

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

Ключові слова: рак ендометрію, лімфоцити периферичної крові, трансмембранний потенціал мітохондрій, вільні радикали, брахітерапія, метформін.

РІВЕНЬ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ МІТОХОНДРІЙ ТА ІНТЕНСИВНІСТЬ НАПРАЦЮВАННЯ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ СПОЛУК У ЛІМФОЦИТАХ ХВОРИХ НА РАК ЕНДОМЕТРІЮ

Важливими показниками, що відображають зміни функціонування немалігнізованих клітин з оточення пухлини, зокрема при застосуванні променевої терапії та речовин з можливою радіопротекторною дією, є рівень поляризації мітохондріальної мембрани та інтенсивність продукції реактивних форм кисню і азоту. **Мета:** дослідити наявність зв'язку між рівнем трансмембранного потенціалу (ТМП) мітохондрій та інтенсивністю продукції вільнорадикальних сполук (ВР) у лімфоцитах периферичної крові (ЛПК) хворих на рак ендометрію (РЕ) до та після початку брахітерапії. Оцінити вплив на ці показники метформіну (МФ) у системі *ex vivo*. **Об'єкт і методи:** у дослідженні використовували зразки периферичної крові хворих на РЕ до початку променевої терапії та після першого сеансу брахітерапії в дозі 6 Гр, а також крові умовно здорових осіб (група контролю). МФ вносили в зразки крові у фінальних концентраціях 2 та 20 мМ за 1 год до виділення ЛПК. Рівень ТМП у ЛПК визначали з використанням барвника JC-1, інтенсивність продукції ВР — барвника DCFH-DA. **Результати:** показано, що у ЛПК обстеженої групи хворих на РЕ спостерігалася тенденція до підвищення рівня ТМП (у 1,24 рази) та зниження продукції ВР (у 1,58 рази). Також у обстежених хворих на РЕ стадії T2–T4 рівень ТМП та інтенсивність продукції ВР були вищими відповідно у 1,70 і 1,61 рази порівняно із хворими на РЕ стадії T1. На відміну від жінок контрольної групи, у обстежених хворих виявлено достовірну кореляцію між рівнем ТМП та інтенсивністю продукції ВР ($r=0,428$), яка була тіснішою після проведення першого сеансу брахітерапії ($r=0,615$). Застосування МФ, особливо у концентрації 20 мМ, зменшувало кореляційний зв'язок між цими показниками. **Висновок:** у хворих на РЕ наявна достовірна кореляція між рівнем ТМП та продукцією ВР у ЛПК. Після першого сеансу брахітерапії цей кореляційний зв'язок стає більш тісним, що свідчить про можливість використання показника ТМП для прогнозу виникнення окисного стресу вже на початку терапевтичного опромінення хворих на РЕ. У модельній системі показано, що МФ зменшує залежність між продукцією ВР та рівнем ТМП у ЛПК.

Втрата потенціалу мітохондріальної мембрани є критичною подією у клітині та її вступом до апоптозу у зв'язку з утворенням активних форм кисню (АФК) [1]. Показано кореляцію між показниками трансмембранного потенціалу (ТМП) мітохондрій, виділених з лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) людини, та продукцією АФК і виникненням нітрозативного стресу [2]. Значне та тривале підвищення ТМП, що супроводжується зростанням продукції АФК, може призводити до пошкодження мітохондріальної мембрани, втрати її функцій та, як наслідок, загибелі клітини.

У багатьох дослідженнях показано зв'язок між змінами ТМП мітохондрій, надлишковою продукцією АФК та загибеллю клітин під дією токсичних речовин або у разі розвитку різних захворювань. Так, зниження ТМП, накопичення АФК та посилення апоптозу спостерігалось у разі дії мікотоксину дезоксиніваленолу, хлорбензолів, оксиду миш'яку. При цьому індукцію апоптозу пов'язують із АФК-залежною активацією каспаз, зниженням регуляції Bcl-2 і Bcl-x(L), а також підвищенням експресії Bax [3, 4, 5]. Також знижений рівень ТМП і підвищену інтенсивність утворення АФК зафіксовано у ЛПК

хворих на хронічну серцеву недостатність [6], мітохондріальна активність знижена і у пацієнтів з розсіяним склерозом [7]. Однак за активації продукції АФК мітохондріями не завжди спостерігається зниження поляризації мітохондріальної мембрани. У ЛПК пацієнтів із системним червоним вовчаком на фоні збільшення вироблення АФК, зниження внутрішньоклітинного рівня глутатіону, цитоплазматичного підлужування і виснаження АТФ, навпаки, спостерігалася гіперполяризація мембран мітохондрій [8].

Аналіз результатів змін ТМП та продукції АФК у ЛПК показав, що ці показники є незалежними предикторами повторної госпіталізації пацієнтів з розсіяним склерозом [7], існує перспектива їх використання в якості біомаркерів при захворюванні на червоний вовчак [8]. Також моніторинг рівня ТМП у ЛПК може бути одним з корисних маркерів для оцінки ступеня післяопераційного стресу для імунної системи [9].

