

Е.В. Трубникова^{1,2*}, В.П. Иванов^{1,2}, Н.В. Стабровская^{1,2},
Е.А. Климова^{1,2}, А.В. Храмцов², А.С. Барышев¹

УДК [615.28:616-006.6](045)

¹ ГОУ ВПО Курский государственный медицинский университет, кафедра биологии, медицинской генетики и экологии
² ГОУ ВПО Курский государственный университет, научно-исследовательская лаборатория «Генетика»

ВЛИЯНИЕ ХИМИОТЕРАПИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ РИБОСОМНЫХ ГЕНОВ У БОЛЬНЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ЛИМФОМАМИ

Резюме

Настоящая работа отражает особенности влияния химиотерапии на показатели активности рибосомных генов (РГ) *in vivo*. Обнаружено снижение показателей функциональной активности РГ по 10 хромосомам после 1-го курса полихимиотерапии и повышение после 3-го. Показано, что данный модификационный эффект проявлялся за счет показателей функциональной активности РГ по D-хромосомам. Показатель по G-хромосомам демонстрировал стабильность. Также показано увеличение числа хромосом, вступивших в ассоциации, и числа ассоциаций акроцентрических хромосом. Наблюдаемые изменения в активности РГ при различных курсах полихимиотерапии отражают особенности ответных реакций организма на экзогенное воздействие химических веществ.

Ключевые слова: рибосомные гены, злокачественные лимфомы, полихимиотерапия.

Abstract

This article shows the special features of the influence of chemotherapy on the indices of the activity of ribosomal genes *in vivo*. Reduction in the indices of the functional activity of ribosomal genes on 10 chromosomes after the first course of poly-chemotherapy and increase after the third course is discovered. It is shown that this modification effect appeared due to the indices of the functional activity of ribosomal genes on the D-chromosomes. Index on the G-chromosomes demonstrated its stability. Also an increase in the number of chromosomes was shown, which entered association, and number of associations of acrocentric chromosomes. The observed differences in the indices of the activity of ribosomal genes with different courses of poly-chemotherapy reflect the special features of response reactions to the manifestation of exogenous actions of chemical ingredients.

Key words: ribosomal genes, malignant lymphomas, poly-chemotherapy.

В настоящее время известны многочисленные примеры хромосомных перестроек, которые либо обуславливают предрасположенность к развитию онкологических заболеваний, либо являются прямой причиной злокачественной трансформации [3]. Опухолевую прогрессию при злокачественных лимфомах (ЗЛ) связывают с появлением клеточных клонов, несущих хромосомные перестройки и отличающихся от исходного штамма рядом признаков [2, 7, 8]. При неходжкинских лимфомах аномалии кариотипа выявляются у 80–90% больных, при лимфомах Ходжкина — в 40–80%, и хромосомные нарушения, как правило, очень сложны. Выявлен целый ряд хромосомных изменений, характерных для лимфом, среди них транслокации (8;14), (2;8), (8;22), (14;18), (11;14), разные перестройки длинного плеча хромосомы 2, делеции длинного плеча хромосомы 6, трисомии 3, 7, 12 и 18 [3, 12, 13]. Установлены некоторые корреляции между особенностями кариотипа и гистологическим строением опухоли, однако данные не всегда совпадают [5, 6]. Но несмотря на значительные успехи в изучении проблемы, в настоящее

время окончательно этиология ЗЛ не выяснена [3]. Известно, что злокачественная трансформация при наличии генетической предрасположенности может проявляться при определенных условиях. Изучение генетических процессов непосредственно в лимфоцитах может помочь найти адекватный способ коррекции сдвига пролиферативной активности и лечения заболеваний.

Рибосомные гены (РГ) эукариот определяют синтез рРНК — «каркаса» для рибосом, которые отвечают за продукцию белковых молекул и, в конечном счете, за клеточную активность. Изучая функциональный статус рибосомных генов и комплекса их транскрипции, можно проследить изменение пролиферативного статуса клетки и по возможности найти способ повлиять на него.

В свете изложенного на фоне неуклонного роста заболеваемости ЗЛ во многих развитых странах [1] вопросы их профилактики, ранней диагностики и адекватной терапии являются весьма актуальными [3].

