

А.А. Фильченков
М.П. Завелевич
Э.А. Дёмина
А.А. Главин

Институт экспериментальной
патологии, онкологии
и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого
НАН Украины, Киев, Украина

Ключевые слова:

рак предстательной
железы, лучевая
терапия, индивидуальная
радиочувствительность
организма, лимфоциты
периферической крови,
рентгеновское тест-облучение
in vitro, апоптоз, активные
формы кислорода, аберрации
хромосом, простатический
специфический антиген.

АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ОБЛУЧЕНИЕМ *IN VITRO*

Высокие дозы облучения при лучевой терапии (ЛТ) радиорезистентных опухолей, к которым относится и рак предстательной железы (РПЖ), сопряжены с развитием постлучевых осложнений, прогнозирование возникновения которых требует учета индивидуальной радиочувствительности организма (ИРО) больного. Одним из методов оценки ИРО может быть определение уровня апоптоза (Ап) в лимфоцитах периферической крови (ЛПК). **Цель:** исследовать изменения уровней индуцированного тест-облучением *in vitro* Ап ЛПК больных РПЖ в процессе проведения курса ЛТ и определить корреляцию с содержанием активных форм кислорода (АФК), частотой пострадиационных нарушений хромосом в ЛПК и рядом клинических показателей. **Объект и методы:** в исследовании приняли участие 16 больных РПЖ, преимущественно II–III стадии. До начала лечения пациентов, после первой фракции терапевтического облучения и по окончании ЛТ методом проточной цитометрии определяли уровень Ап после 48-часового культивирования ЛПК *in vitro* без стимуляции митогеном как с предварительным тест-облучением, так и без него. Индуцированную Fe^{2+} продукцию АФК в плазме крови определяли с красителем *N,N*-диэтилпарафенилендиамином. Метафазный анализ аберраций хромосом проводили после «провокативного» рентгеновского облучения культуры ЛПК в конце G_2 -фазы митотического цикла в дозе 1,5 Гр. **Результаты:** отмечена корреляция между показателями апоптотической гибели с тест-облучением и без него ЛПК больных РПЖ, выделенных как до начала ЛТ ($r = 0,88$), так и после первой фракции облучения ($r = 0,77$). Широкий диапазон значений апоптотического индекса ЛПК больных РПЖ свидетельствует о значительной вариабельности ИРО. Выявлена корреляция между фракцией апоптотических ЛПК и уровнем АФК в плазме крови больных при исследовании, проведенном после первой фракции терапевтического облучения ($r = 0,77$). В то же время при сравнительном изучении данных показателей до начала ЛТ корреляции между ними не выявлено ($r = 0,13$). Частота радиационно-индуцированных аберраций хроматидного типа по данным G_2 -теста находилась в диапазоне 11,0–19,0 аберраций/100 метафаз. **Выводы:** среди всех исследованных показателей больных РПЖ статистически значимые корреляции выявлены только между уровнями Ап при тест-облучении ЛПК *in vitro* и уровнями Ап ЛПК, культивированных без тест-облучения, как до начала ЛТ, так и после первой фракции терапевтического облучения. Корреляция между показателями спонтанного Ап и уровнем АФК в плазме крови является слабой, а корреляция с клиническими параметрами отсутствует.

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований у мужчин во всем мире. В Украине по удельному весу РПЖ занимает второе место в структуре заболеваемости и третье — в структуре смертности мужского населения от злокачественных новообразований, опережая опухоли бронхоле-

гочной системы и рак желудка [1]. Согласно данным Национального канцер-регистра Украины заболеваемость РПЖ (стандартизированный показатель, мировой стандарт) в нашей стране в 2016 г. составляла 26,2 на 100 тыс., смертность — 11,6 на 100 тыс. мужского населения [1]. Несмотря на совершенствование методов диагностики, более чем в 40% случаев РПЖ

диагностируется в III и IV стадии. В 2016 г. от РПЖ в Украине умерли 3222 больных, причем летальность в течение 1 года после установления диагноза составляет около 17%. С возрастом у мужчин наблюдается существенное повышение как заболеваемости, так и смертности от РПЖ [1]. Помимо возраста, важными факторами риска развития заболевания считаются расовая принадлежность, наследственность и ряд приобретенных факторов (чрезмерное употребление животных жиров, жареного мяса, диета с низким содержанием лейкопинов, антиоксидантов, фитоэстрогенов, витамина Е и селена) [2].

