
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ АГРЕГАЦИЕЙ КЛЕТОК КРОВИ И ХРОМОСОМНЫМИ АБЕРРАЦИЯМИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ГЛИОМАМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

В.А. Фролов, С.П. Сяткин, Т.В. Федорончук

Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Макляя, 8, Москва, Россия, 117198

Н.Я. Гридина

ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова АМНУ»
04050 г. Киев, ул. Майбороды, 32, Украина

И.В. Болтина

ГП «Институт экогигиены и токсикологии им. Л.И. Медведя МЗО Украины»
03680, ул. Героев Оборона, 6, Украина

Ю.В. Ушенин

ГУ «Институт физики полупроводников им. В.Э. Лашкарёва НАНУ»
03083, г. Киев, просп. Науки, 41, Украина

Исследовано соотношение уровня агрегации клеток крови, который измерялся с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (ППР), и наличия хромосомных aberrаций лимфоцитов периферической крови у больных с глиомами головного мозга разной степени злокачественности. Обнаружено, что значения ППР, измеряемые на клетках крови у больных с глиомами, достоверно ниже, чем у практически здоровых людей, и постепенно снижаются при повышении степени злокачественности глиом. Было показано, что снижение показателя ППР коррелирует со статистически достоверным повышением количества хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови у больных с глиомами головного мозга.

Ключевые слова: агрегация клеток крови, метод поверхностного плазмонного резонанса, хромосомные aberrации, глиомы головного мозга.

Сложность проблемы комплексного лечения больных с глиомами головного мозга обусловлена последующим прогрессированием процесса и нарастанием степени злокачественности этих опухолей. Исследования частоты регистрации хромосомных aberrаций и уровня экспрессии генов глиом показали, что с повышением степени злокачественности увеличивается количество нарушений в геноме опухолевых клеток [1]. Изменения количества хромосом и их структуры могут служить показателями этого процесса [2]. Существует тесная корреляция между изменениями характеристик мембран клеток крови и клеточных мембран внутренних органов [3]. При этом существенный интерес представляет собой поиск связи между зарядовыми характеристиками мембран клеток крови и уровнем хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови у больных с глиомами. Применение биосенсоров на основе использования эффекта поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [4, 5, 6] позволяет определять уровень агрегации клеток периферической крови, который зависит в первую очередь от электрического заряда мембран.

Целью работы стало исследование связи между уровнем агрегации клеток крови и количеством хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови при глиомах головного мозга различной степени злокачественности.

Материалы и методы. Обследованы 97 больных с глиомами головного мозга различной степени злокачественности, которые проходили курс комплексного лечения в Институте нейрохирургии, включающий в себя хирургическую операцию по поводу удаления глиомы. Кроме того, обследованы 25 больных с черепно-мозговой травмой (ЧМТ) средней степени тяжести. В качестве контроля аналогичный забор крови проводили у здоровых доноров (25 чел.). Значения ППР определяли до начала лечения (97 чел) и у больных с продолженным ростом глиом (20 чел.).

Больных с сопутствующими воспалительными заболеваниями и с патологиями, сопровождающимися изменениями процессов агрегации клеток крови (гипопротеинемия, аутоиммунные заболевания и заболевания, требующие применения салицилатов), в группы обследуемых не включали.

Уровень агрегации клеток периферической крови определяли с помощью прибора «ПЛАЗМОН» (Институт физики полупроводников НАНУ). Уровни анеуплоидии и хромосомных aberrаций смотрели в лимфоцитах периферической крови.

Гепаринизированную венозную кровь (гепарин, как известно, не влияет на степень агрегации клеток крови), взятую у больных до начала лечения, разделяли путем центрифугирования (3000 об./мин. в течение 15 мин.) на клеточные элементы крови и плазму. Клеточную фракцию использовали для определения показателя сдвига значений ППР, отображающего степень агрегации клеток крови. Для сравнительного анализа агрегации эритроцитов и ядросодержащих клеток крови, после центрифугирования, отбирали поверхностный слой ядросодержащих клеток и проводили раздельное определение значений сдвига ППР. Изучение начальных процессов агрегации клеток крови стало возможным с появлением нового направления биосенсорики с использованием эффекта ППР [4, 5, 6]. Мы провели адаптацию этого метода для исследования межклеточных взаимодействий, в частности для определения уровня агрегации клеток периферической крови. За единицу измерения принят сдвиг значений ППР в градусах, который зависит не только от количества клеток, нанесенных на стеклянную пластинку, покрытую тонким слоем золота, но и от общей площади мембран этих клеток, непосредственно взаимодействующих с плазмомом. Плазмон представляет собой облако свободных электронов, возникающих при действии лазерного луча через стеклянную призму на тонкий слой золота.

