

О.А. Главін¹,
Е.А. Дьоміна¹,
В.С. Іванкова²,
Т.В. Хруленко²,
І.В. Прокопенко¹,
Л.І. Маковецька¹

¹ Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України,

² Державне некомерційне підприємство “Національний інститут раку” Міністерства охорони здоров’я України, Київ, Україна

Ключові слова: рак шийки матки, лімфоцити периферичної крові, трансмембранний потенціал мітохондрій, вільні радикали.

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2024.02.095>

ДОСЛІДЖЕННЯ ТРАНС-МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ МІТОХОНДРІЙ ТА ГЕНЕРАЦІЇ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ СПОЛУК У ЛІМФОЦИТАХ ХВОРИХ НА РАК ШИЙКИ МАТКИ

Важливими показниками, що відображають зміни функціонального стану немалігнізованих клітин із оточення пухлини та можуть бути використані як предиктори виникнення ускладнень внаслідок променевої та хіміопроменевої терапії є рівень поляризації мітохондріальної мембрани та інтенсивність напрацювання реактивних форм кисню і азоту (вільнорадикальних сполук, ВР). **Мета:** дослідити зміни трансмембранного потенціалу мітохондрій (ТМП) та інтенсивність напрацювання ВР у лімфоцитах периферичної крові (ЛПК) хворих на рак шийки матки (РШМ) до початку хіміопроменевої терапії. **Об’єкт і методи:** у дослідженні використовували зразки периферичної крові 26 хворих на РШМ перед початком хіміопроменевої терапії та 29 умовно здорових осіб (УЗО, група контролю). Виділення ЛПК виконували на Histopaque®-1077. Рівень ТМП у лімфоцитах визначали з використанням барвника JC-1, інтенсивність напрацювання ВР — з використанням барвника DCFH-DA. **Результати:** Показано, що у ЛПК хворих на РШМ спостерігалась тенденція до зниження ТМП (в 1,46 раза) та достовірно менша генерація ВР (у 2,84 раза). В обстежених хворих із більшим ступенем розповсюдженості первинної пухлини (T_2 порівняно з T_1) або більшим ступенем її диференціювання (G_2 порівняно з $G_{2/3-3}$) рівень ТМП був вищим (в 1,35 та 1,47 раза, відповідно). У хворих на РШМ, на відміну від УЗО, виявлено достовірну кореляцію між рівнем ТМП та інтенсивністю напрацювання ВР ($r=0,473$). Показано, що у ЛПК хворих на РШМ із стадією пухлинного процесу $T_1N_0M_0$ і ступенем диференціювання пухлини G_2 рівень ТМП та інтенсивність напрацювання ВР є достовірно нижчими (у 1,91 та 1,88 раза, відповідно), ніж у аналогічних хворих на рак тіла матки, яких було обстежено раніше. **Висновки:** функціональний стан лімфоцитів крові хворих на РШМ до проведення хіміопроменевої терапії вже є зміненим за показниками величини ТМП та продукції ВР, які є істотно нижчими ніж в УЗО. На відміну від контрольної групи, виявлено достовірну кореляцію між рівнями ТМП і продукції ВР у ЛПК обстежених хворих. Показано, що у хворих на РШМ зі стадією захворювання $T_1N_0M_0$ і ступенем диференціювання пухлини G_2 зміни рівня ТМП та інтенсивності напрацювання ВР є більш вираженими, ніж у аналогічній групі хворих на рак тіла матки. Одержані результати є базовими для оцінки змін, що відбуваються у нормальних клітинах із оточення пухлини після променевої терапії.

На 2020 рік у світі було зареєстровано 604 000 нових випадків захворювання на рак шийки матки (РШМ) та 342 000 смертей. Це захворювання посідало четверте місце серед усіх видів раку за захворюваністю та смертністю у жіночого населення та є основною причиною смертності від раку в 36 країнах світу [1].

В Україні, за даними Національного канцерреєстру, РШМ у 2022 р. посідав 5-е місце на он-

кологічну захворюваність серед жінок (5,5%) та 9-е місце по смертності (5,9%). Особливо висока захворюваність спостерігалась для жінок віком 30–44 роки — 2-е місце від загальної онкологічної захворюваності жінок даної вікової категорії (15%). У 2023 р. було виявлено 2962 нових випадків РШМ та зафіксовано 1075 смертей [2].

