

На правах рукописи

МЕЛЬНИКОВ
Александр Александрович

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НЕЙТРОННОЙ ТЕРАПИИ
У БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ
НОВООБРАЗОВАНИЯМИ**

03.02.07 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт онкологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук и в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН
Чойнзонов Евгений Лхамацыренович

доктор биологических наук
Лебедев Игорь Николаевич

Официальные оппоненты:

Ильинских Николай Николаевич, доктор биологических наук, профессор; Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой биологии и генетики

Назаренко Мария Сергеевна, кандидат медицинских наук; Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, научный сотрудник лаборатории популяционной генетики

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства России (г. Челябинск)

Защита состоится «___» ноября 2013 года в ___ часов на заседании диссертационного совета ДМ 001.045.01 при ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН по адресу: 634050, г. Томск, ул. Московский тракт, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН (634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, 10).

Автореферат разослан «___» _____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Хитринская И.Ю.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Проблема радиационного воздействия на организм человека была и остается наиболее актуальной и находится в центре внимания Всемирной организации здравоохранения, Международной комиссии по радиологической защите, Научного комитета по действию атомной радиации, Международного агентства по атомной энергетике. Исследования эффектов терапевтического излучения на организм больных злокачественными новообразованиями (ЗНО) вызывают вполне закономерный интерес. В индустриально развитых странах более 70% онкологических больных получают лучевую терапию в виде основного, адъювантного, неоадъювантного и паллиативного лечения (Jeremic et al., 2011). Необходимость использования ионизирующих излучений в лечении ЗНО обусловлена высокой эффективностью и органосохраняющей направленностью их воздействия на пораженный орган, позволяющей добиться выздоровления на фоне хорошей социальной и семейной реабилитации (Виноградов, 2013). Между тем анализ клинических данных показывает, что у части больных после лучевой терапии развиваются лучевые изменения нормальных тканей и критических органов. Накопленные радиобиологические сведения дают основание считать, что повреждениям хромосомного аппарата принадлежит ведущая роль в развитии постлучевых нарушений и лучевой гибели клеток (Бочков, Чеботарев, 1989; Аклеев, 1995; Obe et al., 2002; Noda et al., 2012). В этой связи оценка лучевого повреждения организма при действии терапевтического излучения требует детального исследования его мутагенных эффектов на клеточном уровне.

Лучевые повреждения молекул ДНК проявляются в виде хромосомных перестроек, которые отражают кластогенный эффект ионизирующего излучения. Индукция хромосомных мутаций сопровождается задержкой деления, кроме того структурные повреждения хромосом, в частности асимметричные обмены, являются причиной нарушения процессов цитотомии и клеточного деления, которые в дальнейшем приводят клетку к необратимой гибели (Pobiega, Marcand, 2010). Формирование специфических цитогенетических аномалий в различных тканях на сегодняшний день рассматривается как этиологический фактор канцерогенеза (Shah et al., 2012). Наличие хромосомных мутаций, в число которых входят как структурные повреждения (транслокации, инверсии, инсерции, кольцевые хромосомы), так и числовые нарушения – неотъемлемое свойство всех клеток ЗНО (Duesberg, 2004). В мировой литературе начинают накапливаться данные, указывающие на возникновение числовых нарушений хромосом при воздействии ионизирующего излучения (Назаренко, Тимошевский, 2005; Васильев, 2010; Uchida et al., 1975; Natarajan et al., 1991; Kirsch-Volders et al., 1996). Доминирующей гипотезой возникновения анеуплоидных клеток является представление о действии свободных радикалов на структуры, обеспечивающие

клеточное деление. Таким образом, оценка цитогенетических эффектов ионизирующей радиации требует учета не только кластогенных, но и анеугенных событий.

На сегодняшний день накоплено достаточное количество информации о цитогенетических эффектах редкоионизирующего терапевтического излучения (Tawn et al., 2000; Bilban-Jakopin, Bilban, 2001; Pouzoulet et al., 2003; Kumari et al., 2005; Kinashi et al., 2007; Gamulin et al., 2008; Hartel et al., 2010), тогда как воздействие плотноионизирующих видов терапевтического излучения на хромосомы человека остается наименее изученным. Учитывая увеличивающийся потенциал плотноионизирующих излучений в радиационной онкологии, особое значение приобретает вопрос о мутагенном эффекте терапевтического нейтронного излучения, использование которого представляется перспективным в лечении радиорезистентных опухолей (Мусабаева, Лисин, 2008; Мусабаева и др., 2013). На сегодняшний день основной массив данных по исследованию мутагенного потенциала нейтронного излучения представлен результатами *in vitro*. Недостаточность данных по воздействию терапевтического нейтронного излучения на генетический аппарат в условиях *in vivo* обуславливает актуальность исследований, направленных на оценку влияния нейтронной терапии на возникновение структурных и числовых хромосомных мутаций в соматических клетках больных злокачественными новообразованиями.

Цель работы: Определить цитогенетические эффекты нейтронной терапии у больных с местными рецидивами рака молочной железы и больных злокачественными новообразованиями головы и шеи.

Задачи исследования:

1. Установить фоновый уровень хромосомных aberrаций и микроядер у онкологических больных до начала нейтронной терапии в сравнении со значениями в контрольной группе индивидов.
2. Проанализировать частоту и спектр структурных хромосомных мутаций в лимфоцитах периферической крови больных с местными рецидивами рака молочной железы и больных злокачественными новообразованиями головы и шеи в динамике курса нейтронной терапии.
3. Оценить анеугенный эффект нейтронного излучения в лимфоцитах периферической крови больных злокачественными новообразованиями изучаемых локализаций.
4. Провести сравнительный анализ цитогенетических эффектов нейтронной терапии у больных с местными рецидивами рака молочной железы и больных опухолями головы и шеи.
5. Оценить связь активности репарационной системы и радиационно-индуцированного хромосомного дисбаланса в лимфоцитах больных злокачественными новообразованиями при нейтронной терапии.

Научная новизна исследования: Впервые с помощью цитогенетического и молекулярно-цитогенетического анализа хромосомных aberrаций и микроядер показано наличие мутагенного эффекта нейтронной терапии у больных с местными рецидивами рака молочной железы и больных опухолями головы и шеи. Определена положительная динамика выхода хромосомных aberrаций в лимфоцитах больных ЗНО в ходе лечения быстрыми нейтронами. Показано, что основным типом радиационно-индуцированных хромосомных мутаций у онкологических больных являются aberrации хромосомного типа и центромеро-негативные микроядра. Обнаружено повышение частоты центромеро-позитивных микроядер в конце лечения быстрыми нейтронами, что отражает анеугенный эффект нейтронного облучения. Не показано различий в цитогенетических эффектах, вызванных воздействием терапевтического нейтронного излучения у больных с местными рецидивами рака молочной железы и больных опухолями головы и шеи. Установлено наличие обратной связи между активностью репарационной системы и индуцированными терапевтическим нейтронным излучением хромосомными мутациями в лимфоцитах больных злокачественными новообразованиями.

Теоретическая и практическая значимость результатов: Полученные результаты расширяют фундаментальные представления о структурной и числовой изменчивости хромосомного материала соматических клеток человека *in vivo* при воздействии терапевтического нейтронного излучения и могут быть использованы в дальнейших исследованиях мутагенного потенциала плотноионизирующей радиации. Использование методов цитогенетического и молекулярно-цитогенетического анализа хромосомных aberrаций и микроядер может быть применено при комплексных исследованиях воздействия лучевой терапии на нормальные ткани и критические органы больных ЗНО. Осуществлен анализ влияния терапевтического нейтронного излучения на хромосомный аппарат соматических клеток больных с местными рецидивами рака молочной железы и больных опухолями головы и шеи в клинических условиях. Определена частота и спектр aberrаций хромосом и микроядер при воздействии нейтронного излучения на соматические клетки больных ЗНО. Показана обратная зависимость частоты радиационно-индуцированных aberrаций хромосомного типа от уровня фокусов белка репарации γ H2AX до нейтронной терапии, что может быть использовано для индивидуализации схем лучевой терапии. Материалы работы могут быть использованы в учебно-методическом процессе на медицинских и биологических факультетах ВУЗов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Терапевтическое нейтронное излучение оказывает кластогенное и анеугенное действие на хромосомный аппарат лимфоцитов больных злокачественными новообразованиями.