* Контакты. E-mail: tr_e@list.ru. Телефон: (4712) 58-81-47

Цель нашей работы — изучить влияние химиотерапии на показатели комплекса транскрипционной активности (РГ) у больных со ЗЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования послужила группа из 15 испытуемых больных со ЗЛ. Диагностику и верификацию ЗЛ проводили на базе Курского областного онкологического диспансера (КООД) с использованием комплекса клинико-лабораторных методов обследования (рентгенологического, метода ультразвуковой диагностики, цитологического исследования пунктата костного мозга, исследования биоптата лимфатических узлов). Основные лабораторные исследования крови и мочи выполняли согласно унифицированным методикам. Оценку общесоматического статуса больных проводили по шкале Карновского в модификации Восточной кооперативной онкологической группы. Каждый из пациентов был обследован трижды: при 1-м поступлении и постановке диагноза (до начала лечения), при 2-м поступлении — после прохождения 1-го курса полихимиотерапии (ПХТ), при 4-м поступлении, после прохождения 3-го курса ПХТ (до лучевой терапии). Таким образом исключалась возможность влияния факторов нехимической этиологии. При каждом из этих поступлений осуществлялась оценка показателей комплекса транскрипции РГ и анализировались 3 популяции лимфоцитов. Все больные получали лечение по схеме циклофосфан (750 мг/м² в/в 1-й день), доксорубицин (50 мг/м² в/в 1-й день), винкристин (1,4 мг/м² в/в 1-й день), преднизолон (60 мг/м² внутрь 1–5-й дни); цикл возобновлялся через 2–3 недели.

Статистический анализ сформированного банка данных проводили на ПК с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 6.0» фирмы StatSoft Inc. (США). Обработку данных осуществляли по стандартным методикам вариационной статистики. При описании количественных признаков использовали параметры нормального распределения: среднее значение, стандартную ошибку среднего значения, минимальные и максимальные значения признака, несмещенную дисперсию. Для проверки достоверности различий между совокупностями использовали параметрические критерии Стьюдента и Фишера (F). Уровень значимости принимали равным 0,05. В работе использовали корреляционный и кластерный анализы.

При подготовке препаратов культуры клеток лимфоцитов периферической крови использовали полумикрометод. Фиксацию клеток и приготовление цитогенетических препаратов метафазных хромосом лимфоцитов периферической крови проводили на 72-м часу после стимуляции ФГА. После высушивания препараты маркировали и до окраски хранили при комнатной температуре.

Для детекции транскрипционно активных рибосомных генов использовали метод дифференциальной окраски хромосом нитратом серебра, предложенный Howell и Black [10, 11]. Для каждого случая средний показатель суммарной активности по 10 акроцентрическим хромосомам рассчитывали без кариотипирования в 20–40 клетках. Показатель транскрипционной активности РГ лимфоцитов периферической крови оценивали визуально по размерам преципитатов восстановленного серебра и выражали по 5-балльной шкале в условных единицах. Ассоциативную

№	Цитогенетический показатель	Поступления					
		I, N = 423		II, N = 457		IV, N = 422	
		M ± S _m	σ ²	M ± S _m	σ ²	M ± S _m	σ ²
1	Активность РГ по 10 хромосомам	18,38 ± 0,11	4,86	17,97 ± 0,12	6,28	19,19 ± 0,11	5,41
2	Активность РГ по D-хромосомам	10,76 ± 0,12	5,65	10,79 ± 0,09	3,54	11,55 ± 0,1	4,2
3	Активность РГ по G-хромосомам	7,62 ± 0,08	2,99	7,17 ± 0,09	3,87	7,63 ± 0,09	3,26
4	Число хромосом в ассоциации	2,53 ± 0,1	4,40	2,39 ± 0,1	4,26	2,63 ± 0,1	4,59
5	Число ассоциаций	1,11 ± 0,04	0,81	1,02 ± 0,04	0,81	1,16 ± 0,04	0,85
		t				F	
		I–II	I–IV	II–IV	I–II	I–V	II–IV
1	Активность РГ по 10 хромосомам	2,08*	5,16*	2,89*	1,29*	1,11*	1,16*
2	Активность РГ по D-хромосомам	1,67	5,18*	4,15*	1,6*	1,35*	1,18*
3	Активность РГ по G-хромосомам	0,73	0,05	0,67	1,29*	1,09	1,19*
4	Число хромосом в ассоциации	0,05	0,72	0,7	1,03	1,04	1,08
5	Число ассоциаций	0,08	0,8	0,74	1	1,05	1,05

* — различия статистически достоверны при p < 0,05.

