

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

Цитогенетичні особливості хромосом у лімфоцитах периферичної крові при гліомах головного мозку

Розуменко В.Д., Болтіна І.В., Кравчук О.П.

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова АМН України, м. Київ, Україна
Інститут екології та токсикології ім. Л.І. Медведя МОЗ України, м. Київ, Україна

Ключові слова: гліоми головного мозку людини, хромосомні аберації, лімфоцити периферичної крові.

Вступ. Одним з актуальних питань сучасної нейроонкології є дослідження взаємодії організму хворого та пухлини. Як свідчать літературні дані, ця взаємодія мало вивчена на цитологічному рівні. Зміни у соматичних клітинах поза розвитком пухлини автори оцінюють по-різному:

- як основу ризику виникнення пухлини;
- як результат впливу пухлини на різні органи та системи [7].

У деяких наукових роботах доводиться схильність організму до розвитку злоякісних новоутворень внаслідок генетично обумовленої ламкості хромосом при різних спадкових хворобах [1,18].

Виявлено збільшення кількості хромосомних аберацій у лімфоцитах периферичної крові людей при злоякісних пухлинах [8], хронічному виразковому коліті [17], сімейному раковому синдромі [16,25].

Рівень показників резистентності організму обумовлений генетично, тому дуже важливо проводити цитогенетичне дослідження периферичної крові при патологічних станах, у тому числі при новоутвореннях [5].

У зв'язку зі специфічними змінами каріотипу клітин проводяться дослідження, присвячені вивченню кількісних та якісних змін хромосом у клітинах крові при онкологічних захворюваннях [10].

Вважається, що аномальний генотип чутливіший до різних впливів середовища, бо в клітинах, які вже мають хромосомні зміни, додаткові аберації виникають частіше [12,21].

Відомі три основні положення цитогенетики щодо видозміни хромосом у злоякісних пухлинах [12,13,22,23]:

- більшість пухлин людини мають змінений хромосомний склад, при цьому злоякісніші пухлини характеризуються більш вираженими аномаліями;

- хромосомні зміни в клітинах однієї й тієї ж пухлини подібні між собою;

- пухлини мають клональне походження.

Існує точка зору, згідно з якою хромосомні порушення на рівні клітинної популяції є джерелом неперервної та самовідновної мінливості, яка виявляється потенційно онкогенною, тобто нестабільність хромосомного балансу може передувати розвитку пухлинного процесу в організмі [15].

З позиції генетичної нестабільності ракових клітин оцінюються у наш час і якісно нові ступені розвитку пухлини, пов'язані з її прогресуванням. Показано, що біологічне прогресування пухлини та набуття нею нових клінічних ознак, таких, як агресивність та більший ступінь злоякісності, свідчать про посилення генетичних порушень у субпопуляціях клітин зі змінними характеристиками [21,22].

Крім того, цитогенетичні кількісні (гетероплоїдія) та якісні (структурні) зміни каріотипу клітин є маркерами не тільки ступеня злоякісності пухлини, але і прогнозу захворювання [2,18].

При цитогенетичних дослідженнях, що проводяться в онкологічних хворих, перевагу віддають вивченню лімфоцитів периферичної крові, оскільки вони добре піддаються коротчасному культивуванню [11].

Вивченню частоти хромосомних аберацій у лімфоцитах периферичної крові хворих з гліальними пухлинами головного мозку, на жаль, не присвячено жодної наукової роботи. Саме тому метою нашого дослідження було визначення особливостей аберацій хромосом периферичної крові при гліальних пухлинах головного мозку різного ступеня анаплазії (ст.ан.).

Матеріали та методи. Всього обстежено 31 хворого до лікування (11 пацієнтів — з відносно доброякісними гліомами: I—II ст. ан.; 20 — зі злоякісними гліомами: III—IV ст. ан.). Середній вік хворих становив 40,6 року (діапазон коливання віку — від 17 до 61 року). Серед обстежених 6 осіб були з сільської місцевості, 25 — мешканці міст. "Позитивна" контрольна група складалася з 6 осіб з діагнозом метастатичних пухлин. Середній вік цих пацієнтів був 41,8 року

(діапазон коливання віку — від 19 до 50 років). Серед цих обстежених 1 особа мешкала у сільській місцевості та 5 — у містах.

