

В.Ю. Нугис, Т.А. Астрелина, В.А. Никитина, М.Г.Козлова, И.В. Кобзева, Е.Е. Ломоносова, Ю.Б. Сучкова, Д.Ю. Усупжанова, В.А. Брунчуков, А.А. Расторгуева, Т.Ф. Маливанова, В.А. Брумберг, Т.В. Карасева, Е.С. Любаева, Д.Ю. Бобров, Н.Г. Степанянц, М.Ю. Сухова, А.С. Самойлов

## Трёхцветный FISH-метод: транслокации в культурах лимфоцитов периферической крови до и после локального гамма-облучения по поводу рака молочной железы

Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

Контактное лицо: Нугис Владимир Юрьевич, E-mail: nugisvju@list.ru

### РЕФЕРАТ

**Цель:** Изучение выхода хромосомных aberrаций с помощью трёхцветного FISH-метода в культурах лимфоцитов периферической крови пациентов с раком молочных желёз до и после локального облучения.

**Материал и методы:** Использовалась венозная кровь 24 пациенток в возрасте от 33 до 79 лет, страдавших от рака левой или правой молочной железы, которым была проведена секторальная или радикальная резекция поражённого органа с последующей локальной адьювантной дистанционной лучевой терапией (ДЛТ) на область рубца. Также ей могла предшествовать адьювантная полихимиотерапия (ПХТ). Для локального облучения использовался линейный ускоритель системы Trilogy на основе платформы Clinac X. СОД была установлена на уровне 50 Гр за 25 фракций (ежедневно по 2 Гр). Забор крови старались производить до ПХТ и/или ДЛТ и через 1 и/или 3 месяца после облучения. Для трёхцветного FISH-окрашивания применялся набор ДНК-зондов к 1, 4 и 12 парам хромосом.

**Результаты:** Уровни транслокаций, дицентриков и ацентриков (на 100 клеток) в культурах лимфоцитов периферической крови пациенток до ДЛТ статистически существенно не различались при проведении ПХТ и без неё, равняясь в среднем  $0,63 \pm 0,10$ ;  $0,10 \pm 0,04$  и  $0,17 \pm 0,06$  соответственно. После радиационной терапии частоты этих перестроек хромосом значимо параллельно возрастали в среднем до  $4,62 \pm 0,46$ ;  $1,48 \pm 0,19$  и  $0,95 \pm 0,14$  при этом различия между 1 и 3 мес взятия материала после облучения отсутствовали. Одна из больных в отличие от остальных была цитогенетически обследована спустя 11 лет после аналогичного локального воздействия, и частоты транслокаций и дицентриков у неё в культуре лимфоцитов равнялись  $4,56$  и  $0,19$  (на 100 клеток) соответственно, тогда как у остальных пациенток они варьировали от 1,63 до 10,00 для транслокаций и от 0,27 (0 у одной пациентки) до 4,06 для дицентриков.

**Заключение:** При использовании трёхцветной FISH-методики после ДЛТ по поводу рака молочной железы наблюдалось значимое возрастание частот транслокаций, дицентриков и ацентриков в культурах лимфоцитов периферической крови. При этом транслокаций было больше, чем дицентриков и, судя по всему, они длительное время сохраняются на первоначальном уровне. После ДЛТ по поводу рака молочной железы частота транслокаций на 1 клетку с транслокациями в культурах лимфоцитов периферической крови в большей части случаев превышает 1. Корреляция между физическими средними дозами на всё тело и цитогенетическими оценками у отдельных больных была статистически несущественной.

**Ключевые слова:** культура лимфоцитов периферической крови, трёхцветный FISH-метод, транслокации, рак молочной железы, локальное гамма-облучение

**Для цитирования:** Нугис В.Ю., Астрелина Т.А., Никитина В.А., Козлова М.Г., Кобзева И.В., Ломоносова Е.Е., Сучкова Ю.Б., Усупжанова Д.Ю., Брунчуков В.А., Расторгуева А.А., Маливанова Т.Ф., Брумберг В.А., Карасева Т.В., Любаева Е.С., Бобров Д.Ю., Степанянц Н.Г., Сухова М.Ю., Самойлов А.С. Трёхцветный FISH-метод: транслокации в культурах лимфоцитов периферической крови до и после локального гамма-облучения по поводу рака молочной железы // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2022. Т. 67. № 4. С. 62–68. DOI: 10.33266/1024-6177-2022-67-4-62-68

## Three-Color FISH Method: Translocations in Peripheral Blood Lymphocytes Cultures before and after Local Gamma Radiation for Breast Cancer

V.Yu. Nugis, T.A. Astrelina, V.A. Nikitina, M.G. Kozlova, I.V. Kobzeva, E.E. Lomonosova, Yu.B. Suchkova, D.Yu. Usupzhanova, V.A. Brunchukov, A.A. Rastorgueva, T.F. Malivanova, V.A. Brumberg, T.V. Karaseva, E.S. Lyubaeva, D.Yu. Bobrov, N.G. Stepanyants, M.Yu. Sukhova, A.S. Samoilov

A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA of Russia, Moscow, Russia

Контактное лицо: Nugis V.Yu., E-mail: nugisvju@list.ru

### ABSTRACT

**Purpose:** Study of chromosomal aberration yields with a three-color FISH method in the peripheral blood lymphocyte cultures of patients with breast cancer before and after local irradiation.

**Material and methods:** Venous blood was obtained from 24 patients aged from 33 to 79 years which suffering from cancer of the left or right breast after the implementation of a sectoral or radical resection of an affected organ with subsequent local adjuvant distant radiation therapy (DRT) to the scar area. Also it could be preceded by adjuvant polychimotherapy (PCT). A linear accelerator of the Trilogy system based on the Clinac iX platform was used for local irradiation. SOD was installed at 50 Gy per 25 fractions (daily 2 Gy). Venous blood sampling produced to PCT and/or DRT and after 1 and/or 3 months after irradiation. A set of DNA probes to 1, 4 and 12 pairs of chromosomes was used for three-color FISH staining.

