

которой основными были делеции 5q12-q23, 18q и ампликации 20p11.2-p13, 7q31-q35 и 8q21.2-q21.3. Можно предположить, что клеточные клоны, несущие aberrации по 15q11.2-q26 и 3p12-p23 хромосомным сегментам на начальных стадиях, не участвуют в дальнейшем развитии опухоли, уходя в апоптоз, тогда как для инициации и становления клона опухолевых клеток более важными оказываются другие aberrации, способствующие преодолению клетками эндогенной регуляции и выживанию в жестких условиях иммунного контроля организма. Кроме того, можно сделать вывод о том, что на начальном этапе развития патологического процесса ведущими aberrациями хромосом являются ампликации, которые обеспечивают увеличение хромосомного материала и повышению жизнеспособности клеточных клонов. Далее, в ходе клональной эволюции выделяются клоны с мутациями, способными поддерживать существование клона, на фоне которых появляются делеции хромосомного материала, по регионам, в которых могут находиться опухолесупрессорные гены. Таким образом, опухолевые клетки приобретают относительную стабильность для дальнейшего существования и развития.

ИНДИКАЦИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БЫСТРЫМИ НЕЙТРОНАМИ

А.А. Мельников, С.А. Васильев, А.И. Мусабиева, В.В. Великая, О.В. Грибова, А.Н. Уразова, Ж.А. Старцева, И.Н. Лебедев, Е.А. Чойнзон

НИИ онкологии СО РАМН, г. Томск
НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск
Сибирский ГМУ, г. Томск

Накопленный мировой опыт показал, что проведение нейтронной терапии существенно повышает эффективность лучевого лечения больных радиорезистентными опухолями слюнных желез и молочной железы за счет более выраженного повреждающего действия на биологическую ткань [1]. При этом в ходе лечения очень часто невозможно достичь инактивации наиболее резистентной части клеток

опухоли, не превышая толерантности окружающих нормальных тканей [1-3]. Данное обстоятельство создает угрозу появления отдаленных эффектов облучения, что, в свою очередь, определяет актуальность поиска эффективных методов биоиндикации лучевого поражения организма больного при нейтронной терапии. Индикация цитогенетических нарушений в лимфоцитах периферической крови рекомендована Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), Научным комитетом по действию атомной радиации (НКДАР) и Международным агентством по атомной энергетике (МАГАТЭ) в качестве надежного и достоверного метода оценки радиационного поражения организма [4]. Высокая значимость цитогенетических методов при лучевой терапии обусловлена тем, что «биологическая доза» определяется не только поглощенной терапевтической дозой, но и характером её распределения в организме больного, индивидуальной радиочувствительностью последнего и степенью репарационных процессов [5]. Необходимо отметить, что на сегодняшний день остается открытым вопрос о влиянии терапевтического нейтронного излучения на индукцию структурных и числовых мутаций хромосом в клетках человека в клинических условиях, что определило цель настоящего исследования.

Материалы и методы. Материалом исследования служила периферическая кровь, полученная от 9 больных ЗНО околоушных слюнных желез стадии $T_3N_{0-3}M_0$ и 8 больных рецидивами рака молочной железы (РМЖ) с 3-х исследуемых точек: до лечения, через сутки после первого сеанса и в конце курса нейтронной терапии. У всех больных ЗНО диагноз был верифицирован морфологически. Клинические данные больных были получены при анализе первичных документов – историй болезни и амбулаторных карт. Лучевая терапия быстрыми нейтронами с энергией 6,3 МэВ проводилась на циклотроне У-120 в НИИ ядерной физики Томского политехнического университета. Режим облучения у больных с опухолью околоушной слюнной железы на циклотроне У-120 включал: разовая очаговая доза (РОД) после первого сеанса – 1,3-2,2 Гр, суммарная очаговая доза (СОД) – 5,5-8,4 Гр (23-44 Гр стандартного фотонного излучения). У больных рецидивами РМЖ применяли режим облучения: РОД после первого сеанса – 1,6 Гр, СОД – 4,8-8,0 Гр (30-40 Гр стандартного фотонного излучения). Применялись 2 поля облучения размерами: 6×6 и 6×8 см. Проведение исследования было одоб-