Для проведення умовного контролю було створено дві контрольні групи з мешканців м.Києва, які заперечували свідомий професійний чи побутовий контакт з мутагенними факторами. До першої групи (25 осіб) ввійшли хворі з соматичною патологією (за винятком онкопатології) до лікування, госпіталізовані до клініки Інституту екології та токсикології ім.Л.І.Медведя. Середній вік цих хворих дорівнював 34,8 року (діапазон коливання віку — від 21 до 60 років). Другу групу (19 осіб) склали практично здорові особи (за визначенням спеціалістів того ж інституту). Середній вік цих обстежених — 32,9 року (діапазон коливання віку — від 25 до 60 років).

Лімфоцити культивували, відповідно до методу Хангерфорда, протягом 52 год [20] з модифікаціями, що дозволяли досліджувати клітини, які перебували у першому мітозі.

Відбір метафазних платівок для цитогенетичного аналізу, класифікація та облік аберацій хромосом здійснювалися за загальноприйнятими методами [4]. Для цитогенетичного аналізу використовували метафазні платівки без перехрещень хромосом, які містили 46 ± 2 хромосоми. Враховували аберації хроматидного та хромосомного типів. Проводили аналіз зашифрованих препаратів, забарвлених рутинним методом. Аналізували не менше 100 метафаз від кожного індивідууму. Статистичну обробку проводили згідно з критеріями Ст'юдента. Кореляційний аналіз виконували за загальноприйнятою методикою [9].

Результати досліджень наведено у таблицях.

Згідно з даними, вміщеними в табл. 1, у обстежених з гліальними пухлинами є тенденція до зниження відсотка вироцнених культур: найвищий відсоток таких зразків у хворих з г л і о м а м и I—II ст.ан. склав 63,3%. У хворих зі злоякісними гліомами цей відсоток знизився до 50%. У групі з метастатичними пухлинами він був найвищий серед хворих з онкопатологією і становив 83,3%. У контрольних групах (у хворих з соматичною патологією та здорових осіб) можна було спостерігати всі 100% зразків. Напевно, це пов'язано з тим, що у хворих зі злоякісними новоутвореннями зменшується загальна кількість лімфоцитів [13].

Як видно з наведених у табл.2 даних, частота аберацій у осіб першої групи умовного контролю склала $2,7 \pm 0,2\%$, що збігається з іншими даними, отриманими при обстеженні хворих групи клінічного контролю [3]. Рівень аберацій хромосом у другій групі умовного контролю ($1,7 \pm 0,2\%$) був у межах, характерних для показників, отриманих під час обстеження здорових осіб [12].

Частота аберацій хромосом у кожній з груп хворих з гліальними пухлинами була статистично вірогідно вищою за аналогічні показники в обох групах умовного контролю і складала: в групі хворих з гліомами I—II ст.ан. — $3,4 \pm 0,5\%$; в групі хворих з гліомами III—IV ст. ан. — $4,75 \pm 0,5\%$; в групі хворих з метастатичними пухлинами — $5,26 \pm 0,76\%$. Таким чином, спостерігається тенденція до зростання відсотка аберацій хромосом у лімфоцитах периферичної

Таблиця 1. Узагальнені відомості про обстежених

Показники	Гліоми I—II ст. ан.		Гліоми III—IV ст. ан.		Метастатичні пухлини		Хворі з соматичною патологією		Здорові особи	
	m	%	m	%	m	%	m	%	m	%
Кількість обстежених	11		20		6		25		19	
Кількість культур, в яких проаналізовано не менше 100 метафаз										
Узагальнені дані	7	63,3	10	50	5	83,3	25	100	19	100

Таблиця 2. Узагальнені дані щодо аберацій та анеуплоїдії за групами обстежених

Показники, %	Гліоми I—II ст. ан.	Гліоми III—IV ст. ан.	Метастатичні пухлини	Хворі з соматичною патологією	Здорові особи
Аберації	$3,4 \pm 0,5^*$	$4,75 \pm 0,5^*$	$5,26 \pm 0,76^*$	$2,7 \pm 0,2^*$	$1,7 \pm 0,2$
Анеуплоїдія	$14,4 \pm 0,9^*$	$22,0 \pm 0,9^*$	$15,8 \pm 1,2^*$	$9,2 \pm 0,3$	$7,8 \pm 0,5$

Примітка: * $p < 0,01$

крові обстежених залежно від ступеня злоякісності.

Крім того, відсоток аберацій хромосом у всіх хворих з новоутвореннями перевищує 3%, що підтверджено літературними даними [8,16,17,25].