**Results:** Levels of translocations, dicentrics and acentrics (per 100 cells) in peripheral blood lymphocyte cultures of patients up to DRT did not differ significantly with and without PCT and were amounted to average  $0.63 \pm 0.10$ ;  $0.10 \pm 0.04$  and  $0.17 \pm 0.06$ , respectively. The frequency of these chromosome rearrangements significantly increased after radiation therapy by an average of up to  $4.62 \pm 0.46$ ;  $1.48 \pm 0.19$  and  $0.95 \pm 0.14$ . The differences between 1 and 3 months of taking material after irradiation were absent. One of the patients, unlike the rest, was cytogenetically examined 11 years after a similar local irradiation, and the frequencies of translocations and dicentrics in her lymphocyte culture were 4.56 and 0.19 (per 100 cells), respectively, while they were varied from 1.63 to 10.00 for translocations and from 0.27 (0 in one patient) to 4.06 for dicentrics for other patients.

**Conclusion:** When using a three-color FISH method there was a significant increase in the frequencies of translocations, dicentric and acentric in peripheral blood lymphocyte cultures of patients after DRT of breast cancer. At the same time there were more translocations than dicentric and, apparently, they remain at the initial level for a long time. The frequency of translocations per 1 cell with translocations in the peripheral blood lymphocyte cultures in most cases exceeds 1 after local DRT of the breast cancer. The correlation between average physical doses to the whole body and cytogenetical estimates in individual patients was statistically insignificant.

**Keywords:** *peripheral blood lymphocytes culture, three-color FISH method, translocations, breast cancer, local gamma-irradiation*

**For citation:** Nugis VYu, Astrelina TA, Nikitina VA, Kozlova MG, Kobzeva IV, Lomonosova EE, Suchkova YuB, Usupzhanova DYU, Brunchukov VA, Rastorgueva AA, Malivanova TF, Brumberg VA, Karaseva TV, Lyubaeva ES, Bobrov DYU, Stepanyants NG, Sukhova MYu, Samoilov AS. Three-Color FISH Method: Translocations in Peripheral Blood Lymphocytes Cultures before and after Local Gamma Radiation for Breast Cancer. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2022;67(4):62-68. DOI: 10.33266/1024-6177-2022-67-4-62-68

## Введение

Случайное радиационное воздействие в зависимости от распределения поглощенной дозы по телу пострадавшего может быть разделено на (относительно) равномерное и (существенно) неравномерное. Последнее в своем крайнем варианте, когда определенная часть организма облучена в какой-либо дозе, а остальная часть вообще остается необлученной, обозначается как парциальное. При планировании терапии и лечении пострадавших необходимо идентифицировать и различать эти состояния. Для этого в разделе биологической индикации дозы были предложены некоторые подходы, в основе которых лежит цитогенетическое исследование культур лимфоцитов периферической крови. С помощью этих методик реально осуществлять качественную дифференцировку между однородным и неоднородным воздействием радиации, производить до некоторой степени дозиметрическую оценку острого парциального воздействия (методы Dolphin и Qdr) или оценивать распределение доз по массе тела при тотальном облучении [1, 2]. В то же время для выявления возможностей цитогенетических и примыкающих к ним молекулярно-генетических методов уже достаточно давно в качестве модели случайного локального облучения исследовали случаи его использования в клинической практике для терапии солидных новообразований в различных регионах тела человека. Такие лечение и указанные обследования производились по поводу опухоли мочевого пузыря, шейки и тела матки, яичников, тестикул, простаты, живота, костей, молочных желез, гортани, легких, ротоглотки, носоглотки, головы и шеи, головного мозга [3-18]. При этом, если первоначально применяли только метод классической (однородной, стандартной, рутинной) окраски, то появление новых технологий привело к их использованию в подобных ситуациях (FISH-метод, микроядерный и цитомный тесты с панцентромерным FISH-окрашиванием и без этой процедуры, сестринские хроматидные обмены, преждевременная конденсация хромосом, анализ фокусов  $\gamma$ -H2AX) (см. [4-6]). В работе [4] также высказывается мысль, что регистрация увеличенных частот цитогенетических нарушений у больных онкологическими заболеваниями после однотипной терапии с помощью локального облучения может служить критерием для формирования групп пациентов с повышенной радиочувствительностью и соответствующим риском развития отдаленных последствий.

В то же время следует констатировать, что в настоящее время в рассматриваемой области в целом количество исследований с применением классической методики превышает число работ с использованием других подходов. Это обусловлено не только временным фактором более раннего ее появления, но и наличием определенных научно-экспериментальных разработок для оценки величины дозы и объема облученной ткани при парциальном воздействии радиации, о чем говорилось выше. Однако, цитогенетический анализ с помощью стандартного окрашивания позволяет выявлять в основном аберрации нестабильного типа, из которых дицентрики и центриче-

ские кольца являются основными индикаторами радиационного воздействия и имеют тенденцию элиминировать с течением времени, т.к. представляют механическое препятствие для нормального протекания митоза. Наоборот, FISH-окрашивание позволяет идентифицировать реципрокные транслокации и инсерции (вставки), которые относятся к аберрациям хромосом другого, стабильного, типа и сами по себе теоретически должны сохраняться в организме длительное время. Поэтому данный подход и был предложен для ретроспективной оценки дозы [1]. Наиболее распространенным на практике является одноцветный вариант методики, который основан на использовании наборов олигонуклеотидных ДНК-зондов, в своей совокупности комплементарных целой ДНК (обычно) 2-3 пар хромосом, причем к этим фрагментам ДНК присоединен только один какой-либо флуоресцентный краситель. На самом деле все хромосомы в метафазе окрашены и другой флуоресцентной краской, но уже без ДНК-зондов, что обозначается как контролокрашивание. В основе регистрации хромосомных перестроек лежит обнаружение с помощью применения различных флуоресцентных фильтров двуцветных структур, состоящих из FISH- и контролокрашенных участков. В настоящей же работе для учета хромосомных аберраций в культурах лимфоцитов периферической крови у пациенток с локальным облучением по поводу рака молочных желез была использована, так называемая, трехцветная FISH-методика, когда каждая из трех выбранных пар хромосом может быть идентифицирована с помощью ДНК-зондов, несущих различные флуоресцентные красители. Таким образом, возникает возможность выявлять перестройки не только между FISH- и контролокрашенными хромосомами, но и между самими FISH-окрашенными хромосомами.

