

В.Ф. Чехун
Ю.В. Лозовська
О.Л. Севко
Г.І. Кулик
Л.З. Поліщук
Л.А. Налескіна
Т.В. Призимирська
Ю.Г. Шкорбатюк

Інститут експериментальної
патології, онкології
та радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ

Харківський національний
університет ім. В.Н. Карабіна,
Харків, Україна

Ключові слова: мікроядра,
інтерфазний хроматин,
букальний епітелій, гомоцистеїн,
плазма крові, фіброаденома, рак
молочної залози.

В останні роки у багатьох наукових дослідженнях підкреслюється вагома роль гіпометилування ДНК у виникненні та прогресії раку молочної залози (РМЗ) [10, 12]. Встановлено, що порушення метилування ДНК відзначають в усіх типах клітин, навіть у тих, які значно віддалені від основного місця локалізації пухлини [21]. Показано також, що кількість мікроядер (МЯ) та ступінь гетерохроматизації прямо корелюють із гіпометилуванням ДНК [15]. Водночас ефекти результуючого продукту порушення процесів метилування — гомоцистеїну (ГЦ) при формуванні злоякісного фенотипу клітин досліджено недостатньо [12, 13]. Встановлено, що ГЦ індукуює *in vitro* гіперпроліферацію клітин коло ректального раку [9], експресію макрофагами мРНК білків — прозапальних цитокінів [20], виявляє потенційно модулюючу дію на протеолітичний баланс, зокрема утворює тіолові сполуки, що інгібують металопротеїнази 2 і 9 [11]. Є дані, що ГЦ виявляє ангіогенну активність та впливає на ключові позиції в процесах ангіогенезу і пухлинної інвазії [13] і що ГЦ інгібує ангіогенез та інвазію пухлин. Доведено, що із гіпометилуванням ДНК прямо корелює кількість МЯ та ступінь гетерохроматизації інтерфазних ядер; поряд з цим показано тісний зв'язок між гіпометилуванням ДНК та розладами у метаболізмі ГЦ [15, 19].

Оцінка кількості МЯ може бути використана як непрямої спосіб визначення гіпометилування геному, оскільки гіпометилування сателітів 2 і 3 геномної ДНК призводить до втрати хромосом 1, 9 і 16 у вигляді МЯ, а кількість МЯ прямо корелює з гіпометилуванням геномної ДНК [15]. Гіпометилування ДНК у свою чергу впливає на експресію генів, наслідком чого є зміна конформації хроматину та фенотипу клітин [15, 19].

КІЛЬКІСТЬ МІКРОЯДЕР І ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРИ ХРОМАТИНУ В КЛІТИНАХ БУКАЛЬНОГО ЕПІТЕЛІЮ ТА РІВЕНЬ ГОМОЦИСТЕЇНУ У ПЛАЗМІ КРОВІ ЖІНОК З ПУХЛИНАМИ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Резюме. Проаналізовано зв'язок між кількістю мікроядер, структурою хроматину інтерфазних ядер клітин булакального епітелію та рівнем гомоцистеїну у плазмі крові жінок з новоутвореннями молочної залози. Зроблено висновок про пряму кореляційну залежність між кількістю мікроядер та концентрацією гомоцистеїну у плазмі крові хворих на рак молочної залози та пацієнток з фіброаденомою. Виявлена зворотня кореляційна залежність між вмістом гетерохроматинових гранул у ядрах булакального епітелію та рівнем гомоцистеїну у групах хворих. Показано достовірне збільшення кількості мікроядер у булакальному епітелії хворих на рак молочної залози порівняно з такою у пацієнток з фіброаденомою.

Мета роботи — оцінка стабільності геному клітин булакального епітелію (БЕ) шляхом дослідження кількості МЯ та структури хроматину ядер у зіставленні з вмістом гомоцистеїну у плазмі крові хворих з пухлинними процесами молочної залози (МЗ).

