

С.С. КИРСЄВА, Н.П. ЮРЧЕНКО, В.С. ПРОЦИК, М.В. СИДОРЕНКО

ЧУТЛИВІСТЬ ДО МУТАГЕНУ БЛЕОМІЦИНУ КУЛЬТИВОВАНИХ ЛІМФОЦИТІВ ТА СТАН ЕПІТЕЛІЮ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ НА ВІДСТАНІ ВІД СФОРМОВАНОЇ ПУХЛИНИ У ХВОРИХ НА РАК ПОРОЖНИНИ РОТА

Від-ня біотехнічних проблем діагностики Ін-ту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України; Ін-т раку МОЗ України, м. Київ

Генетичний поліморфізм чутливості до генотоксичних чинників обумовлює значимість вивчення ролі чутливого фенотипу в канцерогенезі. Суттєвим аспектом проблеми індивідуальної чутливості до дії факторів канцерогенезу є ризик розвитку вторинно-первинних та вторинних пухлин у онкологічних хворих, що гостро постав із застосуванням агресивних доз як опромінення, так і хіміопрепаратів, які переважно за механізмом дії є мутагенами та канцерогенами. Актуальною є також розробка надійної технології для клінічної оцінки індивідуального ризику рецидиву та вторинного канцерогенезу в слизовій оболонці порожнини рота [2, 5, 11, 15].

Захворюваність на плоскоклітинний рак слизової оболонки порожнини рота та всього дихального шляху при низьких показниках виживання має неухильну тенденцію до зростання в індустріальних країнах. Аналітична епідеміологія визначила основні фактори ризику розвитку раку в слизовій оболонці порожнини рота і сьогодні пов'язує його виникнення з тривалим часом тютюнопаління та вживання алкоголю за дії мутагенів та канцерогенів з тютюну та їх потенціювання алкоголем. Все більшу вагомість серед факторів ризику у мешканців індустріально розвинутих країн набувають також тривалі контакти з іншими факторами, що пошкоджують ДНК, та індивідуальна чутливість до них [6, 7, 11, 12, 16, 14, 18, 19].

Клінічно рак порожнини рота характеризується інвазивним ростом, часто розвитком первинно-множинних та вторинно-

первинних пухлин після проведеної терапії. Пацієнти, що успішно пройшли лікування, мають високий ризик виникнення вторинних пухлин у дихальному та травному шляхах. Ризик розвитку вторинно-первинних пухлин у них оцінюється у 20%, а щорічно - в 4-6%. Вторинно-первинні пухлини стають також переважною причиною смерті хворих, які пройшли лікування на ранніх стадіях перебігу пухлинного процесу [6, 11, 12, 14, 18]. Тому важливою є розробка нових стратегій для оцінки ризику вторинного канцерогенезу у цих пацієнтів після терапії. Одним з таких сучасних підходів можуть стати дослідження чутливості організму хворого до мутагенів, зв'язок цієї чутливості з епідеміологічними чинниками канцерогенезу та мутацій в гені супресорі пухлинного росту TP53, що призводять до аномальної ядерної акумуляції білку p53 у клітинах епітелію слизової оболонки на відстані від пухлини.

Ген TP53 найчастіше мутує під впливом мутагенних чинників. Мутації в гені TP53 та визначення акумуляції білку p53 у клітинах вважається початковою генетичною подією в розвитку карцином у порожнині рота і є показником прогресування патологічного фенотипу [12, 13]. Існує також достатньо даних про те, що індивідуальна чутливість до мутагенів може бути використана як біомаркер для оцінки ризику розвитку раку. Для оцінки чутливості організму до мутагену використовується показник хроматидних розривів у лімфоцитах в системі *in vitro* в тесті з блеоміцином. Цей тест знайшов сьогодні використання для оцінки

чутливості організму до мутагену та ризику вторинного канцерогенезу [6, 8, 17-19].

Мета роботи – дослідити індивідуальну чутливість хворих на рак порожнини рота до мутагену блеоміцину та стан епітелію слизової оболонки на відстані від сформованої пухлини з оцінкою рівня білку p53.