Значения ППР клеток крови у здоровых лиц и больных с нейрохирургической патологией определяли с помощью ППР-спектрометра «ПЛАЗМОН», имеющего источник оптического возбуждения (GaAs лазер, $\lambda = 650$ нм). Стеклянные пластинки ($n = 1,61$) с напыленным через промежуточный адгезионный слой хрома (1—1,5 нм) слоем золота (45—50 нм) закреплялись на ретроотражающей стеклянной призме ($n = 1,61$) спектрометра при помощи иммерсионной жидкости (полифениловый эфир, $n = 1,61$). В процессе работы с клетками крови пластинки с нанесенным слоем золота использовались повторно, после неоднократной промывки бидистиллированной водой. Взаимодействие золотого слоя с зарядом мемб-

ран клеток крови приводит к сдвигу кривой ППР. Это измерялось и обрабатывалось прибором с программным пакетом BSS55 с выводом результатов в графическом виде на монитор компьютера. При конструировании прибора использовались принципы нанотехнологий (эффект ППР), что позволяет благодаря его высокой чувствительности регистрировать межклеточное взаимодействие при наноразмерных расстояниях (порядка 200—300 нм).

Перед исследованиями приборную микрокювету промывали деионизированной водой. Подачу клеточной фракции объемом 400 мкл проводили с помощью электронасоса со скоростью 100 мкл/мин. По окончании исследования клетки крови смывали с подложки большим объемом бидистиллята, контролируя возвращение исходной кривой на экране дисплея в исходное положение.

Лимфоциты периферической крови обследованных больных культивировали методом Хангердорфа [7] в течение 52 ч. Получали препараты метафазных хромосом и анализировали равномерно окрашенные хромосомы с групповым кариотипированием. Учитывали все структурные aberrации хроматидного и хромосомного типов, числовые aberrации (анеу- и полиплоидные клетки). Изучали распределение анеуплоидных клеток на гипо- (количество хромосом в метафазе было меньше 44) и гиперплоидные (количество хромосом в метафазе было больше 48).

Статистический анализ данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты. Определение агрегации клеток крови с помощью биосенсора «ПЛАЗМОН». У больных с глиомами различной степени злокачественности величина сдвига ППР клеток крови до операции была статистически достоверно более низкой ($p \leq 0,05$) по сравнению с практически здоровыми лицами (рис. 1).

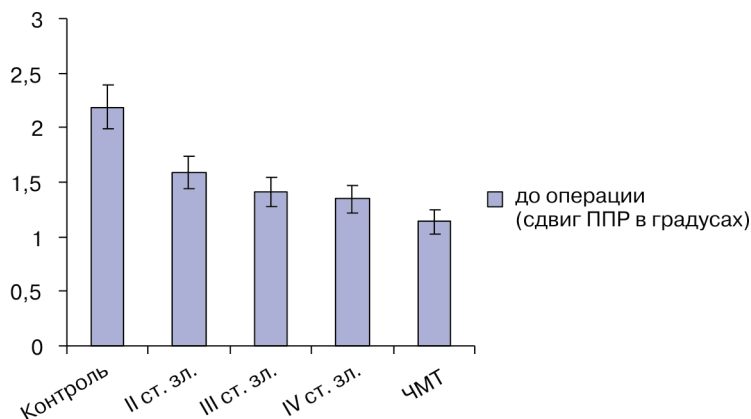


Рис. 1. Сдвиги значений ППР клеток крови у больных с глиомами головного мозга различной степени злокачественности и с ЧМТ

При этом у больных с глиомами II степени злокачественности (ст. зл.) она составляла $(1,6 \pm 0,2)^\circ$ и отражала тенденцию к постепенному снижению у больных с глиомами III ст. зл. и IV ст. зл., соответственно $(1,4 \pm 0,14)^\circ$ и $(1,3 \pm 0,13)^\circ$. Этот результат может свидетельствовать об изменениях физико-химических характеристик мембран клеток крови. В результате этого увеличивается степень их агрегации. Аналогичные данные получены в группе больных с ЧМТ. Это может свидетельст-

говать о воспалительной природе увеличения агрегации клеток крови при глиомах. Изменения значений ППР клеток крови происходят параллельно с повышением степени злокачественности глиом. Минимальные значения фиксируются у больных с глиомами высокой степени злокачественности. Тенденцию к снижению величин ППР, определенную при исследовании клеток крови в процессе прогрессии глиом, наблюдали у больных с продолженным ростом опухолей, которые были госпитализированы в клинику для проведения повторных операций. При этом степень злокачественности глиом у этих больных становилась более высокой. Это подтвердили морфологическими исследованиями на гистологических срезах.

