

А. М. Некрасова¹, И. А. Хлусов¹, Г. К. Жерлов²,
Н. Н. Плотникова¹, Н. В. Севостьянова¹, Г. Б. Слепченко³, В. В. Новицкий¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет
Московский тракт, 2, Томск, 634050, Россия

² НИИ гастроэнтерологии Сибирского государственного медицинского университета
пос. Чекист, Северск Томской обл., 636013, Россия

³ ООО «СибМедАналит»
ул. Сибирская, 31, Томск, 634021, Россия
E-mail: anhenan@mail.ru

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОГО СИНТЕЗА ДНК У БОЛЬНЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА *

Изучена репарация ДНК лимфоцитов периферической крови у 61 больного с гастроинтестинальным раком и 30 пациентов с хроническими заболеваниями и доброкачественными изменениями желудочно-кишечного тракта. Показано, что для больных со злокачественными новообразованиями характерно подавление системы репарации ДНК. Угнетение репарации иммунокомпетентных клеток на 33 % ($p < 0,02$) обусловлено 6-валентным хромом, что может быть одним из механизмов канцерогенного действия металла. Индекс стимуляции репарации лимфоцитов может рассматриваться в качестве негативного показателя злокачественности опухоли и раковой прогрессии. Была обнаружена обратная связь ИС репарации лимфоцитов с уровнем онкомаркера крови СА19-9 ($r = -0,32$; $p < 0,04$; $n = 41$) и со стадией опухоли ($r = -0,44$; $p < 0,002$; $n = 47$). Тем более, что выявлена зависимость между степенью репаративного синтеза, гистологическим типом опухоли и наличием метастазов.

Ключевые слова: желудочно-кишечный тракт, злокачественные новообразования, лимфоциты крови, репарация ДНК, индекс стимуляции.

Опухолевые заболевания желудочно-кишечного тракта остаются одной из наиболее актуальных проблем современной онкологии в связи с высокой частотой встречаемости, значительной степенью запущенности при первичной диагностике и соответственно высокой смертностью. Так, несмотря на некоторое снижение показателей в течение последних 15–20 лет, заболеваемость и смертность населения РФ при раке желудка и кишечника остаются на высоком уровне. При этом частота встречаемости рака желудка в Томске выше, чем в среднем по России [1; 2]. Поздняя выявляемость рака желудка приводит к 54 % летальности в течение одного года, низкой пятилетней выживаемости больных [1]. За последнее столетие, к сожалению, ситуация значительно не улучшилась [3].

Применяющийся в настоящее время анкетный, инструментальный и лабораторный

скрининг с выделением групп риска, последующая уточняющая диагностика и динамическое наблюдение за состоянием пациентов недостаточно эффективны с социально-экономической точки зрения.

Разработка новых форм активного выявления ранних стадий злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта и прогнозирования исходов заболевания с использованием современных средств диагностики является сложной научной задачей, без успешного решения которой трудно рассчитывать на увеличение выживаемости и снижение летальности онкологических пациентов.

Цель исследования: установить особенности системы ДНК-репарации у больных со злокачественными новообразованиями желудочно-кишечного тракта, определить ее связь с лабораторными показателями и минеральным гомеостазом организма.

* Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке программы «СТАРТ» Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере и инновационного гранта Администрации Томской области (государственный контракт № 90; 2006–2007 гг.), проект № 5228.

Материал и методы

Обследован 61 пациент со злокачественными новообразованиями желудка и кишечника I–IV стадий (основная группа). Группу сравнения составили 30 пациентов с хроническими заболеваниями и доброкачественными изменениями в слизистой ЖКТ, также 100 здоровых доноров сопоставимого пола и возраста. Пациенты находились на стационарном лечении в Областном государственном учреждении здравоохранения «Томский онкологический диспансер» (Томск) и в НИИ гастроэнтерологии СГМУ (Северск). Исследование выполняли с разрешения Комитета по этике Сибирского государственного медицинского университета (заключение № 583 от 19.03.2007).

