

М. А. Пілінська, С. С. Дибський, О. Б. Дибська, Л. І. Швайко

Використання модифікованого тесту “G₂ bleomycin sensitivity assay” для виявлення прихованої хромосомної нестабільності у хворих на рак легенів

(Представлено академіком НАН України Д. М. Гродзинським)

За допомогою модифікованого тесту “G₂ bleomycin sensitivity assay” оцінено приховану хромосомну нестабільність (ПХН) у хворих на рак легенів (РЛ), які заперечували свідомий контакт із мутагенними факторами. Визначено додаток до фонові середньогрупової частоти аберацій хромосом (надспонтанний цитогенетичний ефект) у групі онкологічних пацієнтів — 44,6 та 53,3 на 100 метафаз при концентраціях блеоміцину 0,05 та 5,00 мкг/мл відповідно, що вірогідно ($p < 0,001$) відрізняється від такої в групі умовно здорових осіб (9,14 та 14,31 на 100 метафаз відповідно). Встановлено широке міжіндивідуальне варіювання індукованого цитогенетичного ефекту у хворих на РЛ (8,20–109,25; 23,20–99,58 хромосомних аберацій на 100 метафаз при концентраціях блеоміцину 0,05 та 5,00 мкг/мл відповідно) та відсутність позитивної кореляції між фоновими та індукованими частотами хромосомних пошкоджень. У групі пацієнтів з діагнозом РЛ виявлено 53,3% осіб з ПХН, що достовірно ($p < 0,01$) відрізняється від такої у групі умовно здорових осіб (33,3%). Одержані результати підтверджують літературні дані щодо можливості використання ПХН як одного з онкомаркерів при обстеженні осіб з підвищеним онкологічним ризиком.

Згідно з численними літературними даними, до одного з найбільш поширених злоякісних новоутворень людини належить рак легенів (РЛ), який є провідною причиною смерті від онкологічних захворювань у чоловіків і займає друге місце (після раку молочної залози) у жінок [1]. Вважають, що 80–90% випадків РЛ спричинено курінням, хоча онкозахворювання цієї локалізації виникає тільки у ~ 10% курців, що дозволяє припустити існування екзогенних та ендогенних факторів ризику виникнення РЛ. До екзогенних факторів ризику, що збільшують захворюваність на РЛ, відносять професійні контакти з деякими хімічними та фізичними канцерогенами, особливо, з іонізуючою радіацією, яка індукує так званий радіогенний професійний РЛ [2, 3]. Серед ендогенних факторів ризику виникнення РЛ виділяють генетичну схильність, обумовлену різними онкоасоційованими генними поліморфізмами, індивідуальну радіочутливість, а також генетично детерміновану або індуковану мутагенними факторами нестабільність геному, одним із проявів якої є прихована хромосомна нестабільність (ПХН) [4–7].

Виявлення ПХН як одного з можливих маркерів схильності до онкопатології проводиться за допомогою тестів з мутагенним навантаженням *in vitro*, де як хімічний мутаген-провокатор найчастіше використовується протипухлинний антибіотик блеоміцин (“G₂ bleomycin sensitivity assay”). Цей тест одержав найбільше поширення для обстеження пацієнтів з реалізованою онкопатологією, хворих на рак різної локалізації, включаючи РЛ [1, 5].

Показано, що серед онкологічних пацієнтів частота індивідів, гіперчутливих до тестуючої дії блеомицину, вірогідно перевищує таку серед здорових осіб, на підставі чого цей тест було рекомендовано для визначення схильності до індукції чи промоції канцерогенезу [6, 7].

Удосконалений нами тест “G₂ bleomycin sensitivity assay” було апробовано в культурах лімфоцитів периферичної крові, одержаних від умовно здорових осіб та від осіб, постраждалих внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС, в результаті чого було підтверджено радіаційно-індуковану модифікацію генетично детермінованої чутливості хромосом соматичних клітин людини до тестуючого мутагенного навантаження блеомицином [8, 9].

Для оцінки можливої асоціації між радіаційно-індукованим підвищенням індивідуальної чутливості до тестуючої мутагенної дії блеомицину та можливістю реалізації онкопатології нами проведено цитогенетичні обстеження онкологічних хворих, які заперечували свідомий контакт зі знаними чи потенційними мутагенами, та осіб, які мали професійний контакт з іонізуючим випромінюванням.