## Материал и методы

Материалом цитогенетических исследований служила венозная кровь 24 пациенток в возрасте от 33 до 79 лет, страдавших от рака левой или правой молочных желез, которым была проведена секторальная или радикальная резекция пораженного органа с последующей локальной адьювантной дистанционной лучевой терапией (ДЛТ) на область рубца. Также ей могла предшествовать адьювантная полихимиотерапия (ПХТ). В ряде случаев воздействие радиации осуществлялось на фоне гормональной терапии (ГТ). Эти данные представлены в табл. 1, как и стадия заболевания по классификации TNM. Также в ней приведены вес (В, кг) и рост (Р, см) пациенток, необходимые для расчета площади поверхности тела (ППТ, м<sup>2</sup>) по формуле Мостеллера (Mosteller):  $ППТ = (В \times Р)^{0,725} / 60$ . Общий объем тела (ООТ, л) определяли по еще одной формуле:  $ООТ = ППТ \times (51,44 \times В/Р + 15,3)$  [10]. Для локального облучения использовался линейный ускоритель системы Trilogy на основе плагформы Clinac iX. СОД была установлена на уровне 50 Гр за 25 фракций (ежедневно по 2 Гр). В табл. 1 показан объем целевого участка и средняя доза на него. Средняя физическая доза на все тело была получена путем умножения этих двух показателей с последующим делением на общий объем тела.

Таблица 1

**Индивидуальные характеристики пациентов, больных раком молочной железы, и осуществлённого лечения, включая адъювантную дистанционную лучевую терапию (ДЛТ) Individual characteristics of patients with breast cancer, and implemented treatment including distance radiation therapy (DRT)**

№ п/п	Код пациентки	Возраст, лет	Рост, см	Вес, кг	Локализация опухоли и стадия заболевания по классификации TNM	Наличие химио- или гормональной терапии	Общая поверхность тела, м <sup>2</sup>	Общий объём тела, л	Объём целевого участка тела, л	Средняя доза на целевой участок тела, Гр	Средняя доза на всё тело, Гр	Примечания
1	T-01	58	170	97	левая железа, рT <sub>1c</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> , ШВст.	нет	2,14	95,56	26,52	5,36	1,49	
2	T-01-К	39	158	59	левая железа, сT <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> II ст.	ПХТ: АС; АГ	1,61	55,53	20,49	4,92	1,81	
3	T-02-К	44	170	60	левая железа, рT <sub>1c</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	ГТТ	1,68	56,31	21,88	4,88	1,90	
4	T-03	49	163	89	правая железа, рT <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> ПА ст.	ГТ	2,01	87,10	34,49	6,71	2,66	
5	T-05	74	158	95	левая железа, рT <sub>4b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> ШВ ст.	ПХТ: АС+Р	2,04	94,40	29,92	5,58	1,77	
6	T-05-К	59	164	71	левая железа, рT <sub>1c</sub> pN <sub>0</sub> M <sub>0</sub> IA ст.	нет	1,80	67,57	27,81	5,45	2,24	
7	T-06-К	67	167	71	правая железа, рT <sub>1c</sub> N <sub>2a</sub> M <sub>0</sub>	ПХТ: АС	1,82	67,46				
8	T-07	44	176	61	правая железа, рT <sub>1c</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	ПХТ	1,73	57,31	19,59	4,51	1,54	
9	T-07-К	45	161	57	левая железа, рT <sub>1b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> IB ст.	ГТ	1,60	53,50	21,15	4,51	1,78	
10	T-08	35	160	50	левая железа, рT <sub>2</sub> pN <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	ПХТ	1,49	46,77	20,15	3,42	1,48	
11	T-09	70	150	65	правая железа, рT <sub>1b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> I ст.	нет	1,65	61,86	23,03	6,87	2,56	
12	T-09-К	73	170	102	левая железа, T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> ПА ст.	ГТ	2,20	101,32	34,73	7,75	2,66	
13	T-10	59	164	72	правая железа, рT <sub>1c</sub> pN <sub>0</sub> M <sub>0</sub> IA ст.	ГТ	1,81	68,61	21,22	6,29	1,95	Первично-множественный синхронный рак: рак левой железы без ДЛТ (секторальная резекция)
14	T-10-К	33	165	69	левая железа, рT <sub>1c</sub> pN <sub>0</sub> M <sub>0</sub> IA ст.	ПХТ: АС; ГТ	1,78	65,46	20,88	5,29	1,69	
15	T-11	63	168	93	левая железа, рT <sub>1c</sub> pN <sub>0</sub> M <sub>0</sub> IA	ДЛТ нет						Первично-множественный метастатический рак: правая железа I I лет назад (радикальная резекция, ПХТ, ДЛТ)
16	T-11-К	50	170	82	правая железа, рT <sub>1c</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> IA ст.	ПХТ: ТСН	1,97	78,93	26,08	7,76	2,56	
17	T-12-К	79	168	94	левая железа, рT <sub>1b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> IA ст.	ПХТ: АС; ГТ	2,09	92,33	36,65	6,28	2,49	
18	T-13	60	163	78	левая железа, рT <sub>1c</sub> pN <sub>0</sub> M <sub>0</sub> IA ст.	нет	1,88	75,01	34,09	6,85	3,11	
19	T-14	52	170	88	левая железа, рT <sub>1c</sub> pN <sub>0</sub> M <sub>0</sub> IA ст.	ПХТ: АС+Р	2,04	85,47	31,18	5,65	2,06	
20	T-14-К	38	160	80	правая железа, рT <sub>1c</sub> pN <sub>0</sub> M <sub>0</sub> ПА ст.	ПХТ: АС; ГТ	1,89	77,35	31,84	7,23	2,98	
21	T-15	60	167	67	левая железа, рT <sub>1c</sub> pN <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	ПХТ: АС; ГТ	1,76	63,36	26,64	6,14	2,58	
22	T-15-К	36	175	73	правая железа, рT <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	ПХТ: АС+Г	1,88	69,24	20,33	6,80	2,00	
23	T-16	60	164	74	правая железа, рT <sub>1c</sub> pN <sub>0</sub> M <sub>0</sub> ПА ст.	ПХТ: АС; ГТ	1,84	70,71	24,87	3,89	1,37	
24	T-16-К	69	163	65	левая железа, рT <sub>1b</sub> pN <sub>0</sub> M <sub>0</sub> IA ст.	ГТ	1,72	61,44	22,01	6,70	2,40	

**Примечание** – АС – доксорубин + циклофосфамид; Р – паклитаксел; ЕС – эпирубин + циклофосфамид; ТСН – доцетаксел (такотер) + циклофосфамид + трастузумаб (герцептин); АС+Г – доксорубин + циклофосфамид + доцетаксел (такотер).