Одним из радикальных методов терапии локального РПЖ является дистанционная лучевая терапия (ЛТ). Разработка и внедрение в практику трехмерной конформной дистанционной ЛТ (3DCRT), а также ЛТ с модуляцией интенсивности дозы (IMRT) позволили существенно увеличить подводимую к опухоли дозу излучения без повышения риска развития местных и общих лучевых реакций. Несмотря на конформную «стратегию» радиационной онкологии, в зону облучения, включающую опухоль, неизбежно попадают клетки нормальных тканей, а именно: тканевые структуры, расположенные на входе и выходе терапевтического пучка ионизирующего излучения (ИИ), кровеносные сосуды, которые подвергаются облучению в той же дозе, что и опухоль, а также микроскопические инфильтраты опухоли в здоровые ткани [3]. Одна из причин радиорезистентности опухолей заключается в том, что восстановление поврежденных ДНК в опухолевых клетках происходит более активно, чем в клетках нормальных тканей, поскольку в них наблюдается повышенная экспрессия ферментов репарации ДНК [4]. Поэтому для эффективного воздействия на радиорезистентные опухоли, к которым относятся и РПЖ, назначаются достаточно высокие дозы ЛТ, вызывающие в определенной степени разрушение и здоровых тканей. При этом лечение лучевых поражений органов малого таза (постлучевой ректит, цистит, уретрит) остается сложной задачей, решение которой требует индивидуального подхода с учетом индивидуальной радиочувствительности организма (ИРО) больного, определяемой хромосомным методом (G_2 radiation sensitivity assay) [5, 6]. По показателю ИРО человеческая популяция гетерогенна: 14–20% составляют лица с радиорезистентностью, 10–20% — с повышенной радиочувствительностью, 7–10% — со сверхрадиочувствительностью [7]. Учитывая вышеизложенное, определение ИРО больных онкологического профиля будет способствовать персонализированной тактике ЛТ.

ИРО можно определять также по содержанию клеток с преждевременной конденсацией хромосом, частоте микроядер, средней длине теломер, количеству одностранных разрывов ДНК, количеству фокусов гистона γ -H2AX, полиморфным вариантам и мутациям определенных генов (например *GYPА* или *HPRT*) [8, 9]. Одним из перспективных подходов к определению ИРО является оценка уровня постлу-

чевого апоптоза (Ап), которая впервые была предложена в 1996 г. [10]. Как оказалось, облучение *in vitro* лимфоцитов периферической крови (ЛПК) даже без стимуляции митогеном приводит к их гибели путем Ап. Поскольку гибель ЛПК в ответ на воздействие ИИ чаще всего реализуется путем Ап [11], уровень последнего начали рассматривать в качестве одного из критериев определения ИРО [10, 12, 13]. Однако вопрос клинического значения оценки вероятности постлучевых осложнений у больных РПЖ по данным определения Ап в ЛПК остается предметом дискуссии. Некоторые авторы не выявили достоверных различий между уровнем радиационно-индуцированной апоптотической гибели ЛПК и степенью выраженности постлучевых осложнений у больных РПЖ [14, 15].

Известно, что Ап связан с оксидативным стрессом, развивающимся вследствие нарушения равновесия между генерированием активных форм кислорода (АФК) и антиоксидантной защитой. Антиоксидантные системы способны предотвращать образование АФК и инициацию ими цепных реакций, а также нейтрализовать образующиеся АФК. Избыточное формирование АФК может вызывать активацию процессов перекисного окисления липидов, что может приводить к разрушению клеточных мембран, а также повреждению белков и нуклеиновых кислот [16]. Кроме того, АФК могут запускать внутриклеточные пути передачи сигнала, приводящие к активации эффекторных механизмов клеточной гибели, а проявление токсического действия свободнорадикальных соединений обуславливает структурно-метаболические нарушения в клетках с последующим их некрозом.

Оценка возможных корреляций между показателями Ап, индуцированного тест-облучением *in vitro*, в ЛПК больных РПЖ на различных этапах ЛТ, а также корреляций между показателями Ап и биохимическими показателями, характеризующими уровень оксидативного стресса и состояние антиоксидантных систем, может быть важной при последующем их сопоставлении с отдаленными последствиями ЛТ. С целью дальнейшего отбора соответствующих показателей в настоящей работе анализировали, как коррелируют уровни индуцированного тест-облучением *in vitro* Ап ЛПК больных РПЖ до начала проведения курса ЛТ, на промежуточном и конечных этапах терапевтического облучения. Нас интересовало также, существует ли связь между уровнем индуцированного тест-облучением Ап ЛПК и уровнем продукции АФК в плазме крови, рядом клинических показателей или частотой пострадиационных нарушений хромосом.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие 16 пациентов в возрасте от 51 до 77 лет (медиана 68,5 года) с верифицированным диагнозом РПЖ. Диагноз установлен на основании комплексного обследования больных, находящихся на стационарном лечении в кли-

нической больнице «Феофания» Государственного управления делами (Киев, Украина), с обязательной гистологической верификацией. Характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Таблица 1
Клиническая характеристика больных РПЖ (n = 16)

Регистр. № пациента	Возраст, лет	Стадия заболевания	ПСА ¹ , нг/мл*	Оценка по шкале Глисона, баллов
0014	69	T3bN0M0	1,65	7
0015	69	T2cN0M0	1,03	6
0016	59	T2N0M0	1,05	6
0017	70	T2cN0M0	26,91	6
0018	56	pT2N0M0	0,35	9
0019	69	T2N0M0	0,33	8
0021	68	T2cN0M0	3,01	7
0022	66	pT4N1M0	д/о**	7
0023	70	T1bN0M0	5,60	6
0024	66	pT2N0M0	11,31	7
0026	57	pT2cN0M0	д/о	6
0027	65	T2N0M0G2	9,11	7
0028	51	T3aN0M0	0,88	7
0030	71	T2cN0M0G2	7,60	6
0031	77	T3aN0M0G2	15,49	6
0032	72	T2bN0M0G2	6,07	7

¹ПСА – простатический специфический антиген.

