

УДК 618.19-006.6(476.2):611.-018.1+575

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ЛИЦ, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ

С.Б. Мельнов, Э.А. Надыров, Т.Г. Дрозд, Е.С. Тимофеев, Л.А. Путырский

Международный государственный экологический университет имени А.Д. Сахарова
Гомельский государственный медицинский университет

Проведен цитогенетический анализ препаратов тканей молочной железы женщин Гомельской области с целью оценки активности мутационного процесса. Показано, что уровень агрессивности опухоли тесно связан с уровнем мутагенеза в опухолевой ткани.

Ключевые слова: рак молочной железы, генетическая нестабильность, микроядра, митозы.

CYTOGENETIC AND THE CYTOLOGIC STATUS OF THE BREAST CANCER AT THE PERSONS LIVING IN TERRITORY OF THE GOMEL AREA

S.B. Melnov, E.A. Nadyrov, T.G. Drozd, E.S. Timofeenko, L.A. Putyrsky

International State Ecological University of a name of A.D. Saharov
Gomel State Medical University

Cytogenetic analyses of breast cancer tissue slides from Gomel patients for on mutagenesis activity estimation was done. It was shown that tumor grade is correlated with the levels of mutagenesis in cancer tissue.

Key words: breast cancer, genetic instability, micronuclei, mitosis

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) в настоящее время представляет собой одну из наиболее агрессивных и часто встречающихся форм злокачественных новообразований у женщин. Показатели заболеваемости РМЖ неуклонно растут, особенно в промышленно развитых странах, а также в регионах с неблагоприятной экологической обстановкой, в том числе и в Беларуси [1].

По данным литературы, заболеваемость РМЖ среди женского населения Беларуси сохраняется на средних уровнях по сравнению с показателями в других республиках СНГ. При этом в пересчете на 100 тыс. населения в РБ она росла с 22,9 в 1982 г. до 49,0 в 1996 г., а в 2004 г. составила 64,8 [2].

Данные Л.А. Путырского, касающиеся изменения уровней и динамики заболеваемости РМЖ женщин в Гомельской области, позволяют выдвинуть предположение о влиянии последствий Чернобыльской катастрофы на происходящие изменения. Можно предположить, что развитие радиоиндуцированного РМЖ зависит, по крайней мере, от двух факторов. Один из них — прямое воздействие

канцерогена (радиации) на клетки молочной железы, второй — опосредованное действие, через гормональный статус организма.

В ряде публикаций, посвященных эффектам радиации в отношении риска заболевания РМЖ, отмечен факт радиозависимости этого рака. Как оказалось, самыми распространенными формами радиационнозависимого рака являются именно РМЖ, а также рак щитовидной железы. По оценкам МКДАР, примерно у десяти женщин из тысячи при дополнительном облучении развивается рак молочной железы в расчете на 1 Гр индивидуальной поглощенной дозы.

Эпидемиологические доказательства наличия радиационно-индуцированного рака молочной железы были получены при обследовании и лечении больных раком легкого, лимфомой Ходжкина, подвергшихся облучению по медицинским показаниям [3–7], при лучевой диагностике и терапии туберкулеза, спондилита и др. заболеваний [8, 9], а также по данным по лицам, пережившим атомную бомбардировку в Японии [10–15]. Результаты, полученные при оценке последствий атомной бомбардировки Хиросимы и Нагасаки, свидетельствовали о

том, что РМЖ, как и лейкозы, может индуцироваться дозами ниже 0,5 Гр [16]. Отмечено, что риск развития РМЖ снижается с увеличением возраста в момент облучения. Максимальным он оказался в группе, подвергшейся дополнительному облучению в возрасте 0–9 лет. В то же время риск радиогенного рака молочной железы у женщин, облученных в возрасте старше 40 лет, оказался намного ниже.

Хорошо известно, что латентный период солидных новообразований находится в обратной зависимости от возраста пострадавшего в момент облучения и более длителен у лиц, облученных в относительно молодом возрасте. Зависимость протяженности латентного периода от дозы для человека изучена не достаточно полно. Однако установлено, что увеличение дозы облучения экспериментальных животных сопровождалось сокращением латентного периода. До сих пор риск развития рака в результате действия низких доз ионизирующего излучения остается предметом ожесточенных научных дискуссий, биологические эффекты малых доз при хроническом воздействии, форма дозовой зависимости остаются неясными. Кроме того, до настоящего времени величины полученных дозовых нагрузок населением вследствие катастрофы на ЧАЭС представляют сложную и во многом нерешенную проблему [17].

