

УДК: 611.08

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ АГРЕССИВНОСТИ ТЕЧЕНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Э.А. Надыров¹, к.м.н., доцент; С.Б. Мельнов², д.б.н., профессор;
Ю.В. Малиновская²; Л.А. Путырский³, д.м.н., профессор; Ю.В. Сарана²

¹ - ГУ «РНПЦ радиационной медицины и экологии человека»

² - Международный государственный экологический университет имени А.Д. Сахарова

³ - ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова»

Проанализированы мазки-отпечатки опухолевой и перитуморозной тканей женщин с инвазивным раком молочной железы, проживающих на территориях Гомельской и Минской областей. Полученные в нашем исследовании данные свидетельствуют о существенном различии цитогенетических показателей клеток образцов тканей из Гомельской и Минской областей. Отмечена тесная связь дестабилизации генома и степени злокачественности опухоли.

Ключевые слова: рак молочной железы, генетическая нестабильность, патологические митозы, микроядра.

The impression smears of tumor and peritumor tissues of the women with invasive breast cancer, who live in Gomel and Minsk regions, have been analyzed. The data obtained in our research testify to the essential distinction of cytogenetic indicators of tissue sample cells from the Gomel and Minsk regions. The close connection of genome destabilization and tumor malignancy degree has been marked.

Key words: breast cancer, genetic instability, pathological mitoses, micronuclei

Введение

Онкологические заболевания представляют собой одну из ведущих причин смертности населения во всех странах. В то же время в генезе этой патологии играют роль как средовые, так и наследственные факторы, т.е. на формирование каждого индивидуального случая влияют генетические особенности индивида и частные экологические факторы. Это существенно затрудняет выявление уникального специфического фактора риска из множества возможных, так как в каждом конкретном случае соотношение «генотип-среда» может быть различным.

В настоящее время установлено несколько ведущих причин рака молочной железы (РМЖ), хотя при этом отмечают и ряд сопутствующих факторов, для которых установлена связь с повышенным риском развития этой патологии. Одной из главных причин РМЖ является генетическая предрасположенность, а среди экологических факторов – ионизирующее излучение [7]. Кроме того, интенсивно проводились исследования других потенциальных экологических факторов риска для этой формы рака, включая экспозицию по пестицидам, пассивное курение, загрязнители воздуха и эстроген-подобные вещества, присутствующие в окружающей среде [5].

Ионизирующее излучение является одной из доказанных причин возникновения РМЖ у человека [7, 9]. Так, повышенный риск РМЖ отмечен у выживших при взрывах атомных бомб в Японии, а также у женщин, которые подвергались лучевой терапии с интенсивным облучением грудной клетки. Установлено, что радиационная экспозиция женщин в возрасте старше 40 лет оказывает минимальное влияние на риск развития РМЖ, в то время как облучение в возрасте до 20 лет связано с весьма значительным риском (в некоторых исследованиях отмечали увеличение риска до 9 раз) [8]. Последствия такого воздействия реализуются через 10-15 лет после экспозиции, и повышенный риск сохраняется в течение всей жизни. Таким образом, выявление относительной роли средовых и наследственных факторов в генезе рака молочной железы в каждом конкретном случае представляется весьма актуальным, так как это позволит выявить локальные причины патологии и тем самым обеспечить возможности ее профилактики для конкретной популяции.

Методы исследований

Объект исследований – мазки-отпечатки опухолевой и перитуморозной тканей женщин с инвазивным раком молочной железы, проживающих на территориях Гомельской и Минской областей. Все пациентки из Гомельской области проживали на территориях, пострадавших в результате аварии на ЧАЭС. Цитологические препараты готовили по стандартной методике и окрашивали 10%-ным раствором красителя Романовского-Гимзы в течение 20 мин. Для контроля проводилась гистологическая верификация диагноза с определением гистологической формы рака и степени злокачественности. Анализ проводили с помощью микроскопа «Nikon» (увеличение 10×100).