Таблица 1. Сравнительный анализ показателей комплекса транскрипционной активности РГ в лимфоцитах периферической крови одних и тех же больных ЗЛ при 3 поступлениях в КООД (N – число метафазных пластинок)

активность учитывали как дополнительный цитогенетический критерий при анализе препаратов, окрашенных нитратом серебра. Для индивида подсчитывали число хромосом в каждой ассоциации, число ассоциаций акроцентрических хромосом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбранная нами методология позволила исключить возможность статистических погрешностей между индивидами. С этой целью была сформирована группа из 15 больных. При каждом поступлении оценивалось количество активных РГ и анализировались 3 популяции лимфоцитов. Полученные результаты и их сравнительный анализ представлены в *табл. 1*. Из нее следует, что количество активных рибосомных генов в популяциях лимфоцитов периферической крови после каждого из проведенных курсов ПХТ увеличивалось. Различия были статистически достоверны. Менялась и вариабельность показателей, о чем свидетельствуют статистически значимые коэффициенты Фишера (F). Эти данные, по нашему мнению, можно рассматривать как дополнительное свидетельство изменчивости комплекса транскрипционной активности рибосомных генов у больных со ЗЛ в результате воздействия ксенобиотиков на популяции лимфоцитов в периферической крови больных.

Важным дополнительным доказательством изменчивости показателей комплекса транскрипционной активности РГ в лимфоцитах больных в ходе проводимой ПХТ является многомерный анализ. В *табл. 2*

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1,0														
2	,71	1,0													
3	,29	-,46	1,0												
4				1,0											
5			,96		1,0										
6	,19	,17				1,0									
7	,10					,63	1,0								
8	,15	,17		,13	,13	,67	-,15	1,0							
9						-,12	-,13		1,0						
10						-,10	-,14		,96	1,0					
11						,16	,13				1,0				
12	-,16	-,19		-,10	-,10		,16	-,21		,66		1,0			
13	,19	,17		,10	,24			,38		,54	-,28		1,0		
14											-,10			1,0	
15											-,11			,97	1,0

1 — 1-е поступление, активность по 10-хр.; 2 — 1-е поступление, активность по D-хр.; 3 — 1-е поступление, активность по G-хр.; 4 — 1-е поступление, число хр. в ассоциации; 5 — 1-е поступление, число ассоциаций хр.; 6 — 2-е поступление, активность по 10-хр.; 7 — 2-е поступление, активность по D-хр.; 8 — 2-е поступление, активность по G-хр.; 9 — 2-е поступление, число хр. в ассоциациях; 10 — 2-е поступление, число ассоциаций хр.; 11 — 4-е поступление, активность по 10-хр.; 12 — 4-е поступление, активность по D-хр.; 13 — 4-е поступление, активность по G-хр.; 14 — 4-е поступление, число хр. в ассоциациях; 15 — 4-е поступление, число ассоциаций хр.

Таблица 2. Матрица значимых коэффициентов корреляции цитогенетических показателей лимфоцитов больных ЗЛ, R = 0,10

представлены результаты корреляционного анализа цитогенетических показателей РГ в лимфоцитах 15 больных при постановке диагноза, а также после прохождения ими 1-го и 3-го курсов ПХТ. Полученные данные указывают на отсутствие корреляционных взаимосвязей между цитогенетическими показателями активности РГ в популяциях лимфоцитов в динамике курсов ПХТ. Выявленные же взаимосвязи хотя и носили статистически достоверный уровень, но были настолько малы, что ими можно пренебречь.