Приведенные выше данные и рассуждения позволяют сделать предположение о взаимосвязи индивидуальной радиочувствительности и генетической предрасположенности к раку молочной железы. Таким образом, анализ молекулярно-генетического и цитогенетического статуса клеток РМЖ, а также оценка их общей геномной нестабильности может внести существенный вклад в понимание особенностей генеза этой патологии и роли в этом процессе факторов мутационного давления.

Целью исследования явилось изучение цитогенетического статуса клеток РМЖ у женщин, проживающих на территории Гомельской области.

Материалы и методы

Объектом исследований послужили мазки-отпечатки из опухолей 90 женщин, страдающих инвазивным РМЖ, проживающих на территории Гомельской области. Препараты готовили методом мазков-отпечатков, высушивали, фиксировали в мета-

ноле и окрашивали красителем Романовского-Гимзы, для контроля проводилась гистологическая верификация диагноза с определением гистологической формы рака и степени злокачественности. Препараты высушивали, заключали в оптически прозрачную среду под покровное стекло и исследовали с помощью микроскопа «Axioplan» (увеличение 10×100); при необходимости проводили микрофотографирование препаратов.

Для анализа брали от каждого пациента не менее 1000 клеток, подсчитывались клетки с нормальными и патологическими митозами и микроядрами, результаты выражали в процентах и обрабатывали с помощью программ стандартного пакета «Statistica 6.0» с использованием параметрической и непараметрической статистики.

Результаты и обсуждение

В исследованиях были использованы препараты интактных опухолей, опухолей, подвергшихся предоперационной лучевой терапии, полихимиотерапии и при применении комбинированного лечения.

Результаты исследований суммированы в таблице 1.

Данные таблицы 1 однозначно свидетельствуют о том, что во всех обследованных группах наблюдается довольно высокий уровень мутационных событий (в интактной опухолевой ткани частота клеток с микроядрами составляет $1,874\pm 0,052\%$).

Предшествующая операции радиотерапия существенно ($6,723\pm 0,229\%$, практически в 4 раза) и статистически достоверно ($p<0,001$) увеличивает этот параметр, что отражает имевший место факт радиационного воздействия. В то же время предшествующая химиотерапия обладает значительно менее выраженным ($2,590\pm 0,178\%$), хотя и статистически незначимым ($p>0,05$) эффектом. При этом в случае сочетанной терапии отмечен максимальный мутационный эффект ($8,433\pm 0,507\%$). Обращает на себя внимание и тот факт, что сочетанное воздействие обладает аддитивным, а не синергичным эффектом, т.к. частота клеток с микроядрами практически равна сумме эффектов радио- и химиотерапии ($6,723\% + 2,590\% = 9,313\%$ против $8,433\%$; $p>0,05$).

Уместно также отметить, что аналогичная картина сохраняется и в отдельных классах клеток с микроядрами (клетки с 1, 2, 3 и более микроядрами).

Таблица 1

Особенности цитологического и цитогенетического статуса РМЖ (M±m)

Параметр		Интактная опухолевая ткань	Предоперационная лучевая терапия	Полихимио- терапия	Полихимиотерапия в сочетании с лучевой терапией
Распределение по фазам клеточного цикла (норма)	Профаза	0,124±0,014	0,092±0,028	0,013±0,012	0,002±0,002
	Метафаза	0,004±0,003	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
	Анафаза	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
	Телофаза	0,001±0,001	0,008±0,008	0,012±0,013	0,000±0,000
	Всего клеток в стадии митоза	0,130±0,014	0,101±0,029	0,025±0,018	0,002±0,002
Патологические митозы	Анафазные мости	0,213±0,018	0,017±0,012	0,063±0,028	0,033±0,033
	Отставание в метафазе	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
	Пульверизация хромосом	0,001±0,001	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
	3-групповые митозы	0,001±0,001	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
	Многополюсные	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
	Моноцентрические	0,000±0,000	0,000±0,000	0,012±0,013	0,000±0,000
	Асимметричные	0,007±0,003	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
	К-митоз	0,022±0,006	0,008±0,008	0,000±0,000	0,000±0,000
	Прочие	0,016±0,005	0,025±0,014	0,000±0,000	0,000±0,000
	Всего патологических митозов	0,263±0,020	0,050±0,020	0,074±0,031	0,033±0,033
Клетки с микроядрами	1 микроядро	1,579±0,048	4,392±0,187	2,075±0,159	5,933±0,431
	2 микроядра	0,116±0,013	0,492±0,064	0,163±0,045	0,800±0,163
	3 и > микроядра	0,021±0,006	0,449±0,061	0,063±0,028	0,300±0,100
	Всего клеток с микроядрами	1,716±0,050	5,225±0,203	2,300±0,168	7,033±0,467
	Частота микроядер	1,874±0,052	6,723±0,229	2,590±0,178	8,433±0,507