2. Кластогенный эффект терапевтического нейтронного излучения возникает за счет повышения частоты стабильных и нестабильных аббераций хромосомного типа, а также центромеро-негативных микроядер, тогда как анеугенный эффект формируется за счет повышения частоты центромеро-позитивных микроядер.

3. Спонтанный уровень фокусов белка γ H2AX определяет активность репарационной системы лимфоцитов больных злокачественными новообразованиями при терапевтическом нейтронном облучении.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на: 6-й и 7-й региональных конференциях молодых ученых-онкологов им. академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы в экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 2011, 2012), 7-й и 8-й Российской конференции по фундаментальной онкологии «Фундаментальная онкология – Петровские чтения» (Санкт-Петербург, 2011, 2012), конференции «Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике» (Новосибирск, 2012), семинаре по генетическим исследованиям (Северск, 2012), научно-практической конференции «Современные технологии лучевой терапии» (Санкт-Петербург, 2012), 6-й международной научно-практической конференции «Медицинские и экологические эффекты ионизирующего излучения» (Томск, 2013), 5-ом Межнациональном конгрессе «Невский радиологический форум» (Санкт-Петербург, 2011), на межлабораторных семинарах ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН и ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН (Томск, 2013), научно-практической конференции «Нейтронная терапия в онкологии: проблемы, успехи, перспективы» (Томск, 2013)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах перечня ВАК РФ (одна в зарубежной печати). Получено положительное решение о проведении формальной экспертизы по заявке на патент № 2012148102, приоритет от 12.11.2012, «Способ прогнозирования индивидуальной радиочувствительности больных злокачественными новообразованиями при лучевой терапии».

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов, результатов собственных исследований с обсуждением по разделам, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 158 страницах, содержит 12 таблиц, 18 рисунков и 5 приложений. Список литературы включает 223 источника, из них 45 отечественных и 178 зарубежных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования служили лимфоциты периферической крови больных ЗНО и здоровых индивидов. Для оценки мутагенного эффекта нейтронной терапии были применены методы стандартного цитогенетического

исследования метафазных хромосом и молекулярно-цитогенетического исследования двухъядерных цитокинез-блокированных лимфоцитов с применением панцентромерных ДНК-зондов. Анализ активности репарационной системы проводили методом детекции флуоресцентных фокусов белка γ H2AX.

Больные злокачественными новообразованиями. В исследование включены 12 больных с местными рецидивами рака молочной железы (МР РМЖ) стадии T2-3N0-3M0. Средний возраст больных составил $58,2 \pm 11,3$ лет (40-75 лет). Распределение больных с первичным диагнозом РМЖ было следующим: у 2 – T2N0M0, у 3 – T2N1M0, у 2 – T2N2M0, у 2 – T2N3M0, у 1 – T3N1M0, у 2 – T3N2M0. Согласно морфологическому заключению, инфильтративно-протоковый рак был верифицирован у 10 (83,3 %) из 12 больных, железистый рак у двух (16,7 %). Для всех больных местными рецидивами РМЖ имелось морфологическое подтверждение диагноза. По поводу первичной опухоли всем больным РМЖ было проведено комплексное лечение, включающее радикальную мастэктомию, квадрантэктомию, 2-5 курсов полихимиотерапии по схемам CMF (циклофосфан, метотрексат, 5-фторурацил), FAC (фторурацил, адриабластин, циклофосфан). У 6 из 12 (50 %) больных с МР РМЖ в анамнезе имел место перенесенный курс дистанционной лучевой терапии.

В исследование включено 17 пациентов опухолями головы и шеи (ОГШ), из которых 15 больных опухолями слюнной железы и 2 больных раком языка. Средний возраст составил $52,5 \pm 15,3$ лет (21-76 лет). Распределение больных с опухолями слюнной железы было следующим: у 1 – T1N0M0, у 2 – T2N0M0, у 1 – T2N1M0, у 1 – T2N2M0, у 1 – T3N1M0, у 2 – T3N0M0, у 2 – T3N3M0, у 1 – T4N0M0, у 1 – T4N1M0. Еще для трех пациентов информации о стадии злокачественного процесса не получено. По поводу первичной опухоли всем больным было проведено комплексное хирургическое лечение, у троих больных были проведены курсы дистанционной гамма-терапии. У 2 из 17 больных ОГШ был рак языка стадии T3N3M0 и T4N1M0.

Контрольная группа. В контрольную группу вошли 15 соматически здоровых в доноров, средний возраст которых составил $51,4 \pm 12,2$ лет (37-63 лет).

Нейтронная терапия. Лучевая терапия быстрыми нейтронами со средней энергией 6,3 МэВ проводилась на циклотроне У-120 в НИИ ядерной физики Национального исследовательского Томского политехнического университета. У больных с МР РМЖ применялся режим облучения: разовая очаговая доза (РОД) после первого сеанса – 1,4-1,6 Гр, суммарная очаговая доза (СОД) – 4,2-8,0 Гр (что составляет 17,5-35 Гр стандартного фотонного излучения). Режим облучения у больных ОГШ включал: РОД после первого сеанса – 1,3-2,0 Гр, суммарная очаговая доза (СОД) – 5,5-10,0 Гр (что составляет 24-46 Гр стандартного фотонного излучения). Расчет очаговой дозы проводился с использованием модифицированной математической формулы по расчету фактора ВДФ (время-

доза-фракционирование) (Лисин, 2008). Для лечения больных с МР РМЖ и больных ОГШ применялись 1-2 поля облучения. Размеры одного поля составляли 6×6, 6×8, 10×10 см.

Цитогенетическое исследование. Анализ хромосом ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови первого митоза проводили на зашифрованных препаратах с помощью микроскопа Axioskop 50 («Carl Zeiss», Германия) при увеличении 10×10 и 10×100. Для кариотипирования использовали программное обеспечение «BandView» (версия 4.5.0.06) («Applied Spectral Imaging», США). Отбор метафазных пластинок осуществлялся с учетом следующих требований: цельность метафазной пластинки, четкость окраски, отсутствие или небольшое число (1-2) поперечных наложений хромосом, средняя степень их конденсации, обособленность метафазных пластинок друг от друга. Количество центромер - от 44 до 46. Учитывали все типы хромосомных aberrаций, распознаваемые на рутинно окрашенных препаратах: одиночные и парные фрагменты; хромосомные обмены (дицентрики, кольцевые хромосомы, атипичные моноцентрики); хроматидные обмены. Пробелы и эндоредупликации в анализ не включали. Для исключения ложноположительных результатов проводили групповое кариотипирование. На одну исследуемую точку анализировали в среднем по 300 метафазных пластинок.

Молекулярно-цитогенетическое исследование. В работе был использован метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с набором панцентромерных ДНК-зондов на все хромосомы человека. Визуализация флуоресцентных сигналов в цитокинез-блокированных лимфоцитах осуществлялась на зашифрованных препаратах с помощью микроскопа Axio Imager M1 («Carl Zeiss», Германия) при увеличении 10×100 с использованием светофильтров, специфичных к пропусканию спектра испускания красителей DAPI и TAMRA. Для анализа результатов гибридизации и подсчета числа гибридизационных сигналов применялось программное обеспечение «FISHView» (версия 4.5.0.05) («Applied Spectral Imaging», США). В качестве нормы рассматривались клетки без микроядер с большим количеством флуоресцентных сигналов в ядрах. Аномальными считались клетки с микроядрами с наличием центромерного сигнала (центромеро-позитивные микроядра), являющимися следствием отставания отдельных хроматид в клеточном делении, и с центромеро-негативными микроядрами, содержащими ацентрические фрагменты и являющимися результатом кластогенного воздействия. Кроме того, оценивалась частота нуклеоплазматических мостов. Для каждой исследуемой точки частота микроядер оценивалась в 1000 двухъядерных лимфоцитах индивида.