У значній кількості досліджень показано, що за дії іонізуючого випромінювання спостерігається значне посилення утворення АФК та активних форм азоту, пов'язане зі змінами у функціонуванні мітохондрій та поляризації їх мембрани [10–12]. Тому значний інтерес представляють зміни цих показників при застосуванні променевої терапії (ПТ), яка є одним з найефективніших способів лікування пацієнтів онкологічного профілю. За даними фахівців, більше половини хворих на рак у процесі лікування проходять ПТ. Однак необхідно звертати увагу на те, що, незважаючи на сприятливу терапевтичну дію на пухлинні клітини та конформну стратегію ПТ, частина незмінених клітин з оточення пухлини неодмінно зазнає опромінення, що може викликати ряд побічних ефектів та зумовити розвиток ранніх та віддалених променевих ускладнень, у тому числі вторинного раку [13–15].

При ПТ необхідна рання діагностика, моніторинг і лікування захворювань, пов'язаних з її застосуванням, а також виявлення онкологічних хворих, для яких характерний найвищий ризик розвитку ускладнень, з метою відповідної корекції процесу лікування [16]. Значний інтерес у якості об'єкта для досліджень представляють ЛПК, які є найбільш радіочутливими клітинами людини та визнані біодозиметрами/біоіндикаторами дії опромінення [17].

Слід зазначити, що успішній ПТ хворого перешкоджають дві основні причини — радіорезистентність пухлинних клітин та радіаційне пошкодження нормальних тканин і клітин, що знаходяться в полі дії іонізуючого випромінювання. Ці обмеження вимагають розробки засобів для радіосенсибілізації пухлинних клітин або захисту нормальних тканинних клітин від опромінення [18]. У цьому аспекті значний інтерес представляє метформін (МФ). На культурі ЛПК здорових людей показано, що МФ збільшував відсоток життєздатних клітин

після впливу радіації, що супроводжувалось значним зменшенням аберацій хромосом, зниженням частоти апоптозу, також препарат зменшував викликані дією іонізуючого випромінювання зміни експресії генів *BAX*, *CASP3* і *BCL2* [19, 20]. Радіозахисні властивості МФ були виявлені у пацієнтів з раком щитовидної залози, що отримували терапію із застосуванням радіоактивного ^{131}I [21]. Подібні позитивні ефекти МФ пов'язані з дією АФК були виявлені у разі токсичного впливу метилглюксалу [22], розвитку діабетичної периферичної нейропатії [23], запалення печінки при неалкогольній жировій хворобі [24]. У дослідженнях на пухлинних клітинах, навпаки, показано, що МФ сприяє їх загибелі шляхом активації утворення АФК [25–27]. Протилежні результати отримано щодо впливу МФ на макрофаги. Одні автори повідомляють про те, що внаслідок підвищення концентрації внутрішньоклітинного ксіню і за рахунок впливу на АМФ-активовану протеїнкіназу (AMP activated protein kinase — AMPK) та інгібування транскрипційного ядерного фактора κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells — NF- κB) препарат змінює фенотип пухлиноасоційованих макрофагів М2 до фенотипу М1 [28]. Однак іншими дослідниками показано, що МФ селективно інгібує диференціювання моноцитів людини в прозапальні макрофаги М1, не пригнічуючи їх диференціювання в протизапальні макрофаги М2. Більше того, МФ інгібує процес продукування АФК макрофагами М2 за дії ліпополісахариду *E. coli* [29].

Метою дослідження було визначити зміни ТМП та продукції вільнорадикальних сполук (ВР — АФК та активних форм азоту сумарно) у ЛПК хворих на рак ендометрію (РЕ) — до та після початку проведення брахітерапії (БТ) та за дії МФ *ex vivo*.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Роботу виконано на зразках периферичної крові 22 хворих на РЕ (поширеного онкологічного захворювання, що знаходиться на третьому місці в структурі захворюваності на злоякісні новоутворення у жінок згідно з Національним канцер-реєстром 2019–2020 рр. [30]) до початку проведення променевої або/та хіміотерапії. Для частини хворих, яким було призначено БТ, забір та аналіз зразків крові проводили також через добу після першого сеансу опромінення в дозі 6 Гр. У якості контролю було використано кров 13 умовно здорових осіб (УЗО). Відповідно до принципів проведення біомедичних досліджень у обстежених було отримано інформовану згоду на участь у дослідженні. Для забору зразків крові використовували стандартні стерильні пробірки Vacutainer («F.L. Medical», Італія) об'ємом 6 мл з антикоагулянтом Лігепарин. Транспортування та зберігання зразків крові проводили за температури 3–5 °С. Клініко-морфологічну характеристику обстежених хворих представлено в табл. 1.

У частину зразків крові додавали розчин МФ (1,1-діметилбігуанід гідрохлорид, Santa Cruz

Biotechnology, Inc.) у фосфатному фізіологічному буферному розчині рН 7,4 (PBS) у фінальній концен-трації 2 та 20 мМ за 1 год до початку виділення ЛПК.

