

**СТРУКТУРНІ ТА КІЛЬКІСНІ АНОМАЛІЇ
ХРОМОСОМ І ПОШКОДЖЕНІСТЬ ДНК В
ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ ДІТЕЙ
З САРКОМАМИ М'ЯКИХ ТКАНИН**

О.О. Шоломіцька, С.Р. Рушковський, К.С. Афанасьєва,
О.В. Шайда, Г.І. Климнюк, С.В. Демидов

*Київський національний університет ім.Тараса Шевченка
Національний інститут раку*

Вступ

Індукція і прогресія різних типів онкологічних захворювань тісно пов'язана з множинними аномаліями генома (в основному, з хромосомними перебудовами) трансформованих клітин. [1]. Велика кількість хромосомних аномалій та їх різноманітність свідчать про значу роль дестабілізації геному клітин пухлини в процесі канцерогенезу. Більш суперечливим є питання про зв'язок між хромосомними аномаліями в нормальних непухлинних тканинах (зокрема, в лімфоцитах периферійної крові) та розвитком певних онкологічних захворювань. Чітка залежність між даними явищами була знайдена при карциномі легень та колоректальному раці [2, 3]. Збільшений рівень спонтанної нестабільності хромосом спостерігається також в непухлинних клітинах у пацієнтів зі спорадичними злоякісними новоутвореннями: при раці грудей [4], ендометрію [5], яєчників [6], сечового міхура [7]. Було показано, що рівень спонтанних та індукованих аномалій хромосом в лімфоцитах онкохворих з одного боку може бути відображенням спадкової схильності до появи новоутворень, а з іншого боку залежати від стадії захворювання та інтенсивності антиракової терапії [8]. Останнє є надзвичайно важливим для прогнозування перебігу хвороби та оцінки ступеню пошкодження імунної системи до та після комбінованої хіміотерапії.

В Україні показник онкологічної захворюваності дітей становить близько 10-11 випадків на 100 тисяч дитячого населення. За

даними Національного інституту раку АМН України, серед солідних пухлин переважають саркоми м'яких тканин [9]. На даний час, дослідження щодо аналізу хромосомних аномалій в непухлинних тканинах у даній категорії хворих не проводились. Вивчення рівнів хромосомних аномалій в лімфоцитах периферійної крові у дітей, хворих на саркоми м'яких тканин, дозволить отримати відповіді на ряд актуальних запитань: чи можна використовувати дані аномалії як прогностичні маркери спадкової схильності для цих типів сарком; чи є зв'язок між частотою хромосомних пошкоджень та перебігом хвороби; як пов'язані рівні пошкодженості генетичного матеріалу лімфоцитів із функціональним станом імунної системи хворого до, на протязі та після проведення відповідних схем хіміотерапії?

В даній роботі наведені результати аналізу вихідних рівнів хромосомних аномалій та пошкодженості ДНК в лімфоцитах периферійної (ЛПК) крові дітей хворих на саркоми м'яких тканин до початку проведення антиракової хіміотерапії.

Матеріали та методи дослідження

До групи обстежуваних увійшло 21 дитина віком від 1 до 17 років, як жіночої (7), так і чоловічої (14) статей, у яких було діагностовано такі типи сарком: ембріональна і альвеолярна рабдоміосаркома, синовіальна саркома, нейробластома, мезенхімома, ангіосаркома та гемангіоендотеліома. Ці захворювання клінічно відносяться до однієї нозологічної групи (лікування проводиться за однаковим протоколом). До проведення аналізу хворі не отримували медикаментозної терапії. Об'єднання обстежуваних в одну групу з досить значним розкидом у віці пояснюється статистичним проявом сарком м'яких тканин саме в дитячий або підлітковий період (активний процес росту і розвитку організму).

