

БИОМАРКЕРЫ РАДИАЦИОННОГО ЭФФЕКТА

УДК 599.539.1.047.616-006

ЧАСТОТА ЛИМФОЦИТОВ, МУТАНТНЫХ ПО ГЕНАМ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА, КАК ВОЗМОЖНЫЙ КРИТЕРИЙ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ГРУППЫ ПОВЫШЕННОГО РИСКА РАЗВИТИЯ ОПУХОЛЕЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ОБЛУЧЕННЫХ И НЕОБЛУЧЕННЫХ ЛИЦ

© 2005 г. А. О. Верещагина*, И. А. Замулаева, Н. В. Орлова, С. Г. Смирнова,
В. С. Медведев, А. С. Саенко

Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск

Проведено сравнительное исследование частоты мутантных по локусу Т-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR) лимфоцитов периферической крови у 46 больных раком щитовидной железы (РЩЖ) до лечения и у 186 контрольных здоровых лиц. Часть больных проживает на загрязненных радионуклидами территориях. Установлено статистически значимое увеличение частоты TCR-мутантных клеток у онкологических больных по сравнению с контрольными лицами сходного возраста ($p < 0.01$), что может быть следствием генотоксических воздействий, повышенной чувствительности к ним, генетической нестабильностью (в том числе радиационно-индуцированной). У 37% больных установлена повышенная частота TCR-мутантных клеток, превышающая 95%-ный доверительный интервал для этого показателя в контрольной группе. Наибольшее число лиц с повышенными частотами мутантных клеток отмечено среди больных, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях и находящихся в момент обследования в возрасте до 30 лет. Учитывая эти результаты, представляется перспективным обследование с использованием TCR-метода для формирования групп повышенного канцерогенного риска.

Проточная цитометрия, соматические мутации, Т-клеточный рецептор, рак щитовидной железы, радиационное загрязнение, авария на ЧАЭС.

Наиболее неблагоприятные последствия Чернобыльской аварии для населения связаны с индукцией раков щитовидной железы (РЩЖ), особенно у тех лиц, кто находился в момент аварии в детском возрасте. С 1992 г. число заболевших РЩЖ драматически растет. В Брянской и Орловской областях в настоящее время показатель заболеваемости РЩЖ для лиц, облученных в детском возрасте, в 3–5 раз превышает аналогичный по стране в целом. Поэтому поиск новых подходов для формирования группы риска в отношении развития РЩЖ у облученных людей остается актуальным для практики (с целью улучшения ранней диагностики и профилактики развития опухолей), а также для выяснения возможных механизмов возникновения этого заболевания.

Наряду с такими хорошо известными и широко используемыми диагностическими методами, как УЗИ и морфологическое исследование тонкоигольных биоптатов, не прекращаются поиски молекулярных онкомаркеров в клетках РЩЖ. В настоящее время установлена ведущая роль мута-

ций в анти- и протоонкогенах в злокачественной трансформации клеток, в том числе и клеток щитовидной железы. Эти результаты позволяют считать, что для формирования группы риска в отношении развития злокачественных новообразований наиболее важным было бы определение частоты мутаций в генах, непосредственно вовлекаемых в канцерогенез. Однако существующие методы определения мутаций в таких генах достаточно дороги и трудоемки и, следовательно, не пригодны для популяционных исследований, необходимых для формирования групп риска.

Возникновение мутаций, как правило, является стохастическим процессом, поэтому можно было предположить, что относительное количество клеток с любым мутировавшим геном (в том числе и не имеющим прямого отношения к канцерогенезу) отражает общий уровень соматического мутагенеза в организме. В таком случае лица с высокой частотой мутаций в генах, непосредственно не связанных со злокачественной трансформацией, будут составлять группу риска в отношении развития опухолей. Прямое подтверждение этого предположения представлено в работе ученых из стран Северной Европы, обна-

*Адресат для корреспонденции: 249030 Обнинск, Калужская обл., ул. Королева, 4, МРНЦ РАМН, тел.: (08439) 7-48-47; e-mail: anna-wer@yandex.ru.