От каждого пациента анализировали не менее 1000 клеток опухолевой и перитуморозной (фоновой) ткани, отдельно подсчитывались клетки с нормальными и патологическими митозами, а также микроядрами. Результаты выражали в процентах и обрабатывали с помощью пакета статистических программ «Statistica 6.0» с использованием параметрических и непараметрических методов.

Результаты и обсуждение

Полученные нами в результате исследований данные дают возможность предположить, что цитогенетический статус образцов опухолей из Гомельской и Минской областей существенно отличается. Результаты сравнительного анализа двух групп образцов суммированы в таблице 1.

Сравнительный анализ основных параметров двух групп (отличие – проживание на различных территориях), представленный в таблицах 1 и 2, свидетельствует о статистически значимом их различии в отношении основных показателей уровня мутагенеза, а также по уровню встречаемости патологических митозов.

Нарушение нормального течения митоза – патологический митоз – ведет к различным нарушениям хромосомного аппарата клеток, что, в свою очередь, реализуется в неравномерном распределении генетического материала между дочерними ядрами. Это один из основных механизмов возникновения анеуплоидий и нарастания генетической гетерогенности клеточных популяций. Клеточный полиморфизм, который обычно наблюдается при микроскопии клеток злокачественных опу-

Таблица 1 – Основные цитологические (цитогенетические) показатели клеток опухолевой ткани пациентов с РМЖ, проживающих в Гомельской и Минской областях

| Параметр | | Гомель | Минск | P |
|--|------------------------------|-------------|-------------|-------|
| Клеток в анализе | | 78000 | 63000 | |
| Распределение по фазам клеточного цикла (норма), % | Клетки в стадии профазы | 0,124±0,013 | 0,060±0,001 | 0,01 |
| | Клетки в стадии метафазы | 0,004±0,002 | 0,002±0,002 | |
| | Клетки в стадии анафазы | 0,001±0,001 | 0,000±0,000 | |
| | Клетки в стадии телофазы | 0,001±0,001 | 0,003±0,002 | |
| | Всего клеток в стадии митоза | 0,131±0,013 | 0,065±0,010 | 0,01 |
| Патологические митозы, % | Анафазные мосты | 0,171±0,015 | 0,011±0,004 | 0,005 |
| | Отставание в метафазе | 0,000±0,000 | 0,002±0,002 | |
| | Пульверизация хромосом | 0,001±0,001 | 0,002±0,002 | |
| | Трехгрупповые митозы | 0,001±0,001 | 0,003±0,002 | |
| | Многополосные | 0,000±0,000 | 0,002±0,002 | |
| | Моноцентрические | 0,000±0,000 | 0,003±0,002 | |
| | Асимметричные | 0,006±0,003 | 0,002±0,002 | |
| | К-митоз | 0,023±0,005 | 0,011±0,004 | 0,025 |
| | Прочие | 0,019±0,005 | 0,035±0,008 | 0,025 |
| Всего патологических митозов | 0,222±0,017 | 0,071±0,011 | 0,005 | |
| Клетки с микроядрами, % | 1 микроядро | 1,469±0,043 | 0,450±0,027 | 0,005 |
| | 2 микроядра | 0,124±0,013 | 0,065±0,010 | 0,01 |
| | 3 и > микроядер | 0,022±0,005 | 0,008±0,003 | 0,005 |
| | Всего микроядер | 1,783±0,047 | 0,594±0,031 | 0,005 |
| | Всего клеток с микроядрами | 1,615±0,045 | 0,519±0,029 | 0,005 |