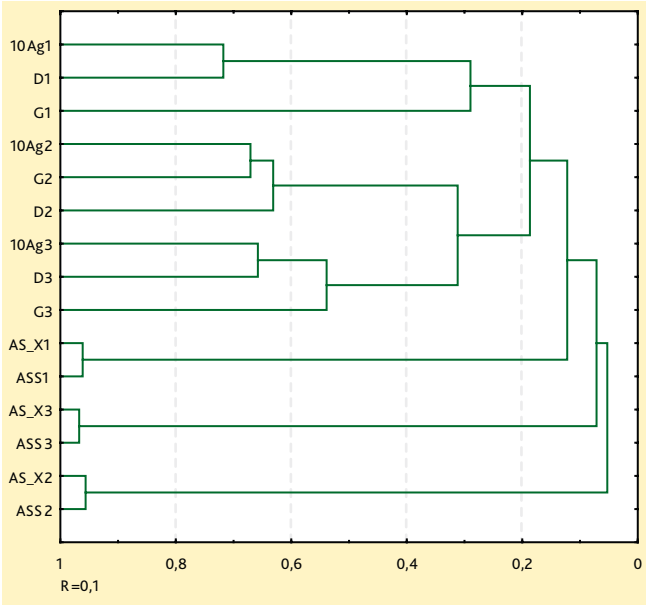
На базе полученных корреляционных матриц был проведен кластерный анализ (*рисунк*), который наглядно демонстрирует относительно независимый характер вариабельности комплекса показателей активности РГ как при поступлении больных в КООД, так и после прохождения ими 1-го и 3-го курсов ПХТ.

Выводы

На сегодняшний день проблема изменчивости функциональной активности рибосомных генов в научной литературе остается открытой. Не останавливаясь подробно на значимости ее решения, отметим, что корректное владение механизмами управления экспрессией рибосомных генов в отдельных видах тканей, органах и системах органов человека может стать совершенно новой страницей в современной клинической генетике, а также расширить представления о функционировании генома.

Выбрав в качестве предмета исследования активность РГ на модели неоплазии лимфоидной ткани человека, мы сочли весьма важным оценить количество активных РГ в динамике проведения различных курсов ПХТ. Подобный подход используется впервые и, на наш взгляд, позволяет детально рассмотреть естественный процесс комбинированного воздействия различных ксенобиотиков не только на трансформированные клетки, но и на другие клеточные популяции организма. Полученные результаты указывают на повышение активности РГ после 2-го и 3-го курсов ПХТ. Иными словами, обнаруженные в зависимости от количества курсов ПХТ различия в показателях активности РГ отражают особенности ответных реакций лимфоцитарных популяций на экзогенные воздействия не только в количественном, но и в качественном значении.

Все это еще раз доказывает, что лимфоцитарные популяции периферической крови больных ЗЛ отвечают на воздействие ксенобиотиков увеличением количества активных РГ. При этом механизмы данного эффекта могут быть различными. В первом приближении можно допустить два из них. Первый — элиминация из популяции в ответ на лечение лимфоцитов с низким количеством активных РГ и сохранение лимфоцитов со средними и высокими показателями.



1 — 1-е поступление, активность по 10-хр.; 2 — 1-е поступление, активность по D-хр.; 3 — 1-е поступление, активность по G-хр.; 4 — 1-е поступление, число хр. в ассоциации; 5 — 1-е поступление, число ассоциаций хр.; 6 — 2-е поступление, активность по 10-хр.; 7 — 2-е поступление, активность по D-хр.; 8 — 2-е поступление, активность по G-хр.; 9 — 2-е поступление, число хр. в ассоциациях; 10 — 2-е поступление, число ассоциаций хр.; 11 — 4-е поступление, активность по 10-хр.; 12 — 4-е поступление, активность по D-хр.; 13 — 4-е поступление, активность по G-хр.; 14 — 4-е поступление, число хр. в ассоциациях; 15 — 4-е поступление, число ассоциаций хр.

Дендрограмма матрицы корреляций цитогенетических показателей больных, получивших 3 курса ПХТ

И второй — это влияние вводимых в организм больных мощных ксенобиотиков, которые, воздействуя на геном клетки, способствуют повышению количества активно функционирующих рибосомных генов. Вероятнее всего, может иметь место и кумулятивный механизм, основанный на элиминации одних клеточных субпопуляций и формировании других — с индуцированным изменением уровня экспрессии генов.