Исследование активности репарационной системы. Детекция флуоресцентных фокусов белка γ H2AX в лимфоцитах осуществлялась на зашифрованных препаратах с помощью микроскопа Axio Imager M1 («Carl Zeiss»,

Германия) при увеличении 10×100 с использованием светофильтров, специфичных к пропусканию спектра испускания красителей DAPI и TAMRA. На препарате производилась оценка количества фокусов белка γH2AX в 100 клетках.

Статистический анализ. Для выявления межгрупповых различий по частоте хромосомных мутаций и микроядер в группах больных ЗНО до лечения быстрыми нейтронами и контрольных лиц был применен статистический критерий Манна-Уитни. Сравнение частоты хромосомных aberrаций и микроядер в лимфоцитах больных ЗНО между исследуемыми точками в течение нейтронной терапии было проведено с применением критерия Уилкоксона. Для выявления межгрупповых различий по частоте радиационно-индуцированных хромосомных нарушений и микроядер в группах больных с МР РМЖ и больных ОГШ применен статистический критерий Манна-Уитни. Ранговый критерий Спирмана использовался для анализа корреляции уровня спонтанных фокусов белка γH2AX с частотой радиационно-индуцированных aberrаций хромосом. Отличия считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аберрации хромосомного и хроматидного типа в лимфоцитах больных злокачественными новообразованиями до лечения быстрыми нейтронами.

Начальным этапом настоящего исследования был анализ частоты и спектра аномалий хромосом в лимфоцитах больных ЗНО до лучевого лечения. Было показано, что больные с МР РМЖ до нейтронной терапии (НТ) характеризуются наличием повышенного уровня aberrантных метафаз ($p=0,003$), числа aberrаций на 100 клеток ($p=0,012$), aberrаций хромосомного типа ($p=0,002$), aberrаций хроматидного типа, ($p=0,005$), парных фрагментов ($p=0,004$), дицентрических хромосом ($p=0,028$) и хроматидных разрывов ($p=0,028$) (табл. 1). У больных ЗНО головы и шеи была обнаружена повышенная частота aberrантных метафаз ($p=0,011$), aberrаций на 100 клеток ($p=0,027$), aberrаций хромосомного типа ($p=0,024$), парных фрагментов ($p=0,021$), хроматидных разрывов ($p=0,023$).

Стоит отметить, что выявленный повышенный по сравнению с контролем уровень хромосомных нарушений в лимфоцитах больных ЗНО может отражать общую геномную нестабильность соматических клеток, а также указывать на существование модифицирующих цитогенетический эффект фоновых факторов экзогенной природы, которыми являются ранее перенесенные курсы лучевой и/или химиотерапии.

Частота и спектр хромосомных aberrаций в лимфоцитах больных злокачественными новообразованиями при нейтронной терапии. Для оценки мутагенного эффекта нейтронной терапии в настоящем исследовании было осуществлено сравнение частоты цитогенетических параметров в динамике процесса лечения. В группе больных с МР РМЖ после первого сеанса нейтронной

терапии в диапазоне полученных доз на очаг от 1,4 до 1,6 Гр наблюдалось статистически значимое повышение частоты аберрантных метафаз ($p=0,023$), числа аббераций на 100 клеток ($p=0,031$), аббераций хромосомного типа ($p=0,028$), дицентрических хромосом ($p=0,044$), парных фрагментов ($p=0,018$) и атипичных моноцентриков ($p=0,032$) (табл. 2). Цитогенетические аномалии в лимфоцитах больных с МР РМЖ формировались, главным образом, за счет нарушений хромосомного типа, которые составили 81 % от общего числа всех аббераций. Соответственно, нарушения хроматидного типа составили 19 % от всех цитогенетических аномалий после первого сеанса.

Таблица 1

Средняя частота хромосомных аббераций ($\% \pm$ ст. ошибка среднего) в лимфоцитах периферической крови у больных ЗНО до лечения быстрыми нейтронами и лиц контрольной группы

Параметр	Группы		
	Контроль	Больные с МР РМЖ	Больные ОГШ
Число исследованных лиц	15	12	17
Число исследованных метафаз	3719	3510	4510
Процент аберрантных метафаз	$0,29 \pm 0,14$	$2,33 \pm 0,42^*$	$0,86 \pm 0,15^*$
Число аббераций на 100 клеток	$0,55 \pm 0,14$	$2,91 \pm 0,63^*$	$1,05 \pm 0,25^*$
Абберации хромосомного типа	$0,37 \pm 0,32$	$2,10 \pm 0,55^*$	$0,72 \pm 0,18^*$
Парные фрагменты	$0,23 \pm 0,12$	$1,29 \pm 0,31^*$	$0,63 \pm 0,16^*$
Дицентрические хромосомы	0	$0,52 \pm 0,16^*$	$0,09 \pm 0,05$
Кольцевые хромосомы	$0,10 \pm 0,10$	$0,19 \pm 0,09$	0
Атипичные моноцентрики	$0,04 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,04$	0
Абберации хроматидного типа	$0,18 \pm 0,09$	$0,81 \pm 0,16^*$	$0,33 \pm 0,09$
Хроматидные разрывы	$0,14 \pm 0,06$	$0,55 \pm 0,13^*$	$0,31 \pm 0,10^*$
Изохроматидные разрывы	$0,04 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,04$	$0,02 \pm 0,02$
Хроматидные обмены	0	$0,14 \pm 0,06$	0

Примечание: * - значимость различий с контрольной группой, $p < 0,05$

Исследование хромосомных нарушений в конце лечения быстрыми нейтронами в диапазоне полученных доз на очаг от 4,2 до 8,0 Гр у больных с МР РМЖ позволило выявить статистически значимые отличия по частоте аберрантных метафаз ($p=0,003$), аббераций на 100 клеток ($p=0,009$), аббераций хромосомного типа ($p=0,002$), дицентрических хромосом ($p=0,011$), парных фрагментов ($p=0,002$), центрических колец ($p=0,028$) и атипичных моноцентриков ($p=0,020$). Цитогенетические аномалии в лимфоцитах больных с МР РМЖ формировались, главным образом, за счет аббераций хромосомного типа, которые составили 86 % от общего числа всех аббераций. Соответственно, нарушения хроматидного типа составили 14 % в конце нейтронной терапии.