рено Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН. Культивирование лимфоцитов периферической крови проводили по стандартной методике с использованием среды RPMI-1640 (Sigma, США) и фитогемагглютина (ФГА) (ПанЭко, Москва). Цитогенетический анализ проводили на зашифрованных препаратах с помощью микроскопа «Axioskop» (Carl Zeiss, Германия) по стандартному критерию оценки частоты хромосомных aberrаций, выявляемых в первом митозе после ФГА-стимуляции лимфоцитов. Учитывались все типы хромосомных аномалий, распознаваемых на рутинно окрашенных хромосомах. Для каждой исследуемой точки анализировали порядка 300 метафазных пластин. Микроядерный тест на двухъядерных цитокинез-блокированных лимфоцитах проводили стандартным методом с использованием флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) [7]. Для получения цитокинез-блокированных лимфоцитов после 44 ч культивирования в культуру клеток добавляли цитохалазин В в концентрации 5 мкг/мл. Через 72 ч после начала культивирования проводили фиксацию клеток. FISH проводили с использованием панцентромерных ДНК-зондов на весь хромосомный набор. Анализ распределения флуоресцентных сигналов вели на люминесцентном микроскопе «Axioskop» (Carl Zeiss, Германия) с набором специфических светофильтров, при увеличении в 1200 раз. На каждом препарате в 1000 двухъядерных клеток проводили оценку частоты центромеро-позитивных (потеря целых хромосом) и центромеро-негативных (ацентрические фрагменты) микроядер, а также нуклеоплазматических мостов (полицентрические хромосомы).

Результаты и обсуждение.

У больных рецидивами РМЖ и опухолями слюнных желез проанализировано 14640 метафазных пластин и свыше 54000 цитокинез-блокированных двухъядерных лимфоцитов. В ходе проведенного исследования в лимфоцитах больных рецидивами РМЖ средняя частота aberrантных метафаз до лечения быстрыми нейтронами составляла 1,62%, а у больных опухолями слюнных желез данный цитогенетический показатель составил 0,32%, что не превышает общепопуляционного уровня (до 2%). В то же время, средняя частота микроядер у больных рецидивами РМЖ и опухолями слюнных желез превышала выявленный ранее уровень данного цитогенетического показателя в

группе из 30 здоровых жителей Томской области ($1,12 \pm 0,19\%$ против $0,55 \pm 0,04\%$, $p=0,019$, а также $0,72 \pm 0,05\%$ против $0,55 \pm 0,04\%$, $p=0,034$ соответственно) [7]. Для оценки мутагенного эффекта нейтронной терапии на хромосомный аппарат больных ЗНО указанных локализаций в настоящем исследовании было проведено сравнение цитогенетических показателей между исследуемыми точками. Частота всех ХА у больных рецидивами РМЖ составила (от суммы проанализированных метафаз): до нейтронной терапии - $2,01 \pm 0,95\%$, после первого сеанса - $3,13 \pm 0,84\%$, в конце курса - $4,65 \pm 0,91\%$. Увеличение частоты aberrантных метафаз ($p=0,046$), aberrаций хромосомного типа ($p=0,017$), атипичных моноцентриков ($p=0,027$), парных фрагментов ($p=0,010$), общего числа микроядер ($p=0,01$) и центромеро-негативных микроядер ($p=0,016$) становилось статистически значимым только после окончания нейтронной терапии. У больных опухолями слюнных желез частота всех ХА составила (от суммы проанализированных метафаз): до нейтронной терапии - $0,32 \pm 0,15\%$, после первого сеанса - $2,00 \pm 0,31\%$, в конце курса - $3,01 \pm 0,35\%$. На протяжении курса нейтронной терапии у больных ЗНО слюнных желез статистически значимо возрастала частота aberrантных метафаз, aberrаций хромосомного типа, парных фрагментов, а также общего числа микроядер ($p < 0,05$). Цитогенетические нарушения формировались за счет aberrаций хромосомного типа, которые составляли у больных рецидивами РМЖ 95,5%, а у больных опухолями слюнных желез - 97% от всех aberrаций, выявленных в конце терапии. Заключение.

Таким образом, в ходе проведенного исследования нами впервые был обнаружен мутагенный эффект нейтронной терапии на хромосомный аппарат больных рецидивами РМЖ и опухолями слюнных желез. Показано, что повышение уровня цитогенетических нарушений в ходе лечения быстрыми нейтронами является следствием увеличения частоты радиационно-индуцированных хромосомных aberrаций. Совокупность клеток с микроядрами у больных ЗНО указанных локализаций при нейтронной терапии формируется в основном за счет центромеро-негативных микроядер.

