

УДК 575.224:616.006.6

БАЗОВЫЙ УРОВЕНЬ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В ЛИМФОЦИТАХ И БУККАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТАХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

© 2019 г. В. Г. Дружинин¹, *, В. И. Минина², Е. Д. Баранова¹, Т. А. Головина¹, А. В. Мейер¹,
А. О. Михайлова¹, А. А. Тимофеева², В. А. Титов³, Т. А. Толочко¹, Д. П. Шубенкина¹

¹Кемеровский государственный университет, Кемерово, 650000 Россия

²Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения
Российской академии наук, Кемерово, 650099 Россия

³Кемеровский областной онкологический диспансер, Кемерово, 650000 Россия

*e-mail: druzhinin_vladim@mail.ru

Поступила в редакцию 24.04.2019 г.

После доработки 24.05.2019 г.

Принята к публикации 30.05.2019 г.

Представлены результаты изучения хромосомных aberrаций и микроядер в лимфоцитах крови, а также микроядер в клетках буккального эпителия 50 нелеченных мужчин больных раком легкого (РЛ) и 62 контрольных доноров. С использованием комплекса цитогенетических тестов выявлено однонаправленное достоверное увеличение базового уровня генетической нестабильности в клетках пациентов по сравнению с контролем. Показано, что у больных РЛ элиминация поврежденных клеток происходит преимущественно путем некроза, тогда как частоты клеток на стадии апоптоза не различаются у больных и в контроле. Возраст пациентов, статус курения, тип и стадия РЛ не оказывают существенного влияния на показатели базового уровня генетических повреждений. Это позволяет утверждать, что цитогенетическая нестабильность соматических клеток нелеченных больных РЛ является постоянным признаком, отражающим реакцию генома на воздействие окислительного стресса, сопровождающего опухолевый процесс.

Ключевые слова: рак легкого, лимфоциты, буккальные эпителиоциты, хромосомные aberrации, микроядра, апоптоз, некроз, генетическая нестабильность.

DOI: 10.1134/S0016675819100047

Нестабильность генома соматических клеток (точковые мутации, структурные и числовые нарушения кариотипа) принято рассматривать в качестве одного из фундаментальных признаков злокачественной трансформации [1–3]. Описанный Теодором Бовери еще более ста лет назад в качестве важнейшего фундаментального свойства раковых клеток [4] этот феномен за последние годы стал важным инструментом для прогнозирования индивидуального риска развития рака или связанных с ним патологий, основанных на повышенных уровнях повреждений генома. На основании результатов обширных популяционных исследований было показано, что уровни хромосомных aberrаций (ХА) и микроядер (МЯ) в лимфоцитах периферической крови здоровых людей являются предикторами развития рака в будущем [5–7]. Это подтверждается гипотезой о том, что генетические повреждения в лимфоцитах крови отражают аналогичные события в дру-

гих клетках организма, подверженных канцерогенезу [8].

Принято считать, что развитие рака обычно зависит от ряда мутационных или эпигенетических событий, а первоначальная повышенная нестабильность генома увеличивает вероятность последующих негативных изменений [9]. Связь геномной нестабильности с ранними событиями в канцерогенезе подтверждается тем фактом, что повышенные уровни повреждений хромосом часто выявляются в нормальных клетках первично диагностированных (нелеченных) пациентов с новообразованиями различных локализаций. Однако данные литературы о частотах спонтанных цитогенетических повреждений в лимфоцитах у пациентов с солидными опухолями не лишены противоречий. В частности, метаанализ частот микроядер в лимфоцитах нелеченных пациентов с различной локализацией опухолей показал, что только 72% образцов, включенных в исследование, продемонстрировали увеличение спонтан-

Таблица 1. Характеристика изученных групп

Группа	N	Возраст, лет		Статус курения, %	
		$\mu \pm SE$	min-max	да	нет
Больные РЛ	50	$61.9 \pm 0.82^*$	45–73	76	24
Контроль	62	51.6 ± 0.96	40–79	50	50

Примечание. N – число обследованных, μ – среднее значение, SE – стандартная ошибка среднего.

* $p < 0.001$; отличается от значения для группы контроля.

ной частоты микроядер у пациентов по сравнению с контрольными донорами [10]. Этот факт указывает на необходимость продолжения исследований в этом направлении, включая максимально полную оценку базового уровня нестабильности генома с использованием различных биомаркеров эффекта у пациентов с наиболее значимыми формами рака.