руживших повышенный риск возникновения злокачественных опухолей у лиц с высокой частотой хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови [1]. Косвенные доказательства получены в работе японских исследователей и наших работах [2, 3], в которых показано, что у больных раком гортани и рядом других злокачественных новообразований до лечения наблюдаются повышенные частоты лимфоцитов с мутациями по генам Т-клеточного рецептора (TCR). Поэтому можно полагать, что определение частоты мутаций в соматических клетках с помощью методов, пригодных для популяционных исследований, может быть использовано для выявления лиц с повышенным риском возникновения онкологических заболеваний.

Цель данной работы - исследование частоты TCR-мутантных лимфоцитов в периферической крови больных раком щитовидной железы до лечения, в том числе у пациентов, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях, и тем самым получение сведений о перспективности использования этого метода для формирования группы риска в отношении развития РЩЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Материалом исследования служила гепаринизированная венозная кровь онкологических больных и здоровых доноров. В группу онкологических больных вошли лица с диагнозом РЩЖ (средний возраст 37.4 ± 14.3). Пациенты были госпитализированы в отделение радиохирургического лечения закрытыми радионуклидами МРНЦ РАМН в период с 2001 по 2003 г. Диагноз был подтвержден морфологически. Частота мутантных клеток определена у 46 человек до начала лечения с помощью TCR-метода. Группу контроля составили практически здоровые лица, проживающие на незагрязненных радионуклидами территориях и не подвергавшиеся ранее зарегистрированному генотоксическому воздействию. Всего с помощью TCR-метода было обследовано 186 контрольных доноров (средний возраст 37.0 ± 15.2). В дальнейшем они были разбиты на подгруппы, соответствующие по возрасту исследуемым группам онкологических больных.

Для определения частоты соматических клеток, мутантных по TCR-генам, использовали методику, подробно описанную ранее [4, 5].

TCR-тест основан на использовании пары моноклональных антител, меченных разными флуорохромами, к CD3- и CD4-антигенам. Как известно, на поверхности Т-лимфоцитов экспрессируется комплекс Т-клеточного рецептора, представленного двумя полипептидными цепями, и CD3-антигена. Поскольку TCR-гены функционально гемизигот-

ны, любая мутация, приводящая к изменению или полному отсутствию функций одной из субъединиц, проявляется в том, что CD3-комплекс на поверхности Т-лимфоцита не экспрессируется. Такие мутанты при анализе определяются как CD3-негативные клетки среди CD4-позитивных Т-хелперов.

В работе были использованы моноклональные антитела производства фирмы "Becton Dickinson Immunocytometry Systems" ("BDIS", США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре "FACS Vantage" ("BDIS", США), оборудованном 488 нм лазером (Enterprise 621, "Coherent Inc.", США), с помощью программы Lysis II ("BDIS", США). Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью программ "Origin 6.0" ("Microcal Software, Inc.") и "Primer of Biostatistics v.4.03" (McGraw Hill, 1998) с использованием критериев Вилкоксона, Стьюдента и Фишера. Повышенными считали частоты, превышающие 95%-ный доверительный интервал, рассчитанный для контрольной группы как среднее значение ± 2 стандартных отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Зависимость частоты TCR-мутантных лимфоцитов от возраста контрольных доноров показана на рис. 1 и в табл. 1. Частота обнаружения таких клеток увеличивается примерно на 1.6% в год от исходного значения, что хорошо соответствует данным литературы [2, 4, 5]. Эти результаты обуславливают необходимость тщательного формирования контрольных групп. Поэтому в дальнейшем для каждой из групп исследования подбиралась соответствующая по возрасту контрольная группа. В группе онкологических больных статистически значимой возрастной зависимости не установлено ($p = 0.07$).

Средняя частота мутантных клеток в контрольной группе составила $(3.4 \pm 1.4) \times 10^{-4}$, а у больных РЩЖ до лечения $(6.3 \pm 3.0) \times 10^{-4}$. Показано, что повышенные частоты TCR-мутантных лимфоцитов ($>6.2 \times 10^{-4}$) наблюдаются у 37% онкологических больных. Распределение обследованных лиц по частоте мутантных лимфоцитов представлено на рис. 2. Частоты мутантных клеток у онкологических больных были статистически значимо выше, чем у здоровых лиц (по критерию Вилкоксона $p < 0.01$). Если из контрольной группы и группы онкологических больных исключить лиц с повышенными частотами, то средние значения частоты TCR-мутантных клеток составят соответственно 3.2 ± 1.2 и 4.4 ± 1.0 на 10000 клеток ($p < 0.01$). Это свидетельствует о том, что повышение частоты мутантных лимфоцитов у онкологических больных не является лишь следствием присутствия в выборке отдельных лиц с высокими частотами встречаемости таких кле-