На першому етапі досліджень використано тест “G₂ bleomycin sensitivity assay” при добровільному обстеженні групи хворих (15 осіб) з діагнозом РЛ, встановленим у відділенні пульмонології Інституту клінічної радіології НЦРМ НАМН України (керівник д-р мед. наук В. А. Сушко). Усі пацієнти — чоловічої статі, віком 51–73 роки, середній вік 60 років, 9 з них — курці тютюну, 6 — заперечували тютюнопаління.

У обстежених осіб визначено фонові (вихідні) частоти всього спектра хромосомних аберацій в лімфоцитах периферичної крові та досліджено індивідуальну чутливість до кластогенної дії блеомицину *in vitro* за розробленим нами алгоритмом [10].

Умови культивування лімфоцитів, принципи проведення цитогенетичного аналізу, обчислення коефіцієнта ПХН для визначення індивідуальної чутливості до дії блеомицину (*K*_{ПХН}) відповідали таким, що були наведені в наших попередніх публікаціях [8–10]. Кількість проаналізованих клітин для кожної з обстежених осіб коливалась від 300 до 500 метафаз; усього проаналізовано 16 900 метафаз.

Середньогрупові фонові та індуковані блеомицином *in vitro* в концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл частоти цитогенетичних показників у групі пацієнтів з діагнозом РЛ наведені в табл. 1. Для аналізу та оцінки одержаних даних використовували результати цитогенетичного обстеження умовно здорових осіб з групи порівняння, проведеного нами на попередніх етапах досліджень [8–10].

У групі хворих з діагнозом РЛ середньогрупова частота інтегральних цитогенетичних показників — абераційних метафаз $2,51 \pm 0,20\%$ та хромосомних аберацій $2,54 \pm 0,20$ на 100 клітин, вірогідно ($p < 0,05$) відрізнялась від аналогічних цитогенетичних показників у групі порівняння — $1,12 \pm 0,19\%$ та $1,23 \pm 0,20$ на 100 клітин відповідно, але не перевищувала верхньої межі середньопопуляційного контролю, який у $\sim 98\%$ випадків варіює від 1,00 до 3,00% [11]. Міжіндивідуальний розкид цих показників становив 1,20–4,00% та 1,40–4,00 на 100 клітин відповідно. Серед пошкоджень хромосом домінували прості аберації — одиночні та вільні парні фрагменти із середньогруповою частотою $1,58 \pm 0,16$ та $0,63 \pm 0,10$ на 100 клітин відповідно, що не перевищувало популяційний рівень, характерний для спонтанного хромосомного мутагенезу в лімфоцитах периферичної крові людини [11]. Разом з тим середньогрупова частота одиночних фрагментів вірогідно перевищувала аналогічні показники в групі порівняння ($1,58 \pm 0,16$ та $0,58 \pm 0,14$ на 100 клітин відповідно; $p < 0,05$).

Середньогрупова частота обмінних аберацій — дицентриків та атипичних моноцентриків, які зустрічались (окремо чи сукупно) у 8 з 15 обстежених індивідів, також відповідала стандартним значенням популяційного контролю та становила $0,11 \pm 0,04$ та $0,08 \pm 0,03$ на 100

Таблиця 1. Результати цитогенетичного обстеження осіб з діагнозом РЛ (середньогрупові дані), $M \pm m$