Матеріал і методи

Матеріалом дослідження були лімфоцити периферичної крові, біопсії слизової оболонки на відстані від новоутворення з візуально макроскопічно незміненої тканини у 16 хворих на рак порожнини рота до терапії, яка проводилась у науково-клінічному відділенні пухлин голови та шиї Інституту раку МОЗ України. Дослідження виконувались згідно з правилами Комітету з

етики. Всі діагнози верифіковані в патогістологічній лабораторії Інституту раку МОЗ. За гістологічним діагнозом досліджені новоутворення являли собою плоскоклітинний рак. Для оцінки у обстежуваних осіб вагомості факторів ризику канцерогенезу була розроблена інформаційно-аналітична картка обстеження онкологічного хворого, яка включає перелік основних епідеміологічних факторів ризику канцерогенезу в епітелії слизової оболонки порожнини рота, комплекс соціально-демографічних характеристик, урахування у родоводі спадкових синдромів та онкологічних захворювань, хвороб протягом життя та методів їх лікування; перелік мутагенів і канцерогенів відповідно до реєстру ВООЗ, з якими можливі тривалі та професійні контакти.

Таблиця 1

p53 у епітелії слизової оболонки на відстані від сформованої пухлини в залежності від гістопатологічних її змін у хворих на рак порожнини рота за постійної дії на слизову оболонку факторів ризику

№ п/п	Обстежуваний пацієнт, вік, стать	Статус куріння (років, ц/д); алкоголь (-, +); чинники, що пошкоджують ДНК	Гістологічна характеристика епітелію слизової оболонки на відстані від пухлини (біопсія)	Рівень градації p53	
1	О-ко; 43, ч.	25р<20ц; (++)	бензпірен	гіперплазія	0 (-)
2	Л-да; 64, ч.	35р>20ц; 15р (+)	хлор	гіперплазія	0 (-)
3	Я-ша; 59, ч.	45р., 60ц; (+++)	бензпірен	дисплазія (середня)	2 (++)
4	Л-та; 79, ч.	60р<20ц; (++)	бензпірен	дисплазія (середня)	1 (+)
5	В-в; 69, ч.	50р., 15ц; (++)		дисплазія (висока)	1 (+)
6	Ш-ня; 62, ч.	32р>10ц; (-)	ліквідатор, ЧАЕС	дисплазія (висока)	2 (++)
7	Т-ч 63; ч	33р., 20ц; (-)		дисплазія (висока)	2 (++)
8	Р-ч; 68, ч.	49р., 20ц; (+)	бензпірен, лаки, розчинники	дисплазія (висока), інтраепітеліальний рак.	1 (+)
9	Б-й; 63, ч.	30р., 15ц; (+)	рентген; опромінення	дисплазія (висока), інтраепітеліальний рак	3 (+++)
10	Неб-й; 55, ч	22р.20ц. (+)	γ-промінення	дисплазія (висока), інтраепітеліальний рак	2 (++)
11	Я-ов; 55, ч.	некур.; (-) (+); γ-опромінення, онкологічне захворювання у родині (рак легенів, батько)		дисплазія (висока), інтраепітеліальний рак	2 (++)
12	С-сь; 65, ч.	некур.; (-) (+); γ-промінення, онкологічне захворювання у родині (щитовидна залоза, мати)		плоскоклітинний рак I ступеня	2 (++)
13	К-ко; 53, ч.	36 р.; 10ц; (+)	гербіциди, інсектициди	плоскоклітинний рак I ступеня	2 (++)
14	К-к; 52, ч.	30р>20ц; (-)		плоскоклітинний рак I ступеня	1 (+)
15	Філ-ов, 43, ч	29р., 20ц.; (+)	ліквідатор наслідків ЧАЕС	плоскоклітинний рак I ступеня	2 (++)
16	Ш-як; 77, ч.	некур.; (-) (+)	бензпірен	плоскоклітинний рак I ступеня	3(+++)

За епідеміологічними факторами ризику канцерогенезу з 16 обстежених пацієнтів 13 мали статус: тютюнопаління – алкоголь. Три особи не палили, але мали тривалі контакти з мутагенами та онкологічні захворювання у родині у пробандів першого ступеня спорідненості. Розподіл хворих за індивідуальними факторами ризику представлено у таблиці.

