

**Е.В. Неруш, В.В. Новицкий, Н.В. Севостьянова, Н.В. Чердынцева,
Н.Н. Плотникова, С.А. Коломеец, О.В. Черемисина, А.И. Дмитриева,
Н.А. Давыдова**

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОГО СИНТЕЗА ДНК У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКИХ

ГОУВПО «Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ», Томск
ГУ НИИ онкологии Томского научного центра СО РАМН, Томск
Томский областной онкологический диспансер

Проведено исследование репаративной системы ДНК лимфоцитов периферической крови у 180 больных раком легких и хроническими неспецифическими заболеваниями легких. Показано, что для онкологических больных характерно снижение активности и ингибирование системы репарации ДНК. Выявлена зависимость между степенью активности репаративного синтеза и гистологическим типом опухоли и наличием метастазирования.

Ключевые слова: рак легкого, ДНК-репарация, индекс стимуляции, лимфоциты

В настоящее время хорошо известно, что в основе процессов спонтанного (ненаследственного) канцерогенеза лежат мутационные изменения соматических клеток, не подвергшихся репарации. Система репарации ДНК является одной из основных систем сохранения гомеостаза организма на молекулярном уровне, обеспечивающей нормальное функционирование и стабильность генома как в норме, так и при повреждающих воздействиях. При нарушении системы репарации ДНК клетки проявляют повышенную чувствительность к действию различного рода мутагенов, что приводит в конечном итоге к повышенному уровню мутационных преобразований, гибели или злокачественному перерождению клеток [1]. В то же время остаются неясными многие принципиальные моменты в работе системы репарации ДНК при конкретных онкологических заболеваниях.

В литературе встречается небольшое количество исследований, посвященных проблеме оценки изменений различных гомеостатических систем при раке легкого (РЛ), несмотря на то, что структурная перестройка ткани является результатом нарушений, как в самой системе, так и в межсистемном взаимодействии [3, 4, 7]. Цель исследования — изучить функциональную активность репарационной системы ДНК клеток периферической крови у больных раком легкого в зависимости от гистологического типа опухоли и наличия очагов метастазирования.

Методика. Обследовано 180 больных центральным раком легкого (162 мужчины, 18 женщин), которые находились на лечении в клинике НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН г. Томска и в областном онкологическом диспансере г. Томска. Средний возраст пациентов составлял $56,57 \pm 7,96$

лет. Из числа больных раком легкого в 51,7 и 26,1% были диагностированы III и IV стадии злокачественного процесса соответственно. В 6,1 и 16,1% выявлены I и II стадии заболевания. Диагноз РЛ в каждом наблюдении был подтвержден морфологически, эндоскопически и рентгенологически. Группы сравнения составили 70 больных диспластическими процессами легких, 91 больной хроническим бронхитом и 100 практически здоровых мужчин соответствующего возраста. В качестве материала исследования использовали периферическую кровь. Забор крови проводили утром, натощак, в стерильную пробирку, содержащую 25 Ед/мл раствора гепарина.

Активность системы ДНК-репарации определяли методом жидкостной сцинтилляционной радиометрии [2]. Для постановки теста гепаринизированную кровь распределяли в 9 лунок иммунологического планшета по 0,05 мл и делили на 3 равные части: одну часть облучали 15 сек, вторую — 10 сек, третья, необлученная проба, являлась контролем. В качестве источника УФ-излучения использовали 2 бактерицидные лампы ДБ-15 (длина волны = 254 нм), расположенные на фиксированном расстоянии (30 см) от объекта, что определяет дозу и мощность облучения соответственно 15 Дж/м² и 1,6 Дж/сек. В каждом случае в лунку вносили по 0,2 мл среды 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС предварительно инактивировали теплом при температуре 56 °С 30 минут) и 10 мкКю/мл среды ³H-тимидина. Пробы перемешивали и инкубировали в течение 2 часов при 37 °С. После чего лимфоциты собирали на стекловолоконные фильтры («Wellcome», Норвегия) с помощью автоматического устройства «Харвестер» («Flow»), затем отмывали дистилли-

рованной водой (по 10 мл на пробу) и фиксировали 5% раствором ТХУ (по 2 мл на пробу), 96% этиловым спиртом (по 1 мл на пробу). Учет радиоактивности (имп/сек) проводили на сцинтилляционном счетчике «Mark-3» (США). За меру способности лимфоцитов периферической крови к репарации ДНК было принято отношение репаративного синтеза ДНК после тест-воздействия к спонтанному репаративному синтезу.

Для каждой выборки вычисляли следующие параметры: среднее арифметическое и ошибку среднего. Для оценки имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Колмогорова-Смирнова). При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента (t). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Для проведения корреляционного анализа устанавливали балл злокачественности патологического процесса (хронические неспецифические заболевания легких — 1 балл, диспластические процессы — 2, рак легкого — 3). Качественные показатели (наличие очагов метастазирования и исход заболевания) выражали в баллах и условных единицах, позволяющих ранжировать выборку.