Виділення ЛПК виконували на Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) згідно з інструкцією виробника (BioReagent) [31]. Кров (2 мл) розводили PBS у спів-відношенні 1:1, після чого нашаровували на 3 мл Histopaque-1077 та центрифугували при 400 g упрод-овж 40 хв за температури 18–20 °C та відбирали кільце з лімфоцитами. Клітини відмивали 2,5 мл PBS 2 рази з перемішуванням та осадженням при 400 g протягом 10 хв. Відмиті клітини розводи-ли 2,0 мл PBS, підраховували кількість життєздат-них клітин за стандартною методикою з суправіталь-ним фарбуванням трипановим синім (Sigma) [32] та доводили концентрацію лімфоцитів до 1,0 млн/мл.

Визначення ТМП у ЛПК проводили з викорис-танням барвника JC-1 [33, 34] з деякими модифіка-ціями [35]. Вимірювання флуоресценції ($I_{ex} = 485$ нм, $I_{em} = 528$ нм та $I_{ex} = 485$ нм, $I_{em} = 590$ нм) проводили на рідері *Sinergy HT* (США). Вміст лунки планшета — 100 мкл суспензії клітин, інкубованих із барвником (100 мкл інтактних ЛПК без фарбування JC-1 в якос-ті контролю). Рівень ТМП підраховували за співвідно-шенням інтенсивності червоного ($I_{em} = 590$ нм) та зеле-ного ($I_{em} = 528$ нм) забарвлення клітин (590 нм/528 нм).

Визначення інтенсивності продукції ВР у ЛПК проводили з використанням флуоресцентного зон-ду дихлоро-флуоресцеїн-діацетату (DCFH-DA) [36, 37] з деякими модифікаціями [35]. Флуоресценцію ($I_{ex} = 485$ нм, $I_{em} = 528$ нм) вимірювали з викорис-танням рідера *Sinergy HT*. Для підрахунків використо-вували значення вимірювань на проміжку інкубації клітин 30–90 хв. Результати перераховували у мМ пероксиду водню на 1000 кл. за год (мМ/тис. клі-тин/год) за калібрувальною кривою.

Статистичну обробку результатів проводили згід-но з [38] з використанням програм «MS Excel» та «OriginPro 2019». Для оцінки наявності достовірної різниці між окремими групами використовували *t*-критерій Ст'юдента для незалежних і парних ви-бірок та критерій Манна — Уїтні. Під час кореля-ційного аналізу — критерій Спірмена. Відмінності вважали достовірними за $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Рівень ТМП у ЛПК обстеженої групи хворих на РЕ був у 1,24 раза вищим, а інтенсивність продук-ції ВР, навпаки, була у 1,58 раза нижчою ніж у УЗО контрольної групи (табл. 2), причому максимальне значення ТМП у хворих на РЕ перевищувало мак-симальне значення в групі УЗО у 1,42 раза, а мак-симальне значення продукції ВР було у 2,0 рази нижчим. Однак, відмінності між групами не були достовірними у зв'язку з високою варіабельністю дос-ліджуваних показників — коефіцієнти варіації ста-новили відповідно 0,819 і 0,877 для ТМП та 0,592 і 0,819 — для ВР. Проведення першого сеансу БТ, а та-кож введення в зразки крові МФ суттєво не на серед-

Таблиця 1

Клініко-морфологічні дані хворих на РЕ				
Показник		Середній вік, роки	Кількість хворих	
			п	%
Обстежені хворі				
Загалом		61,6	22	100,0
Стадія захворювання, TNM	T1aN0M0	62,3	3	13,6
	T1bN0M0	62,6	13	59,1
	T2N0M0	56,5	4	18,1
	T3N0M0	73,0	1	4,6
	T4N1M1	56,0	1	4,6
Ступінь диференціювання пух-лини, G	G ₁	59,0	1	4,6
	G ₂	60,8	17	72,7
	G ₃	65,0	5	22,7
Після операції			20	90,9
Хворі після БТ, 6 Гр				
Загалом		60,8	12	100,0
Стадія захворювання, TNM	T1aN0M0	63,5	2	16,7
	T1bN0M0	63,3	7	58,3
	T2N0M0	53,0	3	25,0
Ступінь диференціювання пух-лини, G	G ₂	60,5	10	83,3
	G ₃	62,0	2	16,7
Після операції			12	100,0

Таблиця 2

Рівень ТМП (590 нм/528 нм) та інтенсивність продукції ВР (мМ/тис. кл./год) у ЛПК				
		Внесення МФ у зразки крові		
		Без МФ	2 мМ	20 мМ
Хворі на РЕ	ТМП	19,316 ± 3,372	21,934 ± 3,245	21,000 ± 3,033
	ВР	13,081 ± 1,652	13,625 ± 1,602	14,801 ± 1,831
Хворі на РЕ після БТ	ТМП	18,276 ± 4,655	17,511 ± 4,938	18,832 ± 3,799
	ВР	12,899 ± 2,089	13,657 ± 2,615	12,315 ± 1,864
УЗО, група контролю	ТМП	15,536 ± 3,780	16,061 ± 4,090	17,924 ± 3,958
	ВР	20,668 ± 4,693	19,031 ± 3,324	21,987 ± 4,206