Рак легкого (РЛ) является одной из наиболее распространенных опухолевых патологий и лидирует в качестве причин смертности от злокачественных новообразований. В частности, смертность у мужчин от рака легкого составляет примерно треть летальных исходов от всех злокачественных опухолей [11]. В недавней публикации [12] мы показали, что частота ХА в лимфоцитах нелеченных пациентов с раком легкого значимо увеличена по сравнению с контрольной выборкой. Продолжая это исследование, в настоящем сообщении мы представляем новые результаты с одновременным использованием трех цитогенетических биомаркеров (хромосомных aberrаций и микроядер в лимфоцитах, а также микроядер в буккальных эпителиоцитах) для оценки уровня геномной нестабильности у пациентов с раком легкого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика исследованных групп

Базовые частоты ХА и МЯ были проанализированы у 50 пациентов с первично диагностированным РЛ (только мужчины, средний возраст 61.9 ± 0.82 года), поступивших в Кемеровский областной онкологический диспансер, и у 62 здоровых мужчин-доноров, жителей г. Кемерово (средний возраст 51.6 ± 0.96 года). 76% пациентов с РЛ являлись активными курильщиками, в то время как в контрольной выборке было зарегистрировано равное число курящих и некурящих доноров (табл. 1).

Образцы крови и буккального эпителия от пациентов с РЛ были получены до начала диагностических или терапевтических процедур. На каждого участника обследования была заполнена индивидуальная анкета, содержащая сведения о месте и дате рождения, профессии, наличии профессиональных вредностей, состоянии здоровья,

приеме лекарственных препаратов, рентгенологических процедурах, наличии вредных привычек. Для пациентов с РЛ дополнительно были учтены параметры клинического и патоморфологического анализов, в соответствии с которыми выборку составили доноры с диагнозами: плоскоклеточный рак – 27 (54%); аденокарцинома – 11 (22%); мелкоклеточный рак – 5 (10%); прочие формы рака: крупноклеточный плеоморфный, аденогенный, мезенхимальный, немелкоклеточный недифференцированный, распад злокачественной опухоли – 7 (14%). Кроме этого, для каждого пациента была определена стадия заболевания в соответствии с TNM-классификацией [13]. В соответствии с этим 16 пациентов (32%) имели I–II стадии заболевания. А 34 пациента (68%) – III–IV. Дополнительно у 20% пациентов с РЛ наблюдались метастазы первичной опухоли в отдаленные органы.

Все участники были проинформированы о цели, методологии и возможных рисках исследования; информированное согласие было подписано каждым донором. Исследование было выполнено в соответствии с требованиями Этического комитета Кемеровского государственного университета.

Анализ хромосомных aberrаций

Подготовку препаратов метафазных хромосом осуществляли с помощью стандартного полумикрометода [14]. В культуральный флакон помещали 1 мл крови, 0.1 мл фитогемагглютинаина (ПанЭко), 9 мл среды RPMI 1640 (ПанЭко), 2 мл эмбриональной телячьей сыворотки. Длительность инкубации составляла 48–50 ч. За 2 ч до фиксации в культуры добавляли колхицин (ПанЭко) 120 мкл. По окончании инкубации клеточные культуры обрабатывали гипотоническим раствором 0.55%-ного KCl в течение 20 мин при 37°C. Фиксацию материала проводили в трех сменах охлажденной фиксатора Карнуа (метанол и ледяная уксусная кислота в соотношении 3 : 1). Полученную суспензию раскапывали на чистые охлажденные и смоченные водой предметные стекла. Препараты шифровали и окрашивали с помощью 2%-ного раствора красителя Гимза (Merck).

Учет метафаз, включаемых в анализ, и критерии для регистрации цитогенетических поврежде-

ний соответствовали общепринятым рекомендациям [15]. Учитывали следующие показатели: доля aberrантных метафаз, частота aberrаций, частота aberrаций хроматидного типа (одиночных фрагментов, хроматидных обменов), частота aberrаций хромосомного типа (парные фрагменты, дисцентрические и кольцевые хромосомы, атипичные моноцентрики). Ахроматические пробелы в число aberrаций не включали и не учитывали.

Анализ микроядер в культуре лимфоцитов с блоком цитокинеза

Микроядерный тест выполняли в соответствии со стандартным протоколом СВМН [16], используя модификации, предложенные Ф.И. Ингель [17].

В культуральный флакон, содержащий 3.8 мл культуральной среды (среда RPMI-1640 + 20% сыворотки крупного рогатого скота + 100 ед./мл пенициллина), помещали 0.2 мл цельной крови. Во флаконы добавляли фитогемагглютинин (ПанЭко) и культивировали в течение 44 ч при температуре 37°C. Через 44 ч от начала инкубирования в каждую культуру добавляли цитохалазин В (Applichem GmbH) до конечной концентрации 6 мкг/мл и культивировали еще 24 ч при той же температуре. По окончании цикла клетки фиксировали в соответствии с протоколом, готовые суспензии раскапывали на охлажденные предметные стекла. Препараты шифровали и окрашивали 2%-ным раствором красителя Гимза (Merck) в течение 15 мин. Анализировали препараты под микроскопом Nikon Eclipse 80i при увеличении ×1000.

На каждом препарате анализировали пролиферативный пул – подсчитывали 500 клеток с различным числом ядер, а также учитывали клетки, находящиеся на стадиях апоптоза и митоза. Затем на других участках стекла подсчитывали еще по 1000 только двуядерных лимфоцитов, в которых регистрировали различные типы цитогенетических повреждений, таких как частоты двуядерных лимфоцитов с МЯ, частоты клеток с нуклеоплазменными мостами, частоты клеток с ядерными протрузиями. Дополнительно рассчитывали показатель числа одноядерных лимфоцитов с МЯ.