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріалом дослідження були зскребки БЕ 11 хворих на РМЗ I–II стадії (за класифікацією TNM) і 9 пацієнток з фіброаденомою (ФАД) МЗ. Вік хворих коливався від 23 до 75 років, середній вік становив $50,2 \pm 3,1$ року. До обстеження хворим не проводили неoad'ювантну терапію та оперативне втручання.

Зскребки проміжного шару клітин БЕ наносили на чисті знежирені предметні скельця, підсушували їх при кімнатній температурі, забарвлювали за Папенгеймом та 1% розчином ацетоорсеїну за стандартними протоколами [3, 18]. Підрахунок кількості МЯ та вмісту гетерохроматинових гранул (ГГ) проводили за допомогою світлооптичного мікроскопу Micros MC 300 (Австрія) при збільшенні $\times 1000$ (масляна імерсія). Для кількісної оцінки МЯ у кожному препараті підраховували 1000 клітин, результати виражали у %. Клітини з ознаками каріопікнозу, каріорексісу, каріолізісу, з фрагментованими ядрами, двоядерні клітини у підрахунок не включали. Ідентифікацію МЯ проводили, користуючись описаними у літературі критеріями [14]. Конденсацію інтерфазного хроматину у ядрах клітин БЕ вираховували на підставі вмісту ГГ. У кожному препараті підраховували ГГ у ядрах 30 клітин, результати виражали у % [18].

Концентрацію ГЦ у плазмі крові визначали імуноферментним методом, використовуючи набори «DIAZYME» та «AXIS-SHIELD» (США) згідно з про-

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

токолами фірм-виробників, і як антикоагулянт — ЕДТА. Забор крові для аналізу проводили у лежачому положенні вранці до сніданку, до прийому лікарських засобів.

Клінічні діагнози у всіх пацієнок верифіковані при гістологічному дослідженні видалених пухлин. За морфологічними особливостями злоякісні пухлини відповідали інфільтруючому протоковому РМЗ, доброякісні — ФАД МЗ з гіперплазією епітелію протоків.

Статистичні розрахунки проводили, використовуючи критерій Ст'юдента та кореляційний аналіз [4].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Якісний аналіз цитологічних препаратів, виготовлених із зскребоків БЕ, дозволив ідентифікувати МЯ з діаметром меншим, ніж $\frac{1}{3}$ діаметра основного ядра клітини. Вони розташовувались у цитоплазмі, чітко простежувались у тому ж фокусі мікроскопу, що і ядро, та мали подібний до останнього колір і текстуру хроматину. За формою МЯ округлі або овальні та чітко відокремлювались від ядра (рис. 1). Структуру інтерфазного хроматину у ядрах визначали на підставі вмісту ГГ, що мали більш інтенсивне забарвлення та чітко відокремлювались від загальної текстури хроматину (рис. 2).

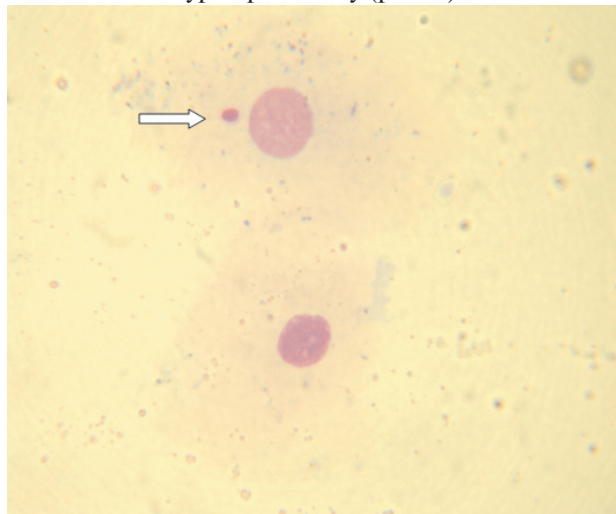


Рис. 1. МЯ у цитоплазмі однієї з клітин проміжного шару БЕ. Забарвлення за Папенгеймом. 36×1000