Основним методом лікування РШМ у більшості випадків є радикальні програми променевої

терапії (ПТ), а саме поєднаної ПТ (дистанційна та внутрішньопорожнинна, або брахітерапія), з використанням хіміотерапевтичних препаратів в якості радіомодифікаторів [3]. Однак, механізм знищення клітин радіацією не є селективним для пухлинних клітин. Не дивлячись на досягнення у проведенні ПТ, опроміненню також піддаються немалігнізовані клітини хворих [4–6], що може обумовити розвиток променевого ускладнення [7]. Токсичні прояви при ПТ є поширеним явищем і виникають як внаслідок застосування більш високих доз ПТ, так і в результаті комбінованих ефектів при застосуванні інших методів лікування. Тому, для оптимального проведення ПТ, потрібен баланс між максимізацією дози, отриманої пухлиною, і мінімізацією дози, отриманої нормальними тканинами [8].

Показано, що пізні ускладнення внаслідок проведення ПТ можуть виникати через значний проміжок часу. За даними Yamada T., et al. [9] у 49,0% хворих на РШМ зафіксовано виникнення побічних проявів та у 24,2% — серйозних ускладнень протягом 74,3 місяця після закінчення ПТ. Додаткове застосування хіміотерапії не впливало на частоту і тяжкість пізніх ускладнень. Gellrich J., et al. повідомили про те, що середній час латентного періоду урологічних ускладнень після ПТ дорівнює 19,4 року [10]. Тому, важливим є виявлення онкологічних хворих, які мають найбільший ризик розвитку ускладнень при ПТ з метою відповідної корекції процесу лікування [11].

Опромінення органів малого тазу при ПТ хворих на РШМ призводить до значного пошкодження клітин периферичної крові — зниження кількості абсолютного числа нейтрофілів, лімфоцитів та тромбоцитів [12]. У ряді досліджень показано, що зміни стану клітин крові хворих та їх співвідношення можуть бути предикторами ефективності лікування хворих на РШМ [13–15].

Ризик виникнення побічних ефектів у хворих на рак, що проходять ПТ та хіміотерапію, може бути обумовлено інтенсивним виробництвом активних форм кисню (АФК) під дією іонізуючого випромінювання (ІВ) або деяких хіміотерапевтичних препаратів [16]. Утворення цих реактивних сполук може відбуватися як у результаті радіолізу води за безпосередньої дії ІВ, так і опосередковано, внаслідок пошкодження біологічно активних макромолекул і змін функціонального стану клітин [17, 18].

Значна роль у цих процесах належить мітохондріям, які одночасно є й основною мішенню прямої дії ІВ, а також основним джерелом утворення радіаційно-індукованих АФК за дії опромінення [17, 19–21]. У багатьох дослідженнях показано зв'язок між інтенсивністю продукції АФК мітохондріями, рівнем трансмембранного потенціалу мітохондріальної мембрани (ТМП) та загибеллю

клітин. Підвищені рівні АФК, що утворюються за прямого впливу ІВ, можуть призвести до порушень окисного фосфорилування мітохондрій, значного підвищення ТМП і, як результат, викликати додаткове утворення значної кількості АФК, які ще більше посилюють внутрішньоклітинне навантаження АФК, пошкоджують мітохондріальну мембрану та викликають падіння її ТМП [22, 23].

Втрата потенціалу мітохондріальної мембрани є критичною подією у клітині, а мітохондріально-залежний шлях апоптозу є основним способом радіаційно-індукованої загибелі клітин внаслідок надмірної продукції АФК [20, 24]. Слід приймати до уваги те, що втрата ТМП, активація генерації АФК та загибель клітин від апоптозу за впливу ІВ — це тривалий за часом процес, а швидкість його реалізації залежить від типу клітин, їх радіочутливості та дози ІВ [25–27].

Немалігнізовані клітини онкологічних хворих можуть бути значно модифіковані внаслідок розвитку канцерогенезу вже до початку терапії [28]. Тому зміни функціонування їх мітохондрій є важливими при лікуванні онкологічних хворих. Показано роль мітохондрій, як джерела ендогенних АФК, у сповільненні загоєння ран при ураженнях внаслідок дії ІВ [29]. Моніторинг рівня ТМП у лімфоцитах периферичної крові (ЛПК) може бути одним з корисних маркерів для оцінки ступеня післяопераційного стресу імунної системи [30].