Анализ микроядер и других кариологических нарушений в буккальных эпителиоцитах

Приготовление цитогенетических препаратов осуществляли с учетом рекомендаций [18]. Перед взятием образцов буккального эпителия доноры тщательно ополаскивали рот очищенной питьевой водой. Сбор материала проводили смоченным в буферном растворе (Tris HCl, EDTA, NaCl, pH 7) шпателем. После трехкратной промывки клетки раскапывали на предварительно отмытые и подогретые предметные стекла. Препараты

фиксировали фиксатором Кларка, окрашивание проводили 2.5%-ным раствором ацетоорсеина и 1%-ным спиртовым раствором светлого зеленого. Анализ препаратов проводили на микроскопе Nikon E200 при увеличении ×1000.

Учитывали три группы повреждений: цитогенетические нарушения (микроядра, протрузии типов “пузырек”, “язык”, “разбитое яйцо”, нуклеоплазменный мост и атипичная форма ядра), нарушения клеточной пролиферации (двуядерность, ядерная насечка и сдвоенное ядро), а также показатели деструктивных изменений (перинуклеарная вакуоль, вакуолизация ядра, конденсация хроматина, кариопикноз, кариорексис, кариолизис и апоптотные тела). Идентификацию микроядер проводили с помощью классических критериев [19], другие ядерные аномалии регистрировали с учетом рекомендаций [20]. Частоту клеток с цитогенетическими, пролиферативными и деструктивными нарушениями выражали в промилле (‰).

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы StatSoft STATISTICA 7.0. Оценку количественных показателей осуществляли посредством вычисления средних значений (μ) и стандартных ошибок среднего (SE). Проверку распределения частот цитогенетических показателей проводили с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Сравнение групп осуществляли с помощью рангового U-теста Манна–Уитни. Корреляцию между показателями для случая данных с ненормальным распределением рассчитывали с использованием непараметрической статистики при помощи коэффициента корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Базовый уровень цитогенетических повреждений в лимфоцитах больных РЛ и контрольных доноров

Результаты изучения кластогенных эффектов в лимфоцитах крови больных РЛ и контрольных доноров сведены в табл. 2. Из данных, приведенных в таблице, следует, что уровень структурных aberrаций хромосом у мужчин с диагностированным РЛ оказался существенно выше, чем в контроле. Это утверждение относится как к основному параметру цитогенетического теста на определение ХА – доле aberrантных метафаз ($4.03\% \pm 0.26$ и $2.03\% \pm 0.16$ соответственно; $p < 0.0001$), так и ко всем основным типам ХА: одиночным и парным фрагментам, обменным aberrациям хроматидного и хромосомного типа (табл. 2).

Итоги микроядерного анализа лимфоцитов, культивированных в условиях цитокинетического блока, суммированы в табл. 3. Как и в случае

Таблица 2. Частоты хромосомных aberrаций в лимфоцитах больных раком легкого и контрольных доноров

Группа	Число метафаз	Доля aberrантных метафаз, $\mu \pm SE$, %	Количество aberrаций на 100 клеток, $\mu \pm SE$, %			
			фрагменты		обмены	
			одиночные	парные	хроматидные	хромосомные
Рак легкого	9900	$4.03 \pm 0.26^{***}$	$2.59 \pm 0.26^{**}$	$1.07 \pm 1.07^{***}$	$0.12 \pm 0.04^*$	$0.49 \pm 0.09^*$
Контроль	12249	2.03 ± 0.16	1.47 ± 0.13	0.4 ± 0.06	0.01 ± 0.01	0.22 ± 0.06

* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$; отличаются от значения для группы контроля.

Таблица 3. Частоты микроядер и других цитогенетических повреждений в лимфоцитах больных раком легкого и контрольных доноров

Показатель	Больные РЛ, $\mu \pm SE$, %	Контроль, $\mu \pm SE$, %
Всего двуядерных клеток с МЯ	$1.4 \pm 0.10^{**}$	0.87 ± 0.06
Двуядерные клетки с одним МЯ	$1.27 \pm 0.09^{**}$	0.77 ± 0.05
Двуядерные клетки с двумя МЯ	$0.12 \pm 0.01^*$	0.08 ± 0.01
Двуядерные клетки с более чем двумя МЯ	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Двуядерные клетки с мостами	$0.31 \pm 0.04^{**}$	0.12 ± 0.02
Двуядерные клетки с протрузиями	1.84 ± 0.16	1.65 ± 0.13
Одноядерные клетки с МЯ	$0.41 \pm 0.06^*$	0.21 ± 0.03

* $p < 0.001$; ** $p < 0.0001$; отличаются от значения для группы контроля.