ток. Эти результаты хорошо согласуются с полученными в других исследованиях, среди которых можно указать на работу японских авторов, проводивших сравнительное изучение частоты TCR-мутантных лимфоцитов на небольшом числе пациентов со злокачественными опухолями различных локализаций до лечения и у здоровых лиц [2], а также на наши данные по частоте TCR-мутантных лимфоцитов у больных раком гортани и гортаноглотки [3]. В этих исследованиях отмечено повышение частоты TCR-мутантных лимфоцитов у онкологических больных. В работе [6] получены противоречащие нашим результаты, однако поскольку данные по контрольной группе приведены не полностью, это не дает возможности судить о причине такого несоответствия.

Повышенная частота соматических мутаций может быть обусловлена разными причинами, в том числе и наследственными особенностями, приводящими к нестабильности генома. Как известно, вероятность неопластической трансформации резко повышается при нарушениях работы систем, контролирующей стабильность генома. Подтверждением этому служат результаты исследования соматического мутагенеза у лиц с наследственными синдромами (атаксией-телеангиэктазией, синдромом Блума, анемией Фанкони и др.), для которых характерны врожденная нестабильность генома (в частности, нарушение работы систем репарации) и высокая вероятность развития онкопатологии. В этих исследованиях выявлено значительное повышение частоты обнаружения клеток, мутантных по локусам T-клеточного рецептора и гликофорина А (GPA) [7-10].

Интересные результаты получены при обследовании пациентов с синдромом Кокэйна [11]. Этот синдром характеризуется нарушением систем репарации ДНК, однако не ассоциирован с предрасположенностью к развитию онкологических заболеваний. При исследовании частоты мутаций по TCR-, GPA- и HPRT-локусам у пациентов с синдромом Кокэйна не было выявлено статистически значимых различий с контролем.

Частота TCR-мутантных лимфоцитов, $\times 10^{-4}$

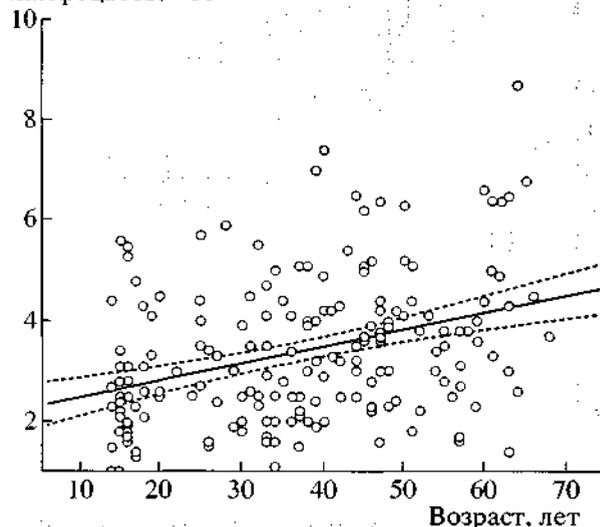


Рис. 1. Зависимость частоты TCR-мутантных лимфоцитов у 186 контрольных доноров от их возраста. Пунктиром обозначен 95%-ных доверительный интервал линейной регрессии $R = 0.4, p < 0.0001$.

Учитывая крайне низкую частоту перечисленных выше синдромов в популяции, нельзя ожидать их значительного вклада в повышение частоты TCR-мутантных клеток у онкологических больных, которое наблюдалось нами и другими авторами. Скорее приведенные примеры иллюстрируют связь повышенного уровня мутагенеза (в частности, по TCR-локусу) с высокой вероятностью возникновения онкологических заболеваний и соответственно возможность использования TCR-метода для выявления лиц с повышенным канцерогенным риском.

