

УДК: 575:224. 23: 616-006

## РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ МУТАГЕННЫХ И КАНЦЕРОГЕННЫХ ЭФФЕКТОВ У НАСЕЛЕНИЯ КРУПНОГО ПРОМЫШЛЕННОГО РЕГИОНА

© 2010 В.И. Минина

Институт экологии человека СО РАН, г. Кемерово

Поступила в редакцию 29.09.2010

Разработка региональных программ профилактики онкологических заболеваний должна базироваться на достоверной информации об особенностях онкологической заболеваемости на отдельных территориях, сведениях о её динамике и трендах, данных о генотоксических эффектах у населения для прогнозирования развития канцерогенной ситуации на отдельных территориях. Для получения подобной информации и корректного сравнения территорий между собой необходим единый стандартизованный подход для проведения подобных оценок. Предлагаются методические рекомендации для проведения комплексного анализа процессов канцерогенеза и мутагенеза у населения крупного промышленного региона.

Ключевые слова: *онкологическая заболеваемость, хромосомные aberrации, профилактика рака*

Эпидемиологические исследования свидетельствуют о повсеместном росте заболеваемости и смертности от злокачественных опухолей. По данным международного агентства по изучению рака к 2020 г. прогнозируется увеличение числа вновь выявленных случаев онкозаболеваний до 16 миллионов человек [5]. На основании большого числа данных было сформулировано представление, согласно которому канцерогенез в значительной мере связан с загрязнением окружающей среды [3]. Поэтому в промышленно развитых районах с высокой антропогенной нагрузкой особую актуальность приобретает разработка региональных противораковых программ. В основе разработки региональных программ профилактики онкологических заболеваний должна лежать достоверная информация об особенностях онкологической заболеваемости на отдельных территориях, сведения о динамике и трендах, данные о генотоксических эффектах у населения для прогнозирования развития ситуации на отдельных территориях. Для получения подобной информации и корректного сравнения территорий между собой необходим единый стандартизованный подход для оценок канцерогенных и мутагенных эффектов у населения.

Важной количественной характеристикой генотоксического воздействия окружающей

среды на организм человека является уровень хромосомных aberrаций (ХА) в лимфоцитах крови человека. Предлагается использовать тест на ХА при формировании групп риска онкологических заболеваний [1, 6-8, 10]. Однако остается много неясного относительно механизмов реализации отдаленных эффектов ХА, о степени риска того или иного типа повреждений ДНК для развития заболеваний, о согласованности процессов мутагенеза и канцерогенеза в популяциях человека. Для выяснения данных вопросов необходим комплексный подход, подразумевающий оценку онкологической заболеваемости (и/или смертности) и учет повреждений ДНК в одной и той же опытной группе, т.е. проведение генетико-эпидемиологических исследований.

**Цель работы:** разработка системы комплексной оценки процессов мутагенеза и канцерогенеза у населения крупного промышленного региона, которые могут быть использованы в научных, лечебных и санитарных учреждениях.