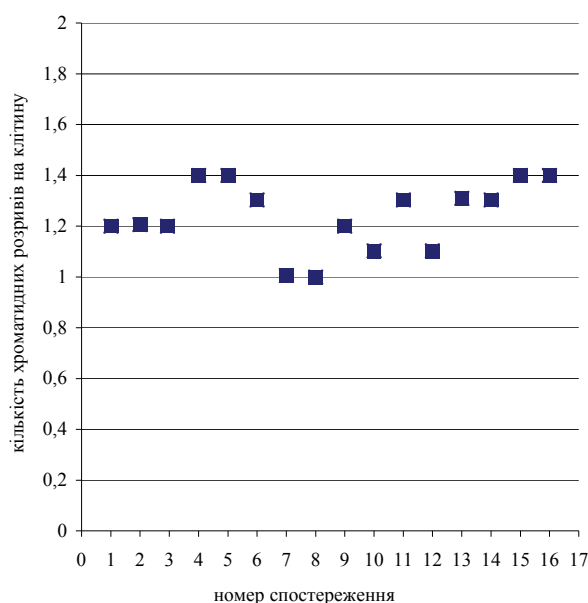
Для оцінки рівня хромосомних аберацій, індукованих блеоміцином (Jaran), лімфоцити культивувались 3 доби за стандартним макрометодом [6, 9] в середовищі RPMI 1640 (“Sigma”) з 20% телячої сироватки та 1% фітогемаглютиніну (Phytohemagglutinin РНА-Р, “Sigma”). Дослідні культури витримували інкубацію 5 год з блеоміцином у дозі 3 мкг/мл, останні 1,5-2 год культивувались з колхіцином (“Fluka”). Препарати оброблялись 1% розчином барвника Гімза (“Merck”) на фосфатно сольовому буфері, рН 6,8. При аналізі хромосом каріотипу лімфоцитів оцінювались хроматидні розриви і визначалась їх кількість на клітину. У кожного обстеженого аналізувалося від 50 до 100 метафаз. Згідно з методом оцінки індивідуальної чутливості організму за рівнем хроматидних розривів у культивованих лімфоцитах з мутагеном блеоміцином, чутливим до мутагену є індивід, у якого рівень хроматидних розривів на клітину дорівнює 1 чи перевищує 1 [9].

Біопсія зі слизової оболонки на відстані від сформованої пухлини здійснювалась з візуально макроскопічно незміненої тканини. Для гістологічної діагностики препарати фарбувались гематоксиліном та еозином. Імуногістохімічна технологія використовувалась для визначення експресії ядерного фосфопротеїну р53 за допомогою моноклональних антитіл до р53 (clone DO-7, “Daco”) та системи візуалізації EnVision+System-HRP (DAB), (“Daco Cytomation”). Негативний контроль виконувався без первинного антитіла. Білок забарвлювався за допомогою хромогену-3-діамінобензидину тетраклориду (ДАБ). Препарати дофарбовувались гематоксиліном і еозином. Рівень р53 по імуногістохімічній реакції оцінювався за методикою [10], яка враховує відсутність та наявність клітин з маркером у ядрі, а також інтенсив-

ність забарвлення за рівнями градації р53: 0(-), 1(+), 2(++), 3(+++), відповідно.

Результати дослідження та їх обговорення

Як показали дослідження, всі хворі на плоскоклітинний рак порожнини рота мали підвищену чутливість до мутагену (рисунк). Індивідуальний рівень хроматидних розривів на клітину в 14-ти спостереженнях був більше 1, а в випадках дорівнював 1, коливання середніх значень складали від 1,0 до 1,4 хроматидних розриви на клітину (хр. розр./ кл.). Аналіз індивідуальних показників хроматидних розривів в залежності від факторів ризику виявив тенденцію до зростання цього цитогенетичного маркера у осіб з тривалим статусом «тютюнопаління-алкоголь» (статус тютюнопаління > 20-ти р. > 20 ц / д., коливання 1,3-1,4 хр. роз./кл.) та тривалою дією на їх слизову оболонку та організм інших факторів ризику (бензпірен, важкі метали), а також у 1 пацієнта, що мав статус «тютюнопаління» лише 32р. >10ц /д і був ліквідатором наслідків аварії на ЧАЕС.