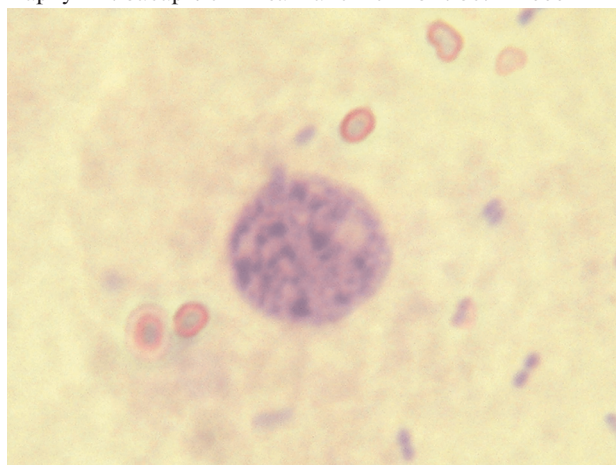


Рис. 2. Інтерфазне ядро БЕ з ознаками гетерохроматизації. Забарвлення за Папенгеймом. 36×1000

Результати дослідження кількості МЯ та вмісту ГГ у клітинах БЕ хворих на РМЗ і ФАД МЗ та концентрації ГЦ у плазмі крові наведені у табл. 1.

Таблиця 1
Результати цитологічних та імуноферментних досліджень у хворих на РМЗ і ФАД МЗ

Клінічний діагноз	Кількість хворих	БЕ*		Плазма крові*
		кількість МЯ, %	вміст ГГ, %	концентрація ГЦ, мкмоль/л
РМЗ	11	$6,4 \pm 0,9$	$7,9 \pm 0,6$	$16,8 \pm 1,9$
		1,3–13,0	4,6–12,5	5,1–24,0
ФАД МЗ	9	$3,1 \pm 0,6$	$7,3 \pm 0,5$	$18,8 \pm 2,5$
		0,0–5,6	5,1–10,5	8,0–32,0

В табл. 1, 2, 3 — *чисельник — середні значення ($M \pm m$), знаменник — коливання показників \min – \max .

Отримані результати свідчать про достовірне збільшення ($p < 0,05$) кількості МЯ у БЕ хворих на РМЗ відносно значень пацієнок з ФАД МЗ. Не встановлено достовірної різниці між групами за вмістом ГГ. Відомо, що рівень ГЦ у плазмі крові здорових людей становить 5–15 мкмоль/л, що і вважали орієнтиром для оцінки власних досліджень [8]. Порівняльний аналіз концентрації ГЦ у плазмі крові хворих на РМЗ та ФАД не виявив достовірної різниці між групами за цим показником. Слід відзначити значні індивідуальні коливання концентрації ГЦ. Тому за рівнем концентрації ГЦ у плазмі крові кожен з груп розподілили на підгрупи. У 1-шу підгрупу увійшли хворі з доброякісними або злоякісними новоутвореннями МЗ з рівнем концентрації ГЦ у плазмі від 5,1 до 15,0 мкмоль/л. У пацієнок 2-ї підгрупи рівень ГЦ коливався від 15,1 до 32,0 мкмоль/л. Середні дані щодо кількості МЯ та вмісту ГГ та індивідуальних коливань цих показників у клітинах БЕ хворих на РМЗ та ФАД із різною концентрацією ГЦ у плазмі крові наведені у табл. 2 та 3. Порівняльний аналіз кількості МЯ у БЕ хворих на РМЗ залежно від рівня ГЦ у плазмі крові виявив тенденцію до її збільшення по мірі зростання концентрації ГЦ; в обох підгрупах визначено пряму кореляційну залежність між цими показниками: відповідно $r = 0,50$ та $r = 0,52$. Одночасно в обох підгрупах відзначали тенденцію до зниження вмісту ГГ із підвищенням концентрації ГЦ у плазмі крові (див. табл. 2). Виявлено сильну кореляційну залежність між кількістю МЯ у БЕ і концентрацією ГЦ у плазмі крові хворих обох підгруп: відповідно $r = -0,65$ та $r = -0,72$.

