

ДИНАМИКА ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ И МИКРОЯДЕР В ЛИМФОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ПРИ НЕЙТРОННОЙ ТЕРАПИИ

**А.А. Мельников¹, С.А. Васильев², Е.В. Смольникова³, Л.Н. Уразова¹,
Л.И. Мусабаева¹, В.В. Великая¹, О.В. Грибова¹, И.Н. Лебедев²,
Е.Л. Чойнзонов^{1,3}, Ж.А. Старцева¹**

ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, г. Томск¹

ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН, г. Томск²

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет»

Минздравсоцразвития РФ, г. Томск³

634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: genetic87@sibmail.com¹

У больных злокачественными новообразованиями околоушных слюнных желез исследованы частота и спектр хромосомных нарушений и микроядер в лимфоцитах периферической крови при лечении быстрыми нейтронами. Впервые зарегистрирован мутагенный эффект нейтронной терапии, формируемый, главным образом, за счет радиационно-индуцированных хромосомных aberrаций. Статистически значимое повышение частоты aberrантных метафаз, aberrаций хромосомного типа, парных фрагментов и общего числа микроядер в ходе лечения поднимает вопрос о возможности использования данных цитогенетических показателей для биоиндикации лучевой нагрузки при нейтронной терапии.

Ключевые слова: хромосомные aberrации, нейтронная терапия, злокачественные новообразования.

DYNAMICS CHROMOSOMAL ABERRATIONS AND MICRONUCLEI IN LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH MALIGNANT NEOPLASMS IN NEUTRON THERAPY

A.A. Melnikov¹, S.A. Vasilyev², E.V. Smolnikova³, L.N. Urazova¹,

L.I. Musabaeva¹, V.V. Velikaya¹, O.V. Gribova¹, I.N. Ledebnev²,

E.L. Choynzonov^{1,3}, Zh.A. Startseva¹

Cancer Research Institute, SB RAMS, Tomsk¹

Research Institute of Medical Genetics, SB RAMS, Tomsk²

Siberian State Medical University, Tomsk³

5, Kooperativny Street, 634050-Tomsk, Russia, e-mail: genetic87@sibmail.com¹

The frequency and spectrum of chromosomal aberrations and micronuclei in lymphocytes of peripheral blood in therapy using fast neutrons were examined in patients with malignant neoplasms of parotid salivary glands. The mutagenic effect of neutron therapy formed, mainly, due radiation induced chromosomal aberrations was recorded for the first time. Statistically significant increase of frequency of aberrant metaphases, chromosomal aberrations, pair fragments and total number of micronuclei in the course of treatment raises a question of possibility to use the results of cytogenetic indices for bioindication of radical load in neutron therapy.

Key words: chromosomal aberrations, neutron therapy, malignant neoplasms.

Одним из возможных путей преодоления радиорезистентности злокачественных новообразований (ЗНО) является лучевая терапия быстрыми нейтронами. Накопленный мировой опыт показал, что ее применение существенно повышает эффективность лучевого лечения больных радиорезистентными опухолями мягких тканей, слюнных желез, молочной железы за счет более выраженного повреждающего действия [5, 7].

При этом не всегда удается добиться инактивации наиболее резистентной части клеток опухоли, не превышая толерантности окружающих нормальных тканей [9, 13]. Данное обстоятельство создает угрозу появления отдаленных лучевых реакций, что, в свою очередь, определяет актуальность поиска эффективных методов биоиндикации лучевого поражения организма при нейтронной терапии. Индикация лучевой нагрузки на основе цитогене-

тических исследований 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 [6]. 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, его индивидуальной радиочувствительностью и выраженностью репарационных процессов [3]. Необходимо отметить, что вопрос о влиянии ионизирующей радиации на индукцию числовых нарушений хромосом в клетках человека остается открытым [4]. Данные литературы недостаточны и противоречивы, что создает необходимость учета как структурных, так и числовых хромосомных aberrаций в клетках больных ЗНО слюнных желез при нейтронной терапии (НТ). Количественная детекция структурных и числовых аномалий хромосом в настоящее время проводится с применением молекулярно-цитогенетических технологий, в частности анализа микроядер в комбинации с флуоресцентной *in situ* гибридизацией (FISH) [8, 10]. Метод является хорошим дополнением к стандартному цитогенетическому исследованию и может использоваться для индикации радиационного воздействия при лучевой терапии.