Таблица 2 – Основные цитологические (цитогенетические) показатели клеток фоновой ткани пациентов с РМЖ, проживающих в Гомельской и Минской областях

| Параметр | | Гомель | Минск | P |
|--|------------------------------|-------------|-------------|-------|
| Клеток в анализе | | 60000 | 55000 | |
| Распределение по фазам клеточного цикла (норма), % | Клетки в стадии профазы | 0,038±0,008 | 0,013±0,005 | 0,025 |
| | Клетки в стадии метафазы | 0,000±0,000 | 0,000±0,000 | |
| | Клетки в стадии анафазы | 0,000±0,000 | 0,000±0,000 | |
| | Клетки в стадии телофазы | 0,008±0,004 | 0,000±0,000 | |
| | Всего клеток в стадии митоза | 0,047±0,009 | 0,013±0,005 | 0,01 |
| Патологические митозы, % | Анафазные мосты | 0,028±0,007 | 0,002±0,002 | 0,01 |
| | Отставание в метафазе | 0,000±0,000 | 0,000±0,000 | |
| | Пульверизация хромосом | 0,000±0,000 | 0,000±0,000 | |
| | Трехгрупповые митозы | 0,000±0,000 | 0,004±0,003 | |
| | Многополосные | 0,000±0,000 | 0,000±0,000 | |
| | Моноцентрические | 0,000±0,000 | 0,000±0,000 | |
| | Асимметричные | 0,000±0,000 | 0,000±0,000 | |
| | К-митоз | 0,007±0,003 | 0,000±0,000 | |
| | Прочие | 0,000±0,000 | 0,002±0,002 | |
| Всего патологических митозов | 0,035±0,008 | 0,007±0,004 | 0,01 | |
| Клетки с микроядрами, % | 1 микроядро | 0,608±0,032 | 0,178±0,018 | 0,005 |
| | 2 микроядра | 0,048±0,009 | 0,002±0,002 | |
| | 3 и > микроядер | 0,003±0,002 | 0,000±0,000 | |
| | Всего микроядер | 0,715±0,034 | 0,182±0,018 | 0,005 |
| | Всего клеток с микроядрами | 0,66±0,033 | 0,180±0,018 | 0,005 |

холей, представляет собой прямое следствие патологии митоза.

Несмотря на то, что по отдельным типам патологических митозов различия не всегда значимы, общая частота патологических митозов в образцах ткани Гомельской области значительно (0,222±0,017%) и статистически значимо ($P < 0,005$) превышает таковой у женщин Минской области (0,071±0,011 %).

Известно, что возникновение дицентрических хромосом (специфических маркеров радиационного воздей-

ствия), как правило, приводит к образованию мостов, которые могут сохраняться в интерфазе [1]. Как видно из табл. 1 и 2, число клеток с данной аномалией значимо выше в опухолевой ($P < 0,005$) и перитуморозной ($P < 0,01$) ткани у пациентов, проживающих в Гомеле и Гомельской области.

Частота встречаемости микроядер является весьма чувствительным, но неспецифическим показателем мутационного давления, отражающим степень общей дестабилизации генома соматических клеток. В настоящее время выделяют два основных механизма образования микроядер [2]:

1. Микроядро в ядерной клетке может быть образовано фрагментом хромосомы в результате повреждения ДНК. Оно не содержит центромерного участка и характеризует общий кластогенный эффект. Увеличение частоты встречаемости клеток с микроядрами этого типа свидетельствует об индукции хромосомных и, возможно, генных мутаций.

2. Микроядро может быть результатом повреждения веретена деления, и образовано одной или несколькими целыми хромосомами, отставшими в анафазе митоза и не вошедшими в основное ядро. В этом случае микроядро включает число центромер, соответствующее количеству вошедших в него хромосом. Появление таких микроядер характеризует анеуплоидный эффект (изменение числа хромосом в основном ядре) и указывает на присутствие геномных мутаций.

В настоящее время появляются данные о значимости микроядер как биомаркеров канцерогенного эффекта. Показано, что повышение частоты клеток с микроядрами в ротовой полости является самым ранним признаком высокого риска рака ротовой полости, который отмечается еще до развития лейкоплакии и усиливается на каждой последующей стадии предраковых изменений [6]. Интересным является тот факт, что повышение частоты буккальных эпителиоцитов с микроядрами выявлено также и при раке других локализаций: лимфатических узлов, грудной клетки, шейки матки [4]. Эти факты позволяют сделать заключение о том, что при канцерогенезе имеют место определенные универсальные процессы, приводящие к дестабилизации генома, в том числе – к повышению частоты генетически измененных клеток в органе, удаленном от места локализации опухоли [3].

