

© А. С. Монахов, 2012  
УДК 616 006.04:[612.014.24:616]

**А. С. Монахов**  
докт. биол. наук

Санкт Петербург

## Роль эндоредупликации хромосом в развитии злокачественных опухолей человека

---

Данные литературы свидетельствуют, что клетки с эндоредупликацией хромосом (ЭРХ) являются предшественниками злокачественных клеток. В данном исследовании ЭРХ, наряду с другими цитогенетическими нарушениями, была выявлена в метафазных пластинках лимфоцитов периферической крови у пациентов с разными злокачественными заболеваниями солидной природы: с меланомой кожи, со злокачественными заболеваниями желудочно кишечного тракта, молочной железы, легкого, щитовидной железы, яичника и почки. Кроме того, ЭРХ была выявлена у пациентов с базалиомой и папилломой, у некоторых пациентов из группы риска и у некоторых практически здоровых пациентов. При обследовании больных с меланомой кожи до лечения и неоднократно во время лечения было показано, что количество таких клеток увеличивается перед развитием рецидива за болевания. Уменьшению количества клеток с ЭРХ эффективно способствовала иммунотерапия пациентов. Если её не применяли, то клетки с ЭРХ превращались в полиплоидные и/или гиперанеуплоидные. Предполагается, что появление клеток с ЭРХ при доброкачественных опухолевых заболеваниях инициирует переход доброкачественного процесса в злокачественный, а появление таких клеток у пациентов из группы риска или у пациентов контрольной группы свидетельствует о высоком риске развития первичного злокачественного заболевания.

**Ключевые слова:** метафазные пластинки лимфоцитов периферической крови, эндоредупликация хромосом, злокачественные и доброкачественные заболевания, гиперанеуплоидные и полиплоидные клетки, иммунотерапия, развитие рецидива

---

В 1991 г. B. Dutrillaux и соавт. [1] показали, что клетки с эндоредупликацией (ЭР) хромосом (ЭРХ) являются предшественниками гиперанеуплоидных — злокачественных клеток. В последующих исследованиях, кроме этого, было показано, что их количество коррелирует с плохим клиническим прогнозом [2–8]. Например, X. Wang и соавт. выяснили, что ЭРХ в большом количестве клеток сопровождается делецией гена *RAD17*, которая приводит к развитию злокачественного процесса любого характера [2]. M. Grigorova и соавт. обнаружили, что при ЭРХ нередко возникают мутации генов *BRCA1* и *BRCA2*, которые приводят, соответственно, к развитию рака молочной железы и рака поджелудочной железы [4]. При обнаружении ЭРХ в 4–6 % клеток, наряду с другими цитогенетическими нарушениями, S. Gagos и соавт. определили усиление агрессивности меланомы кожи [5]. J. Zhiying и соавт. показали, что ЭРХ, индуцированная метаболитами бензола — гидрохиноном и этопозидом, инициирует нестабильность генома и развитие канцерогенеза [6]. В нескольких исследованиях было пока-

зано, что ЭРХ выявляется не только в клетках краткосрочных клеточных культур из опухолевого материала человека и животных, но и в лимфоцитах их периферической крови [7, 9, 10]. Практически во всех исследованиях была показана роль ЭРХ как индуктора нестабильности генома и последующего развития злокачественного заболевания [2–10]. При этом отмечается [11], что на многоступенчатом пути образования опухоли ЭР ДНК является первым звеном, а затем развивается полиплоидия, деполиплоидизация и, наконец, генерация клоногенных клеток со стабильной гиперпloidией, и такие клетки являются причиной рецидива даже после первичной — обычно очень эффективной — химиотерапии. Таким образом, к настоящему времени выяснено, что ЭРХ является неспецифическим, но наиболее ранним и информативным прогностическим цитогенетическим критерием для своевременного определения риска развития злокачественного заболевания или его рецидива. Однако очень мало сведений о динамике развития ЭРХ у пациентов в зависимости от характера злокачественного заболевания, что имеет основное значение для успешного лечения и профилактики рецидива заболевания. Также мало известно о возможностях предот-

---

Александр Степанович Монахов  
e mail: monakhovas@mail.ru

вращения размножения клеток с ЭРХ и их ликвидации. Этим вопросам и посвящено данное исследование.