Целью исследования явился анализ частоты и спектра aberrаций хромосом и микроядер у больных ЗНО слюнных желез при нейтронной терапии.

Материал и методы

Материалом исследования служила периферическая кровь, полученная от 9 больных с морфологически верифицированными злокачественными новообразованиями околоушных слюнных желез $T_3N_{0-3}M_0$ стадии до лечения, через сутки после первого сеанса и в конце курса НТ. Клинические данные больных были получены при анализе первичных документов – историй болезни и амбулаторных карт. Средний возраст больных на момент выявления заболевания составил 55,1 года (21–76 лет).

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: 4 сеанса НТ в разовой очаговой дозе – 1,3–2,2 Гр, СОД 5,5–8,4 Гр, что соответствует 23–44 Гр стандартного фотонного излучения. Применялись 2 поля облучения размерами 6×6 и 6×8 см. Проведение исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН.

Культивирование лимфоцитов периферической крови проводили по стандартной методике [12] с использованием среды RPMI-1640 (Sigma, США) и фитогемагглютинаина (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) [8, 10]. 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

В ходе проведенного исследования в лимфоцитах больных опухолями околоушных слюнных желез средняя частота aberrантных метафаз до лечения быстрыми нейтронами составляла 0,3 %, что не превышает общепопуляционного уровня (до 2 %) [1]. В то же время средняя частота микроядер

у больных ЗНО слюнных желез превышала выявленный ранее уровень данного цитогенетического показателя в группе из 30 здоровых жителей Томской области – $0,72 \pm 0,05$ % против $0,55 \pm 0,04$ % ($p=0,034$) [8].

Для оценки мутагенного эффекта нейтронной терапии на хромосомный аппарат больных ЗНО слюнных желез в настоящем исследовании было проведено сравнение цитогенетических показателей между исследуемыми точками (таблица). После первого сеанса нейтронной терапии отмечалось статистически значимое повышение частоты aberrантных метафаз ($p=0,045$), aberrаций хромосомного типа ($p=0,010$), парных фрагментов ($p=0,014$) и всех микроядер ($p=0,013$) в сравнении с исходными показателями. В конце курса лечения быстрыми нейтронами статистически значимо воз-

растала частота aberrантных метафаз ($p=0,011$), aberrаций хромосомного типа ($p=0,011$), атипичных моноцентриков ($p=0,027$) и всех микроядер ($p=0,049$) относительно первого сеанса. Сравнение цитогенетических показателей после курса нейтронной терапии с исходными показателями позволило выявить статистически значимое повышение частоты aberrантных метафаз ($p=0,027$), aberrаций хромосомного типа ($p=0,007$), атипичных моноцентриков ($p=0,027$), парных фрагментов ($p=0,007$) центромеро-негативных микроядер ($p=0,011$) и всех микроядер ($p=0,007$).

Цитогенетические нарушения формировались за счет aberrаций хромосомного типа, которые составляли 95,5 % от всех aberrаций, выявленных в конце терапии. Преобладающими нарушениями хромосомного типа являлись парные (ацентри-

Таблица

Частота хромосомных aberrаций и микроядер в лимфоцитах периферической крови у больных злокачественными новообразованиями околоушных слюнных желез при нейтронной терапии

Показатель	До лечения	После 1-го сеанса	В конце терапии
Диапазон терапевтических доз нейтронного излучения	-	1,3–2,2 Гр	5,5–8,4 Гр
Диапазон эквивалентных доз фотонного излучения			23–44 Гр
Хромосомное исследование (рутинная окраска хромосом)			
Число исследованных метафаз	2520	2550	2580
Aberrантные метафазы, %	$0,32 \pm 0,05$	$1,80 \pm 0,26^*$	$2,69 \pm 0,23^*$
Число aberrаций на 100 клеток	$0,32 \pm 0,15$	$2,00 \pm 0,31^*$	$3,01 \pm 0,35^*$
Aberrации хромосомного типа	$0,15 \pm 0,08$	$1,89 \pm 0,26^*$	$2,86 \pm 0,29^*$
Парные фрагменты	$0,08 \pm 0,08$	$1,33 \pm 0,28^*$	$1,71 \pm 0,23^*$
Кольцевые хромосомы	0	$0,03 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,19$
Дицентрические хромосомы	0	$0,15 \pm 0,08$	$0,15 \pm 0,08$
Атипичные моноцентрики	0	0	$0,26 \pm 0,07^*$
Клетки с двойными мини-хромосомами	$0,07 \pm 0,05$	$0,38 \pm 0,20$	$0,40 \pm 0,15$
Aberrации хроматидного типа	$0,17 \pm 0,07$	$0,11 \pm 0,05$	$0,14 \pm 0,06$
Одиночные разрывы	$0,13 \pm 0,07$	0	$0,07 \pm 0,05$
Изохроматидные разрывы	$0,04 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,05$	$0,07 \pm 0,05$
Микроядерный тест (с применением панцентромерной ДНК-пробы)			
Общее число микроядер	$0,72 \pm 0,05$	$1,28 \pm 0,08^*$	$1,87 \pm 0,26^*$
Центромеро-негативные микроядра	$0,43 \pm 0,56$	$0,97 \pm 0,07$	$1,32 \pm 0,19^*$
Центромеро-позитивные микроядра	$0,29 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,04$	$0,55 \pm 0,10$
Нуклеоплазматические мосты	0	$0,07 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,04$