Індивідуальні показники хроматидних розривів у хромосомах культивованих лімфоцитів периферичної крові у хворих на рак порожнини рота в тесті з блеоміцином. Номера спостережень та їх характеристика представлені у таблиці.

В останні роки отримано результати, які свідчать про те, що чутливість до мута-

гену є суттєвим достовірним показником розвитку як первинно-множинних пухлин у слизовій оболонці порожнини рота та дихального шляху, так і вторинно-первинних після лікування. У дослідженнях з ретроспективним аналізом показано, що тест на чутливість до мутагена блеоміцину має суттєве значення для оцінки ризику виникнення вторинно-первинних пухлин у слизовій оболонці у цих хворих після терапії, особливо в поєднанні з такими факторами ризику, як тютюнопаління та вживання алкоголю [6, 18, 19]. Отримані дані дають підставу враховувати у клінічному анамнезі епідеміологічні фактори для подальшої оцінки ризику появи вторинних пухлин після терапії, але, на жаль, у теперішній час вони не відмічаються у картках хвороби пацієнтів.

В епітелії слизової оболонки порожнини рота на відстані від пухлини у цих же хворих виявлено всі послідовні стадії патологічного прогресування процесу в епітелії з наростанням акумуляції в ядрах епітеліальних клітин білку p53 в залежності від ступеня прояву в ній патологічних змін (таблиця 1). У дистантному епітелії слизової оболонки відмічені всі стадії гістопатологічного прогресування від гіперплазії епітелію до гіперплазії з переходом у дисплазійний епітелій різного ступеня прояву і далі до інтраепітеліального раку та раку I ступеня з реєстрацією клітин з p53 у базальному та супрабазальних шарах епітелію слизової оболонки при дисплазії та комплекси і поля клітин з p53 у дисплазійному епітелії з переходом у раковий. У ретроспективних дослідженнях показано, що ядерна акумуляція p53 у клітинах базального та супрабазальних шарів епітелію при передракових станах в слизовій оболонці є суттєвим біомаркером оцінки ризику розвитку раку [8, 14].

Білок p53 в епітеліальних клітинах слизової оболонки виявлений в 14 спостереженнях і відсутній у 2, в яких діагностована гіперплазія епітелію. Відмічені в дистантній слизовій оболонці всі послідовні стадії патологічного прогресування в епітелії з наростанням акумуляції p53 свідчать про те, що вся слизова оболонка порожнини рота зазнає піддається пошкодуючій дії, в результаті якої в ній утворюються комплек-

си та поля епітеліальних клітин з ознаками трансформованого фенотипу з аномальною експресією p53, з яких і виникла пухлина. Ці клітини за подальшої дії на слизову оболонку порожнини рота канцерогена чи мутагена, особливо у чутливих до їх дії індивідумів, як у наших спостереженнях, потенційно представляють загрозу розвитку як первинно-множинних, так і вторинно-первинних та вторинних пухлин у слизовій оболонці після променевого та хіміотерапевтичного впливу [3, 4, 8]. Виявлений нами інтраепітеліальний рак та рак I ступеня у слизовій оболонці обстежуваних хворих підтверджує ці висновки та сучасну концепцію “поля трансформації” Слотера та співавторів, сформульовану на основі даних, отриманих при визначенні гістологічних змін в епітеліальній тканині, що оточує пухлину [13]. Багаторічні молекулярно-генетичні дослідження дозволили підтвердити і поглибити морфологічну концепцію “поля трансформації” при формуванні епітеліальних новоутворень. Поля цих клітин можна розпізнати по наявності мутацій в гені TP53 та аномальній акумуляції білку p53 у ядрах епітеліальних клітин [4, 8, 11, 17]. Важливим є те, що комплекси клітин з p53 часто залишаються після видалення первинної пухлини, що може призвести до розвитку вторинно-первинних новоутворень чи рецидиву. Тому діагностика раку слизової оболонки порожнини рота і лікування повинні бути сфокусовані не тільки на пухлині, а також і на оточуючій тканині, з якої вона розвинулась. Проста імуногістохімічна техніка виявлення експресії білку p53 дозволяє використовувати цей показник у патогістологічних лабораторіях як біомаркер ризику виникнення раку у слизовій оболонці після проведеного лікування.