Кровь забирали до терапевтического облучения и после него главным образом через 1 и/или 3 мес. Постановку культур лимфоцитов периферической крови и приготовление препаратов хромосом осуществляли в соответствии с принятыми в лаборатории методиками, описанными ранее [19]. При выполнении трехцветного FISH-метода окрашивания хромосом использовали готовые наборы ДНК-зондов к целым хромосомам №№ 1, 4, 12 (XCP—chromosome painting probe – ProbeMix, Customized 3 colors; контркраситель – DAPI) фирмы «MetaSystems» (Германия). При обработке и окраске препаратов хромосом руководствовались прилагаемой к набору фирменной инструкцией. С помощью системы «Метафер 4» (фирма «МетаСистемс», Германия) производился автоматический поиск метафаз на препаратах и их фотографирование с использованием различных световых фильтров. Во время цитогенетического анализа отбирали метафазы с квазидиплоидным числом хромосом (40-46) и полным набором всех FISH-окрашенных хромосом с учетом всей их суммарной длины. Соответственно в конечный расчет вошли только перестройки хромосомного типа, в продукции которых участвовали FISH-окрашенные регионы, за исключением терминальных делеций. Дифференциация на стабильные и нестабильные клетки не проводилась. При регистрации aberrаций хромосом использовали традиционную терминологию: все полные и неполные транслокации, инверсии, инсерции, дицентрики, центрические кольца, ацентрики (парные фрагменты и ацентрические кольца).

Для статистической обработки полученных результатов (сравнение средних и регрессионный анализ) использовали пакет программ Statistica 6. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Критической величиной уровня значимости считали  $p = 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В табл.2 приведены результаты цитогенетического FISH-анализа культур лимфоцитов периферической крови указанных пациенток. Хотя старались, чтобы имелись результаты как до проведения ДЛТ, так и после нее (1 и/или 3 мес), однако в ряде случаев из-за плохого роста клеток в культурах лимфоцитов не удавалось проанализировать статистически значимое количество метафазных пластинок. Следует обратить внимание, что одна пациентка (Т-11) страдала от первично-множественного метастазного рака, поразившего обе грудные железы в разное время. По поводу рака правой железы ей примерно 11 лет назад была проведена радикальная резекция с последующими ПХТ и ДЛТ, точные подробности которых нам не известны. Лечение рака левой железы было выполнено только хирургическим путем. Таким образом, оказалось, что у нее цитогенетическое обследование произошло спустя больше 10 лет после локального радиационного воздействия. Также в культурах лимфоцитов периферической крови пациентки Т-05 был обнаружен клеточный клон с транслокацией (1;14?), количественный объем которого составлял до ПХТ и ДЛТ 10 клеток, после ПХТ до ДЛТ – 1 клетку и после ДЛТ – 7 клеток. В суммарное число транслокаций все они не были включены. Клиническое значение этой находки остается не ясным.

Для оценки влияния ПХТ на уровни aberrаций хромосом было проведено их сравнение у разных лиц до и после указанной процедуры. Всего ПХТ была выполнена у 13 человек (без учета пациентки Т-11), а у 10 пациенток ее не включили в процедурный план. Однако только у больных Т-05, Т-15-К и Т-16 имелись одновременно соответствующие цитогенетические данные. Сравнение по непараметрическому критерию Вилкоксона с попарно связанными вариантами продемонстрировало отсутствие

значимых различий у этих трех пациенток между частотами транслокаций ( $p = 1,000$ ), дицентриков ( $p = 0,285$ ) и ацентриков ( $p = 0,593$ ). Статистическая обработка с помощью тоже непараметрического U-критерия Манна-Уитни с принятием в расчет результатов цитогенетического анализа культур лимфоцитов периферической крови всех пациенток также не обнаружила существенной разницы до и после ПХТ как для транслокаций ( $p = 0,831$ ), так и для дицентриков ( $p = 0,303$ ) и ацентриков ( $p = 0,570$ ). При отсутствии данных об исходном (до ДЛТ) уровне хромосомных повреждений для выявления его истинной радиационно-индуцированной величины после ДЛТ использовались соответствующие средние значения для групп с и без проведенной ПХТ, которые составляли  $0,67 \pm 0,13$  и  $0,67 \pm 0,12$  для транслокаций,  $0,03 \pm 0,02$  и  $0,13 \pm 0,06$  для дицентриков и  $0,13 \pm 0,05$  и  $0,20 \pm 0,10$  для ацентриков.

В проведенном ранее исследовании средняя частота транслокаций (на 100 клеток) в контрольном контингенте равнялась  $0,28 \pm 0,16$  [20]. Уровень тех же aberrаций у пациенток до проведения ДЛТ был статистически несколько выше и составлял в среднем  $0,63 \pm 0,10$  ( $p = 0,045$  по критерию Манна-Уитни). Тот же показатель после ДЛТ значимо вырос примерно в 7,3 раза до  $4,62 \pm 0,46$  ( $p < 0,000001$ ), что существенно (в 16,5 раз) больше контрольных значений ( $p = 0,00018$ ). Средние же частоты (на 100 клеток) дицентриков и ацентриков у лиц из контрольной группы из той же работы [20] составили соответственно  $0,015 \pm 0,015$  и  $0,07 \pm 0,05$  и статистически не отличались от частот этих aberrаций у пациенток до ДЛТ:  $0,10 \pm 0,04$  ( $p = 0,301$ ) и  $0,17 \pm 0,06$  ( $p = 0,317$ ). После ДЛТ частоты указанных нестабильных aberrаций увеличились в среднем до  $1,48 \pm 0,19$  и  $0,95 \pm 0,14$  соответственно, что привело к существенным отличиям как с контролем ( $p = 0,00035$  и  $p = 0,00115$ ), так и с уровнями у пациенток до ДЛТ ( $p = < 0,000001$  и  $p = 0,000015$ ).