Проаналізувавши матеріали каріотипування пухлин людини, можна дійти висновку, що анеуплоїдія є майже обов'язковою ознакою злоякісності новоутворення [15]. Анеуплоїдія відображує генетичну нестабільність пухлини. Це обумовлено тим, що в анеуплоїдних клітинах змінюється послідовність синтезу ДНК: ділянки, котрі рано реплікуються в диплоїдних клітинах, в анеуплоїдних реплікуються пізніше. Анеуплоїдія має також відношення до ступеня наявності біологічної злоякісної пухлини одного і того ж генезу, причини варіабельності якої до цього часу не розкриті. Анеуплоїдія та структурні порушення каріотипу надають клітині нові біологічні властивості, що позначається на клінічному перебігу пухлинного процесу.

Середньогрупова частота анеуплоїдних клітин у групі хворих на злоякісні пухлини ($22,0 \pm 0,9\%$) була статистично вірогідно вищою, ніж у пацієнтів з доброякісними пухлинами ($14,4 \pm 0,9\%$) та у групах умовного контролю ($9,2 \pm 0,3$ у хворих без новоутворень та $7,8 \pm 0,5\%$ у здорових осіб). Крім того, цей показник був вищий у групі хворих з метастатичними пухлинами ($15,8 \pm 1,2\%$).

Таким чином, в результаті досліджень встановлено статистично вірогідне підвищення частоти аберацій хромосом та рівня анеуплоїдних клітин у лімфоцитах периферичної крові у хворих з гліальними пухлинами. При цьому спостерігалась тенденція до зростання цих показників залежно від ступеня злоякісності пухлини.

Розглянемо спектр аберацій хромосом у лімфоцитах периферичної крові в обстежених групах (табл. 3).

Якщо зробити аналіз за частотою основних

типів аберацій хромосом, то спектр буде зміщено в сторону хроматидних аберацій. Втім, слід зауважити, що у групі пацієнтів з онкозахворюваннями цей відсоток значно вищий (90% — при доброякісних гліомах, 82,9% — при злоякісних та 89,4% — при метастатичних пухлинах), ніж у групах умовного контролю (71,1% — у хворих без новоутворень та 63,8% — у здорових осіб).

Стосовно обмінів, то їх відсоток вищий у хворих з гліальними пухлинами (8,0%, 13,8% та 8,6% проти 5,1% та 3,4% відповідно).

Серед аберацій хромосомного типу переважну більшість становлять парні фрагменти. Їх кількість у 3 рази менша у групі з онкозахворюваннями, ніж у контрольній групі (8,0%, 9,5% та 8,5% проти 24,6 та 36,2%). На кільцеві та дицентричні хромосоми припадає 2,0%; 7,4% та 2,1% у групі з онкозахворюваннями та 0 і 4,3% — у контрольній групі.

Дехто з дослідників [2,13] вважає, що виявлення хромосомних аберацій різного типу в клітинах злоякісних пухлин свідчить про різний ступінь нестабільності та може служити додатковим критерієм при оцінці ступеня злоякісності.

З метою встановлення можливої залежності частоти аберацій у крові пацієнтів при гліомах головного мозку нами проведено розрахунки коефіцієнтів лінійної кореляції, які подано в табл. 4.

Отже, встановлено позитивний кореляційний зв'язок між ступенем злоякісності та деякими показниками аберацій хромосом. Отримано дуже слабкий невірогідний кореляційний зв'язок між кількістю хромосомних аберацій та ступенем злоякісності (кореляційний коефіцієнт 0,03 при помилці 0,12).

Крім того, встановлено вірогідний прямий позитивний кореляційний зв'язок середньої сили між ступенем злоякісності пухлин та частотою аберацій (коефіцієнт +0,70 при помилці 0,06) і кількістю аберацій хроматидного типу (кореле-

Таблиця 3. Спектр аберацій хромосом у лімфоцитах периферичної крові в обстежених групах

Діагноз	Всього аберацій	Хроматидні аберації						Хромосомні аберації					
		Всього		Одиничні фрагменти		Обміни		Всього		Парні фрагменти		Кільцеві, дицентричні	
		m	%	m	%	m	%	m	%	m	%	m	%
Група хворих з гліальними пухлинами													
Гліоми I-II ст. ан.	50	45	90,0	41	82	4	8,0	5	10,0	4	8,0	1	2,0
Гліоми III-IV ст. ан.	94	78	82,9	65	69,1	13	13,8	16	16,9	9	9,5	7	7,4
Метастатичні пухлини	47	42	89,4	38	80,8	4	8,6	5	10,6	4	8,5	1	2,1
Група умовного контролю													
Хворі без новоутворень	138	98	71,1	91	66,0	7	5,1	60	28,9	34	24,6	6	4,3
Здорові особи	58	37	63,8	35	60,4	2	3,4	21	36,2	21	36,2	0	0