Таблиця 2
Кількість МЯ та вміст ГГ у клітинах БЕ пацієнтів з РМЗ залежно від концентрації ГЦ у плазмі крові

Концентрація ГЦ, мкмоль/л			
5,1–15,0, n = 4		більше 15,1–32,0, n = 7	
МЯ, %*	ГГ, %*	МЯ, %*	ГГ, %*
$5,77 \pm 1,47$	$8,4 \pm 1,02$	$6,68 \pm 1,67$	$7,61 \pm 1,02$
3,1–9,0	5,8–9,9	3,0–13,0	4,6–12,5

У БЕ хворих з ФАД МЗ відзначено тенденцію до збільшення кількості МЯ та достовірне зниження ($p < 0,05$) вмісту ГГ із підвищенням концентрації ГЦ у плазмі крові (див. табл. 3). Виявлено пряму кореляційну залежність між кількістю МЯ та рівнем ГЦ ($r = 0,52$) і сильну зворотню кореляцій-

ну залежність між ГГ і рівнем ГЦ для хворих як 1-ї ($r = -0,98$), так і 2-ї ($r = -0,50$) підгрупи.

Таблиця 3
Кількість МЯ та ГГ у клітинах БЕ хворих з ФАД МЗ залежно від концентрації ГЦ у плазмі крові

Концентрація ГЦ, мкмоль/л			
5,1–15,0, n = 3		15,1–32,0, n = 6	
МЯ, ‰*	ГГ, ‰*	МЯ, ‰*	ГГ, ‰*
2,86 ± 1,61	9,3 ± 0,66	3,53 ± 0,81	6,35 ± 0,90
0–4,9	8,2–10,2	2,1–5,0	5,1–10,5

Порівняльний аналіз кількості МЯ та вмісту ГГ у БЕ хворих зі злоякісними та доброякісними новоутвореннями виявив достовірні відмінності цих показників. У хворих на РМЗ, що увійшли у 1-шу підгрупу, кількість МЯ становила 5,77‰, у пацієнтів з ФАД — 2,86‰ ($p < 0,05$); достовірних змін вмісту ГГ у БЕ не виявлено. У хворих на РМЗ, що увійшли у 2-гу підгрупу, кількість МЯ становила 6,68‰, а з ФАД — 3,53‰ ($p < 0,05$); достовірних змін вмісту ГГ у хворих даної підгрупи також не виявлено, проте відзначено пряму кореляційну залежність між рівнем ГЦ та кількістю МЯ ($r = 0,56$) та зворотно — між рівнем ГЦ та вмістом ГГ ($r = -0,72$). Отже, у БЕ хворих на РМЗ встановлено збільшена кількість МЯ, що свідчить про значніше порушення генетичної стабільності клітин, ніж у хворих ФАД.

Відомо, що розвиток і прогресія злоякісного росту пов'язані із появою стійкої нестабільності геному у клітинах організму. Такі зміни відзначають не тільки у пухлинних клітинах, але і у соматичних немалігнізованих клітинах [1, 21]. Загально визнаним, швидким та інформативним тестом для оцінки хромосомних пошкоджень, у тому числі втрати хромосом у клітинах, є мікроядерний тест, що широко використовують як показник нестабільності геному у медико-біологічній практиці [6, 7, 16]. Але деякі аспекти цієї проблеми, зокрема формування МЯ, залишаються ще дискусійними. Вважається, що формування малих за розміром МЯ пов'язане із відставанням ацентричних фрагментів, а втрата цілих хромосом призводить до утворення великих за розміром МЯ [2]. Існує точка зору про походження МЯ, незалежно від каріокінезу, шляхом «інтерфазної демінуції хроматину» [5]. Дані літератури підтверджують подібний механізм утворення МЯ у лімфоцитах крові людини, стимульованих фітогемаглютиніном після опромінення *in vitro* [5]. Встановлено збільшення кількості МЯ порівняно з показниками здорових осіб у БЕ пацієнтів зі шлунково-кишковими захворюваннями та при гіпотоксичному пошкодженні щитовидної залози [6, 7]. Також існують дані літератури про збільшення кількості МЯ у БЕ людей, які працюють із токсичними речовинами [17].