Следует отметить, что частоты транслокаций и дицентриков в лимфоцитах пациентки Т-11, которая была обследована спустя 11 лет после локального терапевтического облучения, равнялись  $4,56$  и  $0,19$  (на 100 клеток) соответственно. У других больных через 1-3 месяца после подобного радиационного воздействия уровни aberrаций (на 100 клеток) варьировали от  $1,63$  до  $10,00$  для транслокаций и от  $0,27$  (0 был у одной пациентки с небольшим числом просмотренных метафаз) до  $4,06$  для дицентриков. Таким образом, по-видимому, можно признать, что в отдаленные сроки весьма велика вероятность, что количество транслокаций (стабильный во времени тип aberrаций хромосом) практически не изменилось, тогда как число дицентриков (нестабильный тип aberrаций хромосом) уменьшилось.

При вычитании уровня aberrаций хромосом до ДЛТ (с проведением ПХТ или без нее) из его наблюдаемой величины после осуществления этой процедуры количество радиационно-индуцированных дицентриков было статистически существенно ниже, чем аналогичное число транслокаций:  $p = 0,0037$  и  $p = 0,0015$  для обследованных спустя 1 и 3 месяца соответственно. Это согласуется с данными работы [15], в которой с помощью одноцветного FISH-окрашивания осуществлялся цитогенетический анализ культур лимфоцитов периферической крови пациентов, подвергшихся локальному терапевтическому облучению по поводу раков различной локализации.

Сравнение радиационно-индуцированных частот транслокаций через 1 и 3 месяца после ДЛТ продемонстрировало отсутствие статистически существенных различий между этими двумя сроками как при использовании критерия Вилкоксона для попарно связанных вариантов, когда у одной и той же пациентки имелись ре-

зультаты обоих цитогенетических анализов ( $p = 0,753$ ), так и при применении U-критерия Манна-Уитни на материале всех больных в совокупности ( $p = 0,624$ ). Это позволяет оценку дозы производить по средней частоте транслокаций для обоих временных интервалов (там, где они были). Одновременно частоты дицентриков и ацентриков также значимо не различались при обследовании в указанные сроки после ДЛТ (критерий Вилкоксона для парно связанных вариантов:  $p = 0,173$  и  $p = 0,463$ ; критерий Манна-Уитни:  $p = 0,0502$  и  $p = 0,624$  соответственно).

Для цитогенетической оценки средней дозы на лимфоциты использовали полученное ранее уравнение зависимости доза-эффект для частот транслокаций, выявленных с помощью трехцветного FISH-окрашивания, после гамма-облучения крови здоровых доноров *in vitro* [20]. Ее единственной модификация состояла в исключении свободного члена, характеризующего спонтанную частоту aberrаций хромосом, после чего оно приняло следующий вид:

$$Y = (1,19 \pm 1,69) \times D + (2,31 \pm 0,24) \times D^2,$$

где Y – частота радиационно-индуцированных транслокаций (на 100 клеток), D – доза, Гр. Полученные значения оценок доз по частотам транслокаций внесены в последний столбец табл. 2.

С помощью регрессионного анализа был построен график линейной зависимости цитогенетических оценок доз от величины средних физических доз на все тело, который представлен на рис. 1. Коэффициент корреляции между двумя показателями равнялся 0,147 при  $p = 0,548$ , что свидетельствовало о недостатке связи между ними в данном дозовом диапазоне. Сами же цитогенетические оценки были ниже величин расчетных физических доз.

Как следует относиться к данному обстоятельству? На самом деле, так называемая, средняя физическая доза на все тело в биологическом смысле является фикцией, т.к. происходит локальное облучение определенного целевого участка, а потом полученная им средняя доза «растягивается» («усредняется») на все тело. Несколько другому обстоит дело при цитогенетическом анализе культур лимфоцитов периферической крови при терапевтическом фракционированном парциальном радиа-

ционном воздействии. В этом случае поражению разовой очаговой дозой (2 Гр) подвергаются лимфоциты, которые в определенный момент проходят через облучаемый участок или находятся в составляющих его тканях. Если лимфоциты длительно пребывают в облучаемом регионе, то каждая последующая фракция увеличивает вероятность их гибели без деления. Периферическая же кровь к каждой последующей процедуре может доставить или новую порцию лимфоцитов, или некоторые лимфоциты подвергнутся повторному облучению, которое для них становится фракционированным и его эффективность в соответствии с радиобиологическими закономерностями будет меньше, чем однократное облучение в такой же суммарной дозе. При повторном облучении все повторится. Соотношение же этих субпопуляций лимфоцитов на самом деле в настоящее время сложно установить, оно будет неопределенным и, вероятно, подверженным индивидуальным колебаниям.

Для цитогенетических исследований после ДЛТ характерным оказалось наличие метафаз с несколькими транслокациями: у различных пациенток в разном соотношении число транслокаций в клетках с ними варьировало от 1 до 4. На это косвенно указывают приведенные в табл. 2 частоты транслокаций на 1 клетку с транслокациями, которые только в трех культурах из 25 равнялись 1,00, а в остальных колебались от 1,05 до 1,42, причем у пациентки Т-11 через 11 лет облучения этот показатель составлял 1,09, что согласуется с представлением о длительном сохранении/размножении лимфоцитов с транслокациями в организме. Таким образом, обнаружение клеток с несколькими транслокациями (как, впрочем, и совместно с другими перестройками) свидетельствует о том, что реальная доза поражения определенных фракций лимфоцитов была выше, чем рассчитанная средняя доза на все тело, часто не превышавшая 1 Гр, о чем упоминалось выше.