Протягом дослідження здійснювався забір проб периферійної крові у всіх обстежуваних осіб. Культивування лімфоцитів (1 мл цільної крові) проводили з використанням 5 мл комерційного середовища RPMI 1640 ("Sigma", США) з додаванням ФГА ("Sigma", США) із розрахунку 10 мкг/мл культуральної суміші протягом 52 годин у термостаті при температурі 37°C. За дві години до закінчення культивування в середовище додавали колхіцин у концентрації 5 мкг/мл. Далі проводили гіпо-

тонічну обробку (0,5% KCl) та фіксацію за стандартними рекомендаціями. Для аналізу у світловому мікроскопі хромосоми фарбували 2% розчином барвника Гімза протягом 30 хв [10]. Отримані препарати досліджували на наявність структурних хромосомних аберацій та кількісних аномалій хромосом (поліплоїдів, колхіцинових анафаз, передчасного розходження хроматид) [11]. Оцінку проліферативної здатності культур оцінювали вираховуючи мітотичний індекс (MI), який розраховували як частоту клітин на стадії метафази (у ‰).

Оцінку пошкодженості ДНК лімфоцитів проводили за допомогою методу "кометного" електрофорезу [12]. Із проб периферійної крові виділяли лімфоцити, використовуючи градієнт щільності фікол-верографін. 50 мкл отриманої суспензії лімфоцитів змішували з 100 мкл 1 ‰ легкоплавкої агарози ("Sigma", США) при температурі 37°C. 25 мкл отриманої суміші наносили на предметне скельце, покрите шаром 1% тугоплавкої агарози і витримували протягом 3-5 хв при температурі 4°C для полімеризації агарози, а потім занурювали в охолоджений до 4°C лізуючий буфер (2,5 М NaCl, 100 мМ Na₂EDTA, 10 мМ тріс-НСІ, 1 ‰ тритон Х-100, рН 8,0). Лізис проводили протягом 2 годин. Електрофорез проводили у буфері TBE (89 мМ тріс, 89 мМ Н₃ВО₃, 2 мМ Na₂EDTA, рН 7,5) за напруги 1 В/см і сили струму 200 мА протягом 20 хв. Скельця фарбували барвником ДАРІ, аналіз препаратів проводили під люмінесцентним мікроскопом. Визначали частку нуклеоїдів, які мали характерну "кометоподібну" морфологію. Статистичну обробку даних проводили за стандартними методиками [13].

Отримані результати та їх обговорення

За даними цитогенетичного дослідження було встановлено, що середня частота структурних аберацій хромосом лімфоцитів обстежуваних становить $4,41 \pm 0,54\%$ з при мінімальному (min) значенні 0% і максимальному (max) - $13,0 \pm 3,58\%$ (табл. 1) при приблизно 1-3% загальнопопуляційному рівні [14]. Особливу увагу до себе привертають хворі 1, 3, 9, 11 та 14. Високі значення частот хромосомних аберацій у даних пацієнтів свідчать про значні порушення генетичного матеріалу досліджуваних клітин імунної системи. Серед структурних

аномалій найчастіше зустрічалися одинарні та подвійні фрагменти, розриви хромосом і дицентричні хромосоми.

Таблиця 1

Структурні та кількісні аномалії хромосом у дітей хворих на саркоми м'яких тканин