Всем пациентам проведено хирургическое вмешательство, удаленные ткани забиралась для гистологического исследования, которое проводилось в отделении патологической морфологии Томского областного онкологического диспансера (зав. д-р мед. наук, проф. Н. В. Севостьянова) и в отделении патологической морфологии МСЧ-81 г. Северска (зав. Г. Б. Некрасов). Среди доброкачественных изменений отмечены эрозия и язвенная болезнь желудка (по 9,5 % соответственно), железистые полипы желудка (57,2 %) и кишечника (9,5 %), дивертикулез с дивертикулитом (4,8 %), ворсинчатая опухоль толстой кишки (9,5 %). Злокачественные неоплазии были представлены в основном аденокарциномами различной степени дифференцировки (83,3 %), перстневидноклеточным (7,4 %) и недифференцированным (9,3 %) раком.

По окончании хирургического лечения пациенты с доброкачественными образованиями продолжали наблюдение у гастроэнтеролога и / или хирурга по месту жительства. У пациентов со злокачественными новообразованиями, при наличии показаний, лечение дополнялось химио- либо лучевой терапией. В дальнейшем данная группа пациентов наблюдалась в областном онкологическом диспансере.

Активность репарационной системы ДНК лимфоцитарных клеток исследовали методом сцинтилляционной радиометрии [4]. В качестве источника УФ-излучения использовали две бактерицидные лампы «ДБ-15» (длина волны 254 нм), располо-

женные на фиксированном расстоянии (30 см) от объекта, что определяло дозу и мощность облучения соответственно 15 Дж/м² и 1,6 Дж/с. Измерение радиоактивности (имп/с) проводили на сцинтилляционном счетчике «Mark III» (США). Для выражения результатов рассчитывали индекс стимуляции (ИС) в условных единицах репаративного синтеза ДНК. Индекс стимуляции репарационной системы ДНК определяли, рассчитывая отношение показателя радиоактивности облученной пробы к радиоактивности необлученного образца. Полученные результаты выражали в условных единицах.

Содержание 6-валентного хрома в волосах и операционном материале оценивали методом инверсионной вольтамперометрии [5; 6].

В периферической крови определяли мембранный CD95-маркер лейкоцитов крови методом проточной цитометрии (комплекс CoulterEPICS-XL-MCL) с использованием флюоресцирующих моноклональных антител. Количественное содержание онкомаркеров CA19-9 и CA242 в сыворотке крови оценивали методами иммуноферментного анализа с использованием наборов специфических моноклональных антител («CanAg», Швеция; «DSL», США).

Статистическую обработку результатов осуществляли методами вариационной статистики с использованием критерия Т по Стьюденту и коэффициента корреляции рангов Спирмена.

Результаты исследования и обсуждение

Способность лимфоцитов к репарации ДНК, определяемая отношением УФ-индуцированного репаративного синтеза к спонтанному, характеризовалась индивидуальными особенностями донора, о которых судят по величине репаративного синтеза в ответ на стандартную дозу УФ-излучения, вызывающую максимальный уровень репаративного синтеза. С другой стороны, она определялась величиной спонтанного репаративного синтеза. Причиной снижения способности лимфоцитов к репарации ДНК являлось увеличение спонтанного репаративного синтеза, что отражало наличие повреждений в ДНК. По данным литературы [7],

Индекс стимуляции (ИС) и CD 95-маркер лейкоцитов у больных с патологией желудочно-кишечного тракта ($M \pm m$)

Показатель	Обследованные лица		
	Здоровые доноры	Больные с доброкачественными изменениями ЖКТ	Больные со злокачественными новообразованиями ЖКТ
ИС репарации лимфоцитов, усл. ед.	2,40 ± 0,09 (n = 100)	2,00 ± 0,04 (n = 30)	1,20 ± 0,02 (n = 61)
p		p1 < 0,001	p1 < 0,001 p2 < 0,001
CD95-маркер лейкоцитов, %	–	6,77 ± 0,74 (n = 18)	11,64 ± 1,50 (n = 22)
p			p2 < 0,02

Примечание: достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров (p1) и у больных доброкачественными изменениями ЖКТ (p2).

ингибирование репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови отмечается при ИС менее 1 усл. ед.

При исследовании лимфоцитов у здоровых доноров установлено среднее значение ИС (табл.). Необходимо отметить, что коэффициент стимуляции репаративного синтеза ДНК в клетках крови обследованных лиц, составивших контрольную группу, колебался от 1,74 до 3,99 усл. ед. Полученные результаты подтверждают данные литературы о наличии у здоровых доноров индивидуальных вариаций в способности лимфоцитов к репарации ДНК в ответ на тест-воздействие [7–9].