Таблиця 4. Кореляційний зв'язок між частотою аберацій хромосом у лімфоцитах периферичної крові пацієнтів при гліомах головного мозку

Показники	Коефіцієнт кореляції	Помилка коефіцієнта кореляції
Частота аберацій	0,70*	0,06
Кількість хроматидних аберацій	0,69*	0,06
Кількість хромосомних аберацій	0,03	0,12

Примітка: * $p < 0,001$

ляційний коефіцієнт +0,69 при помилці 0,06), що підтверджує вищевикладене, не заперечує літературних даних [12,13].

Таким чином, спостерігається тенденція до зростання відсотка аберацій хромосом та рівня анеуплоїдних клітин у лімфоцитах периферичної крові обстежених хворих залежно від ступеня злоякісності пухлин, що свідчить про ступінь структурної нестабільності генома та може служити додатковим критерієм при оцінці прогресування гліом головного мозку. Результати дослідження підтверджуються позитивним кореляційним зв'язком між частотою аберацій та ступенем злоякісності.

Список літератури

1. Бочков Н.П. Хромосомная нестабильность и злокачественный рост // Вест. АМН СССР. — 1977. — № 10. — С. 54 — 59.
2. Ганина К.П., Налескина Л.А., Киреева С.С. Исследование кариотипа и хроматина лимфоцитов периферической крови больных пигментными новообразованиями кожи // Цитология и генетика. — 1990. — Т. 24. — № 2. — С. 16—21.
3. Ганина К.П., Полищук Л.З., Бучинская Л.Г. и др. Цитогенетическое обследование лиц, подвергшихся радиационному воздействию в некоторых регионах Украины // Цитология и генетика. — 1994. — Т. 28. — № 3. — С. 32—35.
4. Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. Хромосомы человека : Атлас. — М.: Медицина, 1982. — 263 с.
5. Ильинских Н.Н., Бессудова С.С., Ильинских И.Н. Аутоиммунный процесс и хромосомные аномалии // Цитология и генетика. — 1987. — Т.21 — № 1. — С. 64—70.
6. Кадагидзе З.Г. Субпопуляция лимфоцитов при злокачественном росте // Вопр. онкологии. — 1984. — Т.30. — № 1. — С. 90—97.
7. Корнева Е.А., Шекоян В.А. Регуляция защитных функций организма. — Л.: Наука, 1982. — 139 с.
8. Кузнецов А.И., Кружалов А.И., Илюшенко В.Г. и др. Возрастно-половая зависимость спонтанной частоты хромосомных абераций и аберрантных клеток в лимфоцитах периферической крови // Генетика. — 1980. — Т. 16 — № 7. — С.1284—1293.
9. Минцер О.П., Угаров Б.Н., Власов В.В. Методы обработки медицинской информации. — К: Вища школа, 1991. — 271 с
10. Олиници К.Д. Хромосомы при раке: Пер. с румынского. — М: Медицина, 1982. — 232 с
11. Пилинська М.А., Дибський С.С., Дибська О.В. Цитогенетичний ефект в лімфоцитах периферичної крові дітей, що мешкають в деяких населених пунктах Овруцького району Житомирської області України, забруднених радіонуклідами // Цитология та генетика. — 1992. — Т. 26. — № 4. — С. 10—14.
12. Полищук Л.З., Несина И.П. Структурные аберации хромосом в лимфоцитах периферической крови у больных предраком и раком эндометрия // Цитология и генетика. — 1995. — Т. 29. — № 3. — С. 17—24.
13. Цитологическая реактивность онкологического больного/Под редакцией проф. К. П. Ганиной.—Киев: Наукова думка, 1995. — 150 с.
14. Уманский Ю.А., Пинчук В.Г. Лимфоциты и опухолевый рост. — Киев : Наукова думка, 1982. — 255 с.
15. Atkin N. B. Cytogenetic aspects of malignant transformation // Exp. Biol. Med. — 1976. — V. 6, N. 3(8). — P. 1—171.
16. Bottomley R.H., Trainer A.L, Condit P.T. Chromosome studies in a 'cancer family'// Cancer. — 1971. — V. 28. — N. 2. — P. 519—528.
17. Emerit I., Emerit J. et al. Chromosome studies in patients with ulcerative colitis // Ibid. — 1972. — V. 16. — N. 4. — P. 313—322.
18. German J. Chromosomes and cancer // Ed. John Wiley and Song. New York —Sydney — Toronto. — 1974. — P. 601.
19. Hart J.S. Chromosome abnormalities in human neoplasia // Cancer Treat. Revs. — 1983. — V. 10. — № 1. — P. 173—183.
20. Hungerford K.A. Leucocytes cultured from small inocula of whole blood and preparation metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl // Stain Techn. — 1965. — V. 40. — P. 333—338.
21. Knudson A.G. Hereditary cancer of man //