Результаты. Способность лимфоцитов к репарации ДНК, определяемая отношением УФ-индуцированного репаративного синтеза к спонтанному, характеризуется, с одной стороны, индивидуальными особенностями донора, о которых судят по величине репаративного синтеза в ответ на стандартную дозу УФ-излучения, вызывающую максимальный уровень репаративного синтеза, а с другой стороны — величиной спонтанного репаративного синтеза. Причиной снижения величины способности лимфоцитов к репарации ДНК является увеличение спонтанного репаративного синтеза, что отражает наличие повреждений в ДНК.

По данным литературы [5], ингибирование репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови считается при индексе стимуляции (ИС) менее 1 усл. ед. В настоящей работе установлено, что снижение интенсивности этого процесса соответствует коэффициенту стимуляции, находящемуся в интервале от 1 до 1,74 усл. ед. (1,74 усл. ед. — минимальное значение данного показателя, полученное у здоровых доноров). Относительно нормальный уровень репарации ДНК — при индексе стимуляции более 1,74 усл. ед.

При исследовании функциональной актив-

ности системы ДНК репарации в лимфоцитах периферической крови здоровых доноров было установлено, что средние значения индекса стимуляции репаративного синтеза ДНК соответствовали $2,40 \pm 0,09$ усл. ед. 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 индивидуальных колебаний в способности лимфоцитов периферической крови здоровых доноров к репарации ДНК в ответ на тест-воздействие [3, 5]. Исследование репаративного синтеза ДНК показало, что наибольшее ингибирование данных процессов отмечали у больных раком легкого, индекс стимуляции репарации ДНК у которых ($1,20 \pm 0,02$ усл. ед.) оказался в 2 раза ниже данного показателя в контроле ($p=0,00...$; $t=14,3$), а также аналогичных значений у больных с хроническими неспецифическими заболеваниями (ХНЗЛ) и диспластическими процессами легких — $2,00 \pm 0,05$ ($p=0,00...$; $t=13,1$) и $1,42 \pm 0,06$ усл. ед. ($p=0,0019$; $t=3,1$) соответственно. Необходимо отметить также наличие выявленной отрицательной коррелятивной связи между уровнем репаративного синтеза и злокачественностью патологического процесса ($r=-0,56$; $p=0,00...$).

Анализ полученных данных показал, что у больных раком легкого величина индекса стимуляции варьировала в широких пределах — от 0,32 до 2,30 усл. ед. Это обстоятельство позволило разделить обследованных на 3 группы. 1-ю группу составили больные раком легкого (75 пациентов) с индексом стимуляции менее 1 усл. ед., что соответствует глубокому ингибированию ДНК-репаративных процессов в лимфоцитах периферической крови. У больных 2-й группы (75 пациентов) коэффициент стимуляции находился в пределах от 1 до 1,74 усл. ед. (1,74 усл. ед. — минимальное значение данного показателя, полученное у доноров). В 3-ю группу вошли больные (30 пациентов) с уровнем репаративной способности лимфоцитов крови выше 1,74 усл. ед. Средние значения индекса стимуляции у больных 1-й, 2-й и 3-й групп составляли $0,74 \pm 0,02$, $1,37 \pm 0,03$ и $1,94 \pm 0,02$ усл. ед. соответственно. В группе больных с глубоким ингибированием репаративных процессов ДНК (1-я группа) в лимфоцитах периферической крови преобладали III (45,3%) и IV (42,7%) стадии злокачественного процесса. Метастатические поражения в регионарных лимфоузлах и/или в отдаленных органах отмечены в 74,7% случаев ($T_{1-4}N_{0-2}M_1$). Летальный исход заболевания у пациентов первой группы регистрировали в 56% случаев. Следует отметить, что во вторую группу входили больные преимущественно с III (61,3%) стадией опухолевого процесса, а также с IV (16%) и II (18,7%) стадиями. У 38 (50,7%) па-

циентов этой группы диагностировали метастазы ($T_{1-4}N_{1-2}M_{0-1}$). Неблагоприятный исход заболевания отмечали у 26,7% пациентов (Рис. 1.).

Наибольшее количество больных с незначительным снижением репаративного синтеза ДНК (3-я группа) имели III стадию опухолевого процесса — 43,3% больных. Поражение лимфоузлов и/или органов регистрировали в 33,3% случаев. В данной группе больных было наибольшее количество пациентов (90%) с относительно благоприятным исходом опухолевого процесса. Таким образом, у обследованных больных раком легкого отмечена низкая способность лимфоцитов крови к репарации ДНК (41,7% — 2-я группа) и ее прогрессирующее подавление (41,7% — 1-я группа).