Таблиця 3

Рівень ТМП та інтенсивність продукції ВР у ЛПК хворих на РЕ залежно від стадії захворювання та ступеня диференціювання пухлини			
		Рівень ТМП (590 нм/528 нм)	Продукція ВР (мМ/тис. кл./год)
Стадія захворю-вання, TNM	T1aN0M0	13,658 ± 8,881	8,090 ± 1,099
	T1bN0M0	16,557 ± 4,321	12,404 ± 1,655
	T2N0M0	28,122 ± 6,347	18,796 ± 4,379
	T3N0M0		
	T4N1M1		
Ступінь диферен-ціювання пухли-ни, G	G ₂	20,681 ± 4,791	14,066 ± 1,884
	G ₃	15,958 ± 3,952	13,620 ± 4,705

ній рівень значень ТМП та інтенсивність продукції ВР у ЛПК (табл. 2).

Поділ хворих на РЕ на підгрупи (табл. 3) пока-зав наявність тенденції до підвищення рівня ТМП та продукції ВР у ЛПК з розвитком хвороби (за кла-сифікацією TNM). Так, порівняно з хворими ста-дії T1aN0M0 у хворих T1bN0M0 рівень ТМП на ін-тенсивність продукції ВР у ЛПК були вищими від-повідно у 1,21 та 1,53 раза, а у пацієнтів зі стадіями захворювання T2–T4 у 1,53 та 2,32 раза. Однак, від-мінності були недостовірними, що пов'язано як зі значною варіабельністю досліджених показників, так і з невеликою кількістю обстежених — 3 хворих у підгрупі T1a та 6 хворих у підгрупі T2–T4. Значних

змін у значеннях показників під час поділу обстежених хворих на підгрупи за ступенем диференціювання пухлини (G_2 та G_3) не спостерігалось. Оскільки було показано, що CD8+ Т-лімфоцити з низьким ТМП характеризуються поліпшеним метаболізмом, більшою тривалістю життя та підвищеною протипухлинною активністю [39], а мезенхімальні клітини-попередники серця із низьким ТМП мають більш високий потенціал самовідновлення [40], можна зробити припущення, що зростання ТМП у ЛПК обстежених хворих на РЕ є негативним показником. Про це свідчать і результати модельного дослідження, в якому виявлено, що зниження ТМП є одним з показників набуття раковими клітинами радіорезистентності [41].

Виходячи з того, що тривале зростання ТМП призводить до надлишкового утворення активних форм кисню, пошкодження мітохондріальної мембрани та загибелі клітин, було проаналізовано наявність кореляції між рівнями ТМП та продукцією ВР у ЛПК обстежених хворих на РЕ та УЗО, а також вплив на зв'язок між цими показниками МФ.

Для контрольної групи УЗО не було виявлено достовірного кореляційного зв'язку між рівнем ТМП та інтенсивністю продукції ВР — коефіцієнт кореляції (r) становив лише 0,341. Внесення в зразки крові МФ призводило до зниження коефіцієнта кореляції до $r = 0,280$ за концентрації препарату 2 мМ і $r = -0,115$ за 20 мМ (рис. 1).

ляції до $r = 0,280$ за концентрації препарату 2 мМ і $r = -0,115$ за 20 мМ (рис. 1).

У обстежених хворих на РЕ спостерігалась інша картина. Зв'язок між ТМП і продукцією ВР був достовірним. До початку променевої терапії $r = 0,428$ (рис. 2), а через добу після опромінення в дозі 6 Гр (перший сеанс БТ) кореляція між показниками була ще вищою $r = 0,615$ (рис. 3).

Таким чином, можна зробити висновок про наявність більш тісного зв'язку між рівнем ТМП та продукцією ВР у ЛПК хворих на РЕ, особливо на початку проведення БТ. Це свідчить про те, що ТМП поряд з такими показниками, як вміст малонового діальдегіду, утворення двониткових розривів ДНК та аберацій хромосом із застосуванням тест-опромінення зразків крові хворих до початку лікування [42], може бути використаним для прогнозу виникнення окисного стресу та виявлення пацієнтів з високим ризиком ускладнень уже на початку терапевтичного опромінення хворих на РЕ.