Литература:

1. Нейтронная терапия злокачественных новообразований / Под ред. проф. Л.И. Мусабаевой и д.т.н. В.А. Лисина. – Томск: Изд-во НТЛ, 2008. – 288 с.
2. Cohen L. Complications of fast neutron therapy // Recent. Results. Cancer Res. 1998. – Vol. 150. – P. 156-169.
3. Schwarz R., Krull A., Heyer D., et al. Present results of neutron therapy. The German experience // Acta Onkol. – 1994. - Vol. 33, № 3. – P. 281-287.
4. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ // Гигиенические критерии состояния окружающей среды № 51. – Женева: ВОЗ, 1989. – 212 с.
5. Мельников А.А., Великая В.В., Уразова Л.Н., и др. Цитогенетические эффекты лучевой терапии у больных злокачественными новообразованиями // Медицинская генетика. – 2011. – Т. 10, № 12. – С. 3-12.
6. Назаренко С.А., Тимошевский В.А. Сравнительный анализ частоты анеуплоидии в покоящихся и делящихся клетках человека при воздействии вредных внешнесредовых факторов // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 3. С. 391–395.
7. Тимошевский В.А., Лебедев И.Н., Васильев С.А., и др. Хромосомный и цитомный анализ соматических клеток работников радиохимического производства с инкорпорированным ^{239}Pu // Радиационная биология и радиоэкология. – 2010. – Т. 50, № 6. – С. 672-680.

ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ, ПРОЖИВАЮЩИХ В ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ И РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)

М.К. Мерзлякова, Л.Н. Уразова, Л.Ф. Писарева, О.Н. Чуруксаева, Н.Н. Макарова

НИИ Онкологии СО РАМН, г. Томск
РОД, г. Якутск, республика Саха (Якутия)

E-mail авторов: virology@oncology.tomsk.ru

По данным литературы, рак шейки матки (РШМ) находится на втором месте по частоте и третьем по смертности среди онкологической патологии женского населения. В структуре смертности онкогинекологических больных РШМ занимает первое место, и является доминирующим среди женщин репродуктивного возраста, больных генитальным раком. К настоящему времени этиологический фактор РШМ четко идентифицирован – это вирус папилломы человека (ВПЧ). Так, у 93–99% пациенток с данной патологией анализ на ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР) является положительным. После проведения исследова-

ний по изучению частоты встречаемости ВПЧ ВКР было показано, что в Европейской и Центральной частях России лидирует ВПЧ 16 типа, однако эпидемиологические данные по инфицированности и распространенности вируса на территории Сибирского Федерального округа оказались весьма малочисленными, хотя именно здесь отмечаются наиболее высокие по РФ показатели заболеваемости и смертности от РШМ. При этом, в числе лидирующих регионов находится Томская область (ТО) и не менее остро стоит данная проблема в Республике Саха (Якутия). Между тем эпидемиологические данные об инфицированности различных групп населения ВПЧ необходимы для разработки, и организации эффективных программ по профилактике, ранней диагностике и лечению данной онкопатологии.

Целью работы является изучение частоты встречаемости ВПЧ, определение вирусной нагрузки и типирование ВПЧ методом Real-Time PCR у больных раком шейки матки, проживающих в Томской области и республике Саха (Якутия).

Материал и методы. В исследовании приняли участие 160 женщина: р. Саха – 80 (n1) и ТО – 80 (n2), (средний возраст $42,7 \pm 1,05$ и $42,0 \pm 0,94$, соответственно) с гистологически верифицированным диагнозом рака шейки матки. Для генотипирования ВПЧ ВКР (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типы) и определения вирусной нагрузки использовали методику мультиплекс-ПЦР с диагностическими наборами фирмы «AmpliSens®» (Россия). Статистическую обработку данных проводили с помощью критерия согласия Пирсона в программе Statistica 7.0.

Результаты и обсуждение. При анализе инфицированности ВПЧ ВКР женщин с РШМ в исследуемых регионах было показано, что из 80 пациенток р. Саха ДНК ВПЧ обнаружена у 82,50%, а из 80 жительницы ТО – у 76,25%. Генотипирование ВПЧ-положительных образцов показало, что по частоте встречаемости в данных регионах с практически равнозначной распространенностью среди женщин с РШМ лидирует ВПЧ 16 типа (89,39% в р. Саха и 87,05% в ТО). Менее распространены среди жительниц р. Саха ВПЧ18 (12,12%), ВПЧ45 (10,61%), ВПЧ51\58 (9,09), остальные типы встречались менее чем в 8,0% случаев. Среди женщин ТО на втором месте ВПЧ 31\33 (11,48%), менее распространены 18 (9,84%), 45\56\58 (6,56%), остальные типы ВПЧ встречались менее чем в 6,0% случаев, полученные данные не противоречат литературным. Определение концентрации ДНК вируса (вирусной