### Материалы и методы

Выявление и анализ клеток с ЭРХ проводили наряду с выявлением и анализом всех цитогенетических нарушений у 99 пациентов с меланомой кожи, у 8 — со злокачественными заболеваниями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), у 10 — с раком молочной железы (РМЖ), у 5 — с опухолями щитовидной железы (ОЩЖ), у 3 — с раком лёгкого (РЛ), у 1 — с опухолью почки (ОП), у 1 — с раком яичника (РЯ), а также у 5 пациентов с базалиомой, у 1 — с папилломой, у 20 — из группы риска и у 8 практически здоровых пациентов контрольной группы. Цитогенетическое обследование пациентов проводили на метафазных пластинках лимфоцитов периферической крови. Приготовление препаратов метафазных хромосом и их окраску проводили по ранее описанному методу [12]. Анализ препаратов проводили на микроскопе Zeiss. Для выявления клеток с ЭРХ исследовали либо 50–100 метафаз в препаратах, окрашенных дифференциально на G-бэнды хромосом, либо 50–100 метафаз в препаратах, окрашенных рутинно. Данные, полученные при цитогенетическом обследовании пациентов, сопоставляли с клиническими данными, описанными в историях болезни этих же пациентов.

### Результаты и обсуждение

Показано, что ЭР в лимфоцитах периферической крови развивается у пациентов с различными злокачественными заболеваниями: с меланомой кожи, со злокачественными болезнями ЖКТ, с РМЖ, РЛ, РЯ, ОЩЖ, ОП, а также с доброкачественными опухолевыми заболеваниями, например с базалиомой и папилломой, у некоторых пациентов из группы риска — с признаками возможного опухолевого заболевания и у некоторых практически здоровых пациентов контрольной группы.

Так, при цитогенетическом обследовании 99 пациентов с меланомой кожи лимфоциты с ЭР были выявлены у 42 пациентов, причем количество таких клеток у разных больных было от 1 до 44 %. Обследование большинства этих больных проводили в динамике заболевания и его лечения. Показано, что у каждого пациента количество клеток с ЭР изменялось в зависимости от характера заболевания на момент обследования и эффективности применяемого лечения. Размножение клеток с ЭР всегда со-

провождалось развитием рецидива заболевания, а на уменьшение количества таких клеток эффективно влияла иммунотерапия больного иммуномодулятором Полиоксидонием (ПО).

Например, у одного больного через 1 год и 10 мес после операции, трех курсов ПО, но после 9-месячного перерыва в применении ПО, было выявлено 9 % клеток с ЭР, 1 % полиплоидных и 1 % гиперанеуплоидных клеток. После двух дополнительных курсов ПО количество клеток с ЭР снизилось до 2 %, а клеток с другими цитогенетическими нарушениями обнаружено не было. У другого больного через 5 мес после операции и курса ПО было выявлено 11 % клеток с ЭРХ, а после второго курса ПО такие клетки элиминировались полностью. Через 1 год 2 мес после операции и после третьего курса ПО количество клеток с ЭРХ у этого пациента было 2 %. Однако через 2 года 5 мес после операции количество таких клеток у этого пациента вновь увеличилось до 14 %. После повторного курса ПО количество этих клеток снизилось до 4 %, но через 3 года 3 мес после операции количество клеток с ЭР у этого пациента вновь стало увеличиваться и достигло 5 %. У одной больной через 11 мес после операции и одного курса ПО было выявлено 26 % клеток с ЭР, но после двух последующих курсов ПО количество таких клеток снизилось до 1 %. Однако через 3 года 2 мес после операции количество клеток с ЭР у этой пациентки вновь увеличилось до 4 %. Ещё у одной больной через 3 года 4 мес после двух операций и двух курсов ПО было выявлено 36 % клеток с ЭР. После третьего курса ПО у этой пациентки было 2 % гиперанеуплоидных клеток и 1 % клеток с ЭР, а после четвертого курса ПО такие клетки полностью элиминировались. У другой больной через 1 мес после четвертой операции было выявлено 44 % клеток с ЭР. После первого курса ПО у неё было 6 % клеток с ЭР, 3 % полиплоидных и 1 % гиперанеуплоидных клеток, а после второго курса ПО — только 1 % клеток с ЭР. Дальнейшая динамика появления таких клеток была неоднозначной и зависела от регулярности курсов ПО и от распространённости злокачественного процесса. Ещё у одной больной через 1 год 11 мес после первой операции и через 4,5 мес после второй операции и одного курса ПО было обнаружено 11 % клеток с ЭР и 1 % полиплоидных клеток, что свидетельствовало о развитии рецидива заболевания. После второго курса ПО у этой больной был выявлен только 1 % клеток с ЭР, но через 5 мес вновь были обнару-