Таблица 2

Средняя частота ($\% \pm$ ст. ошибка) хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови у больных с МР РМЖ при нейтронной терапии

Параметр	До лечения	После 1-го сеанса НТ	После НТ
Диапазон терапевтических доз нейтронного излучения на очаг	-	1,4-1,6 Гр	4,2-8,0 Гр
Число исследованных метафаз	3510	3470	3590
Процент aberrантных метафаз	$2,33 \pm 0,42$	$3,82 \pm 0,82^*$	$4,84 \pm 0,85^*$
Число aberrаций на 100 клеток	$2,91 \pm 0,63$	$4,62 \pm 0,88^*$	$6,24 \pm 1,04^*$
Aberrации хромосомного типа	$2,10 \pm 0,55$	$3,72 \pm 0,84^*$	$5,42 \pm 1,02^*$
Парные фрагменты	$1,29 \pm 0,31$	$2,08 \pm 0,41^*$	$3,08 \pm 0,57^*$
Дицентрические хромосомы	$0,52 \pm 0,16$	$0,84 \pm 0,24^*$	$1,13 \pm 0,34^*$
Кольцевые хромосомы	$0,19 \pm 0,09$	$0,41 \pm 0,20$	$0,56 \pm 0,18^*$
Атипичные моноцентрики	$0,08 \pm 0,04$	$0,39 \pm 0,10^*$	$0,63 \pm 0,16^*$
Aberrации хроматидного типа	$0,81 \pm 0,16$	$0,90 \pm 0,18$	$0,82 \pm 0,08$
Хроматидные разрывы	$0,55 \pm 0,13$	$0,54 \pm 0,15$	$0,52 \pm 0,08$
Изохроматидные разрывы	$0,11 \pm 0,04$	$0,17 \pm 0,05$	$0,16 \pm 0,05$
Хроматидные обмены	$0,14 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,07$	$0,14 \pm 0,04$

Примечание: * - значимость различий с показателями до лечения, $p < 0,05$

В лимфоцитах больных ОГШ при лечении быстрыми нейтронами нами была зарегистрирована сходная цитогенетическая картина. После первого сеанса нейтронной терапии в диапазоне полученных доз на очаг от 1,3 до 2,0 Гр отмечалось статистически значимое повышение частоты aberrантных метафаз ($p=0,007$), числа aberrаций на 100 клеток ($p=0,039$), aberrаций хромосомного типа ($p=0,006$), дицентрических хромосом ($p=0,043$) и парных фрагментов ($p=0,040$) (табл. 3). После первой фракции терапевтического нейтронного излучения в лимфоцитах периферической крови больных ОГШ цитогенетические аномалии формировались за счет aberrаций хромосомного типа, которые составили 82 %, при этом нарушения хроматидного типа составили 18 %.

Сравнение цитогенетических показателей после нейтронной терапии с исходными показателями позволило выявить статистически значимое повышение частоты aberrантных метафаз ($p < 0,001$), aberrаций на 100 клеток ($p=0,001$), aberrаций хромосомного типа ($p < 0,001$), дицентрических хромосом ($p=0,003$), кольцевых хромосом ($p=0,043$), парных фрагментов ($p < 0,001$) и атипичных моноцентриков ($p=0,007$). Aberrации хромосомного типа составили 86 % от всех нарушений. На долю aberrаций хроматидного типа пришлось 14 %, соответственно.

При исследовании частоты и спектра хромосомных нарушений в лимфоцитах больных ЗНО при лечении быстрыми нейтронами было показано, что

преобладающими цитогенетическими аномалиями являются aberrации хромосомного типа. На фоне лечения быстрыми нейтронами у больных с МР РМЖ и больных ОГШ средняя частота aberrаций хроматидного типа сохраняется на уровне, близком к исходному.

Таблица 3

Средняя частота (% $\pm$ ст. ошибка) хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови у больных ОГШ при нейтронной терапии

Параметр	До лечения	После 1-го сеанса НТ	После НТ
Диапазон терапевтических доз нейтронного излучения на очаг	-	1,3-2,0 Гр	5,5-10,0 Гр
Число исследованных метафаз	4510	4532	5150
Процент aberrантных метафаз	0,86 $\pm$ 0,15	1,71 $\pm$ 0,18*	2,72 $\pm$ 0,40*
Число aberrаций на 100 клеток	1,05 $\pm$ 0,25	2,30 $\pm$ 0,41*	3,39 $\pm$ 0,47*
Aberrации хромосомного типа	0,72 $\pm$ 0,18	1,92 $\pm$ 0,32*	3,02 $\pm$ 0,46*
Парные фрагменты	0,63 $\pm$ 0,16	1,67 $\pm$ 0,23*	1,97 $\pm$ 0,26*
Дицентрические хромосомы	0,09 $\pm$ 0,05	0,23 $\pm$ 0,05*	0,52 $\pm$ 0,12*
Кольцевые хромосомы	0	0,02 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,11*
Атипичные моноцентрики	0	0	0,28 $\pm$ 0,09*
Aberrации хроматидного типа	0,33 $\pm$ 0,09	0,38 $\pm$ 0,10	0,38 $\pm$ 0,10
Хроматидные разрывы	0,31 $\pm$ 0,10*	0,29 $\pm$ 0,10	0,33 $\pm$ 0,09
Изохроматидные разрывы	0,02 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,05	0,05 $\pm$ 0,03
Хроматидные обмены	0	0	0

Примечание: * - значимость различий с показателями до лечения, $p < 0,05$

Значительную роль в формировании спектра aberrаций хромосомного типа у больных ЗНО исследованных локализаций играют парные хромосомные фрагменты, частота которых возрастала на фоне лучевой терапии быстрыми нейтронами. Формирование ацентрических фрагментов является следствием прямого действия радиации на хромосомный аппарат. Парные фрагменты относятся к нестабильным aberrациям, и их уровень постепенно снижается в процессе клеточных делений. Как правило, наличие ацентрических фрагментов не сказывается на жизнеспособности клеток, поскольку данный хромосомный материал может беспрепятственно остаться в одной из дочерних клеток, сформировать вокруг себя ядерную мембрану (образование микроядра), либо лизироваться нуклеазами в цитоплазме (Mateuca et al., 2006).

Частота дицентрических и кольцевых хромосом в лимфоцитах периферической крови больных с МР РМЖ и больных ОГШ увеличивается на протяжении курса лучевой терапии быстрыми нейтронами. Положительная динамика образования асимметричных обменов является непосредственным следствием влияния ионизирующей радиации на хромосомный аппарат соматических клеток онкологических больных (рис. 1).

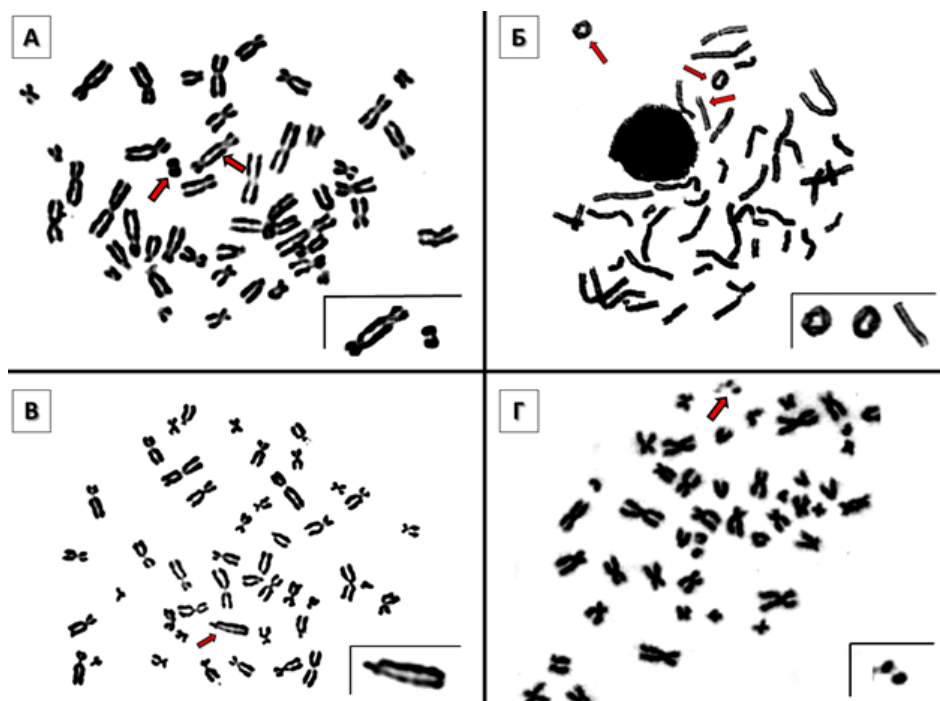


Рис. 1. Аберрации хромосомного типа в лимфоцитах больных после проведения нейтронной терапии.

