

Л. П. Швачко

## Зміни патерну структурного гетерохроматину при онкологічному процесі

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Д. М. Говоруном)

*Виявлені характерні цитоморфологічні зміни структурного гетерохроматину лімфоцитів периферичної крові хворих з різним типом солідної онкопрогресії, які асоціюються з аномальним епігенетичним гіпометилуванням геному. Показано, що ці зміни пов'язані з його гетерохроматинізацією, в основі якої лежить латентна екстрахромосомна хромомеризація структурного гетерохроматину. Отримані результати дають змогу припустити, що геномне метилування ДНК є одним з головних епігенетичних факторів запобігання критичним змінам патерну структурного гетерохроматину по шляху його екстрахромосомної латентної політенії, асоційованої з канцерогенезом.*

Нині механізми канцерогенезу пов'язують з альтернативними генетичному епігенетичними чинниками [1, 2]. Аномальне епігенетичне метилування ДНК геному різних пухлин визнано загальною стадією раку [3]. Це є вагомим доказом того, що онкологічний процес як захворювання є унікальним на рівні соматичного геному, який перебуває під епігенетичним контролем, а отже, повинен мати єдиний біологічний механізм пізнання його ініціації та прогресії, незалежно від етіології та генетичної специфічності самих пухлин. Однак у порушенні метилування ДНК при канцерогенезі відмічається своєрідний парадокс, пов'язаний з одночасним глобальним гіпометилуванням ДНК геному пухлин та з регіональним гіперметилуванням ДНК промоторних CpG-ділянок багатьох регуляторних генів, зокрема онкосупресорних, внаслідок чого пригнічується їхня експресія [4, 5]. Якщо молекулярні механізми гіперметилування ДНК при онкологічному захворюванні активно вивчаються [6, 7], то функція геномного гіпометилування ДНК у механізмах індукції канцерогенезу, хоча і має експериментальне підтвердження [8], залишається ще до кінця незрозумілою. Визнано, однак, що гіпометилування геному промотує широкий спектр хромосомної нестабільності, яка супроводжує канцерогенез [9]. Зважаючи на те, що структурний гетерохроматин стає мішенню геномного гіпометилування ДНК при онкологічному процесі [10], метою проведеного дослідження було виявлення цитоморфологічних аномалій гетерохроматину, що асоціюються зі зміною його патерну в процесі онкологічного захворювання.

**Матеріали і методи.** Об'єктом дослідження були лімфоцити периферичної крові хворих на солідний неспадковий тип онкологічного захворювання ( $n = 75$ ), а саме рак щитоподібної залози ( $n = 35$ ), колоректальний рак ( $n = 26$ ), нейробластома ( $n = 8$ ) та пухлина Вільмса ( $n = 6$ ) у дітей. Контрольна група — умовно здорові донори віком 24–40 років ( $n = 20$ ).

Для аналізу метафазних хромосом та інтерфазної ядерної флуоресценції використовували мітогенстимульовану фітогемаглютиніном "Р" ("Sigma-Aldrich", Німеччина) культуру лімфоцитів [11] осіб контрольної групи та групи з солідною пухлинною прогресією. Метафазні хромосоми візуалізували за допомогою азур-еозину (Гімза) та світлової мікроскопії. Флуорохроми DAPI та Hoechst 33 258 використовували для аналізу інтенсивності ядерної

гетерохроматинспецифічної флуоресценції інтерфазних лімфоцитів при застосуванні мікроскопа “Axiotar plus FL” (“Zeiss”, Німеччина) і програми “Scion Image” (“Zeiss”, Німеччина). Функцію кореляції між індукцією гетерохроматинспецифічної інтерфазної ядерної флуоресценції при пухлинному процесі, що поєднується з геномним гіпометилюванням ДНК, та при модельній дії ДНК-деметилюючого реагенту 5-азацитидину ( $10^{-5}$  М) в культурі нормальних лімфоцитів визначали за [12].

**Результати дослідження та їхнє обговорення.** Ключовою ознакою структурного гетерохроматину є епігенетичне метилювання ДНК — головний механізм, що обумовлює та забезпечує патерн конденсації конститутивного гетерохроматину протягом мітотичного поділу клітини [13]. Оскільки глобальне гіпометилювання ДНК експериментально пов’язується з імовірною ініціацією канцерогенезу [8, 9], то критичні зміни в структурі гетерохроматину можуть набувати принципового значення в епігенетичному механізмі розвитку онкологічного захворювання, незалежно від його етіології.