Введення МФ у зразки крові пацієнтів з РЕ мало ефект, подібний до того, що спостерігався для УЗО групи контролю (див. рис. 2 та рис. 3). Кореляція між рівнем ТМП та інтенсивністю продукції ВР ставала меншою, особливо за використання препарату у вищій із застосованих концентрацій 20 мМ — у випадку крові хворих на РЕ до початку променевої терапії вона була відсутньою ($r = -0,080$), а через

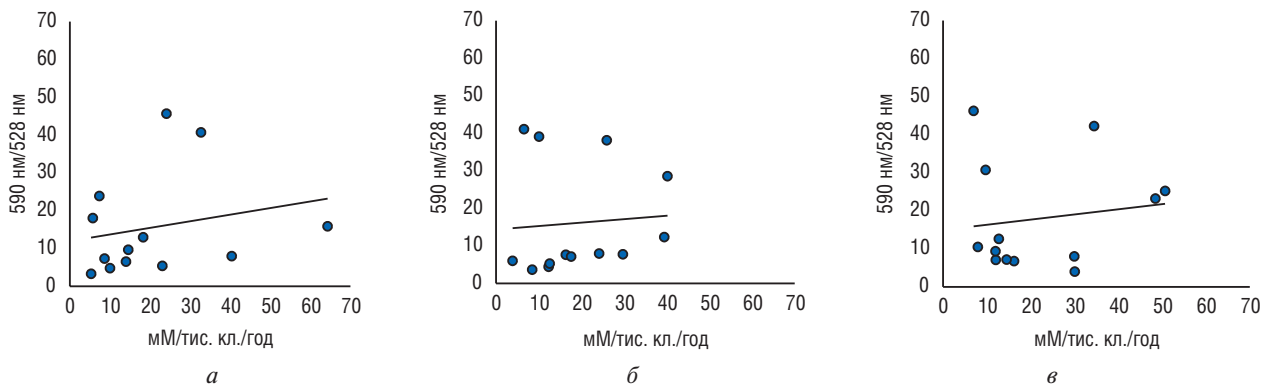


Рис. 1. Кореляційний зв'язок між індивідуальними значеннями ТМП та продукцією ВР у ЛПК УЗО за модифікувальної дії МФ: а — без впливу МФ ($r = 0,341$); б — МФ 2 мМ ($r = 0,280$); в — МФ 20 мМ ($r = -0,115$); • — індивідуальні показники; — — лінійний тренд.

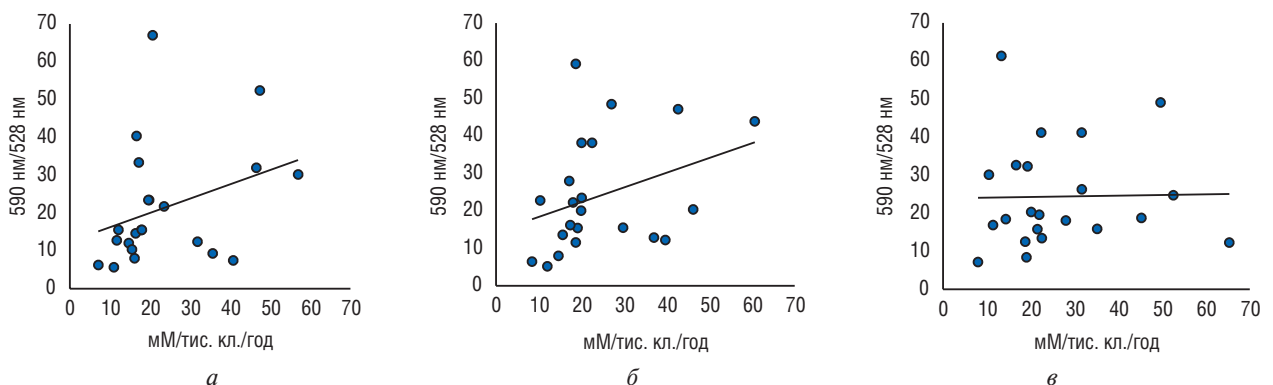


Рис. 2. Кореляційний зв'язок між індивідуальними значеннями ТМП та продукцією ВР у ЛПК хворих на РЕ до початку терапії за модифікувальної дії МФ: а — без впливу МФ ($r = 0,472$; $p < 0,05$); б — МФ 2 мМ ($r = 0,428$; $p < 0,05$); в — МФ 20 мМ ($r = -0,080$); • — індивідуальні показники; — — лінійний тренд.

