – хромосомні аберації,

мікроядра, анеуплоїдія, сестринські хроматидні обміни. З позиції генетичної нестабільності ракових клітин оцінюються і якісно нові ступені розвитку пухлини, що зв'язані з її прогресією (пов'язані з мутаціями). Показано, що біологічна прогресія пухлини та набування нею нових клінічних якостей, ведуть до мутацій у клітинах таких, як агресивність та більша злоякісність, є відображенням збільшення генетичних порушень у субпопуляціях клітин із змінними характеристиками. Крім того, цитогенетичні кількісні (гетероплоїдія) та якісні (структурні) порушення каріотипу клітин є маркерами не тільки ступеню злоякісності пухлини, але і прогнозу захворювань (Р. Якубовська, 2000; J. Kern, 1993; J. Lasutka et al., 1999; R. Lernia et al., 1987; С. Limoli et al., 1997). Оскільки відомості про сумарний внесок мутагенних факторів різної природи в індукцію онкопатології у людини недостатні, актуальним стає проведення комплексних генетико-гігієнічних досліджень серед різних груп населення (А. Курінний, 1986; Ю. Зозуля, Н. Грідіна, 1998; Ю. Рєвазова, В. Журков, 2001). Появі злоякісних пухлин мозку можуть сприяти різні фактори (γ-опромінення, ендогенні мутагени, деякі харчові добавки та, можливо, черепно-мозкові травми), ряд яких мають генотоксичні властивості (Ю. Зозуля, Н. Грідіна, 1998; Y. Rodvall, A. Anibom, B. Spannare, 1996).

Отже, **метою статті** є визначення частоти аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові хворих на пухлини головного мозку при дії мітоміцину С.

Результати дослідження та їх обговорення.

Як відомо, для злоякісних пухлин характерне накопичення хромосомних мутацій. Зокрема для багатьох типів пухлин встановлено позитивну кореляцію між мутаціями певних хромосом та проявом пухлинних фенотипів, що свідчить про суттєве значення цих аномалій під час онкогенезу. Наприклад, такий тип хромосомних аберацій, як транслокації супроводжується зміною місця розташування генів, і, як наслідок, появи нових ефекторів (супресорів чи активаторів), які змінюють експресію генів у транслокованих частинах хромосом. Поява генних вставок (інсерцій) також супроводжується зміною експресії генів.

Існує думка, що хромосомні перебудови в індукції канцерогенезу відіграють більшу роль, ніж генні мутації. Це ґрунтується на властивостях деяких канцерогенів не викликати генних мутацій. Згідно статистичних даних при каріотипуванні пухлин, найбільший процент специфічних змін хромосом

становлять делеції та транслокації. В результаті делецій, транслокацій та інших перебудов хромосом може виникати втрата генів супресорів пухлин або навпаки: онкогени, що репресовані у нормі, можуть активуватись.

Дослідження були проведені на культурі лімфоцитів периферичної крові людини *in vitro* – у класичному варіанті та з метаболічною активацією. В якості основної (дослідної) групи обстежено групу хворих (67 осіб) із вперше встановленим діагнозом - гліоми головного мозку, які поступили до Інституту нейрохірургії ім. акад. А. Ромоданова до лікування. В групу умовного контролю включено 30 осіб (20 жінок та 10 чоловіків), хворих на соматичну патологію (без новоутворень). В таблицях 1-4 подано індивідуальний розподіл частоти аберацій хромосом при дії модельного мутагену та в контролі (без впливу) у експериментах з гліомами та менингіомами.

Таблиця 1. Індивідуальний розподіл частоти аберацій хромосом при дії мітоміцину С та без неї в контрольній групі (здорові особи)

№№	Частота аберацій хромосом, %			
	Без впливу		З мітоміцином	
	Без онкопатологій в роду	З онкопатологіями в роду	Без онкопатологій в роду	З онкопатологіями в роду
1	2,44	1,9	13	12,3
2	2,3	1,5	11,5	11,8
3	1,9	2,9	12,8	12,2
4	2,6	2,4	12,8	12,6
5	3,1	3,0	12,9	12,1
6	3,2	3,9	13,4	12,8
7	1,7	2,8	12,7	12,4
8	2,3	2,4	12,9	12,1
9	2,2	2,1	12,7	12,0
10	2,0	3,3	13,2	11,2
11	2,1	-	12,9	-
12	1,8	-	13,4	-
13	2,1	-	13,2	-
14	1,5	-	13	-
Усього	2,26	2,62	12,9	12,15
Середнє	2,44		12,53	

Таблиця 2. Індивідуальний розподіл частоти аберацій при дії модельних мутагенів та без неї в групі хворих на соматичну патологію без онкопатологій