Представленные в таблице 1 данные однозначно указывают на то, что по частоте встречаемости клеток с 1, 2, 3 микроядрами, общему количеству микроядер и клеток с микроядрами, образцы тканей РМЖ пациентов, проживающих в Гомеле и Гомельской области, превышают аналогичные значения для тканей РМЖ женщин, проживающих в Минске; при этом отмеченное различие статистически значимо ($P < 0,005$ для клеток с 1 и 3 микроядрами, $P < 0,01$ для клеток с 2 микроядрами, $P < 0,005$ для общего количества микроядер и клеток с микроядрами).

При анализе фоновой ткани молочной железы (табл. 2) также было выявлено статистически значимое превышение частоты встречаемости клеток с микроядрами у пациенток из Гомельской области ($P < 0,005$).

Известно, что развитие опухоли характеризуется отбором наиболее активных клонов, а их количество определяется уровнем генетического разнообразия, т.е. чем выше выраженность мутационного процесса, тем более активно может протекать процесс формирования опухоли. Между выраженностью мутационного давления и стадией процесса существует реальная взаимосвязь, которая наглядно выявляется с помощью корреляционного анализа (табл. 3). Следует отметить, что корреляцион-

Таблица 3 – Корреляционный анализ зависимости некоторых цитогенетических параметров опухолевой ткани от размера опухоли и степени ее злокачественности у больных РМЖ (корреляционный анализ проведен в статистике Кендалла (τ))

| Показатели | τ | Z | p |
|--|----------|---------|-----------|
| Размер опухоли / клетки в стадии телофазы | 0,119698 | 2,32407 | p < 0,05 |
| Размер опухоли / клетки с моноцентрическими митозами | 0,136347 | 2,64734 | p < 0,005 |
| Размер опухоли / частота клеток с К-митозами | 0,132119 | 2,56525 | p < 0,05 |
| Степень злокачественности / частота клеток с мостами | 0,176465 | 3,39547 | p < 0,001 |
| Степень злокачественности / частота клеток с трехгрупповыми метафазами | 0,181919 | 3,50042 | p < 0,001 |
| Степень злокачественности / всего клеток с патологическими митозами | 0,121944 | 2,34641 | p < 0,05 |
| Степень злокачественности / частота клеток с одним микроядром | 0,112417 | 2,16308 | p < 0,05 |
| Степень злокачественности / частота клеток с двумя микроядрами | 0,109555 | 2,10801 | p < 0,05 |
| Степень злокачественности / общее количество микроядер | 0,112804 | 2,17052 | p < 0,05 |
| Степень злокачественности / частота клеток с микроядрами | 0,110698 | 2,13002 | p < 0,05 |

Таблица 4 – Корреляционный анализ зависимости некоторых цитогенетических параметров перитуморозной ткани от размера опухоли и степени злокачественности у больных РМЖ (корреляционный анализ проведен в статистике Кендалла (τ))

| Показатели | τ | Z | p |
|---|----------|----------|------------|
| Размер опухоли / клетки с моноцентрическими митозами | 0,121957 | 2,325162 | p < 0,05 |
| Степень злокачественности / частота клеток в стадии профазы | 0,188471 | 3,559773 | p < 0,005 |
| Степень злокачественности / частота клеток в стадиях митоза | 0,188342 | 3,568547 | p < 0,005 |
| Степень злокачественности / частота клеток с мостами | 0,160257 | 3,036406 | p < 0,005 |
| Агрессивность опухоли / частота клеток с К-митозами | 0,176411 | 3,342479 | p < 0,005 |
| Степень злокачественности / всего клеток с патологическими митозами | 0,219481 | 4,15854 | p < 0,0001 |
| Степень злокачественности / частота клеток с 1 микроядром | 0,160773 | 3,046182 | p < 0,005 |
| Степень злокачественности / частота клеток с 2 микроядрами | 0,211028 | 3,998382 | p < 0,0001 |
| Степень злокачественности / частота клеток с 3 и > микроядрами | 0,136414 | 2,584658 | p < 0,05 |
| Степень злокачественности / общее количество микроядер | 0,171223 | 3,24419 | p < 0,005 |
| Степень злокачественности / частота клеток с микроядрами | 0,155588 | 2,929422 | p < 0,005 |

ный анализ проводился в общей группе больных, вне зависимости от места проживания.