теста на выявление ХА, были выявлены существенные однонаправленные различия в уровне цитогенетических маркеров между пациентами и здоровыми донорами. Пациенты с раком легкого демонстрируют повышенную частоту двуядерных лимфоцитов с одним МЯ ($1.27 \pm 0.09\%$ против $0.77 \pm 0.05\%$, $p < 0.0001$), двуядерных лимфоцитов с двумя МЯ ($0.12 \pm 0.01\%$ против $0.08 \pm 0.01\%$, $p < 0.001$) и общую частоту двуядерных клеток с МЯ ($1.4 \pm 0.1\%$ против $0.87 \pm 0.06\%$, $p < 0.0001$) по сравнению с контролем. Лишь один показатель — частота двуядерных лимфоцитов с множественными (более двух) МЯ имел равное значение в выборках пациентов и в контроле ($0.02 \pm 0.01\%$). Другие цитогенетические параметры также показали увеличенные значения у пациентов с РЛ. В частности, в выборке пациентов частота двуядерных лимфоцитов с нуклеоплазменными мостами составила $0.31 \pm 0.04\%$, а частота одноядерных лимфоцитов с МЯ составила $0.41 \pm 0.06\%$, тогда как частоты этих показателей в контрольной группе составили $0.12 \pm 0.02\%$ и $0.21 \pm 0.03\%$ соответственно. Все эти различия, оцененные с использованием U-критерия Манна–Уитни, были статистически значимыми ($p < 0.0001$ для частот двуядерных клеток с мостами; $p < 0.001$ для частот одноядерных клеток с МЯ). Только один цитогенетический индикатор — двуядерные клетки с протрузиями не показал различий между пациентами и контрольной группой ($1.84 \pm 0.16\%$ против $1.65 \pm 0.13\%$).

В результате оценки показателей пролиферативной активности, а также сравнения частот клеток, находящихся на стадии апоптоза (табл. 4), было установлено, что ни по одному из сопоставляемых цитогенетических параметров не наблюдалось значимых различий между группами пациентов с РЛ и контрольными донорами.

Базовый уровень кариологических повреждений в буккальных эпителиоцитах больных РЛ и контрольных доноров

Результаты микроядерного тестирования эксплиативных клеток буккального эпителия сведены в табл. 5. Основной показатель — частота клеток с микроядрами выше в выборке пациентов с РЛ по сравнению с контролем ($0.34 \pm 0.11\%$ против $0.29 \pm 0.12\%$), однако эти различия, оцененные с использованием U-критерия Манна–Уитни, оказались недостоверными ($p = 0.2451$). Вместе с тем некоторые другие цитогенетические маркеры, в частности ядерные протрузии, достоверно чаще отмечались в эпителиоцитах больных РЛ. Так, показатель “Сумма протрузий” составил для выборки пациентов с РЛ $7.48 \pm 1.01\%$, что достоверно превышает значение для контрольных доноров ($4.39 \pm 0.47\%$; $p = 0.0132$). Таким образом, если рассматривать сумму всех типов цитогенетических повреждений, регистрируемых с помощью расширенного микроядерного теста, можно констатировать значимое увеличение этого показателя в группе больных РЛ по сравнению с

Таблица 4. Результаты оценки пролиферативной активности и частот клеток, находящихся на стадиях митоза и апоптоза

Показатель		Больные РЛ, $\mu \pm SE$	Контроль, $\mu \pm SE$
Клеток с различным числом ядер, %	1	28.7 ± 1.75	26.4 ± 1.66
	2	48.9 ± 1.42	51.8 ± 1.50
	3	3.9 ± 0.28	5.0 ± 0.45
	4	15.2 ± 0.87	15.3 ± 1.02
	Множ.	0.9 ± 0.15	0.6 ± 0.07
Митоз, %		2.9 ± 0.17	3.3 ± 0.15
Апоптоз, %		2.2 ± 0.25	2.3 ± 0.20

Таблица 5. Частоты цитогенетических и кариологических нарушений в буккальных эпителиоцитах пациентов с раком легкого и контрольных доноров

Показатель	Контроль $\mu \pm SE, \%$	Рак легкого $\mu \pm SE, \%$	<i>p</i>
Цитогенетические показатели			
Микроядро	0.29 ± 0.12	0.34 ± 0.11	0.24
Протрузия “пузырек”	3.85 ± 0.45	6.88 ± 0.97	0.01
Протрузия “разбитое яйцо”	0.19 ± 0.07	0.38 ± 0.10	0.27
Протрузия “язык”	0.34 ± 0.09	0.22 ± 0.08	0.54
Сумма протрузий	4.39 ± 0.47	7.48 ± 1.01	0.01
Нуклеоплазменный мост	0.29 ± 0.08	0.42 ± 0.14	0.69
Атипичная форма	7.16 ± 0.76	8.85 ± 0.95	0.28
Сумма цитогенетических нарушений	12.13 ± 1.08	16.70 ± 1.69	0.02
Показатели нарушения пролиферации			
Двухядерность	3.94 ± 0.61	3.32 ± 0.59	0.34
Ядерная насечка	2.68 ± 0.58	1.88 ± 0.24	0.87
Сдвоенное ядро	5.23 ± 0.49	7.04 ± 0.62	0.00
Сумма пролиферативных нарушений	11.84 ± 1.37	12.24 ± 0.89	0.14
Показатели ранней и поздней деструкции ядра			
Перинуклеарная вакуоль	58.79 ± 5.35	101.19 ± 9.53	0.00
Вакуолизация ядра	40.15 ± 7.35	179.69 ± 17.60	0.00
Конденсация хроматина	76.34 ± 6.52	71.52 ± 7.04	0.55
Кариопикноз	30.86 ± 3.95	126.48 ± 13.74	0.00
Кариорексис	7.00 ± 3.65	5.29 ± 2.43	0.55
Кариолизис	81.07 ± 8.62	204.48 ± 17.98	0.00
Апоптозные тела	0.07 ± 0.03	0.02 ± 0.02	0.25