При обследовании был также зафиксирован факт общего антипролиферативного эффекта как радио- (количество клеток в стадии митоза «норма» — 0,101±0,029%), так и химиотерапии (0,025±0,018%), хотя в последнем случае эффект снижения пролиферации существенно более выражен ($p < 0,05$). Максимальное подавление опухолевого роста наблюдалось в случае комбинированного дооперационного воздействия (0,002±0,002%). Кроме того, за исключением радиотерапии ($p > 0,05$), в случае химиотерапии и комбинированного воздейст-

вия снижение было статистически достоверным относительно уровня «нормальных» митозов в препаратах относительно «интактных» опухолей (в обоих случаях $p < 0,05$).

Параллельно с этим при терапевтических воздействиях всех типов существенно снижается и количество патологических митозов (радио-, химио- и комбинированная терапия — 0,050±0,020%, 0,074±0,031%, 0,033±0,033% соответственно).

При этом все перечисленные выше параметры существенно ниже (в 3–5 раз; $p < 0,05$) фонового уровня («норма» — 0,263 ± 0,020%).

Этот факт может объясняться следующими моментами:

а) общим подавлением пролиферационного потенциала опухолей при предоперационной терапии любого типа (см. табл. 1, «всего клеток в стадии митоза»).

б) он носит мнимый характер, т.к. дополнительные мутационные воздействия существенно сказываются на общем состоянии генома опухолевых клеток, способствуя формированию мультиабберрантных нежизнеспособных клеток, которые быстро элиминируются из популяции. Учитывая тот факт, что клетки с дестабилизированным геномом гораздо более чувствительны к мутагенным воздействиям, можно констатиро-

вать, что они будут подвергаться избирательной негативной селекции в первую очередь.

Попытка связать уровень цитогенетических нарушений и степень злокачественности опухолевого процесса (табл. 2) свидетельствует о том, что наиболее тесная взаимосвязь наблюдается в отношении суммарной частоты клеток с микроядрами (как с их общим количеством, так и с частотой ($r=0,4$; $p<0,005$), а также в отношении отдельных классов клеток — для клеток с одним и двумя микроядрами $r=0,4$ при $p<0,01$). Кроме того, прослеживается и определенная, хотя и менее выраженная взаимосвязь этого параметра с частотой К-митозов ($r=0,3$; $p<0,05$).

Таблица 2

Корреляционный анализ в статистике Спирмена зависимости цитогенетических параметров и уровня агрессивности опухолевого процесса

Параметр	Кол-во случаев	R по Спирмену	P
К-митоз	59	0,265	0,042
Клетки с 1 микроядром	59	0,357	0,005
Клетки с 2 микроядрами	59	0,356	0,006
Всего клеток с микроядрами	59	0,365	0,004
Всего микроядер	59	0,374	0,004

Таблица 3

Достоверность отличия (тест Манна-Уитни) некоторых цитологических и цитогенетических параметров у пациентов 2 и 3 уровня агрессивности опухолевого процесса

Параметр	U	Z	P
Клетки с 1 микроядром	224	-2,590	0,010
Клетки с 2 микроядрами	232	-2,457	0,014
Всего клеток с микроядрами	221	-2,640	0,008
Всего микроядер	216,5	-2,715	0,007

Сравнительный анализ критических параметров двух наиболее репрезентативных групп (степень злокачественности 2 и 3), представленный в таблице 3, свидетельствует о статистически значимом их различии в отношении основных показателей уровня мутагенеза, отражающих степень дестабилизации генома (для всех параметров $p<0,05$).

Таким образом, суммируя изложенное выше, можно констатировать, что индуцированный дополнительным облучением уровень микроядер может служить экспресс-критерием степени злокачественности опу-

холи. Кроме того, полученные нами данные еще раз заостряют проблему возможной роли неблагоприятных экологических факторов и, в частности, чернобыльского в отношении рака молочной железы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Путьрский Л.А. Рак молочной железы. — Мн., 1998.
2. Злокачественные новообразования в Беларуси 1995–2004 / Под ред А.А. Граковича, И.В. Залуцкого. — Мн.: БЕЛЦМТ, 2005. — 179 с.
3. Breast cancer and other second neoplasms after childhood Hodgkin's disease / S. Bhatia, L.L. Robinson, O. Oberlin et al. // Engl. J. Med. — 1996. — P. 745–751.