жены критерии начинающегося рецидива: 3 % клеток с ЭР, 1 % полиплоидных и 1 % клеток с двойными маленькими хромосомами (ДМХ), которые являются критерием метастазирования [13–15]. После третьего курса ПО ремиссии не наступило, вновь были обнаружены цитогенетические критерии развития рецидива и метастазов: 4 % клеток с ЭР, 1 % гиперанеуплоидных и 4 % клеток с ДМХ. После четвертого курса ПО снова были обнаружены признаки рецидива: 12 % клеток с ЭР, 1 % гиперанеуплоидных и 1 % полиплоидных клеток. Но после пятого курса ПО была достигнута ремиссия — был выявлен только 1 % клеток с ЭР.

При злокачественных заболеваниях ЖКТ, при РМЖ, РЛ, РЯ, ОЩЖ, ОП исследование было проведено, в основном, однократно — либо до начала лечения, либо после хирургического лечения. Так, из четырех пациентов с adenокарциномой толстой кишки клетки с ЭРХ были выявлены у двух. У одной пациентки до операции 1 % клеток с ЭРХ и 1 % полиплоидных клеток, что свидетельствовало о доброкачественном процессе, это было подтверждено после операции гистологически. У второй пациентки через 3 мес после операции было обнаружено 4 % клеток с ЭРХ и 3 % гиперанеуплоидных клеток, что свидетельствовало о вероятном развитии рецидива злокачественного заболевания. У одного пациента с adenокарциномой нисходящей ободочной кишки через 11 мес после операции было выявлено 2 % клеток с ЭРХ, и ему был назначен профилактический курс ПО. У двух пациентов с adenокарциномой желудка после операции было выявлено, соответственно, 11 и 26 % клеток с ЭРХ, причем у одного больного 11 % таких клеток было выявлено через 2 мес после 12 курсов химиотерапии и радикальной операции, но от иммунотерапии и контрольного цитогенетического обследования он отказался и через 8 мес умер от острого рецидива заболевания. Второй больной, у которого было обнаружено 26 % лимфоцитов с ЭРХ через 7 мес после операции, также отказался от иммунотерапии и умер через 3 мес после обследования от множественных метастазов.

У одного пациента с раком сигмовидной кишки через 11 мес после операции и через 6 мес после химиотерапии клеток с ЭРХ не было обнаружено, но было выявлено 4 % гиперанеуплоидных клеток, 3 % полиплоидных и 1 % клеток с ДМХ. Эти цитогенетические нарушения свидетельствовали о развитии рецидива заболевания, когда, вероятно, все клетки с ЭРХ превратились

уже в более злокачественные. Клинически у этого больного был определен выраженный злокачественный процесс с метастазами.