Умови досліджу	Аберантні клітини, %	Хромосомні аберації, на 100 клітин	Частота аберацій хроматидного типу, на 100 клітин			Частота аберацій хромосомного типу, на 100 клітин					
			Одиночні фрагменти	Обміни	Сума	Парні фрагменти	Дицентрики	Центричні кільця	Аномальні моноцентрики	Ацентричні кільця	Сума
Без додавання блеоміцину	$2,51 \pm 0,20$	$2,54 \pm 0,20$	$1,58 \pm 0,16$	$0,03 \pm 0,02$	$1,61 \pm 0,16$	$0,63 \pm 0,10$	$0,11 \pm 0,04$	$0,00 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,04$	$0,93 \pm 0,12$
З додаванням блеоміцину в концентраціях:											
0,05 мкг/мл	$9,54 \pm 0,41$	$47,13 \pm 0,69$	$40,91 \pm 0,68$	$0,01 \pm 0,02$	$40,79 \pm 0,68$	$6,23 \pm 0,34$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,04$	$0,05 \pm 0,03$	$6,35 \pm 0,34$
5,00 мкг/мл	$14,49 \pm 0,48$	$55,95 \pm 0,68$	$43,08 \pm 0,68$	$0,01 \pm 0,02$	$43,13 \pm 0,68$	$12,51 \pm 0,45$	$0,05 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,04$	$12,69 \pm 0,46$

метафаз відповідно і вірогідно не перевищувала таку в групі порівняння — $0,11 \pm 0,06$ на 100 клітин ($p > 0,05$). Разом з тим сумісна зустрічальність нестабільних та стабільних цитогенетичних маркерів дії іонізуючого випромінювання у 3 пацієнтів може свідчити про вплив на них радіаційного фактора малої інтенсивності, що, ймовірно, пов'язано з діагностичними рентгенологічними обстеженнями легенів, які неодноразово проводилися при встановленні відповідного діагнозу [12].

Після дії блеоміцину в концентрації $0,05$ мкг/мл середньогрупова частота аберантних метафаз у хворих на РЛ зросла до $9,54 \pm 0,41\%$, а частота аберацій хромосом — до $47,13 \pm 0,69$ на 100 метафаз, що достовірно ($p < 0,01$) відрізнялось від такої в інтактних культурах — $2,51 \pm 0,20\%$ та $2,54 \pm 0,20$ на 100 метафаз відповідно (див. табл. 1). Середня частота аберацій на одну аберантну метафазу досягала $4,94$ внаслідок індукції клітин із множинними пошкодженнями хромосом. Серед пошкоджень хромосом знов-таки значно домінували вільні ацентрики переважно хроматидного типу (одиначні ацентричні фрагменти) — як у окремих осіб, так і по групі в середньому, що характерно для кластогенної дії блеоміцину. Частота обмінних аберацій хроматидного (хроматидні обміни) та хромосомного (дицентрики, кільцеві хромосоми, атипові моноцентрики) типів залишилась незмінною.

При аналізі індивідуальних результатів цитогенетичних досліджень при дії блеоміцину в концентрації $0,05$ мкг/мл виявлено велику міжіндивідуальну варіабельність цитогенетичного ефекту серед пацієнтів з діагнозом РЛ, що, як і в групі порівняння, не залежала від величини фонових даних, одержаних в інтактних культурах. Наприклад, максимальний цитогенетичний ефект, індукований блеоміцином ($109,25$ на 100 метафаз) спостерігався в індивіда з мінімальною фоновією частотою хромосомних аберацій ($1,40$ на 100 клітин). Міжіндивідуальний розкид частоти хромосомних аберацій у групі онкологічних хворих становив $8,20$ – $109,25$ на 100 метафаз (при $3,00$ – $32,00$ у групі порівняння), тобто як окремі індивіди, так і група онкохворих у цілому виявилися більш чутливими до дії блеоміцину за рахунок вірогідного зростання (порівняно з групою умовно здорових осіб) як мінімального, так і максимального цитогенетичних ефектів.

При дії блеоміцину в концентрації $5,00$ мкг/мл достовірно підвищився середньогруповий рівень аберантних метафаз та хромосомних аберацій — до $14,49 \pm 0,48\%$ та $55,95 \pm 0,68$ на 100 метафаз відповідно, але середня кількість аберацій в одній аберантній клітині не тільки майже не змінилась, але й виявила тенденцію до зниження і становила $3,86$, що може бути зумовлено цитотоксичною дією більш високої концентрації блеоміцину (див. табл. 1). Основним типом хромосомних пошкоджень, індукованих блеоміцином, залишились прості аберації — одиначні та парні ацентрики.

Індивідуальна реакція хромосомного апарату онкопацієнтів на дію мутагену-провокатора в концентрації $5,00$ мкг/мл також істотно відрізнялась у різних осіб і коливалась у межах $23,20$ – $99,58$ на 100 метафаз, незалежно від фонових частот хромосомних аберацій.