*Значение показателя до проведения лучевой терапии; **данные отсутствуют.

ЛТ проводили на медицинском линейном ускорителе Clinac iX («Varian Medical Systems, Inc.», США) с использованием фотонов энергии 6 МэВ, фракциями по 2,5 Гр ежедневно до суммарной дозы 76,0 Гр. Получено информированное согласие всех больных на дополнительное лабораторное обследование и использование их биологических материалов в исследовательских целях. Пробы венозной крови собирали до начала курса ЛТ, после первой фракции терапевтического облучения и по окончании курса. В качестве контроля исследовали образцы периферической крови условно здоровых доноров мужского пола в возрасте старше 60 лет.

Периферическую кровь собирали в стерильные флаконы Vacuette («Greiner Bio-One», Австрия) с напылением гепарина. Фракцию, обогащенную ЛПК, выделяли стерильно центрифугированием в градиенте плотности Histopaque®-1077 («Sigma», США). Количество жизнеспособных клеток определяли по стандартной методике, используя суправитальное окрашивание трипановым синим. Одну из двух проб ($0,5 \cdot 10^6$ жизнеспособных клеток/мл) от каждого больного подвергали однократно воздействию рентгеновского облучения в дозе 2,0 Гр на аппарате РУТ-250-15-2 («РУМ-17», СССР; фильтры 0,5 мм Cu + 0,5 мм Al, сила тока 10 мА, напряжение 180 кВ, фокусное расстояние 40 см, мощность дозы 63 сГр/мин). Контролем служил образец ЛПК без тест-облучения. После этого клетки культивировали в течение 48 ч при 37 °С в содержащей 5% CO₂ атмосфере, в питательной среде RPMI-1640 («Sigma», США) с добавлением 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота («Sigma», США), 2 ммоль/л L-глутамина и 40 мкг/мл гентамицина.

После культивирования *in vitro* содержание гиподиплоидных (апоптотических) клеток в образцах ЛПК, которые подвергались рентгеновскому облучению, и в контрольных пробах определяли методом проточной цитометрии после окрашивания клеток раствором пропидия йодида («Sigma», США), как описано в работе [17]. Флуоресценцию клеток измеряли на цитофлуориметре FACSCalibur («Becton Dickinson», США). В каждой пробе подсчитывали не менее 10 тыс. клеток. Мертвые клетки и их фрагменты исключали из анализа. Для количественной оценки содержания гиподиплоидных клеток применяли программу CELLQuest PRO («BD Biosciences Pharmingen», США).

Для определения индуцированной ионами Fe²⁺ продукции АФК в плазме крови использовали краситель N,N-диэтилпарафенилендиамин (DEPPD) [18]. Образцы плазмы крови сразу после получения замораживали и до проведения исследований хранили в жидком азоте. Реакцию проводили в 96-луночных прозрачных планшетах с плоским дном с использованием планшетного ридера Synergy HT («BioTek Instruments, Inc.», США) с термостатом. Образцы плазмы крови (5 мкл в 145 мкл 0,1 М Na-ацетатного буфера, pH 4,8) инкубировали 5 мин при 37 °С. После этого в лунки вносили по 50 мкл растворов DEPPD (конечная концентрация 0,38 мкмоль/л) и FeSO₄ (конечная концентрация 4,37 мкмоль/л) на 0,1 М Na-ацетатном буфере (pH 4,8) и инкубировали образцы еще 6 мин при 37 °С с измерением интенсивности поглощения при длине волны 511 нм каждые 30 с. Расчеты проводили в интервале 1–4 мин при линейном приросте поглощения. Калибровочную кривую получали при внесении в реакционную смесь вместо плазмы крови стандартных растворов H₂O₂ в концентрациях 0,368–4,412 ммоль/л.

Оценку ИРО больных осуществляли на основании разработанного нами алгоритма, основанного на «провокативном» рентгеновском облучении культуры ЛПК в конце G₂-фазы митотического цикла в дозе 1,5 Гр [19]. Аппаратура и условия облучения аналогичны указанным выше. Метафазный анализ аберраций хромосом проводили в первом постлучевом митозе. Облученные образцы крови переносили во флаконы с питательной средой RPMI-1640 («Sigma», США) и 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота и культивировали в течение 51–52 ч при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO₂, в присутствии митогена фитогемагглютинина (M-форма; «Gibco», США) в концентрации 15 мкг/мл. Для накопления метафазных пластинок через 48 ч инкубации в культуру добавляли раствор колцемиды в концентрации 0,1 мкг/мл. После гипотонической обработки раствором 0,075 моль/л KCl при 37 °С и фиксации суспензии клеток в смеси 3 частей этанола и 1 части ледяной уксусной кислоты при 4 °С готовили препараты метафазных пластинок. Метафазный анализ аберраций хромосом

проводили с использованием светового микроскопа Nikon Eclipse E100 («Nikon Co», Япония).