Висновки

1. Всі обстежені хворі на рак порожнини рота за рівнем хроматидних розривів у культивованих лімфоцитах периферичної крові були чутливі до дії мутагена блеоміцину та мали тривалий постійний вплив на слизову оболонку факторів ризику канцерогенезу.

2. В епітелії слизової оболонки порожнини рота на відстані від сформованої пу-

хлини виявлено всі гістопатологічні стадії прогресування процесу з аномальною акумуляцією p53 у клітинах базальних та супрабазальних шарів епітелію, які представляють високий ризик розвитку у цих пацієнтів, особливо чутливих до мутагена, вторинно-первинних та вторинних новоутворень у слизовій оболонці після променевої та хіміотерапії.

3. Хворі на рак порожнини рота до та після проведеного лікування потребують моніторингу за станом епітелію слизової оболонки та індивідуальної стратегії превентивної терапії.

1. Almadori G., Bussu A., Cadoni G., Galli J., Rigante M., Artuso A., Maurizi M. Multistep laryngeal carcinogenesis helps our understanding of the field cancerisation phenomenon: a review // *European J. of Cancer.* – 2004. – Vol. 40. – P. 2383-2388.
2. Balmain A., Gray J., Ponder B. The genetics and genomics of cancer // *Nat. Genet.* – 2003. – Vol. 33. – P. 238-244.
3. Braakhuis B.J.M., Brakenhoff R.H., Leemans C.R. Second field tumors: A new opportunity for cancer prevention? // *Oncologist.* – 2005. – Vol.10, №7. – P. 493-500.
4. Braakhuis B.J.M., Tabor M. P., Kummer J.A. Leemans C R., Brakenhoff R H. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63. – P. 1727-1730.
5. Busch D. Genetic susceptibility to radiation and chemotherapy injury: diagnosis and management // *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* – 1994. – Vol. 30. – P. 997-1002.
6. Cloos J., Leemans Ch. R., van der Sterre V.L.T. et al. Mutagen sensitivity as a biomarker for second primary tumors after head and neck squamous cell carcinoma // *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* – 2000. – Vol. 9. – P. 713-717.
7. Hayat M.J., Howlader N., Reichman M.E., Edwards K. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the surveillance, epidemiology, and results (SEER) program // *Oncologist.* – 2007. – Vol. 12, №1. – P. 20-27.
8. Homann N., Nees M., Conradt C. et al. Overexpression of p53 in tumor-distant epithelia of head and neck cancer patients is associated with an increased incidence of second primary carcinoma // *Clin. Cancer Res.* – 2001. – Vol. 7, №2. – P. 290-296.
9. Hsu T.C. Genetic predisposition to cancer with special reference to mutagen sensitivity in vitro cells // *Develop. Biol.* – 1987. – Vol. 29. – P. 521-603.
10. Langdon J., Partidge M. Expression of the tumour suppressor gene p53 in oral cancer // *Br. J. Maxillofac. Sur.* 1992. – Vol. 30. – P. 214-220.
11. Perez-Ordenez B., Beauchemin M., Jordan R.C.K. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck // *J. of Clin. Pathol.* – 2006. – Vol. 59, №5. – P. 445-453.
12. Seitz H.K., Stickel F., Homann N. Pathogenetic mechanisms of upper aerodigestive tract cancer in alcoholics // *Int. J. Cancer.* – 2004. – Vol. 108. – P. 483-487.
13. Slaughter D.P., Southwick HW., Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin // *Cancer (Phila).* – 1953. – Vol. 6. – P. 963-968.
14. Tabor M.P., Brakenhoff R.H., Ruijter- Schippers H.J., van der Wal J.E. et al. Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion // *Am. J. Pathol.* – 2002. – Vol.161, №3. – P. 1051-1060.
15. Taramelli R., Acquati F. The human genome project and the discovery of genetic determinants of cancer susceptibility // *European J. of Cancer.* – 2004. – Vol. 40. – P. 2537-2543.
16. Thun M.J., Henley S.J., Calle E. E. Tobacco use and cancer: an epidemiologic perspective for genetics // *Oncogene.* – 2002. – Vol. 21. – P. 7307-732.
17. Van Houten V.M.M., Tabor M.P., van den Brekel M.W.M. et al. Mutated p53 as molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer // *J. Pathol.* – 2002. – Vol. 198. – P. 476-486.
18. Wu X., Gu J., Spitz M.R. Mutagen Sensitivity: A genetic predisposition factor for cancer // *Cancer Research.* – 2007. – Vol. 67, №8. – P. 3493-3495.
19. Wu X., Gu J., Dong Q. et al. Joint effect of mutagen sensitivity and insulin-like growth factors in predicting the risk of developing secondary primary tumors and tumor recurrence in patients with head and neck cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12. – P. 7194-7201.