В результате приведенного выше анализа нами была выявлена устойчивая корреляционная зависимость степени агрессивности опухоли в отношении следующих цитогенетических параметров: количество клеток с одним микроядром (p < 0,05), количество клеток с двумя микроядрами (p < 0,05), общее количество микроядер (p < 0,05), количество клеток с микроядрами (p < 0,05).

Также выявлена четкая и значимая корреляция между размером опухоли и количеством клеток в стадии телофазы (p < 0,05), а также некоторыми формами патологических митозов, включая моноцентрический митоз (p < 0,005) и К-митоз (p < 0,05).

Данные, приведенные в табл. 4, наглядно свидетельствуют о наличии явной корреляционной зависимости между степенью злокачественности опухоли и следующими цитогенетическими параметрами: количеством клеток в стадии профазы (p < 0,005), количеством клеток в стадии митоза (p < 0,005), частотой встречаемости клеток с анафазными мостами (p < 0,005), К-митозами (p < 0,005), общей частотой клеток с патологиями митоза (p < 0,0001), частотой встречаемости клеток с одним микроядром (p < 0,005), частотой встречаемости клеток с двумя микроядрами (p < 0,0001), частотой встречаемости клеток с тремя и более микроядрами (p < 0,05), общим количеством микроядер (p < 0,005) и общим количеством клеток с микроядрами (p < 0,005). Также выявлена четкая и значимая корреляция между размером опухоли и частотой встречаемости моноцентрических митозов (p < 0,05).

Заключение

Полученные в нашем исследовании данные показывают, что общая частота патологических митозов в образцах ткани молочной железы и частоты встречаемости клеток с микроядрами у женщин Гомельской области статистически значимо (p < 0,005) превышают таковые у женщин Минской области, что, вероятно, указывает на влияние факторов экологического неблагополучия. Частота клеток с микроядрами является одной из характеристик степени генетической нестабильности нормальных и злокачественных соматических клеток. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что степень дестабилизации генома тесно связана с агрессивностью опухоли, что может быть использовано в качестве прогностического параметра для послеоперационного ведения пациентов.

Литература

1. Казанцева, И.А. Патология митоза в опухолях человека / И.А. Казанцева. – Наука. – 1980. – 169 с.
2. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Совместное издание ООН, МОТ и ВОЗ. – Женева, 1989. – 212 с.
3. Сычева, Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека / Л.П. Сычева // Медицинская генетика. – 2007. № 11 (65). – С. 3-11.
4. Цитогенетические нарушения в экфолиативных клетках онкологических больных / А.К. Нерсесян [и др.] // Сборник тезисов докладов II Съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. – С-Пб., 2000. Т.2. – С. 202.
5. Environmental and heritable factors in the causation of cancer – analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. / P. Lichtenstein, [et al]. – N. Engl. J. Med. – 2000. – P. 78-85.
6. Evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei, and sister chromatid exchanges in hospital workers chronically exposed to ionizing radiation. / R.S. Cardozo, [et al]. // Teratog. Carcinog. Mutagen. – 2001. – Vol. 21 – №6. – P. 431-439.
7. Identification of women with an increased risk of developing radiation-induced breast cancer. Breast Cancer Res. – 2007. – № 9(3).
8. Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950–1990. / C.E. Land, [et al] / Radiation Research, 2003. – № 160. – P. 707-717.
9. Ronckers, C. M. Radiation and breast cancer: a review of current evidence / C.M. Ronckers, C. A. Erdmann, C. E. Land // Breast Cancer Res. – 2005. – Vol 7. – P. 21-32.

Поступила 31.03.09