Статистическую обработку полученных данных проводили с применением *t*-критерия Стьюдента. Коэффициент корреляции рассчитывали по критерию Спирмена с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6 («GraphPad Software Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Репрезентативные гистограммы распределения клеток по содержанию ДНК в нестимулированных ЛПК больного РПЖ без тест-облучения или с тест-облучением после культивирования представлены на рисунке.

Как можно видеть, большая часть клеток (> 95%) находится в фазе G₁ и отличия выявляются только по увеличению содержания гиподиплоидных клеток. Следует отметить, что если в начале наблюдения уровень постлучевого Ap ЛПК превышает таковой без тест-облучения ($21,5 \pm 2,8\%$ по сравнению с $11,4 \pm 0,6\%$; $p < 0,05$), то после первой фракции терапевтического облучения эти показатели практически не отличались (соответственно $3,1 \pm 0,3$ и $3,1 \pm 0,4\%$), а в конце наблюдения уровень радиационно-индуцированного Ap ЛПК оказался даже ниже такового без тест-облучения ($4,7 \pm 0,2\%$ по сравнению с $10,0 \pm 1,7\%$; $p < 0,05$).

Результаты определения доли апоптотических клеток в пробах ЛПК больных РПЖ (до ЛТ, после первой фракции облучения и по завершении ЛТ) представлены в табл. 2. Пробы ЛПК в полной питательной среде культивировали, как указано выше, после рентгеновского тест-облучения в дозе 2,0 Гр или без него. Сравнение проводили для тех больных, у которых присутствовали соответствующие попарные показатели. При отсутствии одного из показателей данные из расчетов исключали.

Отмечены значительные колебания фракции апоптотических клеток в пробах ЛПК как до начала терапевтического облучения пациентов (3,1–20,7%), так и после первой фракции облучения (2,2–28,5%), а также после его завершения (4,5–35,7%). После тест-облучения суспензий ЛПК, выделенных на всех этапах ЛТ пациентов, отмечен еще более широкий диапазон значений апоптотического индекса (соответственно 1,6–42,6, 2,8–43,0 и 4,3–36,6%), что свидетельствует о вариабельности ИРО. Следует отметить, что уровень спонтанного Ap (без тест-облучения) в ЛПК доноров был ниже, чем у больных РПЖ до начала ЛТ (соответственно $5,1 \pm 1,4$ и $10,6 \pm 2,3\%$; $0,05 < p < 0,1$). Низкие значения относительного содержания апоптотических клеток в культурах ЛПК сохранялись и после их тест-облучения *in vitro*, что может указывать на меньшую вариабельность ИРО практически здоровых лиц по сравнению с больными РПЖ.

При проведении анализа по Спирмену выявлена положительная корреляция между показателями апоптотической гибели с тест-облучением и без

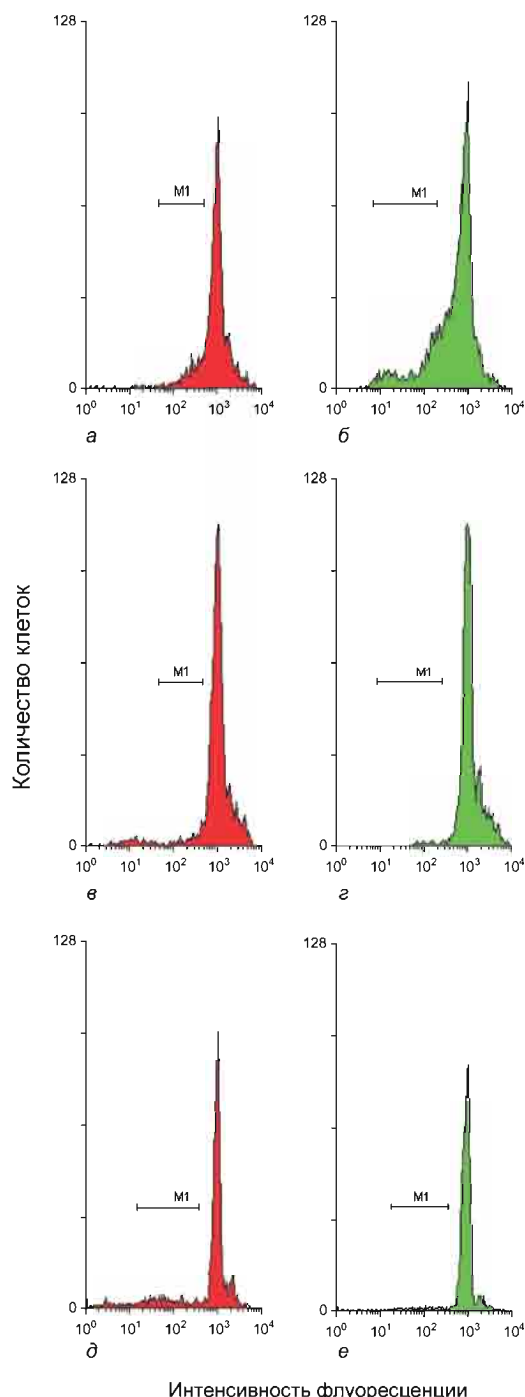


Рисунок. Гистограммы распределения ДНК по интенсивности флуоресценции пропидия иодида в нестимулированных ЛПК больного РПЖ без тест-облучения (гистограммы красного цвета) или с тест-облучением в дозе 2,0 Гр (гистограммы зеленого цвета) после культивирования 48 ч. Гиподиплоидные клетки соответствуют участку M1. ЛПК больного № 0024: а, б — до начала ЛТ; в, г — после первой фракции терапевтического облучения (2,5 Гр); д, е — по окончании курса ЛТ (76,0 Гр); а, в, д — ЛПК без тест-облучения; б, г, е — ЛПК после тест-облучения