Примечание. *p* – уровень значимости (U-критерий Манна–Уитни).

контролем ($16.7 \pm 1.69\%$ против $12.13 \pm 1.08\%$; $p = 0.0284$).

Помимо цитогенетических биомаркеров важную информацию о процессах, происходящих в эксфолиативных клетках, дают показатели нарушения пролиферации (табл. 5). Сравнение этой группы параметров в группах контроля и пациентов позволило выявить у последних достоверное увели-

чение показателя “Сдвоенное ядро” ($7.04 \pm 0.62\%$ против $5.23 \pm 0.49\%$; $p = 0.0068$).

Рассматривая группу показателей ранней и поздней деструкции ядра, можно констатировать высокодостоверное ($p < 0.0001$) увеличение значений таких маркеров как наличие перинуклеарной вакуоли, вакуолизации ядра, кариопикноза и кариолизиса в эпителиоцитах больных РЛ по

Таблица 6. Уровень генетических повреждений в лимфоцитах и эпителиоцитах больных раком легкого и контрольных доноров в зависимости от курения

Группа		Рак легкого				Контроль			
		<i>N</i>	доля aberrantных метафаз, $\mu \pm SE$, %	доля лимфоцитов с микроядрами, $\mu \pm SE$, %	доля эпителиоцитов с микроядрами, $\mu \pm SE$, %	<i>N</i>	доля aberrantных метафаз, $\mu \pm SE$, %	доля лимфоцитов с микроядрами, $\mu \pm SE$, %	доля эпителиоцитов с микроядрами, $\mu \pm SE$, %
Курение	Да	38	4.15 \pm 0.32	1.42 \pm 0.11	0.24 \pm 0.09	31	1.87 \pm 0.19	0.95 \pm 0.10	0.39 \pm 0.21
	Нет	12	3.67 \pm 0.38	1.36 \pm 0.22	0.67 \pm 0.34	31	2.18 \pm 0.24	0.79 \pm 0.08	0.19 \pm 0.14

Примечание. *N* – объем выборки.

сравнению с контролем. Что касается частоты встречаемости клеток на стадии апоптоза, то в эпителиоцитах больных РЛ и контрольных доноров этот показатель значимо не различался, как и в случае сопоставления этого показателя деструкции ядра в микроядерном тесте на лимфоцитах (табл. 4).

Оценка влияния факторов возраста, статуса курения, а также стадии заболевания на базовый уровень цитогенетических повреждений в лимфоцитах и буккальных эпителиоцитах больных РЛ и контрольных доноров

Известно, что возрастной фактор может сказываться на уровне повреждений генома соматических клеток. Средний возраст доноров, включенных в состав сравниваемых выборок, имеет достоверные различия (табл. 1), поэтому необходимо оценить возможное влияние этого фактора на частоты основных биомаркеров, изученных в трех цитогенетических тестах. Корреляционный анализ показал, что ни один из биомаркеров значимо не связан с возрастом обследованных пациентов и контрольных доноров. Так, коэффициент Спирмена составил в контрольной выборке значения при сопоставлении возраста со следующими переменными: доля aberrantных метафаз, $r = -0.2032$; доля лимфоцитов с микроядрами, $r = 0.33262$; доля эпителиоцитов с микроядрами, $r = 0.07428$. Для выборки больных РЛ соответствующие коэффициенты составили: доля aberrantных метафаз, $r = 0.08995$; доля лимфоцитов с микроядрами, $r = -0.0328$; доля эпителиоцитов с микроядрами, $r = 0.03317$.

Оценка влияния курения на частоты цитогенетических параметров также является стандартной процедурой при проведении такого рода исследований. В нашем случае дополнительную актуальность изучению этого фактора придает тот факт, что курение – ведущая причина, провоци-

рующая развитие РЛ [21]. В табл. 6 суммированы результаты сопоставления частот основных биомаркеров генотоксического эффекта из трех цитогенетических тестов, регистрируемых у больных РЛ и контрольных доноров в зависимости от статуса курения. Из данных, приведенных в таблице, следует, что в выборке курящих пациентов с РЛ наблюдается определенное увеличение доли aberrantных метафаз, а также лимфоцитов с МЯ по сравнению со значениями, зарегистрированными для некурящих пациентов. Увеличение числа лимфоцитов и эпителиоцитов с микроядрами отмечено также в выборке курящих контрольных доноров по сравнению с некурящими, вместе с тем следует отметить, что любые различия, наблюдаемые между курящими и некурящими донорами, не достигали статистической значимости.