№№	Частота аберацій хромосом, %			
	Без впливу		З мітоміцином	
	Без онкопатологій в роду	З онкопатологіями в роду	Без онкопатологій в роду	З онкопатологіями в роду
1	3,0	3,9	10,75	10,04
2	5,0	3,3	10,31	11,56
3	4,0	3,8	10,66	10,65
4	3,1	3,5	11,01	9,43
5	2,5	3,1	10,57	9,80
6	3,8	3,22	11,19	9,13
7	3,5	3,0	10,84	15,22
8	3,5	5,0	10,57	12,17
9	3,75	4,0	10,49	9,43
10	3,9	3,1	9,79	7,61
11	3,5	2,5	10,92	11,56
12	2,8	3,8	10,40	10,04
13	3,1	3,3	10,49	10,65
14	2,9	3,5	10,31	11,26
15	2,5	3,7	10,75	11,93
16	3,25	3,92	11,10	10,65
17	3,5	3,5	10,92	8,22
18	2,4	2,7	11,19	9,43
19	2,80	3,1	10,66	10,96
20	-	3,6	-	10,04
Усього	3,19	3,48	10,68	10,59
Середнє	3,33		10,53	

Таблиця 3. Індивідуальний розподіл частоти аберацій хромосом при дії модельних мутагенів та без неї в групі хворих на доброякісні та злоякісні гліоми

№№	Частота аберацій хромосом, %			
	Без впливу		З мітоміцином	
	Доброякісні гліоми	Злоякісні гліоми	Доброякісні гліоми	Злоякісні гліоми
1	3,0	5,5	4,27	2,70
2	4,0	5,5	5,69	2,70
3	5,5	4,0	7,82	1,96
4	4,2	5,0	5,97	2,46
5	5,0	4,0	7,11	1,96
6	4,8	4,2	6,83	2,06
7	4,3	3,75	6,11	1,84
8	4,08	5,5	5,80	2,70
9	-	4,0	-	1,96
10	-	4,8	-	2,36
11	-	5,1	-	2,50
12	-	4,2	-	2,06
13	-	4,3	-	2,11
14	-	3,9	-	1,92
15	-	4,5	-	2,21
16	-	3,6	-	1,77
17	-	4,0	-	1,96
Середнє	4,36	4,46	6,2	2,19

Таблиця 4. Індивідуальний розподіл частоти аберацій хромосом при дії модельних мутагенів та без неї в групі хворих на доброякісні та злоякісні менингіоми

№№	Частота аберацій хромосом, %			
	Без впливу		З мітоміцином	
	Доброякісні гліоми	Злоякісні гліоми	Доброякісні гліоми	Злоякісні гліоми
1	5,2	6,9	11,55	2,72
2	5,0	6,6	11,11	2,60
3	4,0	5,3	8,89	2,09
4	4,6	6,1	10,22	2,40
5	4,0	5,3	8,89	2,09
6	4,75	6,3	10,55	2,48
7	3,75	5,0	8,33	1,97
8	4,7	6,9	10,44	2,72
9	4,0	5,1	8,89	2,01
10	4,5	5,8	10,00	2,28
11	4,1	5,7	9,11	2,25
12	4,3	5,7	9,55	2,25
13	4,5	5,9	10,00	2,32
14	3,7	4,9	8,22	1,93
15	4,5	6,0	10,00	2,36
16	3,6	5,0	8,00	1,97
17	3,8	5,8	8,44	2,28
18	4,0	5,5	8,89	2,17
19	3,0	4,0	6,66	1,58
20	4,0	5,2	8,89	2,05
21	4,2	5,6	9,33	2,21
22	-	5,2	-	2,05
23	-	3,9	-	1,54
24	-	8,8	-	3,47
25	-	5,2	-	2,05
26	-	5,4	-	2,13
27	-	4,3	-	1,69
28	-	5,8	-	2,28
29	-	4,4	-	1,73
Середнє	4,2	5,56	9,33	2,19

Мітоміцин С – доволі відомий сильний мутаген, який використовують в хімічному мутагенезі в якості позитивного контролю. Але, крім цього, він ще являє собою цитостатик, який

використовують в хіміотерапії. Тому досить цікавими виявились результати його впливу на різні групи обстежених (табл. 5).