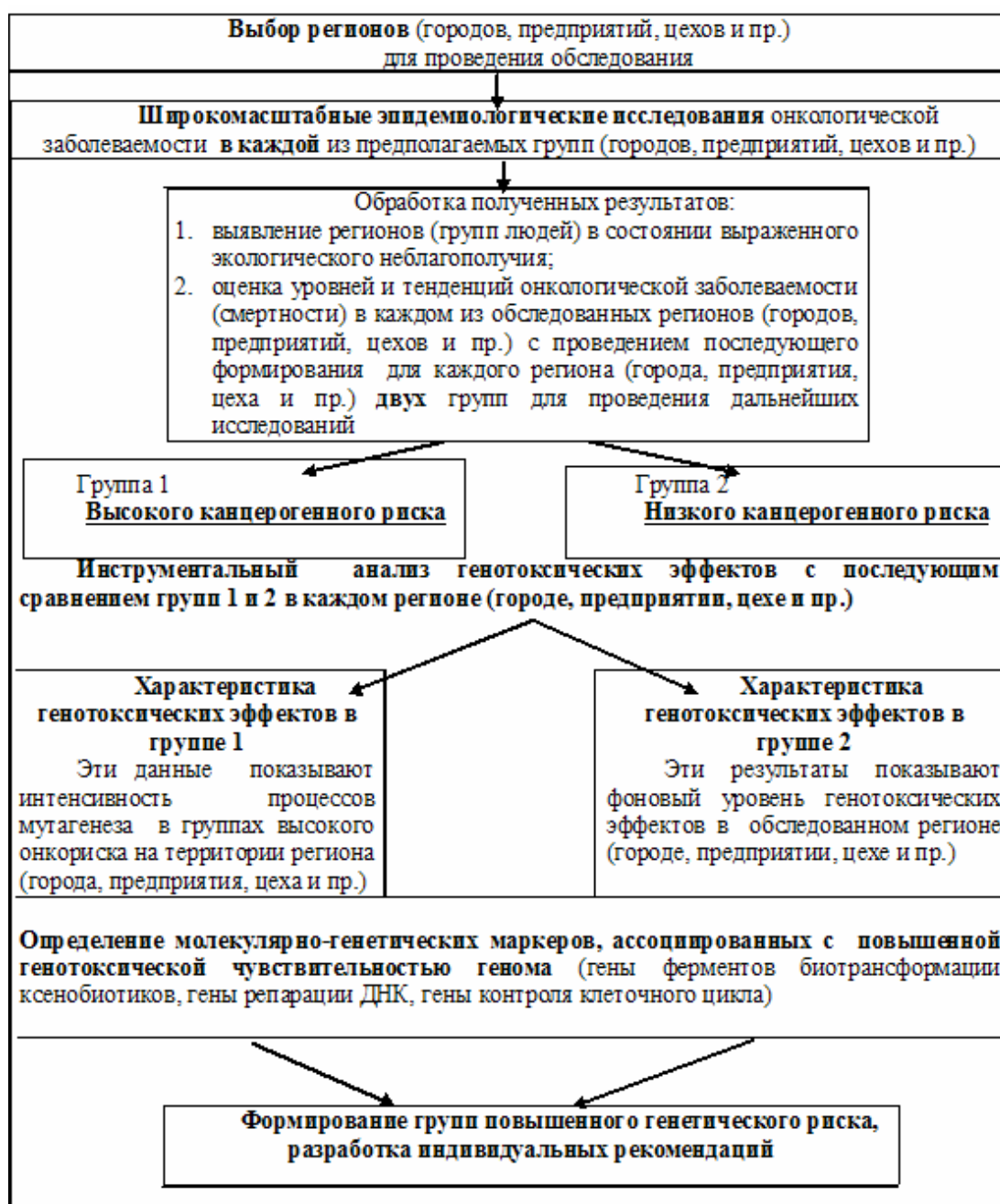
**Материалы и методы.** При разработке системы за основу были взяты стандартные методики культивирования клеток крови [9], учета ХА в лимфоцитах крови человека [2], расчета стандартизованных показателей онкозаболеваемости [4], выделения ДНК [11] и ПЦР-анализа полиморфных маркеров в генах, оказывающих влияние на индивидуальную токсико-генетическую чувствительность (генах репарации ДНК, генах ферментов биотрансформации ксенобиотиков, генах контроля клеточного цикла).

Минина Варвара Ивановна, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии. E-mail: vminina@mail.ru

План обследования:

1. Формулирование цели обследования и его задач.
2. Выбор регионов (городов, предприятий, цехов и пр.) для проведения обследования.
3. Определение контингента, подлежащего обследованию (вид воздействия).
4. Составление рандомизированных выборок численностью большей, чем количество людей, предполагаемых для обследования.
5. Анализ онкологической заболеваемости в выбранных группах (населения городов, предприятий, цехов, когорт, групп и пр.).
6. Обработка полученных результатов – выявление групп высокого онкориска и групп сравнения (население городов, работников предприятий, цехов, когорт, групп и пр.).
7. Определение уровня ХА в клетках крови.
8. Анализ молекулярных маркеров повышенной токсико-генетической чувствительности. Формирование групп высокого риска формирования хромосомных нарушений.
9. Анализ всех данных. Выявление корреляционных связей.
10. Обобщение полученных результатов.
11. Разработка групповых и индивидуальных рекомендаций по профилактике злокачественных новообразований.

**Таблица.** Система комплексных генетико-эпидемиологических исследований



**Результаты.** Была разработана система оценки интенсивности процессов мутагенеза и канцерогенеза в популяциях человека (таблица), направленная на выявление и оценку генотоксических эффектов в популяциях, формирование групп повышенного генетического риска и прогноз индивидуальной чувствительности генома человека к действию комплекса генотоксических факторов среды.

Данная система базируется на: адекватном выборе регионов (городов, предприятий, цехов и пр.) для проведения обследования (включая экологическую характеристику мест проживания); оценке канцерогенных эффектов воздействия комплекса факторов окружающей среды по данным эпидемиологических исследований онкологической заболеваемости и смертности; корректном формировании групп для проведения обследования, включая оценку адаптивного потенциала организма по данным психологического тестирования); определении показателей хромосомного мутагенеза; оценке индивидуальной чувствительности генома; определении генетических маркеров, ассоциированных с повышенной генотоксической чувствительностью генома.