Отдельный интерес представляет оценка влияния стадии рака легкого, наличия или отсутствия метастаз в отдаленные органы на частоты основных биомаркеров генотоксического эффекта, фиксируемых в выборке пациентов. Данные, представленные в табл. 7, показывают, что эти факторы не влияют значимо на частоту цитогенетических повреждений в лимфоцитах (ХА, МЯ) и в буккальных эпителиоцитах (МЯ) больных РЛ. Дополнительно сопоставление частот ХА и МЯ у пациентов, страдающих тремя основными патоморфологическими формами РЛ (плоскоклеточный рак, аденокарцинома и мелкоклеточный рак), не показало достоверных различий ни по одному из исследуемых параметров.

Сведения о повышенной исходной нестабильности генома соматических клеток нелеченных пациентов с РЛ обсуждались ранее в ряде исследований, в которых были использованы различные биомаркеры цитогенетического эффекта. В частности, микроядерный анализ и тест на определение комет были использованы для выявления спонтанных повреждений в лимфоцитах 36 пациентов с раком легкого и 30 контрольных до-

Таблица 7. Оценка влияния стадии рака легкого, наличия или отсутствия метастаз в отдаленные органы на частоты основных биомаркеров генотоксического эффекта в трех использованных цитогенетических тестах

Показатель	Всего (50)	Стадии I–II (16)	Стадии III–IV (34)	С метастазами (10)	Без метастазов (42)
Доля aberrантных метафаз, $\mu \pm SE$, %	4.03 ± 0.26	3.81 ± 0.35	4.13 ± 0.34	3.7 ± 0.79	4.11 ± 0.26
Доля лимфоцитов с микроядрами, $\mu \pm SE$, %	1.4 ± 0.10	1.29 ± 0.15	1.46 ± 0.13	1.28 ± 0.20	1.44 ± 0.11
Доля эпителиоцитов с микроядрами, $\mu \pm SE$, %	0.34 ± 0.11	0.44 ± 0.22	0.29 ± 0.12	0.2 ± 0.13	0.38 ± 0.13

Примечание. В скобках – объем выборки.

норов [22]. В результате микроядерного анализа было установлено, что частота двуядерных лимфоцитов с микроядрами у пациентов значимо выше, чем в контроле ($9.25 \pm 0.58\%$ и $6.10 \pm 0.65\%$; $p < 0.05$). Тест ДНК комет в лимфоцитах дал противоречивые результаты. С одной стороны, значение среднего момента хвоста комет оказалось достоверно выше в выборке больных РЛ (0.84 ± 0.07), по сравнению с контрольной выборкой (0.60 ± 0.05 ; $p < 0.05$). Однако разница между пациентами и контрольной группой для другого показателя – средней длины хвоста оказалась статистически незначимой. Близкие по сути результаты были получены в исследовании 246 случаев немелкоклеточного рака легкого из Южной Индии. Обнаружено, что у пациентов с РЛ уровень повреждений ДНК, изученный методом ДНК комет и методом микроядерного теста, увеличен по сравнению со здоровым контролем [23]. Болгарские авторы [24] опубликовали результаты обширного исследования спонтанных ХА в лимфоцитах пациентов с различными формами новообразований, включая рак легких. В лимфоцитах у 87 больных РЛ была зарегистрирована повышенная частота aberrантных метафаз ($2.86 \pm 1.45\%$), достоверно отличающаяся от соответствующего значения в контроле ($1.82 \pm 1.32\%$; $p \leq 0.001$). Различия между пациентами и контрольной группой были значимыми для обеих основных категорий ХА: хроматидного типа (1.86 ± 1.3 против 1.11 ± 0.99 ; $p \leq 0.001$) и хромосомного типа (1.05 ± 0.98 против 0.84 ± 1.13 ; $p \leq 0.01$). Сходные результаты, свидетельствующие об увеличении частоты aberrаций как хромосомного, так и хроматидного типа у пациентов с раком легкого по сравнению с контролем, были недавно представлены нами [12].

Особенностью настоящего исследования является одновременное использование трех цитогенетических биомаркеров – хромосомных aberrаций и микроядер в лимфоцитах, а также микроядер в буккальных эпителиоцитах – для оценки уровня геномной нестабильности у пациентов с раком легкого. Кластогенные (ХА), а также кластогенные и анеугенные (МЯ) повреждения гено-