До ДЛТ (независимо от наличия или отсутствия ПХТ) частота транслокаций на 1 клетку с транслокациями равнялась 1,00 в 19 из 22 культур. У пациентки Т-12-К были обнаружены 6 метафаз с 1 транслокацией и 1 метафаза с 3 транслокациями в культуре после ПХТ и до ДЛТ. Еще более неожиданные наборы цитогенетических повреждений в отдельных метафазах наблюдались у пациентки Т-16 в культурах лимфоцитов до ПХТ и ДЛТ (4 транслокации, 2 инсерции, 2 дицентрика и 1 ассоциированный парный фрагмент) и после ПХТ до ДЛТ (2 транслокации, 3 дицентрика с 1 ассоциированным парным фрагментом). Формально такие перестройки должны возникать только после воздействия ионизирующих излучений, но они были выявлены до ДЛТ. К сожалению, в данном случае не удалось провести полноценное расследование этого обстоятельства. Единственно, в табл. 2 в столбце с частотами транслокаций на 1 клетку с транслокациями был проигнорирован этот показатель у пациентки Т-16 до ПХТ и ДЛТ, который должен был бы равняться 4. Наряду с этими находками у пациенток Т-02-К и Т-07-К в культурах лимфоцитов до ДЛТ были выявлены по одной мультиабберрантной клетке с множественными обменными перестройками и фрагментами, неподдающимися точному учету.

Кроме явлений, описанных выше, в небольшом количестве культур наблюдалось образование множественных фрагментов в единичных метафазных пластинках, которые не были включены в общую сумму ацентриков в табл. 2. Так, у пациентки Т-07 через 3 месяца после ДЛТ наблюдалась клетка с 9 парными фрагментами, отделившимися от одной из 4 хромосом; у пациентки Т-10-К после ПХТ до ДЛТ хромосома 4 распалась на множество фрагментов; у пациентки Т-14 через 3 месяца после ДЛТ в одной метафазе

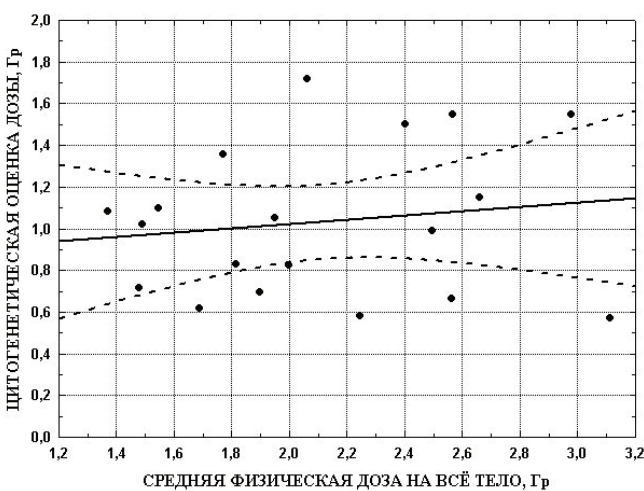


Рис. 1. Линейная зависимость (сплошная линия) с 95%-доверительными интервалами (пунктирные линии) цитогенетических оценок доз от величин средних физических доз на всё тело

Fig. 1. Linear dependence (solid line) with 95%-confidence intervals (dashed lines) of cytogenetic dose estimates from the values of mean physical doses to the whole body

Таблица 2

Результаты цитогенетического анализа с помощью трёхцветного FISH-окрашивания культур лимфоцитов периферической крови больных раком молочной железы до и после дистанционной лучевой терапии (ДЛТ)

The results of cytogenetic analysis using a three-color FISH-staining of peripheral blood lymphocytes cultures of patients with breast cancer before and after distance radiation therapy (DRT)