Примечание: А – дицентрическая хромосома и парный фрагмент, Б – кольцевые хромосомы и парный фрагмент, В – атипичный моноцентрик, Г – парный фрагмент.

Наряду с нестабильными аберрациями хромосом у больных ЗНО наблюдалось увеличение частоты стабильных аберраций – атипичных моноцентриков. Данное наблюдение позволяет сделать заключение о том, что в лимфоцитах больных наблюдаются радиационно-индуцированные инверсионные и транслокационные события.

Сходный спектр цитогенетических аномалий в лимфоцитах больных с МР РМЖ и больных ОГШ при нейтронной терапии указывает на единый механизм влияния терапевтического нейтронного излучения на хромосомный аппарат соматических клеток больных ЗНО. В свете радиобиологических данных известно, что при действии быстрых нейтронов ионизация в клетке распределена вдоль продолжительных треков, что создает вероятность возникновения двух и более ионов в пределах одной субклеточной структуры (Okumura et al., 2013). Адсорбция энергии внутри и вблизи молекулы ДНК вызывает серию разрывов в пределах одного сайта. Близкорасположенные двунитевые разрывы формируют сложное повреждение кластерного типа, репарация которого крайне затруднительна (Jackson et al., 2002). В отсутствие или при неправильной репарации первичные повреждения реализуются в цитогенетические аномалии, а различные комбинации aberrантного воссоединения поврежденных концов молекулы ДНК формируют широкий спектр аберраций хромосомного типа. Таким образом, наблюдаемую цитогенетическую картину в лимфоцитах больных

ЗНО в ходе лучевого лечения можно объяснить с позиции особенностей физических характеристик нейтронного излучения.

Частота и спектр микроядер в лимфоцитах больных злокачественными новообразованиями до лечения быстрыми нейтронами. Использование анализа микроядер в цитокинез-блокированных лимфоцитах периферической крови с помощью FISH с панцентромерными ДНК-зондами позволило оценить частоту потери целых хромосом и их фрагментов при делении *in vitro* соматических клеток больных ЗНО до лечения быстрыми нейтронами. В группе больных с МР РМЖ средняя частота всех микроядер в двухъядерных лимфоцитах периферической крови составила 0,95 %, по сравнению с 0,67 % в контрольной группе, при этом статистически значимых различий по данному показателю не выявлено. В группе больных с МР РМЖ на уровне тенденции наблюдалось повышение частоты центромеро-негативных микроядер, которая составила 0,63 %, по сравнению с 0,45 % в контрольной группе лиц. Также статистически значимых различий не было выявлено по частоте центромеро-позитивных микроядер, частота которых составила 0,32 % против 0,22 % в контроле. В единичных случаях фиксировались нуклеоплазматические мосты, уровень которых в группе больных составлял 0,02 %, а в контрольной группе – 0,01 %.

При проведении FISH-исследования двухъядерных лимфоцитов больных ОГШ было обнаружено, что частота микроядер в исследуемой группе сопоставима с частотой микроядер в контрольной группе и составила 0,63 % и 0,67 %, соответственно. Стоит отметить, что частота центромеро-негативных микроядер не превышала частоту в контрольной группе лиц и составила 0,43 % и 0,45 %, соответственно. В группе больных ОГШ также не было выявлено статистически значимых различий по частоте центромеро-позитивных микроядер и нуклеоплазматических мостов, по сравнению с данными показателями в контрольной группе лиц.

Преобладающим нарушением в цитокинез-блокированных лимфоцитах больных исследуемых локализаций до начала нейтронной терапии были центромеро-негативные микроядра, которые являются следствием образования ацентрических фрагментов. Таким образом, у больных при сравнении с контролем не было обнаружено статистически значимых различий по частоте микроядер, но при этом у больных с МР РМЖ наблюдалась тенденция к повышению частоты центромеро-негативных и центромеро-позитивных микроядер, что, вероятно, является следствием перенесенных курсов химиотерапии и/или лучевой терапии.

Частота кластогенных и анеугенных событий в лимфоцитах больных злокачественными новообразованиями при нейтронной терапии. По данным интерфазного FISH-анализа в группе больных с МР РМЖ после 1-го сеанса нейтронной терапии в диапазоне полученных доз на очаг от 1,4 до 1,6 Гр

наблюдалось статистически значимое повышение частоты всех микроядер ($p=0,006$), в том числе и центромеро-негативных микроядер ($p=0,002$). После завершения нейтронной терапии в диапазоне полученных доз на очаг от 4,2 до 8,0 Гр наблюдалось статистически значимое увеличение частоты всех микроядер ($p=0,003$), центромеро-негативных ($p=0,001$) и центромеро-позитивных микроядер ($p=0,007$), а также нуклеоплазматических мостов ($p=0,043$) (табл. 4).

У больных ОГШ после первого сеанса нейтронной терапии в диапазоне полученных доз на очаг от 1,3 до 2,0 Гр наблюдалось статистически значимое увеличение частоты всех микроядер ($p=0,006$), центромеро-негативных микроядер ($p=0,005$) и нуклеоплазматических мостов ($p=0,05$). После завершения лучевого лечения быстрыми нейтронами в диапазоне полученных доз на очаг от 5,5 до 10,0 Гр было отмечено статистически значимое повышение частоты всех микроядер ($p=0,005$), центромеро-негативных ($p=0,001$) и центромеро-позитивных микроядер ($p=0,010$), а также нуклеоплазматических мостов ($p=0,043$) (табл. 5).

Преобладающими нарушениями в цитокinez-блокированных лимфоцитах больных с МР РМЖ и ОГШ были центромеро-негативные микроядра, частота которых статистически значимо повышалась как после первого сеанса, так и в конце нейтронной терапии ($p<0,05$). Такой тип микроядер является результатом образования ацентрических фрагментов хромосом, которые после прохождения митоза окружаются собственной мембраной (Mateuca et al., 2006).

Динамика образования центромеро-негативных микроядер отражает кластогенный эффект терапевтического нейтронного излучения у больных ЗНО изучаемых локализаций. Как было указано ранее, при цитогенетическом исследовании хромосомных aberrаций преобладающими нарушениями также являлись ацентрические парные фрагменты (табл. 2, 3), что демонстрирует общий механизм повреждения хромосомного аппарата клеток терапевтическим нейтронным излучением.

Таблица 4

Средняя частота ($\% \pm$ ст. ошибка) микроядер в лимфоцитах периферической крови у больных с МР РМЖ при нейтронной терапии

Исследуемая точка	До лечения	После 1-го сеанса НТ	После НТ
Диапазон терапевтических доз нейтронного излучения	-	1,4-1,6 Гр	4,2-8,0 Гр
Число исследованных клеток	12490	13200	12700
Общая частота микроядер	$0,95 \pm 0,18$	$1,52 \pm 0,15^*$	$2,70 \pm 0,73^*$
Центромеро-негативные микроядра	$0,63 \pm 0,13$	$1,23 \pm 0,12^*$	$2,02 \pm 0,59^*$
Центромеро-позитивные микроядра	$0,32 \pm 0,07$	$0,29 \pm 0,07$	$0,68 \pm 0,12^*$
Нуклеоплазматические мосты	$0,02 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,02^*$

Примечание: * - значимость различий с показателями до лечения, $p<0,05$

Таблица 5

Средняя частота (% $\pm$ ст. ошибка) микроядер в лимфоцитах периферической крови у больных ОГШ при нейтронной терапии

Исследуемая точка	До лечения	После 1-го сеанса НТ	После НТ
Диапазон терапевтических доз нейтронного излучения	-	1,3-2,0 Гр	5,5-10,0 Гр
Число исследованных клеток	16740	17400	16200
Общая частота микроядер	0,63 $\pm$ 0,04	1,28 $\pm$ 0,20*	1,58 $\pm$ 0,24*
Центромеро-негативные микроядра	0,43 $\pm$ 0,04	0,95 $\pm$ 0,14*	1,13 $\pm$ 0,15*
Центромеро-позитивные микроядра	0,20 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,06	0,44 $\pm$ 0,09*
Нуклеоплазматические мосты	0	0,05 $\pm$ 0,02*	0,05 $\pm$ 0,02*

Примечание: * - значимость различий с показателями до лечения, $p < 0,05$

Стоит отметить, что в конце терапии в обеих группах больных ЗНО наблюдалось статистически значимое увеличение частоты центромеро-позитивных микроядер (рис. 2). В большинстве случаев такие микроядра являются результатом отставания одной или нескольких хроматид/хромосом (Iarmarcovai et al., 2006; Silkworth et al., 2009).