ма в лимфоцитах пациентов с РЛ существенно превышают соответствующие значения, регистрируемые у контрольных доноров. Таким образом, можно утверждать, что оба цитогенетических теста в лимфоцитах оказались достаточно чувствительными биомаркерами для оценки уровня нестабильности генома человека. Тест на определение цитогенетических повреждений в клетках другого типа – буккальных эпителиоцитах оказался не столь эффективным в отношении МЯ как основного биомаркера. Частота эпителиоцитов с МЯ в выборке больных РЛ была незначительно выше, чем в контроле ($0.34 \pm 0.11\%$ против $0.29 \pm 0.12\%$). Тем не менее использование расширенного протокола [20] позволило помимо собственно микроядер оценить сумму всех типов цитогенетических повреждений, которая оказалась достоверно выше в группе больных РЛ по сравнению с контролем ($16.7 \pm 1.69\%$ против $12.13 \pm 1.08\%$; $p = 0.0284$). Микроядерное тестирование в эксфолиативных клетках позволило также получить важные дополнительные сведения о том, что в клетках буккального эпителия больных РЛ с высокой степенью интенсивности происходят процессы деструкции ядра. Это утверждение основано на выявленном достоверном увеличении значений таких маркеров деструкции как наличие перинуклеарной вакуоли, вакуолизации ядра, кариопикноза и кариолизиса в эпителиоцитах больных РЛ по сравнению с контролем. Показатели деструкции ядра по своим морфологическим проявлениям могут отражать процессы гибели клеток как по пути некроза (перинуклеарная вакуоль, ядерная вакуолизация, кариолизис), так и по пути апоптоза (кариопикноз, кариорексис, апоптозные тела). В настоящем исследовании, анализируя полученные данные относительно показателей деструкции ядра, для лиц с РЛ отмечено значимое повышение скорости гибели эпителиоцитов, характеризующееся большей частотой регистрации клеток с перинуклеарными вакуолями, ядерной вакуолизацией и кариопикнозом относительно группы контроля, при этом можно говорить о преимуществен-

ной гибели клеток по некротическому пути. Нарушение процесса дифференцировки буккальных эпителиоцитов с преобладанием клеток поздних стадий деструкции ядра было ранее показано при анализе цитогрaмм больных РЛ как до, так и после химиотерапевтических мероприятий [25].

Одновременное использование сразу трех цитогенетических тестов при оценке цитогенетических показателей в двух разных типах соматических клеток дало возможность наиболее адекватно оценить влияние факторов возраста, статуса курения, типа и стадии заболевания на показатели базового уровня генетических повреждений в исследованных когортах. Отсутствие явного влияния перечисленных факторов на значения всех трех использованных биомаркеров позволяет утверждать, что увеличение спонтанного уровня генетической нестабильности, регистрируемое в соматических клетках нелеченных больных РЛ, является признаком, характеризующим конституциональное состояние генома при данном виде рака.

Значимо увеличенные базовые частоты ХА и МЯ у нелеченных пациентов с РЛ по сравнению с соответствующими значениями у контрольных доноров, выявленные в настоящем исследовании, согласуются с предыдущими сообщениями о повышенной нестабильности генома при этом типе рака [12, 22–24, 26]. Несмотря на разную чувствительность использованных цитогенетических тестов, их совместное использование дает важную дополнительную информацию. В частности, анализ показателей деструкции ядра, использованный в тесте с буккальными эпителиоцитами, указал на увеличение частоты элиминации поврежденных клеток у пациентов с РЛ путем некроза. Однонаправленные результаты, полученные с одновременным использованием трех цитогенетических тестов на разных типах соматических клеток, показали, что такие факторы как возраст пациентов, статус курения, тип и стадия РЛ не оказывают существенного влияния на показатели базового уровня генетических повреждений. Это, в свою очередь, позволяет утверждать, что цитогенетическая нестабильность соматических клеток нелеченных больных РЛ является признаком, характеризующим геном человека, находящийся под воздействием эндогенных гентоксических факторов. В частности, одним из таких факторов может выступать окислительный стресс, являющийся неперемнным атрибутом опухолевого процесса.

Исследование поддержано грантом РФФ № 18-14-00022.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национально-го комитета по исследовательской этике и Хель-

синкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Negrini S., Gorgoulis V.G., Halazonetis T.D.* Genomic instability – an evolving hallmark of cancer // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010. № 11. P. 220–228. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>
2. *Streffer C.* Strong association between cancer and genomic instability // *Radiat. Environ. Biophys.* 2010. V. 49. № 2. P. 125–131. <https://doi.org/10.1007/s00411-009-0258-4>
3. *Tubbs A., Nussenzweig A.* Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer // *Cell.* 2017. V. 9. № 168(4). P. 644–656. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.002>
4. *Hansford S., Huntsman D.G., Boveri A.T.* 100: Theodor Boveri and genetic predisposition to cancer // *J. Pathol.* 2014. V. 234. P. 142–145. <https://doi.org/10.1002/path.4414>
5. *Hagmar L., Brogger A., Hansteen I.L. et al.* Health risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage // *Cancer Res.* 1994. V. 54. P. 2919–2922.
6. *Bonassi S., Norppa H., Ceppi M. et al.* Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22358 subjects in 11 countries // *Carcinogenesis.* 2008. V. 29. № 6. P. 1178–1183. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn075>
7. *Bonassi S., El-Zein R., Bolognesi C., Fenech M.* Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies // *Mutagenesis.* 2011. V. 26. № 1. P. 93–100. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq075>
8. *Rossner P., Boffetta P., Ceppi M. et al.* Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer // *Environ. Health Perspect.* 2005. V. 113. № 5. P. 517–520. <https://doi.org/10.1289/ehp.6925>
9. *Jeggo P.A., Pearl L.H., Carr A.M.* DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective // *Nat. Rev. Cancer.* 2016. V. 16. № 1. P. 35–42. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.4>
10. *Iarmarcovai G., Ceppi M., Botta A. et al.* Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis // *Mutat. Res.* 2008. V. 659. № 3. P. 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.05.006>
11. *Stewart B.W., Wild C.P.* *World Cancer Report.* Lyon: IARC, 2014.
12. *Minina V.I., Sinitsky M.Y., Druzhinin V.G. et al.* Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of lung cancer patients exposed to radon and air pollu-