Результати порівняння результатів власних досліджень із даними літератури свідчать, що кількість МЯ у БЕ хворих зі злоякісними та доброякісними новоутвореннями МЗ вища, ніж у

пацієнтів із соматичними не пухлинними захворюваннями [6, 7, 16]. Зміна структури інтерфазного хроматину ядер БЕ пацієнтів з гіпергомостеїнемією, яка супроводжується тенденцією до деконденсації хроматину, ймовірно, пов'язана із деметилуванням 5-метилцитозину та послабленням зв'язку між комплементарними парами основ гуаніну та цитозину. Поряд з цим встановлено зниження вмісту ГГ у інтефазних ядрах БЕ хворих на РМЗ та ФАД МЗ [15, 19]. Проте є дані, що структура хроматину інтерфазних ядер у жінок зі злоякісними новоутвореннями МЗ має зовсім інший характер змін, ніж у пацієнтів із доброякісними пухлинами [1]. Як показано нами, кількість МЯ та вміст ГГ у БЕ хворих зі злоякісними та доброякісними новоутвореннями МЗ достовірно корелює з рівнем ГЦ у плазмі крові, що у свою чергу може слугувати свідченням гіпометилування ДНК [15, 19]. Існують дані експериментальних досліджень на клітинних лініях раку кишечника TC71-МА та раку легені SCLC6, що доводять взаємозв'язок гіпометилування ДНК та гіпергомостеїнемії [17]. Отже, отримані результати можуть бути використані як показники нестабільності геному соматичних немалігнізованих клітин у хворих з патологією МЗ.

ВИСНОВКИ

1. У БЕ хворих на РМЗ порівняно з пацієнтками з ФАД МЗ виявлено достовірне збільшення кількості МЯ, яка у середньому становила $6,4 \pm 0,9\%$. Поряд з цим визначено тенденцію до зміни структури хроматину інтерфазних ядер, що проявляється у зниженні вмісту ГГ.

2. Уперше встановлено пряму кореляційну залежність між кількістю МЯ та концентрацією ГЦ у плазмі крові хворих на РМЗ та ФАД МЗ і відзначено зворотною кореляційну залежність між вмістом ГГ та рівнем ГЦ.

ЛІТЕРАТУРА

1. **Бородай НВ.** Цитогенетичні пухлиноасоційовані зміни букального епітелію при доброякісних процесах та раках молочної та щитовидної залоз. [Автореф дис ... д-ра мед наук]. Київ, 2000. 37 с.
2. **Ильинских НН, Новицкий ВВ, Ванчугова НН, Ильинских ИИ.** Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск, 1992. 220 с.
3. Клінічна лабораторна діагностика: Нормативне виробничо-практичне видання. Київ: Медінформ, 2005: 408–9.
4. **Лакін ГФ.** Биометрия. Москва: Высшая школа, 1990. 352 с.
5. **Манских ВН.** К вопросу о механизмах образования микроядер в соматических клетках бесхвостых амфибий в норме и при действии N-нитрозо-N-метилкарбамида. БЭБМ 2006; **141** (2): 217–20.
6. **Павлов АВ, Гасбургский МА, Гасбургский АН и др.** Использование микроядерного теста для выявления гипотоксического повреждения щитовидной железы. БЭБМ 2006; **41** (1): 99–100.