Обстежувані	Рівень структурних аномалій, %	Рівень КА, %	Рівень ПП, %	Рівень ПРХ, %
1	$7,30 \pm 2,12$	$8,31 \pm 1,11$	$0,96 \pm 0,39$	$2,67 \pm 0,64$
2	0	0	0	0
3	$6,00 \pm 2,37$	$0,79 \pm 0,45$	$2,62 \pm 0,82$	0
4	$2,00 \pm 1,4$	0	0	$19,0 \pm 2,74$
5	Н.А.	Н.А.	Н.А.	Н.А.
6	0	0	0	$17,0 \pm 2,38$
7	$2,00 \pm 1,4$	$3,02 \pm 0,81$	$0,65 \pm 0,37$	$6,00 \pm 1,1$
8	$3,00 \pm 1,7$	$2,93 \pm 0,5$	0	$57,0 \pm 2,35$
9	$8,00 \pm 2,71$	$1,64 \pm 0,58$	0	$22,0 \pm 1,22$
10	$2,00 \pm 1,4$	$2,30 \pm 0,8$	$0,42 \pm 0,29$	$49,0 \pm 2,3$
11	$7,00 \pm 2,55$	$6,16 \pm 1,55$	$0,28 \pm 0,28$	$9,00 \pm 1,51$
12	Н.А.	Н.А.	Н.А.	Н.А.
13	Н.А.	Н.А.	Н.А.	Н.А.
14	$13,0 \pm 3,58$	$0,41 \pm 0,41$	$0,83 \pm 0,58$	$10,0 \pm 1,93$
15	Н.А.	Н.А.	Н.А.	Н.А.
16	$3,00 \pm 1,7$	$2,20 \pm 0,89$	$1,10 \pm 0,63$	$10,0 \pm 1,82$
17	Н.А.	Н.А.	Н.А.	Н.А.
18	$2,00 \pm 1,4$	$1,90 \pm 0,84$	$0,38 \pm 0,38$	0
19	$2,00 \pm 1,4$	$0,81 \pm 0,81$	0	$15,0 \pm 3,22$
20	$3,85 \pm 2,67$	$1,87 \pm 1,31$	0	$9,34 \pm 2,81$
21	$3,13 \pm 3,08$	$1,5 \pm 1,48$	0	$10,45 \pm 3,74$

Примітки: Н. А. - не проаналізовані, КА - колхіцинові анафази, ПП - поліплоїдні мітози, ПРХ - передчасне розходження хроматид.

Колхіцинові анафази чи повне передчасне розходження хроматид (КА) і передчасне розходження хроматид (ПРХ) використовуються як основні показники порушення сегрегації хромосом. Колхіцинові анафази - це клітини, у яких хроматиди втратили зв'язок в області центромери, хоча знаходяться поруч одна біля одної [15]. ПРХ - це втрата зв'язку в області центромери окремих хромосом в межах однієї клітини. Середня частота КА у обстежуваних дітей становить $2,67 \pm 0,69\%$ з min=0% і max= $8,31 \pm 1,11\%$, а ПРХ - $4,25 \pm 0,27\%$ з min=0% і max= $57,0 \pm 2,35\%$. Отримані результати значно перевищують встановлену норму, що також негативно впливає на здатність лімфоцитів виконувати свою функцію в організмі. Найчастіше передчасне розходження хроматид спостерігалось у групах хро-

мосом G, F, D, E та C. Для оцінки кількісних аномалій хромосом Т-лімфоцитів досліджували частоту поліплоїдних метафазних пластинок (ПП). Середня частота ПП дорівнює $0,51 \pm 0,09\%$ з $\text{мін}=0\%$ і $\text{макс}=2,62 \pm 0,82\%$. Значення середнього рівня ПП не перевищує загальнопопуляційних показників.

Цитогенетичний аналіз вдалося провести лише для 16 обстежуваних. Це було пов'язано з тим, що у 5 хворих дітей було відмічено надзвичайно низький рівень проліферативної активності культур ЛПК. Значення мітотичного індексу (МІ) для всіх обстежених наведені на рис 1.