- tion // Eur. J. Cancer Prev. 2018. V. 27. № 1. P. 6–12. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000270>
13. Goldstraw P. New staging system: how does it affect our practice? // J. Clin. Oncol. 2013. V. 31. P. 984–991. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.42.7922>
 14. Hungerford P.A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl // Stain Techn. 1965. V. 40. P. 333–338.
 15. Savage J.R. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes // J. Med. Genet. 1976. V. 13. № 2. P. 103–122.
 16. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay // Nat. Protoc. 2007. V. 5. P. 1084–1104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
 17. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 1: пролиферация клеток // Экол. генет. 2006. Т. 4. № 3. С. 7–19.
 18. Thomas P., Holland N., Bolognesi C. et al. Buccal micronucleus cytochrome assay // Nat. Protoc. 2009. V. 4. № 6. P. 825–837. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.53>
 19. Tolbert P.E., Shy C.M., Allen J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development // Mut. Res. 1992. V. 271. № 1. P. 69–77.
 20. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека // Мед. генет. 2007. № 11. С. 3–11.
 21. Schwartz A.G., Cote M.L. Epidemiology of Lung Cancer // Adv. Exp. Med. Biol. 2016. V. 893. P. 21–41. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1_2
 22. Lou J., He J., Zheng W. et al. Investigating the genetic instability in the peripheral lymphocytes of 36 untreated lung cancer patients with comet assay and micronucleus assay // Mutat. Res. 2007. V. 617. № 1–2. P. 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.01.004>
 23. Peddireddy V., Badabagni S.P., Gundimeda S.D. et al. Genetic instability in peripheral lymphocytes as biological marker for non-small cell lung cancer patients in the South Indian state of Andhra Pradesh // Int. J. Biol. Markers. 2014. V. 29. № 4. P. e345–e353. <https://doi.org/10.5301/jbm.5000085>
 24. Vodenkova S., Polivkova Z., Musak L. et al. Structural chromosomal aberrations as potential risk markers in incident cancer patients // Mutagenesis. 2015. V. 30. № 4. P. 557–620.
 25. Бочкарева О.П., Красноженов Е.П., Гольдберг В.Е. и др. Морфофункциональное состояние буккальных эпителиоцитов у больных раком легкого // Сиб. онкологич. журн. 2013. № 3. С. 57–60.
 26. El-Zein R.A., Abdel-Rahman S., Santee K.J. et al. Identification of small and non-small cell lung cancer markers in peripheral blood using cytokinesis-blocked micronucleus and spectral karyotyping assays // Cytogenet. Genome Res. 2017. V. 152. № 3. P. 122–131. <https://doi.org/10.1159/000479809>

The Base Level of Cytogenetic Damage in Lymphocytes and Buccal Epitheliocytes of Lung Cancer Patients

V. G. Druzhinin^{a,*}, V. I. Minina^b, E. D. Baranova^a, T. A. Golovina^a, A. V. Meyer^a,
A. O. Mikhaylova^a, A. A. Timofeeva^b, V. A. Titov^c, T. A. Tolochko^a, and D. P. Shubenkina^a

^aKemerovo State University, Kemerovo, 650000 Russia

^bThe Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Kemerovo, 650099 Russia

^cKemerovo Regional Oncology Center, Kemerovo, 650000 Russia

*e-mail: druzhinin_vladim@mail.ru

The results of the study of chromosomal aberrations and micronuclei in blood lymphocytes, as well as micronuclei in buccal epithelium cells of 50 untreated men with lung cancer (LC) and 62 control donors are presented. Using all cytogenetic tests, a unidirectional significant increase in the base level of genetic instability in the cells of the patients was detected compared to the control. It has been shown that in LC patients, the elimination of damaged cells occurs predominantly by necrosis, whereas the frequencies of cells at the apoptosis stage do not differ in patients and in the control. Patient age, smoking status, type and stage of LC do not have a significant impact on the performance of the baseline level of genetic damage. This suggests that the cytogenetic instability of the somatic cells of untreated LC patients is a sign that characterizes the constitutional state of the genome with this type of cancer.

Keywords: lung cancer, lymphocytes, buccal epithelial cells, chromosomal aberrations, micronuclei, apoptosis, necrosis, genetic instability.