Цитогенетические исследования лимфоцитов периферической крови.

Частота выявления анеуплоидных клеток у больных с глиомами III—IV ст. зл. была выше по сравнению с больными с глиомами II ст. зл. и практически здоровыми лицами — соответственно: $(22,0 \pm 0,9)\%$, $(14,41 \pm 0,9)\%$ и $(7,8 \pm 0,5)\%$ (рис. 2).

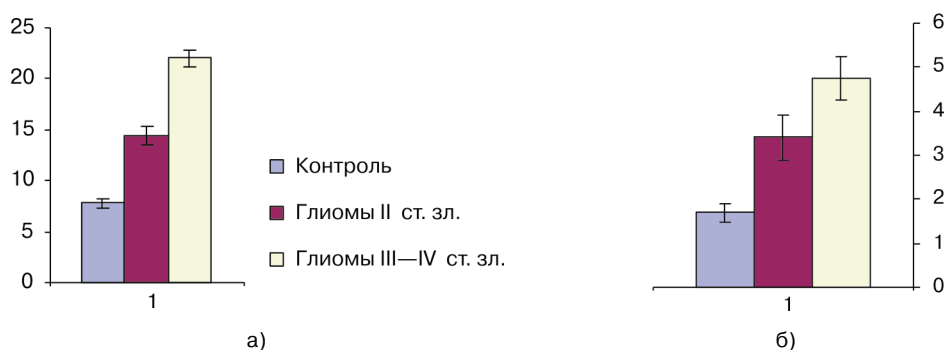


Рис. 2. Количество анеуплоидных клеток (а) и частота регистрации хромосомных aberrаций (б) в лимфоцитах периферической крови у больных с глиомами различной степени злокачественности

Диапазон индивидуальных колебаний частоты регистрации анеуплоидии также увеличивался в зависимости от степени злокачественности глиом. Минимальный разброс наблюдался у практически здоровых лиц (4—14%), средний — у больных с глиомами II ст. зл. (10—24%), наибольший — у больных с глиомами III—IV ст. зл. (14,0—39,5%) до лечения.

Частота регистрации хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови у больных с глиомами II ст. зл. составила $(3,4 \pm 0,5)\%$, с III—IV ст. зл. — $(4,75 \pm 0,5)\%$, а в контрольной группе — $(1,7 \pm 0,2)\%$ (рис. 3). Таким образом, наблюдается тенденция к увеличению частоты выявления хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови в связи со степенью злокачественности глиом. Кроме того, частота регистрации хромосомных aberrаций у больных с опухолями превышает 3%. Это согласуется с данными литературы [8, 9, 1].

Анализ частоты регистрации основных типов хромосомных aberrаций лимфоцитов у больных с глиомами показал, что их спектр смещен в сторону хроматидных aberrаций, составляя 90% при глиомах II ст. зл. и 82,9% — при глиомах III и IV ст. зл. У практически здоровых лиц величина этого показателя составила 63,8%.

В лаборатории В.В. Фролькиса [10] был открыт важный общезиологический механизм связи между активностью клеточного генома и состоянием клеточ-

ной мембраны. При опухолевом процессе под влиянием онкогенных факторов активация генетического аппарата в условиях одновременного нарушения мембраны сопровождается выключением мембранных механизмов регуляции генетической активности, отсутствием гиперполяризации, торможением биосинтеза белков, а также нарушением связи между электрическим зарядом клетки и ее делением.

Современными исследованиями показана тесная связь между мембранным потенциалом митохондрий и механизмом апоптоза клеток организма [11]. При этом уменьшение заряда в митохондриальной или клеточной мембране приводит к нарушению структуры и функции ядерной ДНК.