Исследование репаративного синтеза ДНК у больных показало, что наибольшее подавление данных процессов наблюдалось при злокачественных опухолях ЖКТ. Индекс стимуляции был в 2 раза ниже данного показателя у лиц контрольной группы ($p1 < 0,001$), а также аналогичных значений у больных с хроническими доброкачественными заболеваниями ЖКТ.

Представленные данные дают возможность констатировать, что для большинства обследованных больных основной группы характерным являлось снижение или полное подавление способности лимфоцитов периферической крови к репарации ДНК. При этом еще раз был подтвержден факт наибольшей агрессивности недифференцированных гистологических форм опухолей [10]. Необходимо отметить, что в основную группу были включены две пациентки с верифицированными первично-множественными злокачественными новообразованиями. У одной из них наблюдалось сочетание

опухолей молочной железы и прямой кишки, у второй – опухолей толстой кишки и яичника. Несмотря на достаточную степень дифференцировки новообразований ЖКТ у обеих пациенток (умеренно дифференцированная аденокарцинома), ИС репаративного синтеза ДНК не превышал среднего значения аналогичного показателя у больных с низкодифференцированными и недифференцированными гистологическими типами опухолей.

Низкий уровень репаративного синтеза в клетках у больных с очагами метастазирования был связан с тем, что лимфоциты периферической крови таких лиц претерпевают, вероятно, более глубокое токсическое воздействие, связанное с распространением злокачественного процесса. В то же время конкретные механизмы супрессии репарации лимфоцитов при прогрессии онкологических заболеваний представляют несомненный интерес.

Последствием низкой функциональной активности системы ДНК-репарации в лимфоцитах являются хромосомная нестабильность клеток, повышение частоты спонтанных и индуцированных аббераций, приводящих к вторичной иммунной недостаточности, способствующей прогрессированию онкопатологии.

Корреляционный анализ продемонстрировал, что ИС репарации лимфоцитов периферической крови может быть одним из маркеров злокачественности и раковой прогрессии. Была обнаружена обратная связь между ИС репарации лимфоцитов с уровнем онкомаркера крови СА19-9 ($r = -0,32$; $p < 0,04$; $n = 41$), стадией опухоли ($r = -0,44$;

$p < 0,002$; $n = 47$). Онкомаркер СА19-9 считается маркером 2-й группы выбора при колоректальных опухолях. При карциноме желудка чувствительность первичной диагностики составляет 41 % при специфичности 95 % [11].

У пациентов со злокачественными эпителиальными опухолями желудка и кишечника на 72–76 % увеличивался уровень CD95 на лейкоцитах крови (см. табл.). CD95 (Fas, APO-1) является рецептором для Fas-лиганда, который принадлежит к семейству факторов некроза опухоли (ФНО), обладающих цитотоксическим и противоопухолевым действием [12], присутствует на мембране активированных Т- и В-лимфоцитов. Его стимуляция приводит к антиген-стимулированному апоптозу зрелых клеток [13].

В нашем исследовании отмечалась прямая корреляция экспрессии CD95 на лейкоцитах крови со стадией опухолевой патологии ($r = 0,48$; $p < 0,013$; $n = 26$). Тем не менее нами не обнаружено статистически значимых взаимосвязей CD95 маркера и ИС ($r = -0,24$; $p > 0,19$; $n = 30$), что отвергает, по-видимому, значительное участие ФНО в механизмах нарушения репарации ДНК лимфоцитов крови при раке ЖКТ.

С другой стороны, выявлена обратная зависимость ИС репарации ДНК лимфоцитов от уровня 6-валентного хрома в волосах ($r = -0,33$; $p < 0,02$; $n = 50$). Хром является для человека канцерогенным элементом, а его 6-валентный вариант – первого класса опасности [14]. Патогенез опухолевой трансформации, вызванной металлом, неизвестен до конца, однако установлено прямое генотоксическое действие 6-валентного хрома, а также способность тяжелых металлов вытеснять цинк из цинкзависимых ферментов, участвующих в репарации ДНК [15]. В связи с этим обусловленное хромом угнетение репарации иммунокомпетентных клеток может быть еще одним механизмом, способствующим опухолевой прогрессии.

В заключение отметим, что полученные данные играют важную роль в понимании патогенеза злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта, являются основополагающим материалом для поиска путей совершенствования диагностического процесса у пациентов с онкологическими заболеваниями.