него в ЛПК больных РПЖ, выделенных как до начала терапевтического облучения ($r = 0,88$), так и после его первой фракции ($r = 0,77$). В то же время после окончания курса ЛТ такая корреляция не была выявлена ($r = 0,48$). Обнаружена слабая корреляция

Показатели уровня Ап ЛПК больных РПЖ в течение курса ЛТ

Регистр. № пациента	Количество гиподиплоидных клеток после культивирования ЛПК (48 ч), %					
	до начала ЛТ		после первой фракции облучения		по окончании ЛТ	
	без тест-облучения <i>in vitro</i>	облучение <i>in vitro</i> , 2,0 Гр	без тест-облучения <i>in vitro</i>	облучение <i>in vitro</i> , 2,0 Гр	без тест-облучения <i>in vitro</i>	облучение <i>in vitro</i> , 2,0 Гр
0021	10,0	35,1	11,0	21,8	н/о*	н/о
0022	20,7	42,6	16,2	26,4	н/о	н/о
0023	8,5	6,2	28,5	15,2	35,7	36,6
0024	11,4	21,5	3,1	3,1	10,0	4,7
0026	23,4	40,6	14,0	9,0	н/о	н/о
0027	4,0	6,8	2,2	3,2	8,6	8,0
0028	8,6	8,9	16,3	43,0	4,5	4,3
0030	4,1	1,6	н/о	4,3	26,2	6,4
0031	3,1	5,2	5,4	2,8	7,1	17,5
0032	11,8	12,6	10,5	10,6	н/о	н/о

*Не определяли.

между показателями спонтанного Ап ЛПК до начала ЛТ и по ее окончании ($r = 0,60$). Показатели спонтанного Ап ЛПК до начала терапевтического облучения и после первой его фракции не коррелируют между собой ($r = 0,36$).

Поскольку процессы Ап связывают в том числе и с генерированием АФК, были исследованы возможные корреляции между уровнем спонтанного Ап в ЛПК больных и содержанием АФК в плазме крови до начала терапевтического облучения и после его первой фракции. Результаты определения Ап и содержания АФК приведены в табл. 3. При сравнительном изучении указанных показателей до начала терапевтического облучения корреляции между ними не выявлено ($r = 0,13$). В то же время отмечена корреляция между фракцией апоптотических клеток в ЛПК и уровнем АФК в плазме крови при исследовании, проведенном после первой фракции ЛТ ($r = 0,77$).

Следует отметить, что в проведенных нами ранее исследованиях [20] после первой фракции терапевтического облучения больных РПЖ в дозе 2,5 Гр не наблюдалось значительных изменений интенсивности образования АФК в плазме крови, однако коэффициент вариации этого показателя возрастал в 1,26 раза, прослеживалась обратная корреляционная зависимость между уровнем образования свободнорадикальных соединений в ЛПК и ИРО пациентов до начала ЛТ. Это может быть одним из объяснений отсутствия корреляционной связи между уровнями Ап и продукции АФК до начала ЛТ, а также ее наличием после первой фракции облучения. В наших исследованиях активность образования АФК в ЛПК больных РПЖ (которая характеризовалась высокой индивидуальной вариабельностью) после проведения первой фракции ЛТ возрастала в 1,32 раза. Сходные результаты получены в работе [21]. Уровень образования АФК в ЛПК больных с РПЖ превышал контрольный в 1,48 раза, наблюдалась высокая степень индивидуальной вариабельности этого показателя. Таким образом, корреляция между уровнем Ап ЛПК больных с РПЖ и интенсивностью образования АФК в плазме крови может быть связана также с изменениями продукции свободнорадикальных соединений в ЛПК в резуль-

Таблица 3

Уровень спонтанного Ап в ЛПК, содержание АФК в сыворотке и выход aberrаций хроматидного типа в ЛПК больных РПЖ

Регистр. № пациента	До начала ЛТ			После первой фракции ЛТ	
	Уровень спонтанного Ап, %	Содержание АФК (ммоль H_2O_2 /л плазмы/мин)	Частота aberrаций хроматидного типа/100 метафаз	Уровень спонтанного Ап, %	Содержание АФК (ммоль H_2O_2 /л плазмы/мин)
0014	н/о*	н/о	16,0	12,6	1,382
0015	21,7	1,824	12,0	52,3	2,216
0016	4,0	2,024	16,0	36,3	2,582
0017	15,1	1,832	18,0	18,4	1,455
0018	9,6	1,724	12,0	5,9	0,625
0019	н/о	н/о	16,0	26,4	0,526
0021	10,0	0,655	11,0	11,0	0,071
0022	20,7	0,289	19,0	н/о	н/о
0023	8,5	0,906	15,6	н/о	н/о
0024	11,4	0,572	11,0	3,1	0,458
0027	4,0	0,428	н/о	2,2	0,374
0028	8,6	0,460	н/о	16,3	0,469
0030	4,1	0,524	н/о	н/о	н/о
0031	3,1	0,406	н/о	5,4	0,387
0032	11,8	0,378	н/о	н/о	н/о

*Не определяли.