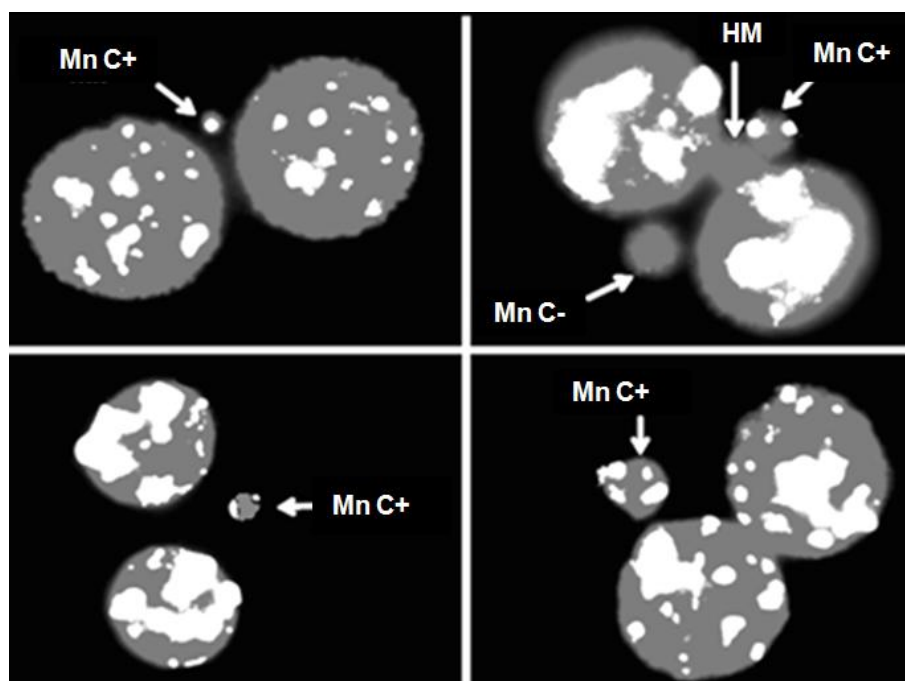


Рис. 2. Варианты распределения флуоресцентных сигналов панцентромерного ДНК-зонда, фиксируемые в цитокинез-блокированных лимфоцитах больных злокачественными новообразованиями после проведения нейтронной терапии.

Примечание: Mn C+ – центромеро-позитивные микроядра, Mn C- – центромеро-негативные микроядра, HM – нуклеоплазматические мосты.

Нарушения сегрегации хромосомного материала – одно из наиболее значительных последствий воздействия мутагенных факторов, приводящее к ошибкам распределения хромосом между дочерними клетками в процессе клеточного деления, что, в свою очередь, предопределяет возникновение дисбаланса по множеству генов (Duesberg et al., 2004; Torres et al., 2008).

Межгрупповой анализ цитогенетических эффектов в лимфоцитах больных местными рецидивами рака молочной железы и больных опухолями головы и шеи. По данным цитогенетического анализа, до лечения в лимфоцитах больных с МР РМЖ по сравнению с больными ОГШ наблюдалось статистически значимое увеличение частоты дицентрических ($p=0,042$) и кольцевых хромосом ($p=0,012$). Повышение частоты aberrаций обменного типа в лимфоцитах больных с МР РМЖ, по сравнению с больными ОГШ, до лечения быстрыми нейтронами отражает факт наличия модифицирующего цитогенетический эффект фона, которым может являться перенесенное раннее лучевое лечение.

У 6 из 12 (50 %) больных с МР РМЖ в анамнезе имеет место перенесенный курс дистанционной лучевой терапии. В этой связи для оценки мутагенных эффектов нейтронной терапии нами было проведено сравнение частот радиационно-индуцированных (за вычетом исходного уровня) цитогенетических нарушений и микроядер в лимфоцитах больных с МР РМЖ и больных ОГШ. Оказалось, что в группе больных с МР РМЖ, по сравнению с больными ОГШ, после первого сеанса имеется статистически значимое увеличение частоты только атипичных моноцентриков ($p=0,011$). Отсутствие различий по частоте других типов радиационно-индуцированных цитогенетических аномалий и микроядер после лечения в группах больных с МР РМЖ и ОГШ указывает, вероятно, на сопоставимые цитогенетические эффекты режимов нейтронной терапии у больных ЗНО исследованных локализаций.

Оценка связи активности репарационной системы и радиационно-индуцированного хромосомного дисбаланса в лимфоцитах больных злокачественными новообразованиями после нейтронной терапии. Детальное описание процессов пострадиационной репарации ДНК стало одним из наиболее важных достижений молекулярной радиобиологии конца XX века. Данные литературы убедительно свидетельствуют о значительной роли модификаций гистонов в устранении двунитевых разрывов ДНК (Фисанов и др., 2012; Jackson, 2002; Fisanov et al., 2011). Заключительным этапом настоящего исследования была оценка активности системы репарации ДНК и поиск возможной связи с радиационно-индуцированным хромосомным дисбалансом у больных с МР РМЖ и ОГШ.

У 4 больных с МР РМЖ и 7 больных ОГШ до лечения быстрыми нейтронами был исследован спонтанный уровень флуоресцентных фокусов белка репарации

γ H2AX в лимфоцитах периферической крови. В результате проведенного анализа активности репарационной системы было показано наличие обратной связи между уровнем спонтанных фокусов белка γ H2AX и выходом радиационно-индуцированных (за вычетом исходного уровня) aberrаций хромосомного типа в лимфоцитах периферической крови онкологических больных указанных локализаций ($R = -0,85$, $p < 0,01$) (рис. 3).

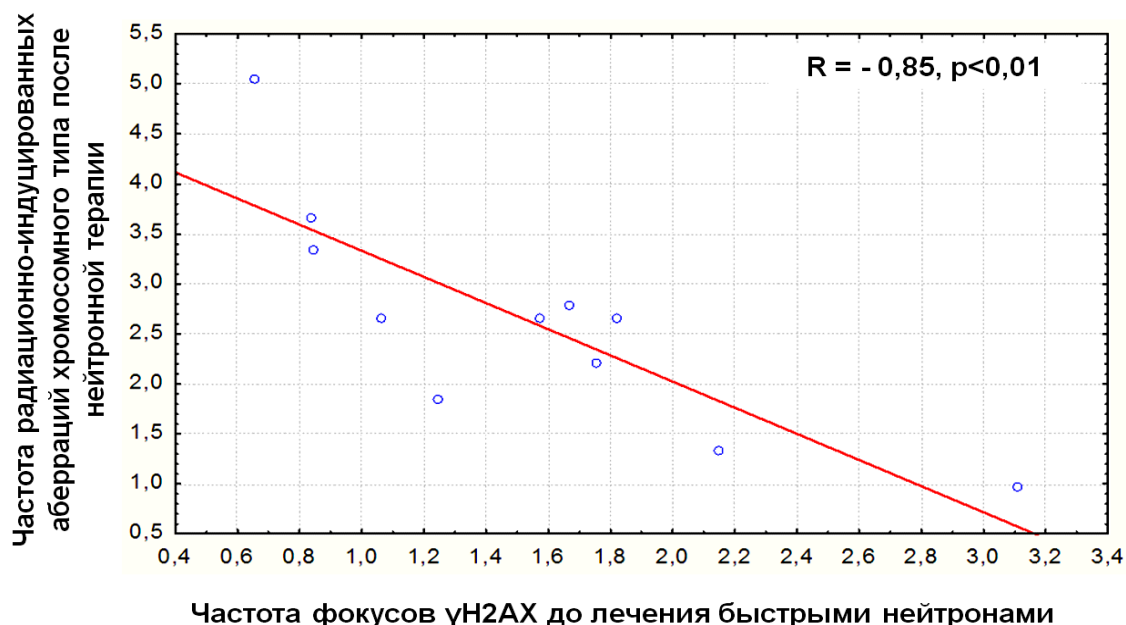


Рис. 3. Отрицательная корреляция спонтанного уровня фокусов γ H2AX и радиационно-индуцированных aberrаций хромосомного типа в лимфоцитах больных злокачественными новообразованиями.