- Cancer Invest. — 1983. — V. 1. — N. 2. — P. 187—194 .
22. *Novell P.S.* Tumors as clone proliferation // *Virchows Arch. B.* — 1978. — V. 29. — P. 145—150.
23. *Nowell P.S.* Mechanisms of tumor progression // *Cancer Res.* — 1986. — V. 46. — N. 5. — P. 2203—2207.
24. *Sandberg A. A.* Chromosomal alterations associated with neoplasia // *Transplant. Proc.* — 1984. — V. 16. — N. 2. — P. 366—369.
25. *Vakil K.V. Morgan R.W.* Etiology of breast cancer. Genetic aspects // *Cancer Med. Assoc. J.* — 1973. — V. 109. — N. 7. — P. 29—32.

Цитогенетические особенности хромосом в лимфоцитах периферической крови при глиомах головного мозга

Розуменко В.Д., Болтіна І.В., Кравчук А.П.

На основании результатов собственных исследований авторы установили статистически достоверное повышение частоты aberrаций хромосом и уровня анеуплоидных клеток в лимфоцитах периферической крови больных с глиомами головного мозга в зависимости от степени злокачественности опухоли.

Cytogenetics of chromosomes in lymphocytes of peripheral blood at cerebral gliomas

Rozumenko V.K., Boltina I.V., Kravchuk A.P.

The statistically authentic increase of chromosomes aberrations frequency and cells aneuploidys of peripheral blood is established. This indexes statistically depending on malignancy degree.

КОМЕНТАР

до статті В.Д. Розуменко, І.В. Болтіної, О.Л. Кравчук "Цитогенетичні особливості хромосом у лімфоцитах периферичної крові при гліомах головного мозку"

На сучасному етапі розвитку онкології вже немає сумніву, що злоякісні пухлини виникають як наслідок генетичних аномалій у соматичних клітинах організму, а нестабільність клітинного генома стає одним з найоб'єктивніших показників причин виникнення та подальшого прогресування пухлин. Існує багато наукових фактів, які дають підстави зробити досить обґрунтоване припущення, що геномна нестабільність при пухлинному рості розвивається в усіх клітинах організму, а її місцевий прояв у вигляді пухлини залежить від рівня прогресування і прямо корелює зі ступенем злоякісності пухлини. Проведений в даній роботі цитогенетичний аналіз свідчить про вірогідне підвищення рівня анеуплоїдних клітин у лімфоцитах периферичної крові хворих з гліальними пухлинами головного мозку. Аналіз частоти основних типів aberrацій хромосом виявив, що спектр зміщено переважно в бік хроматидних aberrацій. При цьому автори відзначили тенденцію до підвищення цих показників залежно від ступеня злоякісності пухлин. Отже, з проведених авторами статті досліджень можна зробити висновок про те, що анеуплоїдія та хроматидні і хромосомні aberrації в клітинах крові організму зі злоякісними пухлинами можуть бути об'єктивними показниками нестабільності клітинного генома. З літературних джерел відомо, що підвищений рівень анеуплоїдії та aberrацій хромосом у лімфоцитах периферичної крові був у людей, які брали участь у ліквідації аварії на Чорнобильській АЕС, до появи в них різних видів злоякісних пухлин. Отже, використання показників цитогенетичного аналізу лімфоцитів крові при формуванні груп осіб підвищеного ризику щодо виникнення злоякісних пухлин головного мозку та інших органів має сенс.

Пошук та дослідження об'єктивних критеріїв нестабільності генома клітин в організмі людини при використанні різних методичних підходів, у тому числі і за допомогою цитогенетичного аналізу клітин периферичної крові, ще до появи пухлини або на ранніх стадіях її розвитку має стати одним з актуальних напрямків сучасної онкології в галузі дослідження взаємодії організму та пухлини на молекулярно-генетичному рівні з метою розробки об'єктивної діагностики онкологічних захворювань та ефективних методів лікування.

*Канд. мед. наук, старш.наук.співроб. Н.Я. Гридіна
Інститут нейрохірургії ім.акад.А.П.Ромоданова АМН України*