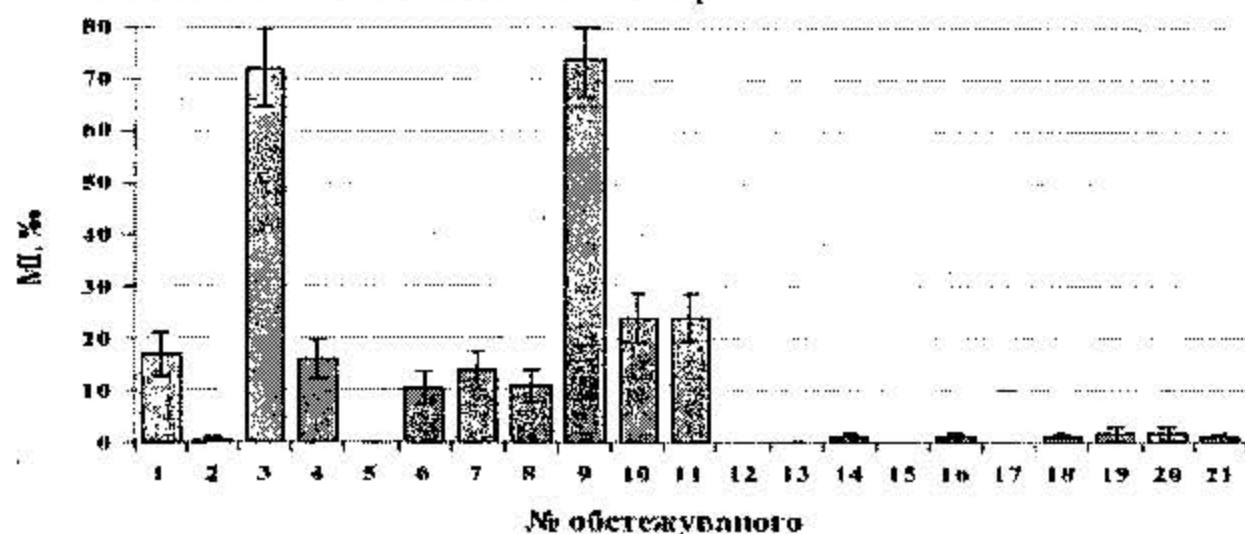


Рис.1. Мітотичний індекс (МІ) в культурах ЛПК у дітей хворих на саркоми м'яких тканин.

Середнє значення МІ у обстежуваних складає $16,74 \pm 0,97\%$ з $\text{мін}=0\%$ та $\text{макс}=73,71 \pm 7,8\%$ значеннями. Відсутність проліферативної активності або низький мітотичний індекс культур лімфоцитів деяких пацієнтів може бути свідченням того, що лімфоцити під час культивування не відповідають на стимуляцію ФГА. Дане явище може бути пов'язане з відсутністю специфічних рецепторів на поверхні клітин або порушенням сигнальних каскадів, що забезпечують проліферацію клітин і добре узгоджується з даними щодо стану імунної системи у дітей з саркомами м'яких тканин [16].

Оскільки, у деяких хворих не вдалось встановити рівень хромосомних аномалій у зв'язку з низькою проліферативною активністю культур, нами був використаний метод "кометного" електрофорезу для визначення рівня пошкодженості ДНК лімфоцитів.

Середня частота "комет" становить $0,66 \pm 0,01$ з $\text{мін}=0,11 \pm 0,03$ та $\text{макс}=0,99 \pm 0,01$ значеннями, хоча встановлена норма не перевищує $0,05-0,07$ [17]. Кореляційний аналіз зв'язку між мітотичним індексом та частотою "комет" показав тенденцію до збільшення пошкодженості ДНК в лімфоцитах людей, у яких спостерігався низький рівень проліферативної активності культур (рис. 2).

