

УДК 575.224.42

АНАЛИЗ УРОВНЯ СПОНТАННОГО МУТАГЕНЕЗА НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЛИМФОМ**^{1,2}Иванов В.П., ^{1,2}Трубникова Е.В., ²Болдинова Е.О., ¹Бобынцева О.В., ²Локтионов А.В.**¹ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет», Курск, e-mail: tr_e@list.ru;²ФГБОУ ВПО «Курский государственный университет» НИЛ «Генетика», Курск, e-mail: lizaboldinova@yandex.ru

Проведен анализ частоты возникновения хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови жителей Курской области больных злокачественными лимфомами на разных стадиях. Учитывался общий уровень спонтанного мутагенеза и специфическая структура типов хромосомных нарушений. Полученные данные показали, что частота спонтанных мутаций при злокачественных лимфомах существенно превышает нормальный уровень (2,13±0,09%): II стадия – 6,00±6,04%, III – 4,40±2,77%, IV – 4,00±3,00%, исключение составляет лишь I стадия (2,00±2,83%). Соотношение типов нарушений на разных стадиях различаются: на I стадии лимфом преобладают aberrации хроматидного типа, на II – хромосомного типа, а на III и IV стадиях оба типа представлены в приблизительно равной пропорции. Особенно отличные от других результаты наблюдаются на второй стадии: уровень мутагенеза и количество нарушений хромосомного типа гораздо выше таковых, чем при более тяжелых стадиях.

Ключевые слова: спонтанный мутагенез, хромосомные aberrации, злокачественные лимфомы**AN ANALYSIS OF THE SPONTANEOUS MUTAGENESIS LEVEL AT THE DIFFERENT STAGES OF MALIGNANT LYMPHOMAS****^{1,2}Ivanov V.P., ^{1,2}Trubnikova E.V., ²Boldinova E.O., ¹Bobyntseva O.V., ²Loktionov A.V.**¹Kursk State Medical University, Kursk, e-mail: tr_e@list.ru;²SRL «Genetics» Kursk State University, Kursk, e-mail: lizaboldinova@yandex.ru

We have done the analysis of the frequency of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of Kursk region residents having different stages of malignant lymphomas. Considered parameters were the level of the spontaneous mutagenesis and the structure of the types of chromosomal abnormalities specific to each particular stage of lymphoma. Findings show that all of the stages except the first one have a quite high frequency of the spontaneous mutations: stage I – 2,00±2,83%, II – 6,00±6,04%, III – 4,40±2,77%, IV – 4,00±3,00% (normal value is 2,13±0,09%). Prevailing types of abnormalities differ among the stages of malignant lymphomas: chromatid-type aberrations are most common at the stage I, chromosome-type aberrations – at the stage II and both types are equally represented at the stages III and IV. Moreover the stage II values of these parameters exceed the values of the last stages.

Keywords: spontaneous mutagenesis, chromosomal aberrations, malignant lymphomas

Злокачественные лимфомы (ЗЛ) на сегодняшний день являются как одними из самых курябельных онкологических заболеваний, так и одними из самых быстро распространяющихся. За 20 лет темпы роста заболеваемости ЗЛ увеличились на 50% [3]. Согласно последним статистическим данным в России ЗЛ в структуре онкологической заболеваемости занимают 1-е место у мужчин и 4-е у женщин 15-40 лет, а среди детского населения лимфомы стоят на 3-м и 4-м месте у мальчиков и девочек, соответственно [4].

Выживаемость больных во многом зависит от диагностируемой стадии лимфомы, например, достоверно известно, что пациенты с I и II стадиями имеют большую продолжительность жизни, чем больные с III и IV стадиями [3]. С цитогенетической точки зрения, возникает вопрос, есть ли связь между таким распределением и частотой хромосомных нарушений лимфоцитов на разных стадиях лимфом. Известно, что ЗЛ вызывают перестройки IG и TCR генов В и

T-лимфоцитов, что приводит к появлению хромосомных aberrаций [6]. Данные показывают, что во многих случаях при ЗЛ возникают хромосомные транслокации, влияние которых на развитие опухоли еще не до конца изучено [7,8]. Не смотря на то, что некоторые конкретные транслокации исследователи соотносят с определенным типом лимфом, в целом, считается, что появление хромосомных нестабильностей при ЗЛ носит стохастический характер [5]. Однако не известно, зависит ли частота возникновения хромосомных мутаций от стадии заболевания.