В силу специфики заболевания и используемого методологического подхода из анализа изначально было исключено возможное влияние хирургического и лучевого лечения. Наблюдаемые эффекты получены в результате использования только комбинации химиопрепаратов. В качестве основных механизмов воздействия противоопухолевых веществ на обмен нуклеиновых кислот можно предположить следующее. Препараты алкилирующего ряда могут непосредственно взаимодействовать или с нуклеиновой кислотой, нарушая ее способность нормально функционировать, или с ферментами, ответственными за биосинтез нуклеиновых кислот и их функциональную полноценность. Возможно встраивание между азотистыми основаниями в цепи ДНК или РНК, препятствующее нормальным процессам репликации и транскрипции. Некоторые противоопухолевые антибиотики и алкалоиды могут блокировать ДНК-матрицу за счет ковалентного связывания, что приводит к снижению активности полимераз. Функционирование нуклеиновых кислот может нарушаться также в том случае, если в цепи ДНК или РНК природные компоненты будут заменены

модифицированными. Механизм антибластического действия препаратов группы антиметаболитов основан на взаимодействии с различными ферментами или группой ферментов, осуществляющих биосинтез компонентов ДНК и РНК и их катаболическое превращение. Для такого взаимодействия с ферментными системами вещество должно иметь структурную аналогию. Это далеко не полный перечень возможных механизмов действия препаратов, однако следует отметить интересную особенность ядрышкообразующих районов (районов локализации рибосомных генов) акроцентрических хромосом. В течение всего жизненного цикла клетки эти участки находятся в деспирализованном состоянии. Таким образом, и в период интерфазы, и в период митотического деления клетки возможность индуцированного влияния на эти области выше, чем в целом по геному.

Не исключаются и другие механизмы наблюдаемого эффекта. В любом случае факт увеличения показателей комплекса транскрипционной активности рибосомных генов в лимфоцитарных популяциях у больных в результате лечения является очевидным и требует дальнейшего изучения.

Список литературы

1. Аксель Е.М., Двойрин В.В. Статистика злокачественных новообразований (заболеваемость, смертность, тенденции, социально-экономический ущерб, продолжительность жизни). М., 1992. 308 с.
2. Аминева Д.Д. Оценка качества полихимиотерапии у больных злокачественными лимфомами. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Уфа, 2000. 22 с.
3. Волкова М.А. Клиническая онкогематология: рук-во для врачей. М.: Медицина, 2001. С. 92–114.
4. Диагностика злокачественных опухолей при диспансеризации населения. Под ред. Н.Н. Блинова, А.Г. Весника, Ю.Г. Пучкова. СПб.: Гиппократ, 1994. С. 181–197.
5. Залетаева Т.А., Кулешов Н.П., Залетаев Д.В., Барцева О.Б. Современные методы хромосомного анализа в клинко-цитогенетических исследованиях: Российская мед. акад. последип. образ. М.: Медицина, 1994. 68 с.
6. Ильинская Г.В., Флейшман Е.В., Пригожина Е.Л. и др. Особенности кариотипа лимфосаркомы человека. В кн. «Хромосомы человека в норме и патологии». М.: Наука, 1989. С. 82–88.
7. Переводчикова Н.И. Онкология. 1996.
8. Поддубная И.В. Клиническая онкогематология. М.: Медицина, 2001. С. 336–375.
9. Поддубная И.В. Современная онкология. 2002. Т. 4. № 1. С. 3–7.
10. Howell W.M., Denton T.E., Piamons I.R. Differential staining of the satellite of human acrocentric chromosomes // Experientia. 1975. Vol. 31. P. 260–265.
11. Howell W.M. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes // Chromosome. 1977. Vol. 62. № 4. P. 1234–1238.
12. LeBeau M.M. Chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphomas // Semin. Oncol. 1990. Vol. 1. P. 20–29.
13. Sorokin E. Third International Symposium on Hodgkin's lymphoma. Koln, 1995. Abstr. 110.