В последние годы достаточно четко показано, что ранним этапом ответа клетки на возникновение радиационно-индуцированных разрывов ДНК является фосфорилирование гистона H2AX по серину 139, которое происходит в мегабазных доменах хроматина вблизи сайта повреждения (Фисанов и др., 2012). При этом природа появления эндогенных фокусов γ H2AX в необлученных клетках является малоизученной. Известно, что спонтанные фокусы γ H2AX могут представлять собой нерепарированные двунитевые разрывы ДНК, возникающие в результате воздействия окислительных агентов или других факторов внутренней среды организма (Markova et al., 2011). Высказывается предположение, что появление эндогенных фокусов γ H2AX является изменением в структуре хроматина в результате неправильной репарации или отсутствии репарации некоторых комплексных двунитевых разрывов ДНК.

Согласно нашим результатам, обнаруженная обратная связь между спонтанным уровнем фокусов γ H2AX и радиационно-индуцированными aberrациями хромосомного типа свидетельствует о потенциальной роли эндогенных фокусов γ H2AX в процессах адаптации клетки к воздействию

терапевтической радиации. В качестве гипотезы, объясняющей наблюдаемую связь параметров, можно предположить, что в необлученных клетках больных ЗНО исходно повышенный уровень фокусов γ H2AX может служить маркером высокой функциональной активности системы репарации радиационно-индуцированных повреждений ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа была направлена на исследование цитогенетических эффектов нейтронной терапии у больных местными рецидивами рака молочной железы и больных ЗНО головы и шеи. Выбор направления исследования был обусловлен, во-первых, высоким повреждающим потенциалом нейтронной терапии (Мусабаева, Лисин, 2008; Maor et al., 1995; Douglas et al., 2008), в связи с чем актуальными являются вопросы о повреждениях хромосомного материала в клетках нормальных тканей больных злокачественными новообразованиями при лечении быстрыми нейтронами. Во-вторых, в свете данных о радиационно-индуцированных цитогенетических нарушениях известно, что воздействие ионизирующих излучений может сопровождаться не только структурными, но и числовыми мутациями хромосом (Kirsch-Volders et al., 1996).

В ходе цитогенетического анализа был выявлен повышенный уровень хромосомных aberrаций у онкологических больных до лучевого лечения быстрыми нейтронами, по сравнению с контролем. Вероятной причиной увеличения частоты хромосомных аномалий в лимфоцитах больных ЗНО исследованных локализаций является наличие модифицирующих цитогенетический эффект фоновых факторов. Повышенный уровень хромосомных мутаций в лимфоцитах больных ЗНО может также служить индикатором общей геномной нестабильности соматических клеток. Было отмечено, что у больных с МР РМЖ до нейтронной терапии уровень двухударных aberrаций хромосомного типа (дицентрических и кольцевых хромосом) статистически значимо выше, чем у больных ОГШ.

Анализ частоты и спектра цитогенетических нарушений и микроядер в лимфоцитах больных с МР РМЖ и больных ОГШ в ходе лечения быстрыми нейтронами позволил выявить положительную динамику выхода стабильных и нестабильных aberrаций хромосом, а также центромеро-негативных микроядер. Кроме того, было впервые показано, что у больных исследуемых локализаций в конце лучевого лечения быстрыми нейтронами наблюдается повышение частоты центромеро-позитивных микроядер, которые отражают анеугенный эффект (Thierens et al., 2000). Радиационно-индуцированная анеуплоидия может быть следствием накопления продуктов окислительного стресса и их последующим влиянием на аппарат сегрегации хромосом. Таким образом, в настоящем исследовании впервые обнаружен анеугенный эффект терапевтического нейтронного излучения в условиях *in vivo*.

Для межгруппового сравнения влияния нейтронной терапии нами было проведено исследование радиационно-индуцированных хромосомных aberrаций и микроядер в лимфоцитах больных с МР РМЖ и больных ОГШ. В результате такого анализа не было выявлено статистически значимых различий по частоте цитогенетических аномалий, что, вероятно, указывает на сопоставимые цитогенетические эффекты режимов нейтронной терапии у больных ЗНО исследованных локализаций.

Заключительным этапом настоящего исследования было изучение активности репарационной системы у больных ЗНО. Показано наличие обратной корреляции между частотой флуоресцентных фокусов белка γ H2AX и уровнем радиационно-индуцированных aberrаций хромосомного типа ($R = -0,85$, $p < 0,01$). В качестве гипотезы, объясняющей наблюдаемую связь фокусов и радиационно-индуцированных aberrаций хромосом, можно предположить, что в необлученных клетках больных ЗНО исходно повышенный уровень фокусов γ H2AX может служить индикатором высокой функциональной активности работы системы репарации ДНК.

Таким образом, полученные в результате проведенного исследования данные позволяют сделать заключение о наличии кластогенного и анеугенного эффекта нейтронной терапии у больных с МР РМЖ и больных ОГШ. Было показано, что воздействие нейтронного излучения в терапевтических дозах вызывает образование широкого спектра aberrаций хромосом. При лечении быстрыми нейтронами наблюдается повышение частоты центромеро-негативных микроядер, отражающих кластогенный эффект изучаемого фактора, и центромеро-позитивных микроядер, которые являются результатом анеугенного эффекта. В настоящей работе показано, что лечение быстрыми нейтронами вызывает сходные цитогенетические эффекты у больных с МР РМЖ и больных ОГШ как по частоте, так и по спектру хромосомных мутаций. В исследовании впервые продемонстрирована связь активности репарационной системы с поддержанием целостности хромосомного материала у больных ЗНО в условиях воздействия терапевтического нейтронного излучения.

ВЫВОДЫ

1. Больные с местными рецидивами рака молочной железы и больные опухолями головы и шеи до нейтронной терапии характеризуются повышенным уровнем aberrантных метафаз в лимфоцитах периферической крови относительно здоровых индивидов.
2. Повышенный уровень хромосомных мутаций у больных с местными рецидивами рака молочной железы формируется за счет парных фрагментов ($p=0,004$), дицентрических хромосом ($p=0,028$) и хроматидных разрывов

($p=0,028$), а у больных опухолями головы и шеи за счет парных фрагментов ($p=0,021$) и хроматидных разрывов ($p=0,023$).