7. **Сокольник СН.** Мікроядерний індекс у соматичних клітинах дітей, хворих на виразкову хворобу дванадцятипалої кишки. Ліки України 2004; (7–8): 101–4.
8. **Шевченко ОП.** Гомоцистеин — новый фактор атеросклероза и тромбоза. Клин лаб диагностика 2004; (10): 25–31.
9. **Akoglu B, Milovic V, Caspary WF, Faust D.** Hyperproliferation of homocysteine-treated colon cancer cells is reversed by folate and 5-methyltetrahydrofolate. Eur J Nutr 2004; **43** (2): 93–9.
10. **Beetstra S, Salisbury C, Turner J, et al.** Lymphocytes of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutation carriers, with or without breast cancer, are not abnormally sensitive to the chromosome damaging effect of moderate folate deficiency. Carcinogenesis 2006; **27** (3): 517–24.
11. **Chavarría T, Rodriguez-Nieto S, Sanchez-Jimenez F, et al.** Homocysteine is a potent inhibitor of human tumor cell gelatinases. Biochem Biophys Res Commun 2003; **303** (2): 572–5.
12. **Kim YI.** Nutritional epigenetics: impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility. J Nutr 2005; **135** (11): 2703–9.
13. **Martinez-Poveda B, Chavarría T, Sanchez-Jimenez F, et al.** An in vitro evaluation of the effects of homocysteine thiolactone on key steps of angiogenesis and tumor invasion. Biochem Biophys Res Commun 2003; **311** (3): 649–53.
14. **Martino-Roth MG, Viegas J, Roth DM.** Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. Gen Mol Research 2003; **2** (4): 410–7.
15. **Michiyo Kimura, Keizo Umegaki, Mitsuru Higuchi, et al.** Methylene tetrahydrofolate reductase C677C polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. Am Society Nutr Sci 2004: 49–56.
16. **Nersesyan AK, Adamyan RT.** Micronuclei level in exfoliated buccal mucosa cells of patients with benign and malignant tumors of female reproductive organs and breast. Цитол и генет 2004; (3): 72–5.
17. **Poirson-Bichat F, Goncaves RA, Miccoli I, et al.** Methionine depletion enhances the antitumoral efficacy of cytotoxic agents in drug-resistant human tumor xenografts. Clin Cancer Res 2000; **6** (2): 643–53.
18. **Shkhorbatov YG, Lyubov A, Zhuravlova VV, et al.** Chromatin structure and the state of human organism. Cell Biology Int 2005; **29**: 77–81.
19. **S Jill James, Melnyk S, Pogribna M, et al.** Elevation in s-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. J Nutr 2002; **132** (8): 2361–6.

20. **Su SJ, Huang LW, Pai LS, et al.** Homocysteine at pathophysiologic concentrations activates human monocyte and induces cytokine expression and inhibits macrophage migration inhibitory factor expression. Nutrition 2005; **21** (10): 994–1002.

21. **Wojewodzka M, Kruszewski M, Iwanenko T, et al.** Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. I Strand breakage. Mutat Res 1998; **416** (1–2): 21–35.

MICRONUCLEI AND CHROMATIN STRUCTURE PATTERNS IN BUCCAL EPITHELIUM CELLS AND RELATIONSHIPS WITH PLASMA HOMOCYSTEINE LEVELS IN FEMALE PATIENTS WITH BREAST TUMORS

*V.F. Chekhun, Y.V. Lozovskaya, A.L. Sevko,
G.I. Kulik, L.Z. Polischuk, L.A. Naleskina,
T.V. Prizimirska, Y.G. Shkhorbatov*

Summary. *The paper analyzes patterns of micronuclei (MNi) level in mucosa buccal epithelium (BE) cells, interphase chromatin structure in BE, and homocysteine (Hcy) levels in blood plasma in women with breast neoplasms. A positive correlation is found between MNi in BE and Hcy levels in blood plasma in both breast cancer and fibroadenoma patients. An inverse correlation was found between heterochromatin granule level in BE nuclei and Hcy level in blood plasma in the groups of patients under consideration. MNi level in BE is shown to increase significantly in patients with breast cancer comparing to women with breast fibroadenoma.*

Key Words: micronuclei, buccal epithelium, interphase chromatin, homocysteine, fibroadenoma, breast cancer.

Адреса для листування:

Лозовська Ю.В.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, відділ механізмів протипухлинної терапії

E-mail: lozovskaya33@yahoo.com