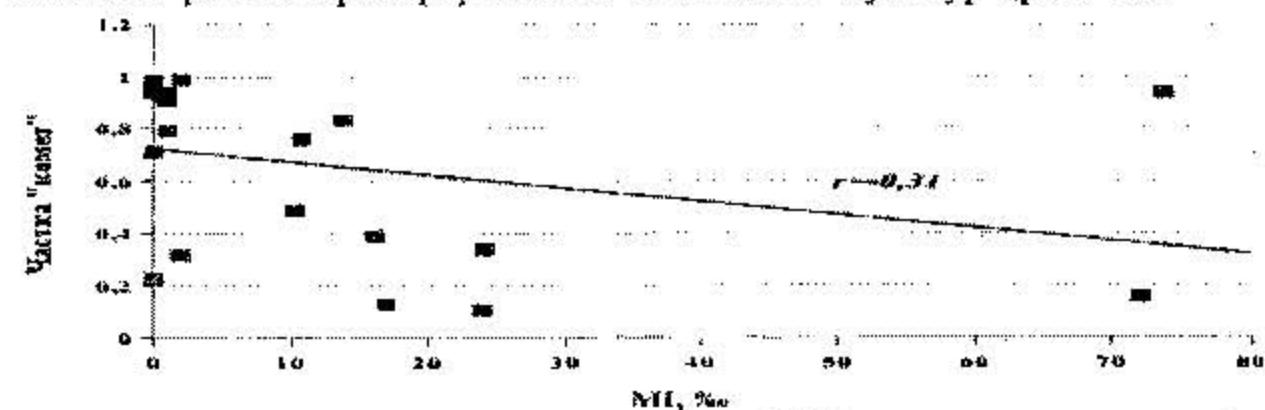


Рис. 2. Зв'язок між рівнем пошкодженості ДНК в лімфоцитах та проліферативною активністю культур ЛПК у дітей з саркомами м'яких тканин.

Для зручності аналізу даного параметру ми поділили обстежуваних на дві групи, в залежності від показника МІ. До першої групи увійшли хворі з відносно високим значенням мітотичного індексу (більше ніж $2,0\%$), а до другої - з низьким значенням (менше $2,0\%$) (рис. 3).

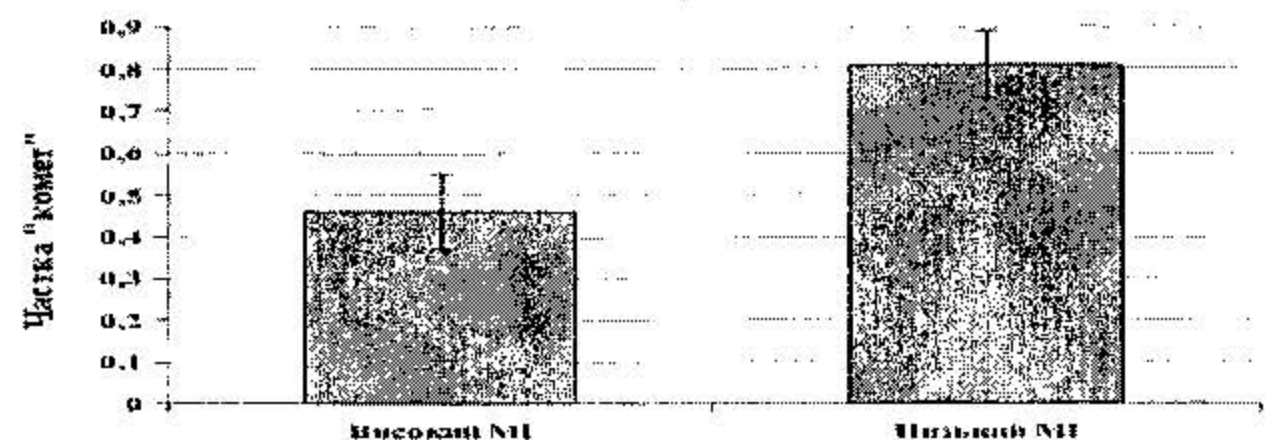


Рис.3. Середні значення частоти "комет" у хворих дітей з високим та низьким рівнями мітотичного індексу (МІ).

Середня частота "комет" за низьких значень МІ дорівнює $0,81 \pm 0,01$, що свідчить про дуже високий рівень пошкодження ДНК лімфоцитів, що досліджувались. Середня частота "комет" за високих значень МІ становить $0,46 \pm 0,02\%$. Це значення перевищує встановлену норму, але являється набагато меншим ніж за низьких значень МІ. Різниця між середніми значеннями частоти

"комет" є статистично значущою - $p < 0,05$. Таким чином, можна допустити, що і слабка відповідь лімфоцитів на мітогенний сигнал, і зниження імунного статусу хворих пов'язані з рівнем пошкодженості генетичного матеріалу в імунокомпетентних клітинах.