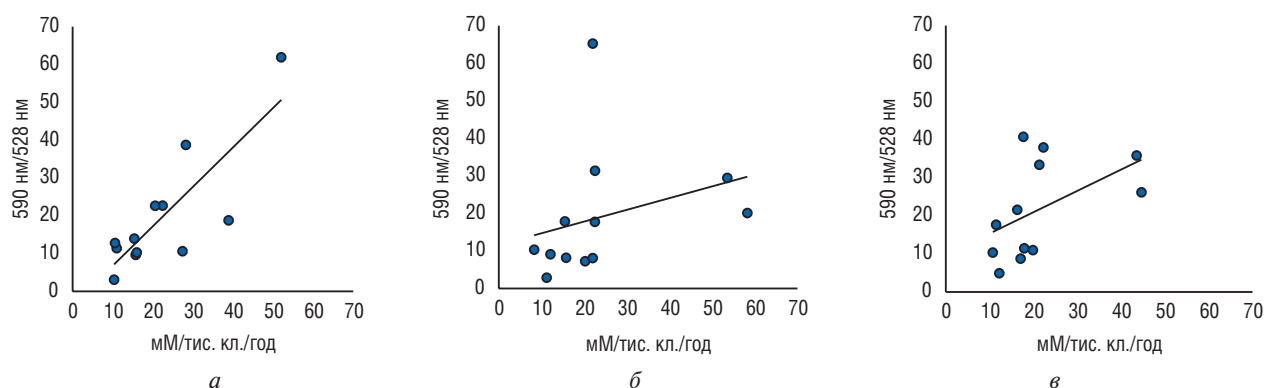


Рис. 3. Кореляційний зв'язок між індивідуальними значеннями ТМП та продукцією ВР у ЛПК хворих на РЕ через добу після першого сеансу БТ за модифікувальної дії МФ: *а* — без впливу МФ ($r = 0,685$; $p \leq 0,05$); *б* — МФ 2 мМ ($r = 0,615$; $p \leq 0,05$); *в* — МФ 20 мМ ($r = 0,594$; $p \leq 0,05$); • — індивідуальні показники; — — лінійний тренд.

добу після проведення БТ залишалася достовірною ($r = 0,594$). Зменшення зв'язку між рівнем ТМП та продукцією ВР у ЛПК за впливу МФ, що спостерігалось як для ЛПК хворих на РЕ, так і УЗО групи контролю, ймовірно, пов'язане з пригніченням функціонування мітохондріального комплексу І та, як наслідок, зменшенням утворення АФК у мітохондріях [43, 44].

ВИСНОВКИ

1. У хворих на РЕ спостерігається тенденція до зниження ТМП у ЛПК та підвищення продукції цими клітинами ВР.
2. У хворих на РЕ стадії Т2–Т4 за TNM рівень ТМП та продукції ВР підвищені у порівнянні з пацієнтами стадії Т1.
3. На відміну від контрольної групи УЗО у хворих на РЕ рівень ТМП у ЛПК достовірно корелює з продукцією ВР, і цей зв'язок стає більш тісним після першого сеансу БТ.
4. Застосування МФ *ex vivo* зменшує зв'язок між рівнем ТМП у ЛПК та продукцією клітинами ВР. Ефект дії препарату був більш вираженим при застосуванні його в більш високій концентрації 20 мМ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ding YY, Luan JJ, Fan Y, *et al.* α -Mangostin reduced the viability of A594 cells in vitro by provoking ROS production through downregulation of NAMPT/NAD. *J Cell Stress Chaperones* 2020; **25** (1): 163–172. doi: 10.1007/s12192-019-01063-2.
2. Doherty E, Perl A. Measurement of mitochondrial mass by flow cytometry during oxidative stress. *React Oxyg Species (Apex)* 2017; **4** (10): 275–83. doi: 10.20455/ros.2017.839.
3. Ren Z, Wang Y, Deng H, *et al.* Deoxynivalenol induces apoptosis in chicken splenic lymphocytes via the reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Environ Toxicol Pharmacol* 2015; **39** (1): 339–46. doi: 10.1016/j.etap.2014.11.028.
4. Michałowicz J, Mokra K, Rosiak K, *et al.* Chlorobenzenes, lindane and dieldrin induce apoptotic alterations in human peripheral blood lymphocytes

(*in vitro* study). *Environ Toxicol Pharmacol* 2013; **36** (3): 979–88. doi: 10.1016/j.etap.2013.08.014.

5. Gupta S, Yel L, Kim D, *et al.* Arsenic trioxide induces apoptosis in peripheral blood T lymphocyte subsets by inducing oxidative stress: a role of Bcl-2. *Mol Cancer Ther* 2003; **2** (8): 711–9.

6. Song B, Li T, Chen S, *et al.* Correlations between MTP and ROS levels of peripheral blood lymphocytes and readmission in patients with chronic heart failure. *Heart Lung Circ* 2016; **25**(3): 296–302. doi: 10.1016/j.hlc.2015.09.004.

7. Armon-Omer A, Neuman H, Sharabi-Nov A, *et al.* Mitochondrial activity is impaired in lymphocytes of MS patients in correlation with disease severity. *Mult Scler Relat Disord* 2020; **41**:102025. doi: 10.1016/j.msard.2020.102025.

8. Perl A, Gergely P Jr, Banki K, *et al.* Mitochondrial dysfunction in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Int Rev Immunol* 2004; **23** (3-4): 293–313. doi: 10.1080/08830180490452576.

9. Takabayashi A, Kanai M, Kawai Y, *et al.* Change in mitochondrial membrane potential in peripheral blood lymphocytes, especially in natural killer cells, is a possible marker for surgical stress on the immune system. *World J Surg* 2003; **27** (6): 659–65. doi: 10.1007/s00268-003-6926-7.

10. Leach JK, Van Tuyle G, Lin PS, *et al.* Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res* 2001; **61** (10): 3894–901.

11. Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, *et al.* Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic Biol Med* 2012; **53**(2): 260–70. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033.

12. Saenko Y, Cieslar-Pobuda A, Skonieczna M, *et al.* Changes of reactive oxygen and nitrogen species and mitochondrial functioning in human K562 and HL60 cells exposed to ionizing radiation. *Radiat Res* 2013; **180** (4): 360–6. doi: 10.1667/RR3247.1.