Таким образом, в наших исследованиях, проведенных на модели клеток периферической крови, была обнаружена связь между величиной сдвига ППР клеток крови и количеством хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови больных с глиомами различной степени злокачественности. Эти показатели коррелировали с повышением степени злокачественности глиом — величина сдвига ППР уменьшалась, а уровень хромосомных aberrаций лимфоцитов увеличивался. В исследованиях, проведенных с учетом возрастных аспектов, отмечены статистически достоверные различия значений показателей в группе здоровых лиц. У больных с глиомами и ЧМТ возрастные отличия практически нивелировались на фоне патологических изменений. Полученные в работе данные можно использовать при планировании дальнейших исследований причин возникновения и повышения уровня нестабильности генома при опухолевом процессе, а также при поиске и применении препаратов, которые способны восстанавливать биоэлектрический потенциал клеточных мембран и репарировать ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] James C.D., Collins V.P. Glial Tumors // Genetics of nervous system tumors / Ed. A.J. Levine, H.H. Schmidek. — Wiley-Liss., inc. — New-York — Chichester — Brisbane — Toronto — Singapore. — 1993. — P. 241—248.
- [2] Duesberg P., Rausch Ch., Rasnick D. et. al. Genetic instability of cancer cells in proportional to their degree of aneuploidy // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — **95**. — P. 13692—13697.
- [3] Гушина Л.М., Кабан А.П., Коробко В.Б. Влияние in vitro натрия сукцината на мембраны эритроцитов при химиотерапии больных с раком желудка // Онкология. — 2003. — **5**, № 3. — С. 200—203.
- [4] Bondeson K., Frostell-Karlsson A., Fagerstam L., and Magnusson G. Lactose Repressor-Operator DNA Interactions: Kinetic Analysis by a Surface Plasmon Resonance Biosensor // Analyt. Biochem. — 1993. — **214**. — P. 245—51.
- [5] Chegel V., Shirshov Yu., Avilov S., Demchenko M., Mustafaev M. A novel aldehyde dextran sulfonate matrix for affinity biosensors // J. Biochem. Biophys. Methods. — 2002. — **50**. — P. 201—216.
- [6] Gaus K., Hall E.A.H. Surface plasmon resonance sensor for heparin measurements in blood plasma // Biosensors and Bioelectronics. — 1998. — **13**. — P. 1307—1315.
- [7] Hungerford D.A. Leucocytes cultured from small inoculate of whole blood and preparation metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl // Stain Techn. — 1965. — **40**. — P. 333—338.
- [8] Кузнецов А.И., Кружалов А.И., Илюшенко В.Г. и др. Возрастно-половая зависимость спонтанной частоты хромосомных aberrаций и aberrантных клеток в лимфоцитах периферической крови // Генетика. — 1980. — **16**. — № 7. — С. 1284—1293.

- [9] *Bottomley R.H., Trainer A.L., Condit P.T.* Chromosome studies in a 'cancer family' // *Cancer*. — 1971. — **28**. — № 2. — P. 519—528.
- [10] *Фролькис В.В.* Старение и увеличение продолжительности жизни. — Л.: Наука, 1988.
- [11] *Dukhanin A.S., Patrashev D.V.* Estimation of transmembrane potential of thymic lymphocytes during dexamethasone-induced apoptosis // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. — 1999. — 127. — № 1. — P. 106—109.

CORRELATION BETWEEN CELLS BLOOD AGGREGATION AND PERIPHERAL BLOOD CELLS LYMPHOCYTE ABERRATION IN BRAIN GLIOMA PATIENTS

V.A. Frolov, S.P. Syatkin, T.V. Fedoronchuk

Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

N.Ya. Gridina

State Institution "Institute of Neurosurgery NAMS of Ukraine"
Mayboroda str., 32, Kiev, 04050, Ukraine

I.V. Boltina

L.I. Medvedya Institute of ecohygiene and toxicology HM of Ukraine
Geroev Obopony str., 6, Kiev, 03680, Ukraine

Yu.V. Ushenin

V.E. Lashkarev Institute of semiconductor physics NAS Ukraine
Nauka av., 41, Kiev, 03083, Ukraine

The correlation between the peripheral blood cells aggregation level measured by surface plasmon resonance method (SPR), and chromosomal aberrations of peripheral blood lymphocytes in brain malignant gliomas patients was investigated. It was found, that results of SPR in patients with brain gliomas were significantly lower than in healthy persons and gradually decreased with increasing of the gliomas malignancy grade. It was shown that decreasing of SPR data correlate with the statistically significant increase of chromosomal aberration in peripheral blood lymphocytes in glioma patients.

Key words: blood cells aggregation, surface plasmon resonance method, chromosomal aberrations, brain malignant gliomas.