Целью данного исследования явилось изучение уровня спонтанного мутагенеза на разных стадиях развития злокачественных лимфом у жителей Курской области.

Материалы и методы исследования

Материалом для данного исследования послужила выборка из 37 больных ЗЛ жителей Курской области, при этом у двоих наблюдалась I стадия заболевания, II стадия – у 13 человек, III – у 15 и IV – у 7 больных.

Приготовление цитогенетических препаратов осуществлялось с помощью полумикрометода [2]. Для получения культуры лимфоцитов из периферической крови проводили стимуляцию клеток ФГА и инкубировали в течение 72 часов. Обработка колхицином проводилась в течение 1, 5 часов, затем материал гипотонизировали и фиксировали. Готовые препараты окрашивали рутинным методом красителем Романовского-Гимза. Статистическую обработку полу-

ченных результатов проводили в программе Microsoft Excel 2010.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты анализа частоты возникновения спонтанных хромосомных мутаций в зависимости от различных стадий ЗЛ представлены в табл. 1.

Таблица 1

Уровень спонтанного мутагенеза у больных с разными стадиями ЗЛ

Показатель/ Стадия ЗЛ	M±Std.Dev.			
	I стадия	II стадия	III стадия	IV стадия
Кол-во aberrантных кл.	2,00±2,83	3,46±1,61	4,00±2,56	3,57±2,63
Кол-во aberrаций	2,00±2,83	6,00±6,04	4,40±2,77	4,00±3,00
Число поврежденных хромосом	1,5±2,12	6,15±6,32	5,06±3,47	4,57±3,95
Кол-во aberrаций хроматидного типа	1,5±2,12	2,07±1,32	2,13±1,50	1,71±1,71
Кол-во aberrаций хромосомного типа	0,00	4,00±5,72	2,27±1,87	2,29±2,29
Количество одиночных фрагментов	0,50±0,70	1,92±1,26	2,13±1,5	1,57±1,81
Количество парных фрагментов	0,00	2,46±3,30	1,27±1,16	1,14±1,06
Количество хроматидных обменов	1,50±2,12	0,07±0,27	0,00	0,14±0,37
Количество хромосомных обменов	0,00	1,53±3,18	1,00±1,70	1,14±1,86

Из таблицы видно, что при первой стадии ЗЛ количество aberrантных клеток составляет 2,00±2,83, частота хромосомных aberrаций при этом так же равна 2,00±2,83%. Число поврежденных хромосом равно 1,5±2,12, причем присутствуют aberrации только хроматидного типа. В структуре нарушений преобладают хроматидные обмены – 75%, а ацентрические одиночные фрагменты составляют только 25%.

Вторая стадия ЗЛ характеризуется большим количеством aberrантных клеток, количество которых равно 3,46±1,61. Уровень спонтанного мутагенеза оказался значительно выше, чем при I стадии – 6,00±6,04%, а число поврежденных хромосом составило 6,15±6,32. В данном случае обнаруживаются aberrации хромосомного типа, причем они преобладают – 65%, а на aberrации хроматидного типа приходится уже только 35%. Количество ацентрический парных и одиночных фрагментов оказалось равно, соответственно, 41 и 30%. Далее по количеству идут хромосомные обмены 26% и хроматидные обмены 3%.

У больных с III стадией ЗЛ количество aberrантных клеток оказалось равно 4,00±2,56, а количество aberrаций составило 4,40±2,77%, причем число поврежденных хромосом было равно 5,06±3,47. Соотношение количества aberrаций хроматидного и хромосомного типов примерно одинаковое – 49 и 51%. Из первых, в данном случае, встречаются только одиноч-

ные фрагменты, а хроматидных обменов не наблюдается. Количество парных фрагментов и хромосомных обменов составило 28 и 23%, соответственно.

На последней стадии ЗЛ количество aberrантных клеток составляет 3,57±2,63. Уровень спонтанного мутагенеза равен 4,00±3,00%, а среднее число поврежденных хромосом – 4,57±3,95. На IV стадии соотношение типов aberrаций таково: хроматидный тип нарушений – 42%, хромосомный тип нарушений – 58%. В структуре хромосомных aberrаций преобладают ацентрические одиночные фрагменты 39%, затем идут парные фрагменты и хромосомные обмены по 28% и на хроматидные обмены приходится 5%.