Список литературы

1. *Зырянов Б. Н. и др.* Рак желудка: профилактика, ранняя диагностика, комбинированное лечение, реабилитация / Б. Н. Зырянов, Л. А. Коломиец, С. А. Тузилов. Томск, 1998.
2. *Особенности* онкологической заболеваемости населения Томской области (1990–2001 гг.) / Л. Ф. Писарева, Е. Л. Чойнзонов, А. П. Бояркина и др. // Бюл. сибирской медицины. 2003. № 4. С. 86–96.
3. *Энциклопедия* клинической онкологии / Под ред. М. И. Давыдова. М., 2004.
4. *Дубинин Н. П., Засухина Г. Д.* Репаративные механизмы клеток и вирусы. М., 1975.
5. *Малахова Н. А. и др.* Инверсионная вольтамперометрия хрома с дифенилкарбазидом / Н. А. Малахова, А. В. Чернышева, Х. З. Брайнаина // Журн. аналит. химии. 1987. Т. 42, № 9. С. 1636–1640.
6. *Слепченко Г. Б. и др.* Возможности и применение метода инверсионной вольтамперометрии как индикатора оценки содержания микроэлементов в волосах / Г. Б. Слепченко, Э. А. Захарова, Е. Г. Черемпей // Изв. вузов: Химия и хим. технология. 2002. Т. 45, № 3. С. 89–94.
7. *Репарация* ДНК лимфоцитов периферической крови онкологических больных / Н. А. Никифорова, И. П. Москаленко, Л. А. Гайсенюк и др. // Медицинская радиология. 1991. № 5. С. 33–35.
8. *Способность* лимфоцитов периферической крови здоровых доноров к репарации ДНК / Е. Ю. Москалева, Н. А. Илюшина, В. Н. Захаров и др. // Тер. архив. 1985. № 7. С. 116–118.
9. *Структура* ДНК лимфоцитов периферической крови человека и их способность к репарации ДНК при иммунизации и некоторых заболеваниях / А. В. Караулов, Е. Ю. Москалева, А. Э. Радзевич и др. // Иммунология. 1991. № 2. С. 15–17.
10. *Белушкина Н. Н., Северин С. Е.* Молекулярные основы патологии апоптоза // Архив патологии. 2001. № 1. С. 51–59.
11. *Фатех-Могхадам А., Стиебер П.* Рациональное использование опухолевых маркеров. М., 1993.
12. *Владимирская Е. Б.* Механизмы апоптотической смерти клеток // Гематология и трансфузиология. 2002. № 2. С. 35–40.

13. *Mature* T-cells of autoimmune Ipr / Ipr mice have a defect in antigen-stimulated suicide / J. H. Russell, B. Rush, C. Weaver et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. Vol. 90. P. 4409–4413.

14. *Металлы* и канцерогенный риск для населения агропромышленного региона / В. В. Быстрых, А. Н. Тиньков, С. С. Макшан-

цев и др. // Вестн. Омск. гос. ун-та. 2004. № 4. С. 21–22.

15. *Hartwig A.* Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition // Toxicol Lett. 1998. Vol. 102–103. P. 235–239.

Материал поступил в редколлегию 16.09.2007

**A. M. Nekrasova, I. A. Khlusov, G. K. Zherlov,
N. N. Plotnikova, N. V. Sevostyanova, G. B. Slepchenko, V. V. Novitsky**

A habits of DNA Reparative Synthesis of Patients with Gastrointestinal Cancer

DNA reparation of peripheral blood lymphocytes of 61 patients with gastrointestinal cancer and of 30 ones with chronic diseases and benign gastrointestinal tumors has been studied. Patients with gastrointestinal cancer have been demonstrated to be marked by inhibition of DNA reparation system. Suppression of immunocompetent cells down to 33 % ($p < 0,02$) is dependent on hexavalent chromium. It may be one of the mechanisms of metal's carcinogenic affect. Index of lymphocytes reparation's stimulation can be considered as negative predictor of tumor malignance and cancer progression, because its reverse correlations with blood level of CA19-9 oncological marker ($r = -0,32$; $p < 0,04$; $n = 41$), with cancer stage ($r = -0,44$; $p < 0,002$; $n = 47$) and patients' clinical group ($r = -0,49$; $p < 0,0004$; $n = 49$) have been established. Moreover, dependence between degree of reparative synthesis, tumor's histological type and metastatic focuses has been elucidated.

Keywords: malignant neoplasms, gastrointestinal tract, blood lymphocytes, DNA reparation, stimulation index.