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с показателями до лечения, $p < 0,05$.

ческие) фрагменты, которые составляли в конце лечения 57 % от всех нарушений (рис. 1б). В конце курса наблюдалось статистически значимое увеличение aberrаций стабильного типа – атипичных моноцентриков, что позволяет сделать заключение о радиационно-индуцированных инверсионных и транслокационных процессах в лимфоцитах больных опухолями слюнных желез (рис. 1в, г). Следует отметить, что в отношении соматических эффектов обменные хромосомные нарушения заслуживают пристального внимания, так как длительное время сохраняются в клеточной популяции. Кроме того, специфические обменные нарушения хромосом характерны для большинства онкогематологических заболеваний, а также системных заболеваний крови [11]. В ходе лечения быстрыми нейтронами нами была отмечена тенденция к увеличению частоты двухударных aberrаций обменного типа – кольцевых и дицентрических хромосом, которые являются классическими маркерами радиационного воздействия (рис. 1а).

Выявленные в микроядерном исследовании нарушения были представлены, главным образом, центромеро-негативными микроядрами, которые составили порядка 70 % от всех нарушений в конце терапии. Происхождение центромеро-негативных микроядер связано с потерей ацентрических фрагментов хромосом в ходе деления клетки, следовательно, данный показатель может отражать факт наличия структурных нарушений хромосом. Отсутствие статистически значимого увеличения центромеро-позитивных микроядер у больных ЗНО слюнных желез свидетельствует об отсутствии влияния быстрых нейтронов на частоту отставания целых хромосом в лимфоцитах периферической крови. На протяжении лечения отмечалась тенденция к увеличению нуклеоплазматических мостов, а также обнаружена зависимость последних от величины суммарной очаговой дозы нейтронного излучения ($R=0,72$, $p=0,045$). Данное обстоятельство позволяет выдвинуть предположение о наличии связи накопленной терапевтической дозы в организме больного с индукцией обменных aberrаций (полицентрические хромосомы).

При действии быстрых нейтронов ионизация в клетке распределена вдоль продолжительных треков, что создает вероятность возникновения двух и более ионов в пределах одной субклеточной структуры [2, 5]. Адсорбция энергии внутри и

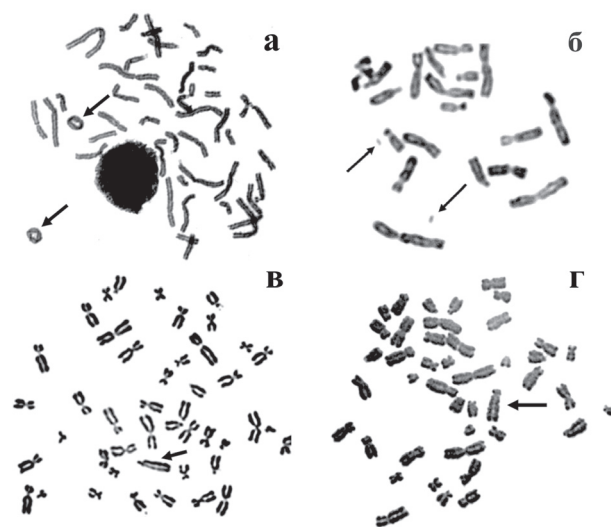


Рис. 1. Метафазные пластинки, содержащие aberrации хромосомного типа – кольцевые хромосомы (а), парные фрагменты (б), атипичные моноцентрики (в, г) в лимфоцитах больных ЗНО слюнных желез после курса нейтронной терапии (рутинная окраска хромосом)