Проведенная далее обработка полученных данных с помощью критерия Фишера позволила выявить статистически значимые различия в распределении кариотипических нарушений у больных ЗЛ на разных стадиях.

Сравнение показало, что I стадия существенно отличается по количеству хроматидных обменов от II (F= 58,5) и IV (F=31,5) стадий, на III стадии данный показатель совсем отсутствует.

Важно отметить, что вторая стадия ЗЛ статистически отличается от других практически по всем показателям. В целях наглядности структура отличий II стадии с указанием значений F-критерия представлена в табл. 2.

Таблица 2

Значения F-критерия для показателей, различающихся при II стадии ЗЛ и других стадиях

Показатель/Стадия	I стадия	III стадия	IV стадия
Кол-во aberrаций		4,75 (0,01)	
Кол-во поврежденных хромосом		3,31 (0,03)	
Кол-во aberrаций хромосомного типа		9,34 (0,01)	6,23 (0,03)
Кол-во парных фрагментов		8,09 (0,01)	9,57 (0,01)
Кол-во хроматидных обменов	58,5 (0,01)		
Кол-во хромосомных обменов		3,37 (0,03)	

Из таблицы видно, что наибольшее расхождение показателей наблюдается при сравнении II стадии с III стадией. Основным отличительным показателем II стадии от остальных является количество aberrаций хромосомного типа ($F=9,34$; $F=6,23$), которое складывается из большего числа ацентрических парных фрагментов ($F=8,09$; $F=9,57$) и хромосомных обменов ($F=3,37$). При сравнении III и IV стадий статистически значимых различий не было выявлено.

Заключение

Таким образом, в результате исследования были установлены значения уровня спонтанного мутагенеза для разных стадий ЗЛ, которые составили для I стадии – $2,00 \pm 2,83\%$, для II стадии – $6,00 \pm 6,04\%$, для III стадии – $4,40 \pm 2,77\%$, для IV стадии – $4,00 \pm 3,00\%$. За контрольное значение, мы приняли уровень спонтанного мутагенеза у жителей Европейской части России и стран СНГ равный $2,13 \pm 0,09\%$ [1].

Так же была выявлена специфическая для каждой стадии структура кариотипических нарушений, отражающая количественное соотношение хромосомных и хроматидных типов aberrаций: при I стадии оно равно 0:100%, соответственно, при II стадии – 65:35%, при III – 51:49%, при IV – 58:42%.

Сравнение уровня спонтанного мутагенеза показало, что на первой стадии ЗЛ он не превышает нормальных значений для жителей данной территории, и что нарушения возникают в уже сформированных хромосомах при делении лимфоцитов.

Вторая стадия ЗЛ отличается наиболее выраженными aberrационными процес-

сами, причем преобладание хромосомных типов нарушений над хроматидными свидетельствует о том, что большинство повреждений возникают еще до начала удвоения хромосом в период интерфазы.

Третья и четвертая стадия демонстрируют однородные высокие значения уровня спонтанного мутагенеза и сходную картину структуры aberrаций. Подобные результаты можно объяснить тем, что данные стадии имеют сходный характер повреждения лимфатических органов.

Список литературы

1. Бочков, Н.П. База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов периферической крови человека / Н.П. Бочков, А.Н. Чеботарев, Л.Д. Катосова, В.И. Платонова // Генетика. – 2001. – Т. 37. – №4. – С. 549-557.
2. Захаров А.Ф., Бениш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. Хромосомы человека. Атлас. – М.: Медицина, 1982. – 263 с.
3. Поддубная И.В., Бабичева Л.Г. Факторы прогноза при диффузной крупноклеточной в-клеточной лимфоме. // Материалы VIII российского онкологического конгресса. – 2004.
4. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г. / ред. Аксель Е.М., Давыдов М.И. – М., 2014. – С. 50-75.
5. Castro M.A. Chromosome aberrations in solid tumors have a stochastic nature. / Castro M.A., Onsten T.G., Moreira J.C., de Almeida R.M // Mutat Res. – 2006. – № 1-2. – С.150-164.
6. Chaganti R.S. Recurring chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphoma: biologic and clinical significance // Semin Hematol. – 2000. – № 4. – С.396-411
7. Nambiar M., Kari V., Raghavan S. Chromosomal translocations in cancer. // Biochim Biophys Acta. – 2008. – № 2. – С. 139-152.
8. Thompson S.L., Compton D.A. Chromosomes and cancer cells. // Chromosome Research. – 2011. – №19. – С. 433-444.