Все більше даних свідчать про те, що зміни морфології та метаболізму мітохондрій пов'язані з радіорезистентністю, але отримані результати є дещо контраверсійними. Одні автори вважають, що хронічний окислювальний стрес, присутній у радіорезистентних клітинах, передбачає стійкість до окислювального стресу, індукованого ІВ [31]. За даними інших, радіорезистентність клітин пов'язана зі збільшеною кількістю мітохондрій і більш високим вмістом мтДНК [32]. Taghizadeh-Hesary F., et al. вважають, що майбутні дослідження покликані більш детально вивчити вплив мітохондріального метаболізму на ефективність дії та токсичність радіації з метою поліпшення відповіді на променеву терапію за рахунок зменшення мітохондріального метаболізму ракових клітин та зниження токсичності променевої терапії внаслідок посилення мітохондріального метаболізму нормальних клітин [33]. Wei Y., et al., навпаки, зазначають, що мітохондріальна дисфункція є причиною радіаційної стійкості пухлинних клітин. Вони припускають, що відновлення функцій мітохондрій може бути ефективним методом підвищення радіочутливості пацієнтів з колоректальним раком [34].

Значний інтерес у якості об'єкта для досліджень представляють ЛПК — найбільш радіочутливі клітини людини [35]. В дослідженні Holub K., et al. показано, що ПТ призводила до зменшення по-

Таблиця 1

Клініко-морфологічні дані обстежених хворих на РШМ

Розподіл обстежених	Кількість обстежених, n	Частка від усіх обстежених, %	Середній вік, роки
Стадія захворювання, TNM			
Загалом	31	100,0	50,8
T ₁ N ₀ M ₀	12	38,7	52,6
T ₁ N _x M ₀	1	3,2	58,0
T ₁ N ₁ M ₀	2	6,5	56,5
T ₂ N ₀ M ₀	6	19,4	52,8
T ₂ N _x M ₀	1	3,2	67,0
T ₂ N ₁ M ₀	3	9,7	51,0
T ₂ N ₁ M _x	2	6,5	32,5
T ₂ N ₁ M ₁	1	3,2	33,0
T ₃ N ₁ M ₀	1	3,2	53,0
T ₄ N ₀ M ₀	1	3,2	30,0
T ₄ N ₁ M ₁	1	3,2	56,0
Ступінь диференціювання пухлини, G			
Загалом	30	100,0	51,6
G ₂	24	80,0	52,5
G _{2/3}	2	6,7	55,0
G ₃	4	13,3	44,0

пуляції лімфоцитів у хворих на РШМ та рак тіла матки (РТМ), а хіміопроменева терапія впливала на всі підтипи лейкоцитів [36]. У дослідженні на мітохондріях з ЛПК людини показано кореляцію між показниками ТМП, підвищеною генерацією АФК та активних форм азоту і виникненням нітративного стресу [37]. Тому, актуальним є дослідження рівнів ТМП та загальної генерації вільно-радикальних сполук (ВР — АФК та активних форм азоту сумарно) у нормальних клітинах з оточення пухлини та її ложа.

Метою даного дослідження було визначити зміни ТМП та напрацювання ВР у ЛПК хворих на РШМ до початку проведення хіміопроменевої терапії.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Роботу виконано на зразках периферичної крові 26 хворих на РШМ (15 неоперованих та 11 оперованих) віком від 21 до 69 років (середній вік по групі 51,6 року) до початку проведення променевої або/та хіміотерапії. У 87,5% було діагностовано плоскоклітинну карциному та у 12,5% аденокарциному шийки матки. Характеристика обстежених хворих на РШМ за стадією захворювання (TNM) та ступенем диференціювання пухлини (G) представлена у *табл. 1*. Контролем слугувала група з 29 умовно здорових жінок (УЗО) віком від 30 до 69 років (середній вік 41,9 року). Отримані результати для хворих на РШМ зі стадією пухлинного процесу T₁N₀M₀ та ступенем диференціювання пухлини G₂ (12 хворих, з них у 10 — плоскоклітинна карцинома шийки матки та у 2 — аденокарцинома шийки матки, 11 після операції, середній вік 52,6 року) також порівнювали з даними, що були отримані для хворих на рак ендометрію (рак тіла матки, РТМ) з такими ж стадією захворювання та ступенем диференціювання пухлини (11 оперованих хворих з аденокарциною тіла матки до початку проведення променевої або/та хіміотерапії, середній вік 62,6 року), яких було обстежено при проведенні попереднього дослідження [38].