№ п/п	Код пациента	Статус	Возраст, лет	Число проанализированных клеток	Число клеток с транслокациями	Частоты aberrаций хромосом на 100 клеток				Частота транслокаций на 1 клетку с транслокациями	Цитогенетическая оценка средней дозы по частоте транслокаций, Гр	
						все транслокации	инверсии	дипентрические кольца	апетрические			
1	T-01	до ДЛТ 3 мес после ДЛТ	58	588 301	4 13	0,68 4,32	0 0,33	0 0,33	0 0,33	0 0,17	1,00 1,00	1,02
2	T-01-K	8 мес после ПХТ до ДЛТ 1 мес после ДЛТ	39	432 849	2 23	0,46 3,06	0 0	0,12 1,41	0 0,24	1,77 1,77	1,13 1,13	0,83
3	T-02-K	до ДЛТ 3 мес после ДЛТ	44	324 973	1 21	0,31 2,21	0,31 0	0,10 0,11	0 0	0,93 0,82	1,00 1,05	0,70
4	T-03	до ДЛТ	49	971	12	1,24	0	0	0	0	1,00	
5	T-05	до ПХТ и ДЛТ после ПХТ до ДЛТ 1 мес после ДЛТ	74	606 675 764	6 11 52	0,99 1,63 7,53	0 0 0,13	0 0,13	0 0,13	0 0,15 1,57	1,00 1,11 1,11	1,36
6	T-05-K	3 мес после ДЛТ	59	886	16	2,14	0	0	0	0,68	1,19	0,58
7	T-06-K	после ПХТ до ДЛТ	67	642	6	0,93	0	0	0	0	1,00	
8	T-07	после ПХТ до ДЛТ 1 мес после ДЛТ 3 мес после ДЛТ	44	597 978 773	3 32 35	0,50 4,24 4,98	0 0,10 0	0 0,13	0 0,10 0	0 1,84 0,52	1,00 1,42 1,10	1,10
9	T-07-K	до ДЛТ	45	976	1	0,10	0	0	0	0,20	1,00	
10	T-08	после ПХТ до ДЛТ 3 мес после ДЛТ	35	955 729	4 17	0,42 2,47	0 0	0 0	0 0	0 0,14	1,00 1,06	0,72
11	T-09	1 мес после ДЛТ 3 мес после ДЛТ	69	303 209	4 6	1,65 3,35	0 0	0 0	0 0	0,99 1,44	1,25 1,17	0,67
12	T-09-K	1 мес после ДЛТ 3 мес после ДЛТ	73	870 738	36 36	4,94 5,28	0,23 0	0,11 0	0,92 0,14	0,34 0,81	1,19 1,08	1,15
13	T-10	1 мес после ДЛТ 3 мес после ДЛТ	50	896 1005	28 48	3,52 5,47	0 0,20	0 0,10	0,56 0,20	0,22 1,09	1,13 1,15	1,05
14	T-10-K	после ПХТ до ДЛТ 1 мес после ДЛТ	33	969 353	9 9	0,93 2,55	0 0	0 0	0 0	0 0	1,00 1,00	0,62
15	T-11	через 11 лет после ПХТ и ДЛТ	63	526	22	4,56	0	0	0	0,19	1,09	
16	T-11-K	после ПХТ до ДЛТ 3 мес после ДЛТ	50	900 1030	2 71	0,22 7,62	0 0	0,10 0	0 0,19	0 0,87	1,00 1,11	1,55
17	T-12-K	после ПХТ до ДЛТ 1 мес после ДЛТ	79	879 759	7 32	1,02 4,48	0 0	0 0	0 0	0,11 1,05	1,29 1,06	0,99
18	T-13	до ДЛТ 1 мес после ДЛТ	60	556 736	1 11	0,18 1,63	0 0	0 0	0 0	0,18 0,54	1,00 1,09	0,58
19	T-14	после ПХТ до ДЛТ 3 мес после ДЛТ	52	1030 712	4 57	0,39 9,27	0,10 0	0 0	0 2,81	0,19 2,25	1,00 1,16	1,72
20	T-14-K	после ПХТ до ДЛТ 1 мес после ДЛТ 3 мес после ДЛТ	38	752 985 538	3 78 30	0,40 10,00 5,58	0 0,30 0,37	0 0	0 0,41 0	0,53 0,62 0,81	1,00 1,26 1,00	1,55
21	T-15	до ПХТ и ДЛТ после ПХТ до ДЛТ	60	780 436	7 1	0,90 0,23	0 0	0 0	0 0	0,13 0	1,00 1,00	
22	T-15-K	после ПХТ 1 мес после ДЛТ 3 мес после ДЛТ	36	925 803	29 22	3,62 2,86	0 0,12	0 0	0,11 0,12	1,30 0,62	1,16 1,05	0,83
23	T-16	до ПХТ и ДЛТ после ПХТ до ДЛТ через 3 мес	60	448 968 872	1 8 35	0,89 0,93 4,93	0,45 0,10 0,23	0 0	0 0	0,22 0,31 0,69	- 1,125 1,23	1,08
24	T-16-K	до ДЛТ 1 мес после ДЛТ	69	850 701	6 47	0,71 7,70	0 0	0,12 0,14	0 0	0 1,14	1,00 1,15	1,50



было обнаружено 7 парных фрагментов из 4 хромосомы, а в другой – 17 парных фрагментов из 1 хромосомы. Такая фрагментация единичных хромосом явно не является следствием радиационного воздействия и, по-видимому, связана с индивидуальными процессами, происходящими в организме онкологических больных и имеющих отношение к специфической нестабильности хромосом.

### Заключение

Таким образом, проведенное исследование показало следующее. Несмотря на локальный характер терапевтического облучения пациенток, страдавших от рака молочных желез, в дозах, хотя и фракционированных, но которые по своей величине могут приводить клетки к гибели без вступления в деление, при использовании трехцветной FISH-методики наблюдалось значимое воз-