После чернойбыльской аварии большая территория РФ подверглась загрязнению радионуклидами, а ее жители - действию ионизирующего излучения в малых дозах. Известно, что у людей, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях, наблюдается повышенный уровень

Таблица 1. Частота выявления TCR-мутантных лимфоцитов у онкологических больных и контрольных доноров

Группа сравнения	Численность группы	Возраст, лет		Частота мутаций, $\times 10^{-4}$ *		n / u
		среднее	диапазон	среднее $\pm SD$	диапазон	
Контроль	186	37.0	14-68	3.4 ± 1.4	0.9-8.7	<0.01
РШЖ до лечения	46	37.2	13-64	6.3 ± 3.0	2.3-15.3	
Параметры линейной регрессии $Y = a + bX$, где Y - частота TCR-мутантных лимфоцитов, X - возраст						
	Численность	возраст	$a \times \sqrt{0r^4 \pm SE}$	$6 \times 10^{-4} \pm SE$	r	P
Контроль	186	37.0	2.1 ± 0.3	0.03 ± 0.01	0.4	0.0001
РШЖ до лечения	46	37.2	4.2 ± 1.2	0.06 ± 0.03	0.3	0.07

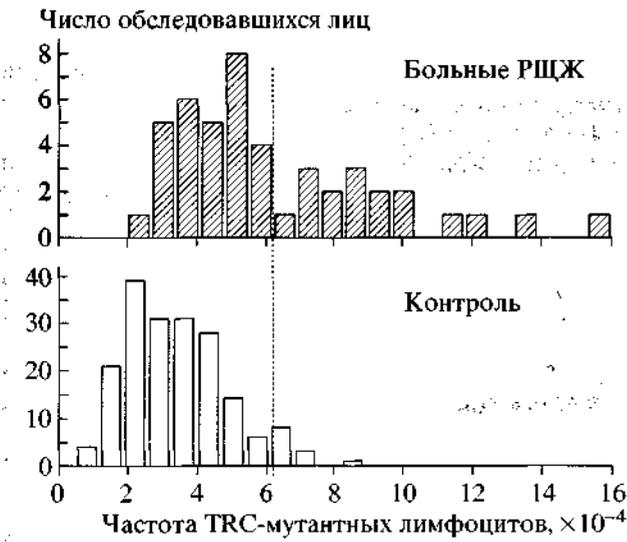


Рис. 2. Распределение частоты ТРС-мутантных лимфоцитов у 46 больных РЩЖ и 186 контрольных лиц с указанием верхней границы 95%-ного доверительного интервала в контрольной группе.

цитогенетических повреждений в соматических клетках [12-14]. Поэтому было интересно отдельно исследовать частоты соматических мутаций у лиц с РЩЖ, проживающих в районах, загрязненных после аварии на ЧАЭС. Для этого из группы онкологических больных была выделена соответствующая подгруппа, в которую вошли 20 человек (табл. 2). Для нее выявлено статистически достоверное по сравнению с соответствующим возрастным контролем повышение средней частоты ТРС-мутантных лимфоцитов. 9 больных РЩЖ (45%), проживающих на загрязненных территориях, имели повышенные частоты мутантных лимфоцитов. При сравнении этого показателя у больных РЩЖ, проживающих на незагрязненных и загрязненных радионуклидами территориях, статистически значимых различий установить не удалось (табл. 2). Однако, как видно из этой таблицы, повышенные частоты мутаций по ТРС-локусу наблюдались примерно у трети больных из

первой группы, тогда как во второй группе этот показатель приближается к 50%.

Известно, что именно в молодом возрасте щитовидная железа наиболее чувствительна к повреждающему действию ионизирующей радиации. Поэтому в группе онкологических больных, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях, была выделена подгруппа пациентов в возрасте до 30 лет (средний возраст 22.5 ± 3.5 лет). Среднее значение частоты ТРС-мутантных клеток в этой подгруппе лиц составило $(5.2 \pm 2.0) \times 10^{-4}$ (в соответствующем возрастном контроле 2.8 ± 1.2 на 10000 клеток ($p < 0.01$)) и было несколько меньше, чем в общей группе больных, что, скорее всего, обусловлено более молодым составом лиц в выборке. При оценке доли лиц с повышенной частотой встречаемости ТРС-мутантных лимфоцитов выявлена тенденция к увеличению этого показателя в группе онкологических больных, проживающих на радиационно-загрязненных территориях; причем в возрасте до 30 лет доля этих лиц выше всего (табл. 2 и 3).

Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными в ряде работ по исследованиям соматических генных мутаций у людей, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. В группе лиц, проживающих в загрязненных районах Орловской обл., которым на момент аварии на ЧАЭС было от 0 до 14 лет [15], и у лиц, облученных в результате проживания на загрязненных радионуклидами территориях в связи с аварией на ПО "Маяк" 1949-1952 гг. [14], было выявлено достоверное повышение по сравнению с контролем частоты ТРС-мутантных лимфоцитов в периферической крови.

В литературе описано большое количество исследований, в которых рассматриваются отдаленные эффекты воздействия ионизирующего излучения (особенно интересны эффекты малых доз) *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что в условиях *in vitro* в облученных клетках и их потомках наблюдается такое явление, как нестабильность генома, которое выражается в увеличении частоты воз-

Таблица 2. Частота обнаружения ТРС-мутантных лимфоцитов у онкологических больных, проживающих на "чистых" и загрязненных радионуклидами территориях

Группа сравнения	Численность группы	Возраст, лет (среднее)	Доля лиц с повышенными частотами, %	Частота мутантных лимфоцитов, $\times 10^{-4}$	
				среднее $\pm SD$	диапазон
Контроль	149	37	5	3.3 ± 1.3	1.1-7.0
РЩЖ (из загрязненных районов РФ)	20	35	45	$6.3 \pm 2.9^*$	2.7-13.4
РЩЖ (из незагрязненных районов РФ)	26	39	31	$6.2 \pm 3.1^*$	2.3-15.3

Отличие от контроля достоверно, * $p < 0.01$.

Таблица 3. Частота обнаружения TCR-мутантных лимфоцитов у онкологических больных и здоровых лиц в возрасте до 30 лет

Группа сравнения	Численность группы	Средний возраст обследованных, лет	Доля лиц с повышенными частотами*, %	Частота мутантных лимфоцитов, $\times 10^4$ *
Контроль	63	20	7	2.8 ± 1.2
РЩЖ (все обследованные)	17	21	41	$5.4 \pm 2.4^{**}$
РЩЖ (из загрязненных районов РФ)	9	22	56	$5.2 \pm 2.1^{**}$
РЩЖ (из незагрязненных районов РФ)	8	20	25	$5.6 \pm 2.8^{**}$

* Для данной контрольной группы верхняя граница 95%-ного доверительного интервала равна 5.2×10^4 . Отличие от контроля достоверно, ** $p < 0.01$.

никновения генных мутаций и хромосомных aberrаций [16, 17]. Результаты, представленные в работе [18], подтверждают гипотезу о том, что радиационно-индуцированная нестабильность генома является критическим событием, ассоциированным с инициацией неопластической трансформации. Этот феномен изучен гораздо хуже в условиях *in vivo*. Косвенные доказательства в пользу возникновения генетической нестабильности после облучения *in vivo* в малых дозах получены в ряде работ при мониторинге жителей загрязненных радионуклидами районов РФ в результате аварий на ЧАЭС, ПО "Маяк" [12-14, 19, 20]. Во всех этих работах показано увеличение у обследованных лиц частоты хромосомных aberrаций (в основном нестабильного типа) или генных мутаций (НРРТ, TCR) в отдаленные сроки после аварий.

Таким образом, учитывая результаты, полученные в данной работе и ранее, увеличение частоты образования TCR-мутантных клеток может быть обусловлено разными причинами, такими, как наличие генотоксических воздействий (в том числе ионизирующего излучения), повышенной чувствительностью к ним, генетической нестабильностью (включая врожденную и радиационно-индуцированную). Результаты исследования показали статистически значимое повышение по сравнению с контролем частоты выявления TCR-мутантных лимфоцитов у больных РЩЖ до начала лечения. В предыдущем исследовании было показано достоверное повышение по сравнению с контролем частоты регистрации TCR-мутантных клеток у лиц с доброкачественными узловыми образованиями в щитовидной железе [15]. Поэтому нам представляется возможным использование TCR-метода для формирования групп риска в отношении развития РЩЖ при эпидемиологических исследованиях. Однако, вероятно, необходим дальнейший поиск генных локусов или других маркеров, одновременное применение кото-

рых повысило бы эффективность выявления лиц с повышенным канцерогенным риском.