Обследование должно проводиться в соответствии с нормами профессиональной этики – соблюдением принципов конфиденциальности получаемой информации, обеспечения права человека отказаться от участия в обследовании и информирования испытуемого о результатах и использовании получаемой информации. Работа должна проводиться в отдельном помещении. Во время проведения обследования не допускается присутствие посторонних. Взятие крови осуществляется только одноразовым оборудованием и проводится профессионалами, имеющими разрешение на проведение всех манипуляций. Перед проведением анализа все анкеты и препараты шифруют и расшифровывают только после получения всего массива данных. Учитывая существование межлабораторной вариабельности в результатах применения стандартных методик, ниже приводится детальное описание процедур исследования канцерогенной ситуации, генотоксических эффектов и анализа молекулярных маркеров.

#### Оценка онкологической заболеваемости.

Расчет стандартизованных показателей заболеваемости проводится прямым методом по общепринятой методике [4]. Для анализа заболеваемости злокачественными новообразованиями используют данные официальных отчетных форм № 7 и № 35 из официальных ежегодных отчетов онкологических

диспансеров МЗ РФ. Данные о численности населения по административным территориям (группам населения) могут быть представлены Территориальным органом федеральной службы государственной статистики. За стандарт принимается возрастная структура населения за определенный период времени, а для сравнения с РФ и другими регионами могут быть взяты стандартизованные показатели из статистических сборников «Злокачественные новообразования в России», подготовленные Московским НИОИ им. П.А. Герцена и Российским Центром информационных технологий и эпидемиологических исследований в области онкологии. Расчет направленности и темпа тенденции может быть проведен с применением одного из видов регрессионного анализа – выравнивание по прямой, с помощью уравнения регрессии типа  $y=A+B*x$ .

Достоверность различия может быть определена с помощью расчета коэффициента Стьюдента по формуле:

$$t = \frac{P_1 - P_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}},$$

где:  $P_1$  и  $P_2$  - сравниваемые показатели;  $m_1$  и  $m_2$  – ошибки сравниваемых показателей. При числе наблюдений 30 и более оценка полученного коэффициента - в сравнении с величиной 1,96; при числе наблюдений менее 30 сравнение полученного коэффициента проводится с табличным значением.

#### Оценка генотоксических эффектов.

Материалом для исследования ХА служит цельная периферическая кровь, забранная из локтевой вены в асептических условиях в стерильные вакутейнеры с гепарином или одноразовые шприцы. Культивирование клеток крови и подготовка препаратов хромосом проводится по единому стандартному протоколу: 1) питательную смесь готовят из расчета: среда RPMI-1640 (4 мл), сыворотка крупного рогатого скота (1 мл) и 0,1 мл фитогемагглютина (ПанЭко); 2) смесь помещают в стерильные культуральные флаконы и добавляют 0,5 мл гепаринизированной крови; 3) культуральные флаконы выдерживают при 37<sup>0</sup>С в течение 48 ч, и за 2 часа до фиксации в культуры вводят колхицин (0,5 мкг/мл); 4) после гипотонической обработки и фиксации клеток суспензию раскапывают на охлажденные чистые предметные стекла и высушивают над пламенем спиртовки; 5) препараты окрашивают 1% красителем Гимза (Merk) и анализируют под световым микроскопом.

Учет ХА проводят без кариотипирования. Регистрируют aberrации хроматидного (одиночные фрагменты, хроматидные обмены) и хромосомного типов: парные фрагменты (включают изохроматидные фрагменты и не включают парные фрагменты, сопровождающие дицентрики и кольцевые хромосомы), дицентрики с парными фрагментами и дицентрики без фрагментов, кольцевые хромосомы (включают центрические кольцевые хромосомы с парными фрагментами и без них, а также ацентрические кольца и интерстициальные делеции), симметричные обмены. Пробелы в анализ не включают. Для каждого индивида анализируют от 100 до 500 метафаз. Уровень ХА определяют путем подсчета частоты метафаз с aberrациями хромосом (в процентах от изученного числа клеток).