растание частот транслокаций, дицентриков и ацентриков в культурах лимфоцитов периферической крови. При этом транслокаций было больше, чем дицентриков и, судя по всему, они длительное время (в отличие от вторых) сохраняются, по-видимому, на первоначальном уровне. После ДЛТ по поводу рака молочной железы частота транслокаций на 1 клетку с транслокациями в культурах лимфоцитов периферической крови в большей части случаев превышает 1. Поэтому FISH-окрашивание хромосом может быть эффективным средством контроля хромосомных aberrаций у пациентов, получающих лучевую терапию, и, возможно, послужит источником информации для оценки потенциальных рисков вторичного рака, связанного с терапевтическим действием радиации [15]. При этом нам не удалось обнаружить значимого цитогенетического эффекта от применения ПХТ.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Vienna: IAEA, 2011. 240 p.
- Нугис В.Ю. Прогноз пострадиационной динамики числа нейтрофилов крови в случаях острого неравномерного облучения (цитогенетические исследования). Радиационная биология. Радиоэкология. 2018;58(5):498-510. [Nugis VYu. Prognosis of dynamics of radiation-induced blood neutrophil count according to the results of cytogenetic research of the peripheral blood lymphocyte cultures in cases of acute non-uniform exposures (cytogenetic investigations). Radiation biology. Radioecology. 2018;58(5):498-510. (in Russ.)]. DOI: 10.1134/S0869803118040112.
- Гузев Г.Г., Севанькаев А.В., Байсоголов Г.Д. Хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови после лучевой терапии. Медицинская радиология. 1974;19(9):36-39. [GuzeevGG, Sevan'kaevAV, BaisogolovGD. Chromosome aberrations in lymphocytes of peripheral blood after radiation therapy. Meditsinskaya Radiologiya. 1974;19(9):36-39. (in Russ.)].
- Мельников А.А., Великая В.В., Уразова Л.Н., Мусабаяева Л.И., Лебедев И.Н., Чойнзонов Е.Л. Цитогенетические эффекты лучевой терапии у больных злокачественными новообразованиями. Медицинская генетика. 2011;10(12):3-13. [MelnikovAA, VelikayaVV, UrazovaLN, MusabaevaLI, LebedevIN, ChoinzonovEL. Cytogenetic effects of radiotherapy in cancer patients. Medical Genetics. 2011;10(12):3-13. (in Russ.)].
- Хвостунов И.К., Курсова Л.В., Шепель Н.Н., Рагулин Ю.А., Севанькаев А.В., Гулидов И.А. и др. Оценка целесообразности применения биологической дозиметрии на основе анализа хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови больных раком легкого при терапевтическом фракционированном  $\gamma$ -облучении. Радиационная биология. Радиоэкология. 2012;52(5):467-480. [KhvostunovIK, KursovaLV, Shepel'NN, RagulynYuA, Sevan'kaevAV, GulidovIA, et al. The estimation of appropriateness of chromosomal aberrations assay as a biological dosimetry based on cytogenetic investigation of lung cancer patients given non-uniform fractional exposures to high doses of therapeutic  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays. Radiation biology. Radioecology. 2012;52(5):467-480. (in Russ.)].
- Хвостунов И.К., Курсова Л.В., Севанькаев А.В., Рагулин Ю.А., Шепель Н.Н., Коровчук О.Н. и др. Радиация и риск. 2019;28(2):87-101. [KhvostunovIK, KursovaLV, Sevan'kaevAV, RagulynYuA, Shepel'NN, KorovchukON, et al. The estimation of radiation effect to cancer patients treated with beam-therapy by means of analysis of chromosomal aberrations in blood lymphocytes. Radiation and risk. 2019;28(2):87-101. (in Russ.)]. DOI: 10.21870/0131-3878-2019-28-2-87-101.
- Gamulin M, Kopjar N, Grgic M, Ramik S, Bisof V, Garaj-Vrhovac V. Genome damage in oropharyngeal cancer patients treated by radiotherapy. Croat Med J. 2008;49(4):515-527. DOI: 10.3325/cmj.2008.4.515.
- Gamulin M, Kopjar N, Grgic M, Ramik S, Viculin T, Petkovic M, Garaj-Vrhovac V. Cytogenetic follow-up in testicular seminoma patients exposed to adjuvant radiotherapy. Coll Antropol. 2010;34(2):455-465.
- Hille A, Hofman-Hüther H, Kühnle E, Wilken B, Rave-Fränk M, Schmidberger H, Virsik P. Spontaneous and radiation-induced chromosomal instability and persistence of chromosome aberrations after radiotherapy in lymphocytes from prostate cancer patients. Radiat Environ Biophys. 2010;49(1):27-37. DOI: 10.1007/s00411-009-0244-x.
- Lee Y, Kang J-K, Lee YH, Yoon HJ, Yang SS, Kim SH, et al. Chromosome aberration dynamics in breast cancer patients treated with radiotherapy: Implications for radiation biodosimetry. Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2021;872:503419. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2021.503419.
- Leonard A, Decat D, Leonard ED, Wambersie A, Renard J. Chromosome aberrations in patients irradiated for pelvic tumours. Strahlentherapie und Onkologie. 1987;163(12):795-799.
- Leonard A, Gerber GB. Chromosome aberrations as biological indicators for radiation damage following partial body irradiation. bga-Schriften. 1986;2:261-262.
- Matsubara S, Sasaki MS, Adachi T. Dose response relationship of lymphocyte chromosomes in locally irradiated persons. J Radiat Res. 1974;15(4):189-196. DOI: 10.1269/jrr.15.189.
- Manivannan B, Kuppusamy T, Venkatesan S, Perumal V. A comparison of estimates of doses to radiotherapy patients obtained with the dicentric chromosome analysis and the  $\gamma$ -H2AX assay: Relevance to radiation triage. Applied Radiation and Isotopes. 2018;131:1-7. DOI: 10.1016/j.apradiso.2017.10.031.
- Matsuoka A, Yamada K, Hayashi M, Sofuni T. Chromosomal aberrations detected by chromosome painting in lymphocytes from cancer patients given high doses of therapeutic X-rays. J Radiat Res. 1996;37(4):257-265. DOI: 10.1269/jrr.37.257.
- Roch-Lefèvre S, Pouzoulet F, Giraudet AL, Voisin Pa, Vaurijoux A, Gruel G, et al. Cytogenetic assessment of heterogeneous radiation doses in cancer patients treated with fractionated radiotherapy. The British Journal of Radiology. 2014;83(993):759-766. DOI: 10.1259/bjr/210225597.
- Senthamizchelvan S, PantGS, RathGK, JulkaPK, NairO, JoshiRC, et al. Biodosimetry using chromosome aberrations in human lymphocytes. Radiation Protection Dosimetry. 2007;123(2):241-245. DOI: 10.1093/rpd/ncl109.
- Silva-Barbosa I, Pereira-Magnata S, Amaral A, Sotero G, Melo HC. Dose assessment by quantification of chromosome aberrations and micronuclei in peripheral blood lymphocytes from patients exposed to gamma radiation. Genetics and Molecular Biology. 2005;28(3):452-457.
- Ломоносова Е.Е., Нугис В.Ю., Снигирёва Г.П., Козлова М.Г., Никитина В.А., Галстян И.А. Цитогенетический анализ культур лимфоцитов периферической крови пациента в отдалённые сроки после аварийного облучения с помощью трехцветного FISH-метода. Радиационная биология. Радиоэкология. 2022;62(1):5-17. [Lomonosova EE, Nugis VYu, Snigiryova GP, Kozlova MG, Nikitina VA, Galstyan IA. Cytogenetic analysis peripheral blood lymphocytes cultures of patient in long terms after emergency irradiation with the help of three-color FISH method. Radiation biology. Radioecology. 2022;62(1):5-7. (in Russ.)]. DOI: 10.31857/S0869803122010064.
- Нугис В.Ю., Снигирёва Г.П., Ломоносова Е.Е., Козлова М.Г., Никитина В.А. Трёхцветный FISH-метод: кривые доза-эффект для транслокаций в культурах лимфоцитов периферической крови после гамма-облучения *in vitro*. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(5):12-20. [Nugis VYu, Snigiryova GP, Lomonosova EE, Kozlova MG, Nikitina VA. Three-color FISH method: dose-effect curves for translocations in peripheral blood lymphocyte cultures after gamma-irradiation *in vitro*. Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(5):12-20. (in Russ.)]. DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-12-20.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Участие авторов.** Статья подготовлена с равным участием авторов.

**Информированное согласие.**

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

**Поступила:** 11.04.2022. **Принята к публикации:** 11.05.2022.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Financing.** The study had no sponsorship.

**Contribution.** Article was prepared with equal participation of the authors.

**Informed Consent**

All patients signed an informed consent to participate in the study.

**Article received:** 11.04.2022. **Accepted for publication:** 11.05.2022