4. *Dershaw D.D., Yahalom J., Petrek J.A.* Breast carcinoma in Women previously treated for Hodgkin disease: mammographic evaluation // *Radiology*. — 1992. — Vol. 184, № 2. — P. 421–423.
5. *Hancock S.L., Tucker M.A., Hoppe R.T.* Breast cancer after treatment of Hodgkin's disease // *J. of the Nat. Canc. Incitute*. — 1993. — Vol. 85, № 1. — P. 25–31.
6. *Janjan N.A., Zellmer D.L.* Calculated risk of breast cancer following mantle irradiation determined by measured dose // *Cancer Detection & Prevention*. — 1992. — Vol. 16, № 5–6. — P. 273–282.
7. Subsequent malignancies in children and adolescents after treatment for Hodgkin's disease / *O. Beaty, M.M. Hudson, C. Greenwald et al.* // *J. of Clin. Oncology*. — 1995. — Vol. 13, № 3. — P. 603–609.
8. *Weiss H.A., Darby S.C., Doll R.* Cancer mortality following X-ray treatment for ankylosing spondylitis // *Int. J. of Cancer*. — 1994. — Vol. 59, № 3. — P. 327–338.
9. Frequent chest X-ray fluoroscopy and breast cancer incidence among tuberculosis patients in Massachusetts / *J.D.J. Boice, D. Preston, F.G. Davis et al.* // *Radiat. Res.* — 1991. — P. 214–222.
10. A case-control interview study of breast cancer among Japanese A-bomb survivors. I. Main effects. / *C.E. Land, N. Hayakawa, S.G. Machado et al.* // *Cancer Causes & Control*. — 1994. — Vol. 5, № 2. — P. 157–165.
11. A case-control interview study of breast cancer among Japanese A-bomb survivors. II. Interactions with radiation dose / *C.E. Land, N. Hayakawa, S.G. Machado et al.* // *Cancer Causes & Control*. — 1994. — Vol. 5, № 2. — P. 167–176.
12. Breast cancer among atomic bomb survivors / *M. Tokunaga, C.E. Land, M. Asantte* // *Radiation Carcinogenesis: Epidemiology and Biological Significance*. — New York, 1984. — P. 10–15.
13. Effect of A-Bomb Radiation on the Human Body / *Edited by I. Shigematsu, C. Ito, N. Kamaga et al.* // Tokyo: Harwood Academic Publishers, Bancodo Ltd. — 1995. — P. 419.
14. Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, 1950–1985 / *M. Tokunaga, C.E. Land, S. Tokuoka et al.* // *Radiat. Res.* — 1994. — Vol. 138, № 2. — P. 209–223.
15. *Machodo S.G., Land C.E., McKay F.W.* Cancer mortality and radioactive fallout in Soutjwestern Utah // *Amer. J. Epidem.* — 1987. — Vol. 125, № 1. — P. 44–61.
16. Cancer incidence in five continents / *D.M. Parkin, C.S. Muir, S.L. Whelan et al.* // *IARC Scintific Publication*. — 1992. — Vol. 6, № 120. — P. 34–35.
17. *Гавриленко С.В.* «Об итогах работы органов и учреждений здравоохранения Брянской области в 2003 году и задачах на 2004 год» // *Здравоохранение Брянской области. Документы* [http](#).

Поступила 07.03.2006

УДК 616-053.2-007+502+614.875

МОНИТОРИНГ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ КАК ИНДИКАТОР НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Ж.П. Кравчук

Гомельский государственный медицинский университет

Проанализирована возможность повышения эффективности работы регистра за счет увеличения размеров исследуемых территорий, поскольку для изучения возможных генетических последствий Чернобыльской катастрофы накопления данных для анализа динамики частот врожденных пороков развития (ВПР) в наиболее загрязненных регионах потребовало значительного отрезка времени. Проведенное исследование показало, что расширение зоны наблюдения нецелесообразно, т.к. объединение регионов с различным уровнем загрязнения радионуклидами приводит к нивелированию различий частот за счет усреднения соотношения загрязненных/незагрязненных территорий.

Ключевые слова: врожденные пороки развития, Чернобыльская катастрофа, регистр врожденных пороков развития.

THE MONITORING OF CONGENITAL ANOMALIES AS AN INDICATOR OF UNFAVOURABLE ENVIRONMENT

Zh.P. Kravchuk

Gomel State Medical University

For studying of possible genetic consequences of Chernobyl accident the collection of data for the dynamics analyses of the frequency of congenital anomalies in contaminated areas a long-time was taken. For increasing efficacy of register a raise in the size of contaminated areas have been analyzed.