вблизи молекулы ДНК вызывает серию разрывов в пределах одного сайта. Близкорасположенные двунитевые разрывы формируют сложное повреждение кластерного типа, репарация которого крайне затруднительна. В отсутствие или при неправильной репарации первичные повреждения реализуются в цитогенетические аномалии, а различные комбинации aberrантного воссоединения поврежденных концов молекулы ДНК формируют широкий спектр aberrаций хромосомного типа [2]. Следовательно, характер наблюдаемой цитогенетической картины в лимфоцитах периферической крови у больных ЗНО слюнных желез при лечении быстрыми нейтронами можно объяснить, исходя из физических свойств исследуемого фактора.

Таким образом, в ходе проведенного исследования впервые зарегистрирован мутагенный эффект нейтронной терапии в лимфоцитах больных ЗНО околоушных слюнных желез. Повышение уровня цитогенетических нарушений в ходе лечения быстрыми нейтронами является следствием увеличения частоты радиационно-индуцированных хромосомных aberrаций (рис. 2). Совокупность клеток с микроядрами у больных ЗНО слюнных желез при нейтронной терапии формируется в основном за счет центромеро-негативных микроядер.

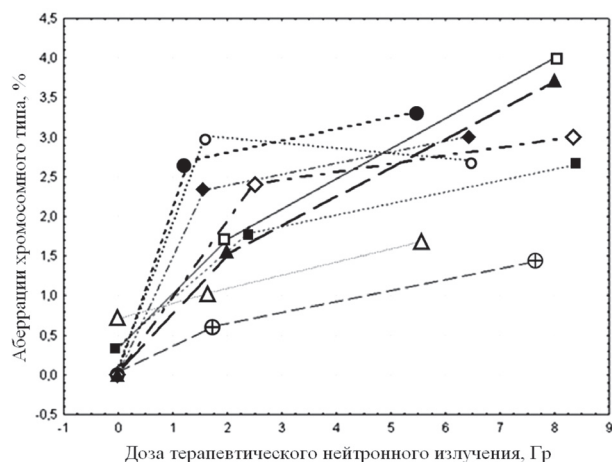


Рис. 2. Частота aberrаций хромосомного типа у 9 больных опухолями околоушных слюнных желез в ходе лечения быстрыми нейтронами

Статистически значимое повышение частоты aberrантных метафаз, aberrаций хромосомного типа, парных фрагментов и общего числа микроядер у больных ЗНО слюнных желез в ходе нейтронной терапии поднимает вопрос о возможности использования именно этих цитогенетических показателей с целью индикации лучевой нагрузки при лечении быстрыми нейтронами. Подобная биоиндикация представляется важной для оценки постлучевых изменений нормальных тканей и может быть использована с целью оптимизации и индивидуализации курсов лучевого лечения.

Настоящее исследование поддержано государственным контрактом ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям

научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» № 16.512.11.2063, а также грантом для поддержки молодых ученых компании «ОПТЭК».

ЛИТЕРАТУРА

1. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. М.: Медицина, 1989. 272 с.
2. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика. М.: Физматлит, 2008. 448 с.
3. 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 (114). С. 3–12.
4. 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.
5. Нейтронная терапия злокачественных новообразований / Под ред. Л.И. Мусабоевой, В.А. Лисина. Томск: Изд-во НТЛ, 2008. 288 с.
6. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ // Гигиенические критерии состояния окружающей среды № 51. Женева: ВОЗ, 1989. 212 с.
7. Сосюкин А.Е. Клиническая радиология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 224 с.
8. 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.
9. Cohen L. Complications of fast neutron therapy // Rec. Results Cancer Res. 1998. Vol. 150. P. 156–169.
10. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death // Mutat. Res. 2006. Vol. 600 (1–2). P. 58–66.
11. Mitelman F., Mertens F., Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia // Nat. Genet. 1997. Spec. No. P. 415–474.
12. Moorhead P.S., Nowell P.S., Mellman W.J. Chromosome preparation of leukocytes cultures from human peripheral blood // Exptl. Cell. Res. 1960. Vol. 20. P. 613–616.
13. 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.

Поступила 15.02.12