13. **Farhood B, Goradel NH, Mortezaee K, et al.** Melatonin as an adjuvant in radiotherapy for radioprotection and radiosensitization. *Clin Transl Oncol* 2019; **21** (3): 268–79. doi: 10.1007/s12094-018-1934-0.
14. **Mun GI, Kim S, Choi E, et al.** Pharmacology of natural radioprotectors. *Arch Pharm Res* 2018; **41** (11): 1033–50. doi: 10.1007/s12272-019-01194-1.
15. **Suit H, Goldberg S, Niemierko A, et al.** Secondary carcinogenesis in patients treated with radiation: a review of data on radiation-induced cancers in human, non-human primate, canine and rodent subjects. *Radiat Res* 2007; **167** (1): 12–42. doi: 10.1667/RR0527.1.
16. **Martin OA, Martin RF.** Cancer Radiotherapy: Understanding the Price of Tumor Eradication. *Front Cell Dev Biol* 2020; **8**: 261. doi: 10.3389/fcell.2020.00261.
17. **Domina EA.** Radiogenic cancer: Epidemiology and primary prevention. Kiyv: Naukova Dumka, 2016. 196 p. (in Russian).
18. **Maier P, Hartmann L, Wenz F, et al.** Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int J Mol Sci* 2016; **17** (1): 102. doi: 10.3390/ijms17010102.
19. **Cheki M, Shirazi A, Mahmoudzadeh A, et al.** The radioprotective effect of metformin against cytotoxicity and genotoxicity induced by ionizing radiation in cultured human blood lymphocytes/ *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2016; **809**: 24–32. doi: 10.1016/j.mrgentox.2016.09.001.
20. **Kolivand S, Motevaseli E, Cheki M, et al.** The anti-apoptotic mechanism of metformin against apoptosis induced by ionizing radiation in human peripheral blood mononuclear cells. *Klin Onkol* Fall 2017; **30** (5): 372–9. doi: 10.14735/amko2017372.
21. **Bikas A, Van Nostrand D, Jensen K, et al.** Metformin attenuates ¹³¹I-induced decrease in peripheral blood cells in patients with differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2016; **26** (2): 280–6. doi: 10.1089/thy.2015.0413.
22. **Wang G, Wang Y, Yang Q, et al.** Metformin prevents methylglyoxal-induced apoptosis by suppressing oxidative stress in vitro and in vivo. *Cell Death Dis* 2022; **13** (1): 29. doi: 10.1038/s41419-021-04478-x.
23. **Haddad M, Eid S, Harb F, et al.** Activation of 20-HETE synthase triggers oxidative injury and peripheral nerve damage in type 2 diabetic mice. *J Pain*; S1526-5900(22)00048-7. doi: 10.1016/j.jpain.2022.02.011.
24. **Yasmin T, Rahman MM, Khan F, et al.** Metformin treatment reverses high fat diet- induced non-alcoholic fatty liver diseases and dyslipidemia by stimulating multiple antioxidant and anti-inflammatory pathways. *Biochem Biophys Rep* 2021; **28**:101168. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.101168.
25. **Zhao Y, Luo Q, Mo J, et al.** Metformin in combination with JS-K inhibits growth of renal cell carcinoma cells via reactive oxygen species activation and inducing DNA breaks. *J Cancer* 2020; **11** (13): 3701–12. doi: 10.7150/jca.36372.
26. **Zhao B, Luo J, Wang Y, et al.** Metformin suppresses self-renewal ability and tumorigenicity of osteosarcoma stem cells via reactive oxygen species-mediated apoptosis and autophagy. *Oxid Med Cell Longev* 2019; **2019**: 9290728. doi: 10.1155/2019/9290728.
27. **Wandee J, Prawan A, Senggunprai L, et al.** Metformin sensitizes cholangiocarcinoma cell to cisplatin-induced cytotoxicity through oxidative stress mediated mitochondrial pathway. *Life Sci* 2019; **217**: 155–163. doi: 10.1016/j.lfs.2018.12.007.
28. **Kurelac I, Umesh Ganesh N, Iorio M, et al.** The multifaceted effects of metformin on tumor microenvironment. *Semin Cell Dev Biol* 2020; **98**: 90–97. doi: 10.1016/j.semcdb.2019.05.010.
29. **Nassif RM, Chalhoub E, Chedid P, et al.** Metformin inhibits ROS production by human M2 macrophages via the activation of AMPK. *J Biomedicine* 2022; **10** (2): 319. doi: 10.3390/biomedicine10020319.
30. **Fedorenko Z, Michailovich Yu, Goulak L, et al.** Cancer in Ukraine, 2018–2019. Bulletin of National cancer registry of Ukraine. Kiyv: National cancer institute of Ukraine 2020; **21**: 116 p. (in Ukrainian).
31. Product Information Histopaque®-1077 Hybri-Max™ (H8889) (https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/h8889pis.pdf).
32. **Bokunyaeva NI, Zolotnitskaya RP.** Handbook of clinical laboratory research methods. Moscow: Medicine, 1975. 384 p. (in Russian).
33. **Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L.** Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe. *Bio Protoc* 2019; **9** (01): e3128. doi:10.21769/BioProtoc.3128.
34. MitoPT® JC-1 Assay Manual. ImmunoChemistry Technologies, LLC. #F18-911-8-G, 8 p. (www.immunocytochemistry.com).
35. **Glavin OA, Domina EA, Mikhailenko VM, et al.** Metformin as a modifier of the oxidative state of peripheral blood and the viability of human lymphocytes under the influence of ionizing radiation. *Oncology* 2020; **22** (1–2): 84–91 (in Ukrainian).
36. **Yao K, Wu W, Wang KJ, et al.** Electromagnetic noise inhibits radiofrequency radiation-induced DNA damage and reactive oxygen species increase in human lens epithelial cells. *Mol Vis* 2008; **14**: 964–9.
37. **Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB.** Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; **286** (3): R431–44. doi: 10.1152/ajpregu.00361.2003.
38. **Lakin GF.** Biometrics. M.: Publishing House «Vysshaya shkola», 1990. 352 p. (in Russian).
39. **Sukumar M, Liu J, Mehta GU, et al.** Mitochondrial Membrane Potential Identifies Cells with Enhanced Stemness for Cellular Therapy. *Cell Metabolism* 2016; **23** (1): 63–76. doi: 10.1016/j.cmet.2015.11.002.
40. **Gambini E, Martinelli I, Stadiotti I, et al.** Differences in Mitochondrial Membrane Potential Identify Distinct Populations of Human Cardiac Mesenchymal Progenitor Cells. *Int J Mol Sci* 2020; **21** (20): 7467. doi: 10.3390/ijms21207467.