Таблиця 5. Основні цитогенетичні показники в обстежених групах, модифіковані мітоміцином С та без його впливу

Групи обстежених	Кількість метафаз	Частота клітин з абераціями, %		Надспонтанний рівень	Діапазон коливань	
		Без впливу	З мітоміцином			
Здорові особи (без ОП в роду)	1045	2,26	12,9	10,71	12,0-16,0	
Здорові особи (з ОП в роду)	745	2,62	12,15	9,52	11,5-17,0	
Х В О Р І	без новоутворень (в т.ч. і в роду)	215	3,19	10,68	7,49	10,0-14,0
	без новоутворень (з ОП в роду)	1085	3,48	10,585	7,11	9,0-12,0
	на доброякісні гліоми	140	4,36	7,73	3,52	6,1-12,0
	на злоякісні гліоми	300	4,46	5,83	-0,19	3,1-14,0
	на доброякісні менингіоми	755	4,2	6,2	1,84	5,3-11,7
	на злоякісні менингіоми	1045	5,56	2,19	-2,3	1,5-7,0

Примітки: * - $p < 0,001$ порівняно з даними без впливу. **- $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою (здоровими особами)

Частота клітин з абераціями хромосом при культивуванні з мітоміцином С була достовірно вища за частоту абераційних метафаз без впливу мутагену.

Частота метафаз з абераціями при дії мітоміцину С становила: у контролі 12,9%, у хворих без новоутворень – 10,68%. У хворих на доброякісні гліоми частота метафаз з абераціями при дії мітоміцину була статистично достовірно нижча за контроль і становила 7,73%. У хворих на злоякісні гліоми частота метафаз з абераціями була статистично достовірно нижча за контроль і становила 5,83 %. У хворих на доброякісні менингіоми частота метафаз з абераціями була статистично достовірно нижча за контроль і становила 6,2 %. У хворих на злоякісні менингіоми частота метафаз з абераціями була статистично достовірно нижча за контроль і становила 2,19 %.

Надспонтанний рівень частоти аберацій (різниця між частотою аберацій при дії мутагена і спонтанного рівня (без впливу)) при дії мітоміцину зменшувався і становив: у здорових осіб – 10,71, у хворих на соматичну патологію – 7,49, у хворих на доброякісні гліоми – 3,52, у хворих на злоякісні гліоми -0,19, у хворих на доброякісні менингіоми – 1,84, у хворих на злоякісні менингіоми -2,3.

Діапазон коливань збільшується із зростанням ступеню злоякісності. У здорових осіб він лежить між 12,0 та 16,0 %; у хворих на соматичну патологію – між 10,0 та 14,0 %, у хворих на доброякісні гліоми – між 10,0 та 12,0 %; у хворих на злоякісні гліоми – між 7,1 та 14,0 %.

В процесі аналізу спектру аберацій при дії мітоміцину, прийшли до висновку, що переважали аберації хроматидного типу: в контролі вони склали – 92,76 % та 13,49 на 100 клітин, у хворих на соматичну патологію без новоутворень – 88,41 % та 12,43 на 100 клітин, у хворих на доброякісні гліоми 76,32 % та 11,12 на 100 клітин, у хворих на злоякісні гліоми – 73,46 % та 10,41 на 100 клітин, у хворих на доброякісні менингіоми - 69,81 % та 8,87 на 100 клітин, у хворих на злоякісні менингіоми – 63,08 % та 7,93 на 100 клітин. Стосовно хроматидних обмінів, то дані наступні: їх кількість однакова в умовно-контрольних групах (7,42 % та 0,8 на 100 клітин; 7,07 % та 0,9 на 100 клітин)) та у групі хворих на доброякісні гліоми (6,11% та 1,44 на 100 клітин), а найбільше значення 17,63 % та 0,98 на 100 клітин спостерігали у групі хворих на злоякісні гліоми. У хворих на доброякісні менингіоми частка хроматидних обмінів становила 5,58% та 1,98 на 100 клітин. А хворих на злоякісні менингіоми – 15,14% та 1,71 на 100 клітин. Диплоцентричні хромосоми знайдено лише у хворих на злоякісні гліоми та менингіоми (3,98 % та 0,39 на 100 клітин і 5,54% та 0,5 на 100 клітин відповідно). Ацентричні кільця були присутні і у хворих на соматичну патологію без новоутворень (4,31 % та 0,1 на 100 клітин).

Висновки: Отримані дані відносно кількості анеуплоїдних клітин у хворих з доброякісними та злоякісними пухлинами достовірно відрізняються, що не суперечить даним, отриманим іншими дослідниками.

Поліплоїдія, яка є проявом значного порушення хромосомного набору, призводить до зупинки онтогенезу на ранніх етапах. Отримані дані про розподіл поліплоїдних клітин у крові здорових людей та хворих на доброякісну та злоякісну форми менингіоми та гліоми свідчать про зв'язок між загальною кількістю абераційних і поліплоїдних клітин зокрема та стадією розвитку пухлинного процесу. Схожу кореляцію було встановлено при дослідженні хворих на рак молочної залози та шлунково-кишкового тракту.