тате их повреждения под воздействием ИИ. Отмечено [22], что повышение интенсивности образования свободнорадикальных соединений и возрастание концентрации восстановленного глутатиона во время прохождения митотического цикла подтверждают гипотезу о наличии регуляторной связи между окислительными метаболическими процессами и функциями клеточного цикла, а нарушения равновесия между этими процессами могут привести к образованию aberrантных клеток. В наших исследованиях повышенный уровень спонтанных aberrаций хромосом в ЛПК больных РПЖ наблюдался на фоне развития оксидативного стресса и истощения звеньев антиоксидантной защиты [20].

Частота радиационно-индуцированных aberrаций хроматидного типа по данным G_2 -теста находи-

лась в диапазоне 11,0–19,0 аберраций/100 метафаз. При анализе возможной связи между ИРО больных РПЖ (по выходу аберраций хромосом хроматидного типа, данные G_2 -теста) и уровнем спонтанного Ап ЛПК (см. табл. 3) до начала ЛТ статистически значимой корреляции не отмечено ($r = 0,244$). Это может быть связано с недостаточным количеством цитогенетических наблюдений. Не исключено, что в хромосомном G_0 -тесте эта связь могла бы оказаться более значимой, так как индуцированные в этот период лучевые маркеры — дицентрики, препятствуя митозу облученных клеток, способствуют их гибели.

Анализ возможных корреляций уровня Ап ЛПК крови больных РПЖ с клиническими характеристиками (значения показателя по шкале Глисона, уровень ПСА) до проведения ЛТ дал отрицательные результаты.

Одной из главных причин развития поздних лучевых осложнений у больных РПЖ является применение больших разовых и суммарных доз облучения, превышающих толерантность здоровых тканей к ИИ [23]. Поэтому для оптимизации отдаленных результатов ЛТ при ее планировании следует учитывать индивидуальную вариабельность ответа организма больных онкологического профиля. Однако до сих пор не существует надежных биомаркеров, способных прогнозировать ответ на ЛТ [24]. В стадии исследования находится в том числе метод количественной оценки радиационно-индуцированного Ап ЛПК для оценки тяжести лучевых реакций со стороны здоровых тканей, попадающих в зону терапевтического облучения. Исследования в данном направлении в дальнейшем предполагается продолжить, в том числе для изучения возможностей определения показателей Ап клеток периферической крови больных со злокачественными опухолями в сочетании с другими биомаркерами постлучевой токсичности.

ВЫВОДЫ

1. Широкий диапазон значений апоптотического индекса ЛПК больных РПЖ после тест-облучения *in vitro* свидетельствует о вариабельности ИРО.

2. До начала ЛТ больных РПЖ и после первой фракции облучения выявлена положительная корреляция между уровнями Ап в культурах нестимулированных ЛПК с тест-облучением *in vitro* и без него. Такой корреляции не отмечено в ЛПК, исследованных после окончания курса ЛТ.

3. После первой фракции терапевтического облучения выявляется корреляция между содержанием апоптотических клеток в ЛПК и уровнем АФК в плазме крови больных.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают искреннюю благодарность доктору медицинских наук, профессору Э.А. Стаховскому (Национальный институт рака, Киев)