41. Kuwahara Y, Tomita K, Roudkenar MH, *et al.* Decreased mitochondrial membrane potential is an indicator of radioresistant cancer cells. Life Sciences. 2021; 286:120051. doi: 10.1016/j.lfs.2021.120051.

42. Domina EA, Makovetska LI, Hrinchenko OO, *et al.* Practical approaches to the detection of patients with endometrial cancer with an increased risk of complications of radiation therapy based on predictors of radiosensitivity of cells from the tumor environment. Guidelines. «DIA». Kyiv, 2021. 28 p. (in Ukrainian).

43. Yu X, Mao W, Zhai Y, *et al.* Anti-tumor activity of metformin: from metabolic and epigenetic perspectives. Oncotarget 2017; 8 (3): 5619–28. doi: 10.18632/oncotarget.13639.

44. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem J 2009; 417(1): 1–13. doi: 10.1042/BJ20081386.

THE LEVEL OF MITOCHONDRIAL TRANSMEMBRANE POTENTIAL AND INTENSITY OF FREE RADICAL COMPOUNDS FORMATION IN LYMPHOCYTES OF ENDOMETRICS CANCER PATIENTS

O.A. Glavin, E.A. Domina

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

Summary. The level of the mitochondrial membrane polarization and the intensity of reactive oxygen and nitrogen species are important indicators that reflect changes in the functioning of non-malignant cells from the tumor environment, in particular when radiation therapy and substances with possible radioprotective effect were using. **Aim:** to investigate the relationship between the level of mitochondrial transmembrane potential (TMP) and the intensity of free radical compounds (FR) formation in peripheral blood lymphocytes (PBL) of patients with endometrial cancer (EC) before and after brachytherapy. Assess the effect of metformin (MF) on these indicators in ex vivo system. **Object and methods:** in the study used samples of peripheral blood of PE patients before

radiation therapy and after the first session of brachytherapy at a dose of 6 Gy, as well as the blood of apparently healthy individuals (control group). MF was added to blood samples at final concentrations of 2 and 20 mM before 1 h of PBL isolation. In the PBL were determined the level of TMP using the dye JC-1 and the intensity of FR formation using the dye DCFH-DA. **Results:** it is shown that in the PBL of the examined group of RE patients there was a tendency to increase the level of TMP (1,24 times) and decrease the production of FR (1,58 times). Also, in the examined patients with T2–T4 disease stage, the level of TMP and the intensity of FR production was 1,70 and 1,61 times higher, respectively, compared with patients with T1 stage. In contrast to women in the control group, the examined patients showed a significant correlation between the level of TMP and the intensity of FR production ($r = 0,428$), which was closer after the first session of brachytherapy ($r = 0,615$). The use of MF, especially at a concentration of 20 mM, reduced the correlation between these indicators. **Conclusions:** in patients with PE there is a significant correlation between the level of TMP and the FR formation in the PBL. At the beginning of brachytherapy, this correlation becomes closer, which indicates the possibility of using the TMP to predict the occurrence of oxidative stress at the beginning of therapeutic exposure of patients with PE. In the model system, it is shown that MF reduces the relationship between the FR production and the level of TMP in the PBL.

Key words: endometrial cancer, peripheral blood lymphocytes, free radicals, transmembrane potential of mitochondria, brachytherapy, metformin.

Адреса для листування:

Главін О.А.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: veterok61@ukr.net

Одержано: 5.05.2022