Исследования проведены при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (контракт № 02.434.11.3003).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hagmar, Brogger A., Hansteen I. et al. // *Cancer Res.* 1994. V. 54. P. 2919-2922.
2. Akiyama M., Umeki S., Kusunoki Y. et al. // *Health Phys.* 1995. V. 68. № 5. P. 643-648.
3. Замулаева И.А., Смирнова С.Г., Орлова Н.В. и др. // *Рос. онкол. журн.* 2001. № 1. С. 23-25.
4. Kyoizumi S., Akiyama M., Hirai Y. et al. // *J. Exp. Med.* 1990. V. 171. P. 1981-1999.
5. Саенко А.С., Замулаева И.А., Смирнова С.Г. и др. // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 1998. Т. 38. № 2. С. 171-180.
6. Vershenya S., Biko J., Drozd V. et al. // *Mutat. Res.* 2004. V. 548. P. 27-33.
7. Bigbee W.L., Langlois R.G., Swift M., Jensen R.H. // *Am. J. Hum. Genet.* 1989. V. 44. № 3. P. 402-408.
8. Langlois R.G., Begbee W.L., Jensen R.H., German J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. P. 670-674.
9. Kyoizumi S., Nakamura N., Takebe H. et al. // *Mutat. Res.* 1989. V. 214. P. 215-222.
10. Kyoizumi S., Kusunoki Y., Seyma T. et al. // *J. Hum. Genet.* 1998. V. 103. № 4. P. 405-410.
11. Lin Y.W., Kubota M., Hirota H. et al. // *Mutat. Res.* 1995. V. 337. № 1. P. 49-55.
12. Севанькаев А.В., Потетня О.И., Жлоба А.А. и др. // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 1995. Т. 35. Вып. 5. С. 581-588.
13. Севанькаев А.В. // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2000. Т. 40. № 5. С. 589-595.
14. Аклеев А.В., Веремеева Г.А., Киоизуми С. // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 1998. Т. 38. Вып. 4. С. 573-585.

15. Саенко А.С., Замулаева И.А., Смирнова С.Г. и др. // Радиация и риск. 2003. Спец. вып. С. 75–86
16. Kadhim M.A., Macdonald D.A., Goodhead D.T. et al. // Nature. 1992. V. 355. P. 738–740.
17. Little J.B. // Int. J. Radiat. Biol. 1998. V. 74. № 6. P. 663–671.
18. Ullrich R.L., Ponnaiya B. // Int. J. Radiat. Biol. 1998. V. 74. № 6. P. 747–754.
19. Пилинская М.А., Шеметун А.М., Дыбский С.С. // Радиобиология. 1992. Т. 32. Вып. 5. С. 632–639.
20. Thomas C.B., Nelson D.O., Plechanov P. // Mutat. Res. 1999. V. 439. P. 105–119.

Поступила в редакцию
09.02.2005

Frequency of Mutant Lymphocytes in T-cell Reseptor Locus as a Possible Predictor of Thyroid Cancer Development in Irradiated and Unirradiated Persons

A. O. Vereshchagina*, I. A. Zamulaeva, N. V. Orlova, S. G. Smirnova,
V. S. Medvedev, A. S. Saenko

Medical Radiological Research Center, Russian Akademy of Sciences, Obninsk, 249030 Russia;
e-mail: anna-wer@yandex.ru

Was compared frequency of lymphocytes mutant at loci of T-cell receptor (TCR) from samples of peripheral blood taken from 186 healthy donors and 46 untreated thyroid cancer patients, including the persons exposed to ionizing radiation as a result of inhabitation in radioactive polluted region of Russian Federation. Was shown that the cell mutation rate within thyroid cancer group was significantly higher than the same parameter for the healthy person with similar age distribution ($p < 0.01$). It could be a result of such factors as genotoxic influence, different sensitivity or possible genome instability (including radiation-induced). It was found that 37% of patients have the increased frequency of somatic mutation cells, i.e. it exceeded 95% confidence interval for the screening group. The presented results cause to anticipate that TCR-test could be used as one of criteria for formation groups of high cancer risk development.