и кандидату медицинских наук Е.В. Сафоновой (клиническая больница «Феофания» Государственного управления делами, Киев) за оказанное содействие в проведении исследований. Работа выполнена в рамках целевой программы научных исследований ОБФМБ НАН Украины «Молекулярно-биологические факторы гетерогенности клинического течения гормонозависимых опухолей».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fedorenko ZP, Michailovich YY, Goulak LO, *et al.* Cancer in Ukraine 2016–2017. Incidence, mortality, activities of oncological service. Bulletin of National Cancer Registry of Ukraine, vol 19. Kyiv: National Cancer Institute of Ukraine, 2018. 82 p.
2. Alekseev BYa, Kaprin AD, Matveev VB, Nyushko KM. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of prostate cancer. Russian Association of Oncologists. Moscow: NN Blokhin National Medical Research Centre of Oncology of the Health Ministry of Russia, 2014. 43 p. (in Russian).
3. Basic Clinical Radiobiology, 4th ed. Joiner MC, van der Kogel A (eds). Boca Raton, FL: CRC Press; 2009. 375 p.
4. Ciszewski WM, Tavecchio M, Dastyh J, Curtin NJ. DNA-PK inhibition by NU7441 sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation and doxorubicin. Breast Cancer Res Treat 2014; 143 (1): 47–55.
5. Borgmann K, Haeberle D, Doerk T, *et al.* Genetic determination of chromosomal radiosensitivities in G_0 - and G_2 -phase human lymphocytes. Radiother Oncol 2007; 83 (2): 196–202.
6. Domina EA, Druzhyna MO, Ryabchenko NM. Individual radiosensitivity of a person. Kyiv: Logos, 2006. 126 p. (in Ukrainian).
7. Kovalev EE, Smirnova OA. Estimation of radiation risk based on concept of individual variability of radiosensitivity. Bethesda: Armed Forces Radiobiology Research Institute, 1996. 198 p.
8. Pernot E, Hall J, Baatout S, *et al.* Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. Mutat Res 2012; 751 (2): 258–86.
9. Domina EA, Philchenkov A, Dubrovskaya A. Individual response to ionizing radiation and personalized radiotherapy. Crit Rev Oncogen 2018; 23 (1–2): 69–92.
10. Boreham DR, Gale KL, Maves SR, *et al.* Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: potential as a biological dosimeter. Health Phys 1996; 71 (5): 685–91.
11. Radford IR, Murphy TK. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part III. Different signals can lead to apoptosis and may influence sensitivity to killing by DNA double-strand breakage. Int J Radiat Biol 1994; 65 (2): 229–39.
12. Ozsahin M, Ozsahin H, Shi Y, *et al.* Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8 T-lymphocytes. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997; 38 (2): 429–40.
13. Ozsahin M, Crompton NE, Gourgou S, *et al.* CD4 and CD8 T-lymphocyte apoptosis can predict radiation-induced late toxicity: a prospective study in 399 patients. Clin Cancer Res 2005; 11 (20): 7426–33.
14. Brzozowska K, Pinkawa M, Eble MJ, *et al.* *In vivo versus in vitro* individual radiosensitivity analysed in healthy donors and in prostate cancer patients with and without severe side effects after radiotherapy. Int J Radiat Biol 2012; 88 (5): 405–13.
15. Vogin G, Merlin JL, Rousseau A, *et al.* Absence of correlation between radiation-induced CD8 T-lymphocyte apoptosis and sequelae in patients with prostate cancer accidentally overexposed to radiation. Oncotarget 2018; 9 (66): 32680–9.
16. Tang D, Kang R, Berghe TV, *et al.* The molecular machinery of regulated cell death. Cell Res 2019; 29 (5): 347–64.
17. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, *et al.* A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods 1991; 139 (2): 271–9.

18. Hayashi I, Morishita Y, Imai K, *et al.* High-throughput spectrophotometric assay of reactive oxygen species in serum. *Mutat Res* 2007; **631** (1): 55–61.

19. Domina EA, Mikhailenko VM, Glavin OA, Makovetska LI. Detection of individuals with high individual sensitivity to protect their genome from exposure to background radiation doses. *Methodical Recommendations*. Kyiv: DIA, 2018. 30 p. (in Ukrainian).

20. Glavin OA, Domina EA, Mikhailenko VM, Makovetska LI. Determination of correlation between the state of pro- and antioxidant processes in the blood of patients with prostate cancer and chromosomal instability of blood lymphocytes. *Oncology (Kyiv)* 2019; **21** (2): 135–141 (in Ukrainian).

21. Pelevina II, Aleshchenko AV, Antoshchina MM, *et al.* The content of ROS in blood lymphocytes of healthy individuals, individuals irradiated as a result of Chernobyl disaster and patients with prostate cancer. *Radiats Biol Radioecol* 2016; **56** (5): 469–74 (in Russian).

22. Sarsour EH, Kumar MG, Chaudhuri L, *et al.* Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2009; **11** (12): 2985–3011.

23. Sycheva IV. Treatment of radiation-induced pelvic damage after radiation therapy for prostate cancer. *Sib J Oncol* 2018; **17** (3): 64–71 (in Russian). [Cited 2019 March 25]. Available from: <https://www.siboncoj.ru/jour/article/view/765/539>.

24. Uemura N, Kondo T. Current status of predictive biomarkers for neoadjuvant therapy in esophageal cancer. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014; **5** (3): 322–34.

АПОПТОЗ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ НА РАК ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ, ІНДУКОВАНИЙ ОПРОМІНЕННЯМ IN VITRO

О.О. Фільченков, М.П. Завелевич, Е.А. Дьоміна,
О.А. Главін

Інститут експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України,
Київ, Україна

Резюме. Високі дози опромінення при променевої терапії (ПТ) радіорезистентних пухлин, до яких належить і рак передміхурової залози (РПЗ), пов'язані із розвитком постпроменевих ускладнень, прогнозування виникнення яких вимагає врахування індивідуальної радіочутливості організму (ІРО) хворого. Одним із методів оцінювання ІРО може бути визначення рівня апоптозу (Ап) в лімфоцитах периферичної крові (ЛПК). **Мета:** дослідити рівень індукованого тест-опроміненням *in vitro* Ап ЛПК хворих на РПЗ в процесі проведення курсу променевої терапії і можливу кореляцію із вмістом активних форм кисню (АФК), частотою пострадіаційних порушень хромосом і низкою клінічних показників. **Об'єкт і методи:** у дослідженні взяли участь 16 хворих на РПЗ, переважно II–III стадії. До початку лікування пацієнтів, після першої фракції терапевтичного опромінення і після закінчення лікування методом проточної цитометрії визначали рівень Ап після 48-годинного культивування ЛПК *in vitro* без стимуляції мітогеном як з попереднім тест-опроміненням, так і без нього. Індуковану Fe^{2+} продукцію АФК у плазмі крові визначали з барвником N,N-дітилпарафенілєндіаміном. Ме-