Цитоморфологічними дослідженнями нами виявлено характерні зміни патерну структурного гетерохроматину при онкологічному процесі на рівні мітотичних лімфоцитів периферичної крові хворих з різним типом солідної пухлини.

Як показано раніше, канцерасоційоване геномне гіпометилювання ДНК спричинює глобальне деметилювання перицентромерних Alu-ДНК повторів та, як наслідок, глобальну деконденсацію структурного перицентромерного/центромерного гетерохроматину на рівні метафазних лімфоцитів [14]. Виявлено, що при онкологічному процесі метафазна деконденсація структурного гетерохроматину поєднується з характерною гетерохроматинізацією на рівні інтерфазних ядерних лімфоцитів. Так, за допомогою гетерохроматинспецифічних флуорохромів DAPI та Hoechst 33 258 показано, що інтерфазні лімфоцити, які асоціюються зі стадією S-реплікації геномної ДНК, у хворих з солідним онкологічним процесом мали значно вищий рівень ядерної флуоресценції гетерохроматину у порівнянні з контролем (табл. 1, рис. 1).

Подібна інтерфазна гетерохроматинізація ототожнюється з екстрареплікацією структурного гетерохроматину на рівні геному при онкологічному захворюванні. За дії модельного

Таблиця 1. Інтенсивність ядерної гетерохроматинспецифічної DAPI- та Hoechst 33258-флуоресценції інтерфазних лімфоцитів периферичної крові при солідному онкологічному процесі (А) та дії ДНК-деметилюючого реагенту 5-азацитидину на культуру лімфоцитів умовно здорових донорів (В),  $n = 5$

Група	Рівень ядерної флуоресценції		
	відн. од., $M \pm m$	% від контролю	$P^*$
DAPI			
Контроль (К)	134 ± 11,86	—	—
Онкологія (А)	252 ± 32,08	88,06 ± 7,04	$P_1 < 0,001$
5-Азацитидин (В)	216 ± 19,32	61,19 ± 4,88	$P_2 < 0,001,$ $P_3 > 0,05 (t = 0,961)$
Hoechst 33258			
Контроль (К)	307 ± 21,34	—	—
Онкологія (А)	558 ± 47,13	81,75 ± 5,32	$P_1 < 0,005$
5-Азацитидин (В)	526 ± 36,95	71,3 ± 6,85	$P_2 < 0,005,$ $P_3 > 0,05 (t = 0,021)$

Примітка. Кількість проаналізованих інтерфазних лімфоцитів — 500 для кожної групи.

\* Достовірність різниці:  $P_1$  — між групами К та А;  $P_2$  — між групами К та В;  $P_3$  — немає достовірної різниці між групами А та В.

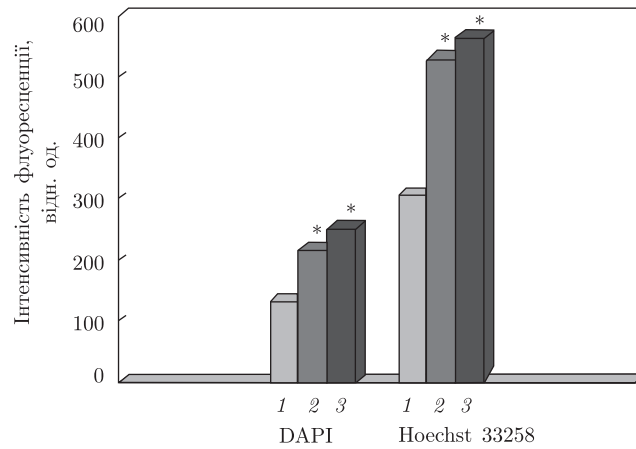


Рис. 1. Інтенсивність DAPI- та Hoechst 33 258-специфічної ядерної флуоресценції інтерфазних лімфоцитів периферичної крові при солідному онкологічному процесі та при дії ДНК-деметилуючого реагенту 5-азацитидину на культуру нормальних лімфоцитів:  
 1 — контроль; 2 — 5-азацитидин; 3 — онкологічна прогресія. \* — зміни статистично недостовірні

ДНК-деметилуючого реагенту 5-азацитидину в культурі нормальних лімфоцитів умовно здорових донорів має місце індукція інтерфазної ядерної гетерохроматинізації структурного гетерохроматину без статистичної різниці з індукцією ядерної гетерохроматинізації при онкологічному процесі, асоційованому з гіпометилуванням геному (див. табл. 1, рис. 1).