Из трех пациентов с РЛ у двух цитогенетическое обследование было проведено в динамике после хирургического, химио- и иммунотерапевтического лечения. При этом у одной пациентки при третьем обследовании через 5 лет 7 мес после операции и полихимиотерапии и через 1 год 4 мес после второго курса ПО было выявлено: 3 % клеток с ЭРХ, 1 % гиперанеуплоидных и 3 % клеток с ДМХ. Эти цитогенетические нарушения свидетельствовали о развитии рецидива заболевания с метастазами. Больная была направлена на клиническое обследование. У второй пациентки через 1 год 2 мес после операции и третьего курса ПО было выявлено 2 % полиплоидных и по 1 % клеток с ЭР и гиперанеуплоидных, что свидетельствовало о начале развития рецидива заболевания. Но после четвертого курса ПО у неё был обнаружен только 1 % гиперанеуплоидных клеток, то есть была тенденция ремиссии заболевания. У третьего пациента при однократном обследовании, но через год после операции и курса ПО было выявлено 2 % полиплоидных и 2 % гиперанеуплоидных клеток, что также, как и у второй пациентки, свидетельствовало о начале рецидива заболевания.

У восьми из 10 пациенток с РМЖ в разные сроки после операции при однократном обследовании, наряду с разными цитогенетическими нарушениями, было выявлено от 1 до 10 % клеток с ЭРХ, а у одной больной — 58 % таких клеток. Никто из этих пациенток иммунотерапевтического лечения не проходил. Пациентка, у которой через 1 мес после операции было выявлено 58 % клеток с ЭРХ, через 2 мес после цитогенетического анализа умерла от множественных метастазов в разные органы.

У пациентки с РЯ до первой операции было выявлено 3 % клеток с ЭРХ и 2 % гиперанеуплоидных клеток — маркеров РЯ, что свидетельствовало о вероятном развитии РЯ и было подтверждено гистологически после операции. Через 10 мес после операции и одного курса ПО у неё было выявлено только 2 % клеток с ЭРХ. Но ещё через 8 мес, когда она не проводила иммунотерапевтического лечения, у неё было выявлено 18 % клеток с ЭРХ, 5 % гиперанеуплоидных клеток и 1 % полиплоидных клеток, что свидетельствовало о развитии рецидива заболевания. Клинически у этой пациентки также был определен рецидив РЯ. Больная была направлена на повторную операцию.

При ОЩЖ у двух из пяти пациенток было выявлено, соответственно, 1 и 10 % клеток с ЭРХ. Пациентка, у которой было выявлено 10 % таких клеток, провела два курса ПО, и после этого аномальных клеток у неё не было обнаружено.

Через 3,5 года после хирургического лечения злокачественной опухоли в правой почке у одного пациента было выявлено 8 % клеток с ЭРХ, что свидетельствовало о вероятном рецидиве заболевания. После одного курса ПО было выявлено 4 % клеток с ЭРХ, после второго курса ПО был 1 % клеток с ЭРХ, после третьего курса ПО таких клеток не было обнаружено.

При базалиоме у трех пациентов из шести при однократном цитогенетическом обследовании было выявлено, соответственно, 3; 1 и 3 % клеток с ЭРХ. У одного пациента с папилломой до её удаления лазером было выявлено 26 % таких клеток, он провел один курс ПО, но контрольный цитогенетический анализ не сделал.

У 11 из 20 пациентов из группы риска развития злокачественного заболевания при однократном цитогенетическом обследовании было выявлено от 1 до 6 % клеток с ЭРХ.

Из восьми практически здоровых пациентов контрольной группы у четырех было выявлено по 1 % клеток с ЭРХ и ещё у одного — 10 % таких клеток. Пациент, у которого было обнаружено 10 % клеток с ЭРХ, провел один курс ПО, но контрольный цитогенетический анализ не сделал.

Прежде всего, необходимо отметить, что ЭРХ мы выявляли в метафазных пластинках лимфоцитов крови пациентов при разных опухолевых заболеваниях солидной природы и у бессимптомных пациентов, что позволяло исследовать количественное и качественное изменение таких клеток у каждого пациента в течение заболевания и его лечения.

Динамика цитогенетического обследования пациентов с меланомой кожи, которая является особенно иммунозависимым злокачественным заболеванием, показывает, что после хирургического лечения ЭРХ в лимфоцитах крови часто развивается у тех пациентов, которые либо не применяли эффективную при этом заболевании иммунотерапию, либо применяли её с большими перерывами (от 6 мес до 1–2 лет) или в недостаточной дозе. В результате, увеличивалось количество клеток с ЭРХ, их превращение в более злокачественные гиперанеуплоидные и полиплоидные клетки и развивался рецидив заболевания.