При исследовании ДНК репарационных систем в лимфоцитах периферической крови больных раком легкого было установлено, что активность репаративных процессов зависит от гистологического типа опухоли. Под наблюдением находилось 150 пациентов больных плоскоклеточным раком легкого, среди которых 100 обследованных с низкодифференцированной и 50 — с умереннодифференцированной формой рака. У 30 больных был диагностирован мелкоклеточный тип рака легкого. Уровень репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови у больных мелкоклеточным раком легкого был статистически значимо ниже (на 38,90%) по сравнению с таковыми у пациентов с плоскоклеточным типом опухоли ($p=0,00...$; $t=5,7$). Статистически значимых отличий индекса стимуляции репаративного синтеза ДНК в группах больных с различным уровнем дифференцировки плоскоклеточного рака обнаружено не было ($p=0,27$).

Для установления значения связи между индексом стимуляции ДНК и исходом заболевания был проведен корреляционный анализ, который показал, что больные с неблагоприятным исходом процесса имели низкие значения коэффициента в случаях обнаружения мелкоклеточного ($r=0,57$;

$p=0,0009$) и плоскоклеточного ($r=0,63$; $p=0,00...$) умереннодифференцированного типов опухолей. Кроме этого, была обнаружена корреляционная связь между индексом стимуляции репарации ДНК и наличием очагов метастазирования ($r=-0,58$; $p=0,00001$) у больных с плоскоклеточным умереннодифференцированным раком. Представленные данные дают возможность констатировать, что для большинства обследованных онкологических больных характерным является снижение и полное подавление способности лимфоцитов периферической крови к репарации ДНК. При этом еще раз был подтвержден факт наибольшей агрессивности мелкоклеточных форм карцином [6].

Заключение. Низкий уровень репаративного синтеза в клетках больных с наличием очагов метастазирования связан, на наш взгляд, с тем, что лимфоциты периферической крови таких больных претерпевают, вероятно, более глубокое повреждение вследствие токсического воздействия эндогенных факторов, связанное с распространением злокачественного процесса. Последствием низкой функциональной активности системы ДНК-репарации в лимфоцитах являются хромосомная нестабильность клеток, повышение частоты спонтанных и индуцированных аббераций хромосом, что приводит к вторичной иммунонедостаточности.

Peculiarities of DNA reparative synthesis in lung cancer patients

E.V. Nerush, V.V. Novitski, N.V. Sevostyanova, N.V. Cherdyntseva, N.N. Plotnikova, S.A. Kolomeets, O.V. Cheremisina, A.I. Dmitrieva, N.A. Davidova

The study of reparative DNA system of peripheral blood lymphocytes in 180 patients with lung cancer and chronic non-specific lung diseases was carried out. Both reduction and inhibition of DNA reparative system was shown to be typical for lung cancer patients. The extent of the reparative synthesis was found to depend on the tumor histology and the presence of metastasis.

Литература

1. Гурцевич В.Э., Галецкий С.А., Неред С.Н. и др. // Вестник РАМН. — 2000. — № 3. — С. 56-59.
2. Засухина Г.Д. // Цитология и генетика. — 1975. — № 12. — С. 375-383.
3. Караулов А.В., Маскалева Е.Ю., Радзевич А.Э. и др. // Иммунология. — 1991. — № 5. — С. 15-19.
4. Ланцов Л.А. // Молекулярная биология. — 1998. — Т.32. — № 2. — С. 1-6.
5. Никифорова Н.А., Москаленко И.П., Гайсенюк А.А. и др. // Медицинская радиология. — 1991. — № 5. — С. 33-35.
6. Dadmarz R., Sgagias M.K., Rosenberg S.A., Schwartzentruber D.J. // Cancer Immunother. — 1995. — Vol. 40 (1). — P. 1-9.
7. Shin W.S., Kang M.W., Kang J.H. et al. // Amer. J. Clin. Path. — 1996. — Vol. 105. — P. 174-181.

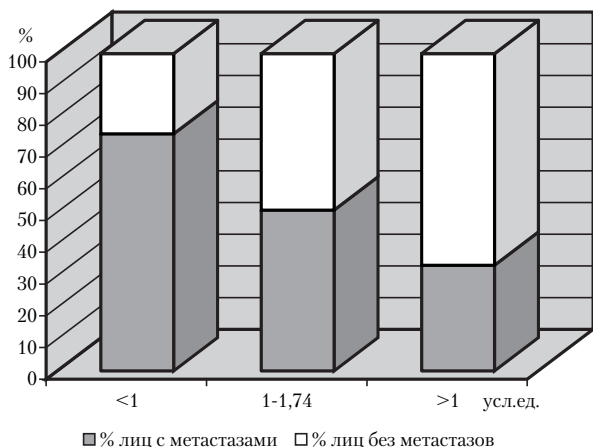


Рис.1. Распределение больных с метастазами и без таковых в зависимости от уровня репаративного синтеза ДНК.