3. После первого сеанса нейтронной терапии в диапазоне полученных доз на очаг от 1,4 до 1,6 Гр у больных с местными рецидивами рака молочной железы наблюдается повышение частоты дицентрических хромосом, парных фрагментов, атипичных моноцентриков и центромеро-негативных микроядер ($p < 0,05$). У больных злокачественными новообразованиями головы и шеи после первого сеанса нейтронной терапии в диапазоне полученных доз на очаг от 1,3 до 2,0 Гр обнаруживается повышение частоты дицентрических хромосом, парных фрагментов, центромеро-негативных микроядер и нуклеоплазматических мостов ($p < 0,05$).
4. После завершения лечения быстрыми нейтронами у больных с местными рецидивами рака молочной железы и больных опухолями головы и шеи в диапазоне полученных доз от 4,2 до 8,0 Гр, и от 5,5 до 10,0 Гр, соответственно, повышается частота дицентрических хромосом, кольцевых хромосом, парных фрагментов, атипичных моноцентриков, центромеро-негативных, центромеро-позитивных микроядер и нуклеоплазматических мостов ($p < 0,05$).
5. Не выявлено различий по частоте радиационно-индуцированных aberrаций хромосом у больных с местными рецидивами рака молочной железы и больных опухолями головы и шеи в течение курса нейтронной терапии.
6. Выявлена обратная зависимость частоты радиационно-индуцированных aberrаций хромосомного типа у больных после нейтронной терапии от уровня фокусов белка репарации γH2AX до лечения.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. **Мельников А.А.,** Великая В.В., Уразова Л.Н., Мусабаева Л.И., Лебедев И.Н., Чойнзонов Е.Л. Цитогенетические эффекты лучевой терапии у больных злокачественными новообразованиями // Медицинская генетика. – 2011. – Т. 10, № 12 (114). – С. 3–12.
2. **Melnikov A.A.,** Vasilyev S.A., Musabaeva L.I., Velikaya V.V., Gribova O.V., Startseva Zh.A., Urazova L.N., Lebedev I.N., Choynzonov E.L. Cytogenetic effects of neutron therapy in patients with parotid gland tumors and relapse of breast cancer // Experimental oncology. – 2012. – V. 34 (4), – P. 354–357.
3. **Мельников А.А.,** Васильев С.А., Смольникова Е.В., Уразова Л.Н., Мусабаева Л.И., Великая В.В., Грибова О.В., Лебедев И.Н., Чойнзонов Е.Л., Старцева Ж.А. Динамика хромосомных aberrаций и микроядер в лимфоцитах больных злокачественными новообразованиями при нейтронной терапии // Сибирский онкологический журнал. – 2012. – Т. 10, № 4 (52). – С. 52–57.

4. Мусабаева Л.И., Лисин В.А., Старцева Ж.А., Грибова О.В., Великая В.В., **Мельников А.А.** Нейтронная терапия на циклотроне U-120 Национального исследовательского политехнического университета. К 30-летию применения нейтронной терапии - обзор результатов научных исследований // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2013. – Т. 58, № 2. – С. 53–61.
5. Мусабаева Л.И., Великая В.В., **Мельников А.А.**, Лебедев И.Н., Васильев С.А. Лучевые реакции нормальных тканей и анализ хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови онкологических больных после нейтронной терапии // Материалы Невского радиологического форума, г. Санкт-Петербург, 2-5 апреля 2011 г., С. 159–160.
6. Смольникова Е.В., **Мельников А.А.**, Васильев С.А. Частота микроядер в лимфоцитах периферической крови как маркер степени повреждения нормальных тканей у больных раком молочной железы в ходе прохождения нейтронной терапии // Материалы Невского радиологического форума, г. Санкт-Петербург, 2-5 апреля 2011 г., С. 222.
7. **Мельников А.А.**, Великая В.В. Исследование цитогенетических эффектов нейтронной терапии у больных злокачественными новообразованиями // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – Приложение 1. – С. 78–79.
8. Смольникова Е.В., **Мельников А.А.**, Васильев С.А. Кластогенный и анеугенный эффекты действия ионизирующего излучения в лимфоцитах периферической крови онкологических больных в ходе нейтронной терапии // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – Приложение 1. – С. 107–108.
9. Смольникова Е.В., **Мельников А.А.**, Васильев С.А., Лебедев И. Н. Потеря ацентрических фрагментов и целых хромосом в лимфоцитах периферической крови онкологических больных в ходе нейтронной терапии // Вопросы онкологии. – 2011. – Приложение 1. – С. 59–60.
10. **Мельников А.А.**, Смольникова Е.В., Великая В.В., Грибова О.В., Васильев С.А., Мусабаева Л.И., Лебедев И.Н. Хромосомный и цитомный анализ лимфоцитов больных злокачественными новообразованиями слюнных желез и молочной железы при нейтронной терапии // Генетика человека и патология. Актуальные вопросы современной цитогенетики: сборник научных трудов / Под ред. В.П. Пузырёва. Вып. 9. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура» 2011. – С. 148–149.
11. **Мельников А.А.**, Васильев С.А., Смольникова Е.В., Грибова О.В., Великая В.В., Мусабаева Л.И., Уразова Л.Н., Лебедев И.Н., Чойнзонов Е.Л. Частота aberrаций хромосомного и хроматидного типа в лимфоцитах больных опухолями слюнных желез при нейтронной терапии // Тезисы 8 Российской конференции по фундаментальной онкологии, г. Санкт-Петербург, 20 апреля 2012 г., С. 92–94.

12. **Мельников А.А.,** Васильев С.А., Грибова О.В., Великая В.В. Цитогенетические эффекты нейтронной терапии у больных рецидивами рака молочной железы и опухолями слюнных желез // Сибирский онкологический журнал. – 2012. – Приложение 1. – С. 106–107.
13. **Мельников А.А.,** Васильев С.А., Уразова Л.Н., Мусабаева Л.И., Великая В.В., Смольникова Е.В., Грибова О.В., Старцева Ж.А., Лебедев И.Н., Чойнзонов Е.Л. Современные технологии биоиндикации цитогенетических эффектов нейтронной терапии у больных злокачественными новообразованиями // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / Под ред. А.Б. Масленникова.-Вып.18. – Новосибирск: «НСК Регион», 2012. – С. 82–89.
14. **Melnikov A.A.,** Vasilyev S.A., Smolnikova E.V., Urazova L.N., Musabaeva L.I., Velikaya V.V., Gribova O.V., Lebedev I.N., Choynzonov E.L. Cytogenetic abnormalities in peripheral blood lymphocytes of patients with malignant salivary gland tumors during neutron therapy // European Journal of Human Genetics. – 2012. – V. 20, Suppl. 1. – P. 124.
15. **Мельников А.А.,** Васильев С.А., Уразова Л.Н., Мусабаева Л.И., Великая В.В., Смольникова Е.В., Грибова О.В., Старцева Ж.А., Лебедев И.Н., Чойнзонов Е.Л. Мутагенный эффект нейтронной терапии у больных злокачественными новообразованиями различных локализаций // Материалы II научно-практической конференции с международным участием «Естественные науки: достижения нового века», Шарджа (ОАЭ), 10-12 августа 2012 г., С. 43.
16. Грибова О.В., Мусабаева Л.И., **Мельников А.А.,** Чойнзонов Е.Л., Лебедев И.Н. Результаты лечения и биоиндикация цитогенетических эффектов у больных раком слюнных желез при терапии быстрыми нейтронами // Материалы научно-практической конференции (с международным участием) «Современные технологии лучевой терапии», Санкт-Петербург, 25-26 октября 2012 г., С. 25.
17. **Мельников А.А.,** Васильев С.А., Мусабаева Л.И., Великая В.В., Грибова О.В., Уразова Л.Н., Старцева Ж.А., Лебедев И.Н., Чойнзонов Е.Л. Индикация цитогенетических нарушений в лимфоцитах периферической крови больных злокачественными новообразованиями при лечении быстрыми нейтронами // Тюменский медицинский журнал. – 2012. – № 4. – С. 76–78.
18. **Melnikov A.A.,** Vasilyev S.A., Musabaeva L.I., Velikaya V.V., Gribova O.V., Urazova L.N., Lebedev I.N., Choynzonov E.L. Frequency and spectrum of chromosome aberrations and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of patients with head and neck tumors and relapse of breast cancer during the course of neutron therapy // European Journal of Human Genetics. – 2013. – V. 21, Suppl. 2. – P. 300.