В то же время, как показало данное исследование, количество клеток с ЭРХ достаточно эффективно уменьшалось при плановом применении иммуномодулятора ПО в определенной дозе, которая корректировалась на основании данных цитогенетического анализа. Это предотвращало последующее развитие клеток с ЭРХ в более злокачественные и, в то же время, уменьшало уровень иммунодепрессии, которая, как известно, наблюдается при любом злокачественном заболевании и коррелирует с количеством аномальных лимфоцитов крови. При большом количестве лимфоцитов с ЭРХ — как, например, у больных с меланомой кожи, у которых было выявлено от 11 до 44 % таких клеток, — для достижения положительного эффекта была необходима длительная иммунотерапия. А в случаях, когда выявляли большое количество лимфоцитов с ЭРХ и иммунотерапию применяли с большими перерывами — как, например, у больного с меланомой кожи, у которого было обнаружено 26 % таких клеток, — или не применяли вообще, как, например, у больной с инвазивным протоковым РМЖ и у двух больных с раком желудка, — рецидив заболевания был очень острым и быстро заканчивался гибелью больных.

Также можно предположить, что клетки с ЭРХ являются цитогенетическим критерием неэффективного (нерадикального хирургического) или неправильно подобранного (химиотерапевтического или рентгенорадиологического) лечения, как, например, в случае применения цисплатина при лечении первичных опухолей [11], когда после такого лечения появляются в большом количестве клетки с ЭРХ, и через некоторое время развиваются вторичные опухоли.

При доброкачественных опухолевых заболеваниях, таких как базалиома и папиллома, обнаружение у пациентов клеток с ЭРХ свидетельствует, вероятно, о высоком риске перехода доброкачественного процесса в злокачественный, а обнаружение клеток с ЭРХ у пациентов из группы риска, у доноров или у практически здоровых людей также свидетельствует, вероятно, о риске развития у них первичных злокачественных заболеваний.

В этих исследованиях показано, что в зависимости от количества клеток с ЭРХ развитие злокачественного заболевания или его рецидива происходило через разные промежутки времени и очень индивидуально в зависимости от характера заболевания и методов лечения.

## Заключение

Результаты исследования свидетельствуют, что лимфоциты периферической крови являются надежной и информативной моделью для исследования эндоредупликации хромосом в динамике, что позволяет своевременно определять начало развития злокачественного заболевания или его рецидива. Подтверждены литературные данные о том, что эндоредупликация хромосом является ранним прогностическим цитогенетическим критерием вероятного развития злокачественного заболевания. Кроме того, исследование показало, что если не применяет-

ся иммунотерапия пациента, у которого обнаружены клетки с эндоредупликацией хромосом, то такие клетки действительно преобразуются в полиплоидные и гиперанеуплоидные — злокачественные, что сопровождается резким обострением заболевания с плохим прогнозом. В то же время, если при выявлении клеток с эндоредупликацией хромосом у пациентов применяется плановая иммунотерапия при цитогенетическом контроле, то все такие клетки удается ликвидировать и, таким образом, предотвратить дальнейшее развитие опухолевого процесса.