Надійшла до редакції 07.12.09.

© С.С. Кіреєва, Н.П. Юрченко, В.С. Процик, М.В. Сидоренко, 2010

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К МУТАГЕНУ
БЛЕОМИЦИНУ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ
ЛИМФОЦИТОВ И СОСТОЯНИЕ СЛИЗИСТОЙ
ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА НА РАССТОЯНИИ
ОТ СФОРМИРОВАННОЙ ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ
РАКОМ ПОЛОСТИ РТА**

*Киреева С. С., Юрченко Н.П., Процик В.С.,
Сидоренко М.В. (Киев)*

Резюме

Исследовались индивидуальная чувствительность к мутагену блеомицину культивируемых лимфоцитов периферической крови (среднее число хроматидных разрывов на клетку) и состояние эпителия слизистой оболочки полости рта на расстоянии от сформированной опухоли с оценкой экспрессии белка p53 у больных плоскоклеточным раком полости рта. Показано, что у обследуемых больных имело место длительное постоянное воздействие на слизистую оболочку полости рта эпидемиологических факторов риска канцерогенеза (статус «курение-алкоголь», длительный контакт с мутагенами, канцерогенами) и у них отмечалась чувствительность к мутагену блеомицину. В эпителии слизистой оболочки полости рта на расстоянии от опухоли выявлены все последовательные стадии гистопатологической прогрессии процесса с аккумуляцией белка p53 в клетках базального и супрабазальных слоев эпителия. Эпителиальные клетки с аккумуляцией p53 в дистантном эпителии слизистой оболочки в сочетании с чувствительностью организма больного к мутагену представляют риск развития в ней вторично-первичных и вторичных опухолей после проведенного лечения и требуют мониторинга за состоянием слизистой оболочки и индивидуальной стратегии превентивной терапии.

**THE SENSITIVITY TO MUTAGEN
BLEOMYCIN OF PATIENTS WITH ORAL
SQUAMOUS CELL CARCINOMA AND STATE
OF EPITHELIUM OF TUMOR-DISTANT ORAL
MUCOSA**

*Kirieteva S.S., Yurchenko N.P., Protsyk V.S.,
Sidorenko M.V. (Kiev)*

Summary

The aim of this study was to investigate the sensitivity to mutagen bleomycin of cultured lymphocytes (mean number of chromatid breaks per cell) and the state of epithelium of tumor-distant oral mucosa with p53 expression in patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC). It has been shown that all patients with OSCC were mutagen sensitivity and had permanent influence on oral mucosa of epidemiological factors of cancer risk (smoking-drinking status, long contact with mutagen, carcinogen). The analysis of tumor-distant mucosa revealed all stages of histopathological progression with nuclear accumulation of p53 protein in basal and suprabasal cells. Areas cells with accumulation of p53 and sensitivity of patient to mutagen represent to high risk of development of second primary and second tumors after treatment and require monitoring of oral mucosa and prevention.