Основні закономірності цитогенетичного відгуку групи онкологічних хворих на дію блеоміцину в концентрації $5,00$ мкг/мл відповідали таким, що встановлені при навантаженні культури лімфоцитів блеоміцином у концентрації $0,05$ мкг/мл, а саме: пацієнти з діагнозом РЛ виявилися більш вразливими, ніж група порівняння, за загальною частотою хромосомних аберацій, середньогрупова надспонтанна (індукована) частота яких становила $44,59$ та $53,41$ на 100 клітин при концентраціях блеоміцину $0,05$ та $5,00$ мкг/мл відповідно (при $9,14$ на 100 метафаз у групі порівняння).

Для визначення відсотка осіб з підвищеною чутливістю до дії блеоміцину розраховали відповідні $K_{ПХН}$ (табл. 2).

Таблиця 2. Індивідуальні коефіцієнти прихованої хромосомної нестабільності ($K_{ПХН}$) в обстеженій групі хворих на РЛ

№ п/п	$(K_{ПХН})$	
	Блеоміцин, 0,05 мкг/мл	Блеоміцин, 5,00 мкг/мл
1	2,32	1,78
2	0,21	0,65
3	0,17	0,41
4	1,32*	1,18*
5	0,34*	1,15*
6	0,85*	0,98*
7	0,74	0,93
8	0,81	1,22
9	1,33*	1,08*
10	1,59*	1,11*
11	1,79	0,83
12	0,89*	0,88*
13	0,36*	0,81*
14	1,69*	1,31*
15	0,59*	0,67*

*Курці тютюну.

Таблиця 3. Порівняння середньогрупових результатів цитогенетичного обстеження умовно здорових осіб та хворих на РЛ за допомогою тесту "G₂ bleomycin sensitivity assay"

Обстежені групи	Гіперчутливі особи, %	Додаток до фонові частоти аберацій, на 100 клітин	
		Блеоміцин, 0,05 мкг/мл	Блеоміцин, 5,00 мкг/мл
Без онкопатології	33,3	9,14	14,31
Хворі на РЛ	53,3	44,59	53,41

При порівнянні середньогрупових результатів, отриманих в групі хворих на РЛ та в групі індивідів без онкопатології, до уваги брали відсоток осіб з ПХН та додаток до фонові частоти хромосомних аберацій (надспонтанний рівень). Як видно з наведених даних (табл. 3), додаток до фонові середньогрупові частоти аберацій хромосом (надспонтанний цитогенетичний ефект) у групі осіб з реалізованою онкологічною патологією становив 44,59 та 53,41 на 100 метафаз при концентраціях блеоміцину 0,05 та 5,00 мкг/мл відповідно, тоді як у групі порівняння він становив 9,14 та 14,31 на 100 метафаз при аналогічних тестуючих концентраціях блеоміцину. У групі онкологічних хворих виявлено і підвищений порівняно з контрольною групою відсоток осіб з ПХН (53,3 та 33,33% відповідно). У цілому, одержані результати відповідають висновкам авторів роботи [1] щодо "вірогідної асоціації підвищеної частоти хромосомних розривів, індукованих блеоміцином *in vitro*, з підвищеним ризиком виникнення РЛ".

Таким чином, результати проведеного нами дослідження підтверджують літературні дані щодо можливості використання ПХН як одного з онкомаркерів при обстеженні груп підвищеного онкологічного ризику.

1. Zheng Y. L., Loffredo C. A., Yu Z. et al. Bleomycin-induced chromosome breaks as a risk marker for lung cancer: a case-control study with population and hospital controls // *Carcinogenesis*. – 2003. – 24, No 2. – P. 269–274.
2. Сокольников М. Э., Кошурникова Н. А. Риск смерти от радиогенного рака легкого, обусловленного альфа-излучением от инкорпорированного плутония // *Материалы РНКРЗ*. – 2005. – 45 с.