Определение молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с повышенной генотоксической чувствительностью генома. Для этого периферическую кровь забирают в вакутейнеры с ЭДТА. ДНК выделяют из лейкоцитов периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции [11]. Полиморфизмы *C163A* гена *CYP1A2* и *3801T>C* гена *CYP1A1* исследуются методом ПЦР-ПДРФ с использованием рестриктазы *Bst2U*. Протяженные делеции в генах *GSTM1* и *GSTT1* анализируют путем амплификации специфических участков исследуемых генов с флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени (Real-time PCR). Генотипирование полиморфных маркеров: *CYP1A1 A2455G*, *GSTP1 C341T*, *APE1 Asp148Glu*, *XRCC1 Arg194Trp*, *XRCC1 Arg280His*, *XRCC1 Arg399Gln*, *hOGG1 Ser326Cys*, *ADPRT Val762Ala*; *ATM Asp1853Asn*; *CHEK2 1100 delC*; *CHEK2 Ile157Thr*;) проводят с использованием метода аллель-специфической ПЦР (метод «SNP-экспресс», разработчик ООО«Литех»). ПЦР проводится на амплификаторах («ТЕРЦИК» ДНК-Технология, Россия). Амплифицированные фрагменты ДНК разделяют электрофоретически в горизонтальном 3% агарозном и в вертикальном 6% полиакриламидном геле. После окончания электрофореза гель окрашивают раствором бромистого этидия и визуализируют в проходящем ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе.

**Обсуждение.** Предлагаемая схема проведения генетико-эпидемиологического мониторинга и разовых обследований различных популяций людей позволяет:

1. Определить границы варибельности генетических показателей, характеризующих

обследуемую группу населения в условиях вредных производств или экологически неблагоприятных условиях проживания;

2. Получить корректные сведения об уровне генетических эффектов и проводить адекватное сравнение показателей здоровья жителей территорий с разными уровнями генотоксического воздействия.

3. Корректно формировать группы повышенного генетического риска – выявлять людей, для которых наиболее опасны генотоксические нагрузки и кто в первую очередь нуждается в диспансерном наблюдении в медико-генетических консультациях, онкологических диспансерах и в проведении профилактических мероприятий.

4. Минимизировать объем исследований, материальных и финансовых затрат, необходимых для заключения об уровне генетических эффектов в изучаемых популяциях.

**Вывод:** рекомендуемый подход может быть включен в систему сравнительной оценки канцерогенной ситуации в разных регионах в рамках проведения социально-гигиенического мониторинга. Кроме того, указанная система позволит выделить персонифицированные группы высокого риска развития онкологических заболеваний и разрабатывать индивидуальные программы профилактики рака.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Болтина, И.В. Использование показателя «частота aberrаций хромосом» при формировании групп риска относительно онкологических заболеваний // Цитология и генетика. 2007. Т.41, №1. С. 66-74.
2. Бочков, Н.П. Хромосомы человека и облучение. – М.: Атомиздат, 1971. 168 с.
3. Гичев, Ю.П. Загрязнение окружающей среды и экологическая обусловленность патологии человека. – Новосибирск, 2003. С. 53-57.
4. Мерков, А.М. Санитарная статистика / А.М. Мерков, Л.Е. Поляков. – Ленинград: Медицина, 1974. 384 с.
5. Чиссов, В.И. Избранные лекции по клинической онкологии / В.И. Чиссов, С.Л. Дарьялова. – М., 2000. 736 с.
6. Boffetta, P. Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe / P. Boffetta, O. van der Hel, H. Norppa et al. // Am J Epidemiol. 2007. V. 165. P. 36-43.
7. Bonassi, S. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22,358 subjects in 11 countries / S. Bonassi, H. Norppa, M. Ceppi et al. // Carcinogenesis. 2008. V. 29. P. 1178-1183.
8. Hagmar, L. Epidemiological evaluation of cytogenetic biomarkers as potential surrogate endpoints for cancer / L. Hagmar, U. Strömberg, H. Tinnerberg et al. // IARC Sci Publ. 2004. V. 157. P. 207-222.

9. *Hungerford, P.A.* Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl // *Stain Techn.* 1965. V. 40. P. 333-338.
10. *Norppa, H.* Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk / *H. Norppa, S. Bonassi, I-L. Hansteen et al.* // *Mutat Res.* 2006. V. 600. P. 37-45.
11. *Sambrook, J.* Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. / *J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis* // Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989. P. 6.4-6.13.

## **DEVELOPMENT THE SYSTEM OF COMPLEX ESTIMATION OF MUTAGEN AND CANCEROGENIC EFFECTS AT THE POPULATION OF LARGE INDUSTRIAL REGION**

© 2010 V.I. Minina

Institute of Human Ecology SB RAS, Kemerovo

Development of regional programs for prophylaxis of oncologic diseases should be based on trustworthy information about features of oncologic case rate in separate territories, data on its dynamics and trends, data about genotoxic effects at the population for forecasting the development of cancerogenic situation in separate territories. For reception the similar information and correct comparison of territories among themselves the uniform standardized approach is necessary for carrying out the similar estimations. Methodical references for carrying out the complex analysis of carcinogenesis processes and a mutagenesis at the population of large industrial region are offered.

*Key words: oncologic case rate, chromosomal aberrations, cancer prophylaxis*