Висновки

1. У дітей хворих на саркоми м'яких тканин спостерігалось підвищення середньої частоти аномалій хромосом у лімфоцитах периферійної крові до початку проведення протиракової терапії.

2. У обстежуваних було відмічено суттєве зниження середнього значення мітотичного індексу.

3. Середня частота пошкодженості ДНК набагато перевищувала встановлену середньопопуляційну норму.

4. У хворих дітей спостерігалась тенденція до збільшення рівня пошкодженості ДНК в лімфоцитах периферійної крові при зниженні проліферативної активності їх культур.

5. Метод "кометного" електрофорезу виявився досить інформативним у тих випадках, коли проведення цитогенетичного аналізу було не можливим.

Література

1. Mitelman F. A breakpoint map of chromosomal rearrangements in human neoplasia / F. Mitelman, F. Mertens, B. Johansson // *Nature genetics*. - 1997. - special issue. - P. 417-474.

2. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in Humans. Preliminary results of an Italian cohort study / S. Bonassi, A. Abbondandolo, L. Camurri [e.a.] // *Cancer Genet Cytogenet*. - 1995. - Vol. 79. - P. 133-135.

3. Несина И.П. Определение хромосомной сайт-ломкости в лимфоцитах периферической крови больных колоректальным раком с учетомотягощенности семейного анамнеза онкопатологией / И.П. Несина, Л.З. Полищук // *Цитология и генетика*. - 2000. - 34. - №. 1. - С. 35-41.

4. Chromosomal instability in breast cancer patients / L. Barrios, M.R. Cabalin, R. Miro [e.a.] // *Hum Genet*. - 1991. - Vol. 88. - P. 39-41.

5. Полищук Л. З. Структурные aberrации хромосом в лимфоцитах периферической крови у больных предраком и

раком эндометрия / Л. З. Полищук, И. П. Несина // *Цитология и генетика*. - 1995. - № 3. - С. 17 - 24.

6. Adhvaryu S.G. Enhancement of lymphocytic SCE frequencies in patients with ovarian cancer / S. G. Adhvaryu, U. M. Rawal, J. V. Patel // *Neoplasma*. - 1988. - Vol. 35. - P. 103-108.

7. Chromosomal instability in bladder carcinoma patients / L. Barrios, R. Miro, M.R. Cabalin [e.a.] // *Cancer Genet Cytogenet*. - 1990. - Vol. 49. - P. 107 - 111.

8. Ганина К.П. Цитологическая реактивность онкологического больного / К. П. Ганина, Л.З. Полищук, Н.В. Бородай. - Київ: Наукова думка, 1995. - 154 с.

9. Коноваленко В. Ф. Опухоли м'яких тканин. Проблемы диагностики и лечения / В. Ф. Коноваленко // *Онкология*. - 2008. - № 2/1. - С. 63 - 64.

10. Human cytogenetics: a practical approach // IRL Press. - 2000.

11. Зеброва-Любимова Т. Е. Стандарты анализа препаратов хромосом людини: методичні рекомендації / Т. Е. Зеброва-Любимова, Н. Г. Городенко. - Київ, 2003. - 52 с.

12. Обратимость выхода петель ДНК при "кометном" электрофорезе изолированных клеток / К. С. Афанасьева, Т. А. Шувалова, М. О. Зажицкая, А. В. Сиволоб // *Биополимеры и клетка*. - 2008. - Т. 24. - С. 105 - 111.

13. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях / В.Ю. Урбах. - М.: Медицина, 1975. - 296 с.