Таким чином, гіпометилування/деметилування ДНК можна імовірно визнати ініціюючим фактором ядерної гетерохроматинізації, що дає вирішальний внесок у соматичну гіперплоїдизацію при канцерогенезі. Відомо, що соматична поліплоїдія межує зі специфічним хромосомним дисбалансом та канцерогенезом [15], однак без достатнього поєднання з епігенетичними чинниками, зокрема з аномальним гіпометилуванням ДНК.

Крім того, методом світлової мікроскопії при аналізі метафазних хромосом та інтерфазних ядерних лімфоцитів з використанням барвника Гімза нами виявлено критичні цитоморфологічні структурні зміни гетерохроматину, що пов'язуються з його екстрахромосомною латентною політенною хромомеризацією (рис. 2, а). Саме вона, на нашу думку, вносить імовірний біологічний зміст у механізм соматичної гетерохроматинізації геному при онкологічному процесі, асоційованому з аномальним епігенетичним гіпометилуванням ДНК (див. рис. 2, б). Про це свідчить також формування масивних хромоцентрів інтерфазного гетерохроматину при дії ДНК-деметилуючого реагенту 5-азацитидину в культурі нормальних лімфоцитів (див. рис. 2, в).

Таким чином, результати проведеного дослідження дозволяють дійти висновку про те, що саме індукція залежної від ДНК-гіпометилування екстрахромосомної організації структурного гетерохроматину може ототожнюватися з глобальною мітотичною та генетичною катастрофою соматичного геному при канцерогенезі.

Результати дослідження свідчать про те, що геномне метилування ДНК є чи не найважливішою епігенетичною детермінантою запобігання латентним змінам патерну структурного гетерохроматину при розвитку онкологічного захворювання.

*Автор висловлює щирі вдячність за плідну співпрацю з фахівцями клінічної онкології — проф. А. П. Степаненку, головному лікарю, канд. мед. наук М. В. Гульчій, лікарю С. М. Цимбалюку (Київський центр лікування та реабілітації хворих на щитоподібну залозу), проф. В. С. Процику; проф. В. О. Кікотю, канд. мед. наук Г. І. Климнюку (Інститут онкології АМН України), а та-*