3. Pakholkina O., Zhukovsky M., Yarmoshenko I. et al. Case-control study of lung cancer incidence under combine occupational and domestic radon exposure // Proc. of 3rd Europ. IRPA Congr., 14–18 June 2010. – Helsinki, Finland. – Helsinki: [s. n], 2010. – P. 01–23, P. 33.
4. Суворова И. К. Полиморфизм генов CYP1A1, GSTM1 и CYP2E1 у больных раком легкого: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.14. – Санкт-Петербург, 2004. – 21 с.
5. Chang R., Komaki R., Sasaki Z. et al. High Mutagen Sensitivity in Peripheral Blood Lymphocytes Predicts Poor Overall and Disease-Specific Survival in Patients with Stage III Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Radiotherapy and Chemotherapy // Clin. Cancer Res. – 2005. – **11**, No 8. – P. 2894–2898.
6. Spitz M. Mutagen sensitivity as a marker of cancer susceptibility // Cancer Detect. Prev. – 2005. – **19**, No 1. – P. 35.
7. Wu X., Gu J., Spitz M. Mutagen sensitivity: A genetic predisposition factor for cancer // Cancer Res. – 2007. – **67**, No 8. – P. 3493–3495.
8. Дибський С. С., Дибська О. Б., Педан Л. Р., Пілінська М. А. Виявлення прихованої хромосомної нестабільності у осіб, що постраждали від дії факторів Чорнобильської аварії, за допомогою удосконаленого тесту “G₂ bleomycin sensitivity assay” // Доп. НАН України. – 2009. – № 11. – С. 191–195.
9. Пілінська М. А., Дибський С. С., Дибська О. Б., Педан Л. Р. Радіаційно-індукована модифікація чутливості хромосом соматичних клітин людини до тестуючої мутагенної дії блеомицину *in vitro* // Цитология и генетика. – 2010. – **44**, № 2. – С. 58–64.
10. Цитогенетичний спосіб визначення прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини за допомогою теста “G₂ bleomycin sensitivity assay”: Метод. рекомендації / Уклад. М. А. Пілінська, С. С. Дибський, О. Б. Дибська, Л. Р. Педан; Державна установа “Науковий центр радіаційної медицини АМН України”. – Київ, 2008. – 25 с.
11. Бочков Н. П., Чеботарев А. Н., Катосова Л. Д., Платонова В. И. База даних для анализа количественных характеристик частоты хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов периферической крови человека // Вестн. РАМН. – 2001. – № 2. – С. 21–29.
12. Bhatti P., Yong L., Doody M. et al. Increased chromosome translocations are associated with ionizing radiation from diagnostic X-ray examinations: a pooled analysis of three studies. Radiation and Environmental Biophysics [Електронний ресурс] / Режим доступу: (published online 7/20/10); DOI:10.1007/s00411-010-0307-z.

Державна установа “Науковий центр
радіаційної медицини НАМН України”, Київ

Надійшло до редакції 18.01.2011

M. A. Pilinskaya, S. S. Dibskiy, Ye. B. Dibskaya, L. I. Shvayko

Using the modified test “G₂ bleomycin sensitivity assay” for detection of hidden chromosome instability in lung cancer patients

With the help of modifying “G₂ bleomycin sensitivity assay”, the hidden chromosome instability (HCI) in patients with lung cancer who deny conscious contact with mutagenic factors has been evaluated. It is shown that the addition to the background mean frequency of chromosome aberrations (above spontaneous cytogenetic effect) in the group of cancer patients is 44.6 and 53.3 per 100 metaphases (at bleomycin concentrations of 0.05 and 5.00 mcg/ml, respectively), which differs significantly ($p < 0.001$) from that in the group of apparently healthy individuals (9.14 and 14.31 per 100 metaphases, respectively). The broad intra-individual variations of the induced cytogenetic effect in patients with lung cancer (8.20–109.25; 23.20–99.58 chromosomal aberrations per 100 metaphases at bleomycin concentrations of 0.05 and 5.00 mcg/ml, respectively) and the absence of a positive correlation between the background and induced frequencies of chromosomal damages are established. In the group of cancer patients, 53.3% of persons with HCI are detected, which significantly ($p < 0.01$) differs from that (33.3%) in the group of apparently healthy individuals. The results obtained confirmed the literary data concerning the opportunity of using HCI as one of the oncomarkers under the examination of patients with high oncological risk.