## Литература

1. Dutrillaux B., Gerbault Seureau M., Remvikos Y. et al. Breast cancer genetic evolution: I. Data from cytogenetics and DNA content // Breast Cancer Res. Treat. 1991. Vol. 19. № 3. P. 245 255.
2. Wang X., Zou L., Zheng H. et al. Genomic instability and endoreduplication triggered by RAD17 deletion // J. List. Genes Dev. 2003. Vol. 17. № 8. P. 965 970.
3. Schwerer M.J., Hemmer J., Kraft K. et al. Endoreduplication in conjunction with tumor progression in an aneuploid laryngeal squamous cell carcinoma // Virch. Arch. 2003. Vol. 443. № 1. P. 98 103.
4. Grigorova M., Staines J. M., Ozdag H. et al. Possible causes of chromosome instability: comparison of chromosomal abnormalities in cancer cell lines with mutations in BRCA1, BRCA2, CHK2 and BUB1 // Cytogenet. Genome Res. 2004. Vol. 104. № 1 4. P. 333 340.
5. Gagos S., Papaioannou G., Chiourea M. et al. Unusually stable abnormal karyotype in a highly aggressive melanoma negative for telomerase activity // Molec. Cytogenet. 2008. Vol. 1. № 20. P. 3 7.
6. Zhiying J., Luoping Z., Weihong G. et al. The benzene metabolite, hydroquinone and etoposide both induce endoreduplication in human lymphoblastoid TK6 cells // Mutagenesis. 2009. Vol. 24. № 4. P. 367 372.
7. Donadini A., Maffei M., Cavallero A. et al. Oral cancer genesis and progression: DNA near diploid aneuploidization and endoreduplication by high resolution flow cytometry // Cell. Oncol. 2010. Vol. 32. № 5 6. P. 373 383.
8. Maralhas A., Monteiro A., Martins C. et al. Genotoxicity and endoreduplication inducing activity of the food flavouring eugenol // Mutagenesis. 2010. Vol. 21. № 3. P. 199 204.
9. Spatz A., Batist G., Eggermont A. M. The biology behind prognostic factors of cutaneous melanoma // Curr. Opin. Oncol. 2010. Vol. 22. № 3. P. 163 168.
10. Kerr J. S., Galloway S., Lagrutta A. et al. Nonclinical safety assessment of the histone deacetylase inhibitor vorinostat // Carcinogenesis. 2009. Vol. 27. № 2. P. 337 343.
11. Puig P. E., Guilly M. N., Bouchot A. et al. Tumor cells can escape DNA damaging cisplatin through DNA endoreduplication and reversible polyploidy // Cell Biol. Int. 2008. Vol. 32. № 9. P. 1031 1043.
12. Monakhov A. S., Semiglazov V. F., Bregneva T. V. Cyto genetic markers in 100 % of blood lymphocytes in three members of the family with high predisposition to cancer development // J. exp. Clin. Cancer Res. 1995. Vol. 14. P. 265 269.
13. Benner S. E., Wahl G. M., Von Hoff D. D. Double minute chromosomes and homogeneously staining regions in tumors taken directly from patients versus in human tumor cell lines (review) // Anti Cancer Drugs. 1991. Vol. 2. № 1. P. 11 25.
14. Trent J. M., Weber B., Guan X. Y. et al. Microdissection and microcloning of chromosomal alterations in human breast cancer // Breast Cancer Res. Treat. 1995. Vol. 33. № 2. P. 95 102.
15. Shimizu N. Extrachromosomal double minutes and chromosomal homogeneously staining regions as probes for chromosome research // Cytogenet. Genome Res. 2009. Vol. 124. № 3 4. P. 312 326.

A. S. Monakhov  
St. Petersburg

### Chromosome endoreduplication role in the development of human malignant tumors

Published data indicate that cells with endoreduplication of chromosomes (Chr End) are precursors of malignant cells. In this study, Chr End, along with other cytogenetic disorders, was identified in metaphase plates of peripheral blood lymphocytes in patients with various malignancies of solid nature: melanoma, malignancies of the gastrointestinal tract, breast, lung, thyroid, ovary and kidneys. In addition, the Chr End has been found in patients with basal cell carcinoma and papilloma, some patients in the group «at risk» and some apparently healthy patients. In a study of patients with melanoma before treatment and repeatedly during treatment has been shown that the number of such cells is increased before the development of disease recurrence. Reduce number of cells with Chr End was effectively promoted by immunotherapy of patients. If immunotherapy was not used, the cells with the Chr End became polyploid and/or hyperaneuploid cells. It is assumed that the appearance of cells with Chr End in benign neoplastic diseases are likely to initiate the transition process from benign to malignant, and the appearance of such cells in patients from group «at risk» or in control patients indicates a high risk of developing primary malignant disease.

**Key words:** metaphase plate of peripheral blood lymphocytes, endoreduplication of chromosomes, malignant and benign diseases, hyperaneuploid and polyploid cells, immunotherapy, the development of recurrence