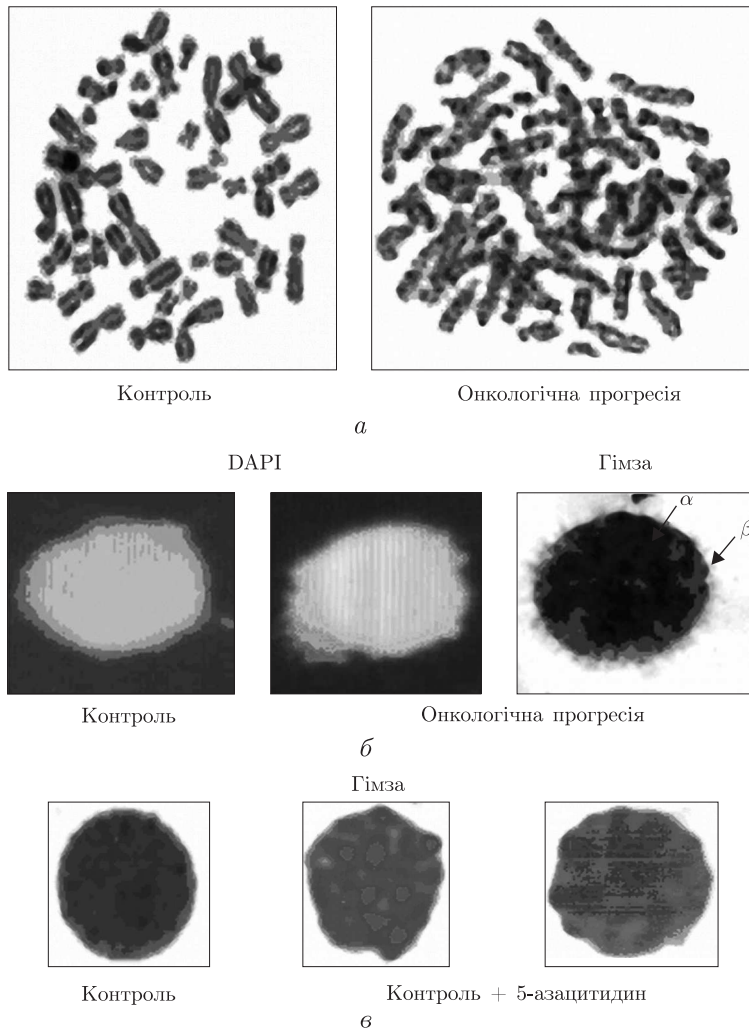


Рис. 2. Латентна екстрахромосомна гетерохроматинізація при онкологічній прогресії: *а* — метафазна хромомеризація структурного гетерохроматину; *б* — інтерфазний ядерний гетеропікноз в мітотичних лімфоцитах; *в* — утворення масивних хромоцентрів структурного гетерохроматину при дії ДНК-деметилуючого реагенту 5-азациитидину

кож канд. хім. наук, ст. наук. співр. Інституту молекулярної біології і генетики НАН України І. В. Алексєєвій за люб'язне надання 5-азациитидину, що був використаний у дослідженні як модельний ДНК-деметилуючий реагент, та канд. біол. наук, ст. наук. співр. Інституту молекулярної біології і генетики НАН України О. Г. Алхімовій за плідне обговорення експериментальної частини роботи.

1. Jones P. A., Baylin S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer // Nature Reviews Genetics. – 2002. – **3**. – P. 415–428.
2. Jaffe L. F. Epigenetic Theories of Cancer Initiation // Adv. Cancer Res. – 2003. – **90**. – P. 209–230.
3. Szyf M. Targeting DNA methylation in cancer // Bull. Cancer. – 2006. – **93**, No 9. – P. 961–972.
4. Jones P. A. The DNA methylation paradox // Trends Genet. – 1998. – **15**, No 1. – P. 34–37.
5. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little // Oncogene. – 2002. – **21**, No 35. – P. 5400–5413.
6. Baylin S. B., Herman J. G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics // Trends Genet. – 2000. – **1**, No 64. – P. 168–174.

7. Sherr C. J. Principles of tumor suppression // Cell. – 2004. – **116**, No 2. – P. 235–246.
8. Gaudet F., Hodgson J. G., Eden A. et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation // Science. – 2003. – **300**, No 5618. – P. 489–492.
9. Eden A., Gaudet E., Waghmare A., Jaenisch R. Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation // Science. – 2003. – **300**, No 5618. – P. 455.
10. Qu G., Dubeau L., Narayan A. et al. Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential // Mutat. Res. – 1999. – **423**, No 1. – P. 91–101.
11. McGregor H. C., Varley J. M. Working with Animal Chromosomes. – New York: Wiley, 1983. – 280 p.
12. Мінцер О. П., Угаров Б. Н., Власов В. В. Методи обробки медичинської інформації. – Київ: Вища шк., 1982. – 159 с.
13. Rountree M. R., Bachman K. E., Herman J. G., Baylin S. B. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer // Oncogene. – 2001. – **20**, No 24. – P. 3156–3165.
14. Швачко Л. П., Бух И. Г., Степаненко А. П. та ін. Спосіб ранньої діагностики злоякісних пухлин // Декл. пат. України. – 2006. – UA 13616, Бюл. № 4.
15. Storchova Z., Pellman D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2004. – **5**, No 1. – P. 45–54.

Інститут молекулярної біології  
і генетики НАН України, Київ

Надійшло до редакції 05.05.2008

**L. P. Shvachko**

### **Alterations in the pattern of constitutive heterochromatin in carcinogenesis**

*The characteristic cytomorphological alterations in a constitutive heterochromatin pattern of peripheral blood lymphocytes, which are associated with the abnormal epigenetic genome DNA hypomethylation, have been revealed in patients with different types of solid cancer. These alterations have been shown to be linked with the genome heterochromatinization based on the latent extrachromosomal chromomerization of a heterochromatin structure. The results obtained allow us to assume the genomic DNA methylation to be one of the main epigenetic factors preventing crucial changes of the heterochromatin structure on the way of its latent extrachromosomal polyteny associated with carcinogenesis.*