14. Рівень спонтанних хромосомних аберацій у дітей з екологічно чистого регіону України, встановлений при цитогенетичному аналізі рівномірно та диференційно забарвлених метафазних хромосом / М.А. Пілінська, С.С. Дибський, О.В. Шеметун, О.О. Талан // *Cytometry*. - 2004. - Vol. 38. - № 6. - P. 45-48.

15. Sirenko A. G. Premature centromere division of metaphase chromosome and blood cell differentiation / A. G. Sirenko, G. R. Acopian, A. V. Petrukh // *Cytometry*. - 1996. - №8. - P. 99.

16. Состояние иммунной системы у детей, больных злокачественными новообразованиями мягких тканей / Е. С. Шумилина, Э. В. Шайда, Ю. А. Гриневич, Г. И. Климнюк, С. Н. Кукушкина // *Матер. V-съезда онкологов и радиологов СНГ*. - Ташкент, 2008. - С. 454.

17. Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі ізольованих клітин / К. С. Афанасьєва, Т. О. Шувалова, М. О. Зажицька, А. В. Сиволоб // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Збірник наукових праць. - 2007. - Т. 2. - С. 243-247.

Резюме

Шоломицька О.О., Рушковський С.Р., Афанасьєва К.С., Шайда О.В., Климнюк Г.І., Демидов С.В. Структурні та кількісні аномалії хромосом і пошкодженість ДНК у лімфоцитах периферійної крові дітей з саркомами м'яких тканин.

Проведено аналіз вихідних рівнів хромосомних аномалій та пошкодженості ДНК в лімфоцитах периферійної крові дітей хворих на саркоми м'яких тканин до початку проведення протиракової хіміотерапії. Встановлено, що у обстежуваних спостерігалось підвищення середньої частоти хромосомних аномалій в лімфоцитах периферійної крові і зниження середнього значення мітотичного індексу.

Ключові слова: саркоми м'яких тканин, хромосомні аберації, колхіцинові анафази, передчасне розходження хроматид, поліплоїди, мітотичний індекс, пошкодженість ДНК, "кометний" електрофорез.

Резюме

Шоломицкая А.А., Рушковский С.Р., Афанасьева К.С., Шайда Е.В., Климнюк Г.И., Демидов С.В. Структурные и количественные аномалии хромосом и поврежденность ДНК в лимфоцитах периферической крови детей с саркомами мягких тканей.

Проведен анализ исходных уровней хромосомных аномалий и поврежденности ДНК в лимфоцитах периферической крови детей больных саркомами мягких тканей до начала проведения противораковой химиотерапии. Установлено, что у обследованных наблюдалось повышение средней частоты хромосомных аномалий в лимфоцитах периферической крови и снижение среднего значения митотического индекса.

Ключевые слова: саркомы мягких тканей, хромосомные aberrации, колхициновые анафази, преждевременное расхождение хроматид, полиплоиды, митотический индекс, поврежденность ДНК, "кометный" электрофорез.

Summary

Sholomitska O.O., Rushkovsky S.R., Afanasieva K.S., Shayda O.V., Klimnyuk G.I., Demidov S.V. Structural and quantitative chromosomal abnormalities and DNA damages in peripheral blood lymphocytes obtained from children diseased with soft tissues sarcomas.

Initial level of chromosomal abnormalities and DNA damages in peripheral blood lymphocytes obtained from children diseased with sarcomas of soft tissues before realizing anticancer therapy was analyzed. The elevation of average levels of chromosomal abnormalities in peripheral blood lymphocytes and decreasing of average levels of mitotic indexes was observed among investigated persons.

Key words: soft tissues sarcomas, chromosomal aberrations, colchicine anaphases, premature divergence of chromatids, polyploids, mitotic index, DNA damage, "comet" assay.

Рецензент: д.біол.н., проф. Т.В.Берегова

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

ЕКОЛОГІЧНА І КЛІНІЧНА ІМУНОЛОГІЯ ТА ІМУНОРЕАБІЛІТАЦІЯ