тафазний аналіз аберацій хромосом проводили після «провокативного» рентгенівського опромінення культури ЛПК в кінці G_2 -фази мітотичного циклу в дозі 1,5 Гр. **Результати:** виявлено кореляцію між показниками апоптотичної загибелі з тест-опроміненням і без нього в ЛПК хворих на РПЗ, виділених як до початку ПТ ($r = 0,88$), так і після першої фракції опромінення ($r = 0,77$). Широкий діапазон значень апоптотичного індексу ЛПК хворих на РПЗ свідчить про значну варіабельність ІРО. Виявлено кореляцію між фракцією апоптотичних ЛПК і рівнем АФК в плазмі крові хворих при дослідженні, проведеному після першої фракції терапевтичного опромінення ($r = 0,77$). Водночас при порівняльному вивченні зазначених показників до початку ПТ кореляції між ними не виявлено ($r = 0,13$). Частота радіаційно-індукованих аберацій хроматидного типу за даними G_2 -тесту знаходилась у діапазоні 11,0–19,0 аберацій/100 метафаз. **Висновки:** серед усіх досліджених показників статистично значущі кореляції у хворих на РПЗ виявлені лише між рівнями Ап при тест-опроміненні ЛПК *in vitro* та рівнями Ап ЛПК, культивованих без тест-опромінення, як до початку лікування, так і після закінчення терапевтичного опромінення. Кореляція між показниками спонтанного Ап і рівнем АФК в плазмі крові є слабкою, а кореляція із клінічними параметрами відсутня.

Ключові слова: рак передміхурової залози, променева терапія, індивідуальна радіочутливість організму, лімфоцити периферичної крові, рентгенівське тест-опромінення *in vitro*, апоптоз, активні форми кисню, аберації хромосом, простатичний специфічний антиген.

APOPTOSIS OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF PROSTATE CANCER PATIENTS INDUCED BY IN VITRO IRRADIATION

A.A. Philchenkov, M.P. Zavelevich, E.A. Domina,
A.A. Glavin

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine,
Kyiv, Ukraine

Summary. High-dose radiation therapy required for treating radioresistant tumors such as prostate cancer (PC) could entail the increased risk of postradiation complications. The individual radiation sensitivity (IRS) should be taken into account for predicting side effects of radiation therapy. The assessment of apoptosis in peripheral blood lymphocytes (PBL) of patients may be considered as one of the methods for IRS estimation. **Aim:** to study the level of apoptosis induced by *in vitro* test-irradiation of PBL isolated from PC patients throughout the course of radiation therapy and its probable correlation with content of reactive oxygen

species (ROS), the frequency of postradiation chromosomal abnormalities and several clinical indices. **Object and methods:** 16 PC patients, predominantly stages II–III were included in the study. Apoptosis level was estimated in PBL isolated prior to the treatment, after the first fraction of therapeutic irradiation and after the completion of the treatment. Apoptotic fraction in PBL was determined by flow cytometry following 48-h culture of isolated cells without mitogen stimulation both in untreated samples and in samples subjected to *in vitro* X-ray test-exposure prior to the initiation of culture. Fe^{2+} induced ROS generation in blood plasma was measured with *N,N*-diethyl-*paraphenylenediamine*. Meta-phase analysis of chromosomal aberrations was provided following the «provocative» X-ray exposure of PBL culture at the end of the G_2 -phase of the mitotic cycle (1.5 Gy). **Results:** The correlation between the values of the apoptotic fraction in PBL samples with/without *in vitro* test-irradiation has been found both in PBL isolated prior to the beginning ($r = 0.88$) and after the first fraction of the therapeutic irradiation ($r = 0.77$). The wide range of the apoptotic index in PBL from PC patients suggests the substantial variability of IRS. The apoptotic fraction in PBL correlated with ROS level in blood plasma in the samples obtained following the first fraction of the radiotherapy ($r = 0.77$) but not in

the samples obtained prior to the beginning of the treatment. According to G_2 -assay, the frequency of radiation-induced chromatid aberrations was within the range of 11.0–19.0 aberrations per 100 metaphases. **Conclusions:** The apoptotic indices in *in vitro* test-irradiated PBL isolated from PC patients subjected to radiotherapy correlated with those in PBL cultured without test-irradiation. Only weak correlation is revealed between the level of spontaneous apoptosis and ROS level in blood plasma. The level of spontaneous apoptosis does not correlate with clinical indices.

Key Words: prostate cancer, radiotherapy, individual radiation sensitivity, peripheral blood lymphocytes, *in vitro* X-ray test-irradiation, apoptosis, reactive oxygen species, chromosomal aberrations, prostate-specific antigen.

Адрес для переписки:

Фильченков А.А.
03022, Киев, ул. Васильковская, 45
Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины
E-mail: a.philch@gmail.com

Получено: 21.05.2019