Сьогодні постає питання про пошук проти-пухлинних агентів, які діють на процеси клітинного розподілу. Таку фундаментальну властивість пухлинних клітин як автономність, не можна модифікувати на перевивних штамах пухлин. Отже, треба приділити увагу пошуку впливів, які могли б примусити пухлинну клітину повернути якусь кількість втрачених ткане-специфічних та інших зв'язків, що теоретично могло б призвести до гальмування або стабілізації росту новоутворень. У практиці хіміотерапії для цього застосовуються цитостатики. Одним з таких препаратів є мітоміцин С, який і було застосовано в дослідженнях.

Мітоміцин С є одночасно і сильним мутагеном і цитостатиком. Як сильний мутаген мітоміцин викликає достовірне збільшення частоти аберацій хромосом. Як цитостатик мітоміцин селективно інгібує синтез ДНК. Вміст гуаніну і цитозину в ДНК корелює з частотою утворення під дією мітоміцину поперечних містків. У високих концентраціях препарат також знижує кількість РНК в клітині та інгібує синтез білку – тобто, можна казати про те, що кількість клітин з абераціями у хворих з онкопатологією при дії цитостатика мітоміцину буде нижча, так як частина з них буде елімінуватися.

Крім цього, зменшення кількості абераційних клітин при дії мітоміцину С при розвитку доброякісних та злоякісних пухлин, може також бути пояснене поліплоїдизацією клітин, що зменшує імовірність виникнення аберацій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Bhatti P et al. Comparison of occupational exposure assessment methods in a case-control study of lead, genetic susceptibility and risk of adult brain tumours / Bhatti P et al // *Occup. Environ. Med.* – 2011. – Vol. 68(1). – P. 4-9.
2. Bhatti P. et al. Lead exposure, polymorphisms in genes related to oxidative stress, and risk of adult brain tumors / Bhatti P et al // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*–2009. – Vol. 18(6). – P. 1841-1848.
3. Brat D. J. et al. Genetic and biologic progression in astrocytomas and their relation to angiogenicdysregulation / Brat D. J. et al. // *Adv. Anat. Pathol.* – 2002. – Vol. 9(1). – P. 24-36.
4. Brat D. J. et al. Genetic modulation of hypoxia induced gene expression and angiogenesis: relevance to brain tumors / Brat D. J. et al. // *Front. Biosci.* – 2003. – Vol. 8. – P. 100-116.
5. Duesberg P., Rasnick D. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own / Duesberg P., Rasnick D. // *Cell Motility and Cytoskeleton.* – 2000. – Vol. 47. – P. 81-107.
6. Duydu Y., Süzen H. S. Influence of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism on the frequency of sister chromatid exchange (SCE) and the number of high-frequency cells (HFCs) in lymphocytes from lead-exposed workers / Duydu Y., Süzen H. S. // *Mutat. Res.* – 2003. – Vol. 540(1). – P. 79-88.
7. Evliyaoglu C. et al. Parathyroid hormone-related protein and its receptor in human glial tumors / Evliyaoglu C. et al. // *ActaNeurochir. (Wien).* – 2000. – Vol. 142(8). – P. 871-878.
8. Fujiwara S. et al. Silencing hypoxia-inducible factor-1 alpha inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas / Fujiwara S. et al. // *Int J. Oncol.* – 2007. – Vol. 30(4). – P. 793-802.
9. Galeffi F., Turner D. A. Exploiting metabolic differences in glioma therapy / Galeffi F., Turner D. A. // *Curr. Drug Discov. Technol.* – 2012. – Vol. 9(4). – P. 280-293.
10. Heuser M. et al. High meningioma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics / Heuser M. et al. // *Blood.* – 2006. – Vol. 108. – P. 3898-3905.
11. Hungerford D. A. Leucocytes cultured from small inoculate of whole blood and preparation metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl / Hungerford D. A. // *Stain Techn.* – 1965. – Vol. 40. – P. 333-338.
12. Kiuru A. et al. XRCC1 and XRCC3 variants and risk of glioma and meningioma / Kiuru A. et al. // *J. Neurooncol.* – 2008. – Vol. 88(2). – P. 135-142.
13. Korshunov A., Cherekaev V., Bekyashev A. Cytogenetic basis of benign invasive sphenoid wing meningiomas / Korshunov A., Cherekaev V., Bekyashev A. // 13th European Congress of Neurosurgery. - EANS, September 2-7, 2007, Glasgow, United Kingdom. Abstract book.
14. Korshunov A., Cherekaev V., Bekyashev A., Sycheva R. Cytogenetic basis of benign invasive skull base meningiomas / Korshunov A., Cherekaev V., Bekyashev A., Sycheva R. // *Neuro-Oncology.* – 2008. – Vol. 10(6). – P. 1132.

Надійшла 17.05.2013 р.

Рецензент: проф. Т.П.Тананакіна