Відповідно до принципів проведення біомедичних досліджень, у обстежених було отримано інформовану згоду на участь у дослідженні. Зразки крові відбирали в стерильні пробірки Vacutainer ("F.L. Medical", Італія) об'ємом 6 мл з антикоагулянтном Li-гепарин та транспортували і зберігали при температурі 3–5°C.

Виділення ЛПК виконували на Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, США) згідно інструкції виробника (BioReagent) [39]. Кров (4 мл) розводили PBS у співвідношенні 1 : 1 після чого нашаровували на 4 мл Histopaque®-1077 та центрифугували при 400 g впродовж 40 хв при (18–20°C) та відбирали кільце з мононуклеарами. Клітини відмивали 5,0 мл PBS 2 рази з перемішуванням та осадженням при 400 g протягом 10 хв. Відмиті клітини

розводили 2,0 мл PBS, підраховували кількість життєздатних клітин за стандартною методикою з суправітальним фарбуванням трипановим синім (Sigma) [40] та доводили PBS концентрацію лімфоцитів до 1,0 млн/мл.

Визначення ТМП у ЛПК проводили з використанням флуоресцентного барвника JC-1 [41, 42] з деякими модифікаціями [43]. Вимірювання флуоресценції (λ_{ex} = 485 нм, λ_{em} = 528 нм та λ_{ex} = 485 нм, λ_{em} = 590 нм) проводили на рідері Sinergy HT (США). Вміст лунки планшета — 100 мкл суспензії клітин, інкубованих із барвником (100 мкл суспензії ЛПК без фарбування JC-1 слугували в якості контролю). Рівень ТМП підраховували за співвідношенням емісії суспензії клітин на 590 нм та 528 нм — 590 нм/528 нм.

Визначення інтенсивності напрацювання ВР у ЛПК проводили з використанням флуоресцентного барвника 2',7'-дихлоро-флуоресцеїн-діацетату (DCFH DA) [44, 45] з деякими модифікаціями [43]. Інтенсивність флуоресценції (λ_{ex} = 485 нм, λ_{em} = 528 нм) вимірювали при інкубації суспензії клітин у PBS протягом 90 хв при температурі 37°C з використанням рідера Sinergy HT. Для підрахунків використовували значення вимірювань на проміжку інкубації клітин 30–90 хв. Результати перераховували у мМ перексиду водню на 1000 клітин за годину (мМ/тис. кл./год) за калібрувальною кривою.

Базуючись на результатах досліджень формених елементів крові проаналізовано вміст еритро-

цитів, тромбоцитів, лейкоцитів та лімфоцитів у обстежених хворих на РШМ.

Статистичну обробку результатів проводили згідно [46] з використанням програм “MS Excel” та “OriginPro 2019”. Для оцінки наявності достовірної різниці між окремими групами використовували *t*-критерій Student та критерій Mann Whitney. При кореляційному аналізі — критерій Spearman. Відмінності вважали достовірними за $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для обстежених хворих на РШМ було проаналізовано дані щодо складу формених елементів крові (еритроцити, тромбоцити і лейкоцити) та частки лімфоцитів у пулі лейкоцитарних клітин (табл. 2). Виявлено особи з показниками як вище, так і нижче граничних значень норми. Найбільше відхилень від норми було зафіксовано відносно вмісту в крові тромбоцитів — 56,3% обстежених. У 46,9% хворих спостерігався тромбоцитоз із перевищенням максимальних значень норми до 1,5 раза, а у 18,8% виявлено тромбоцитопенію зі зниженим вмістом цих клітин до 3,7 раза порівняно з мінімальними значеннями норми. Також слід відмітити, що у 31,3% хворих на РШМ спостерігались еритро- та лейкопенія. Більш вираженим було падіння кількості лейкоцитів — до 2,1 раза порівняно з нижчим значенням норми. Не було виявлено значних змін вмісту лімфоцитів у пулі лейкоцитарних клітин. Максимальне зниження вмісту еритроцитів не перевищувало мінімально нормальне більш ніж у 1,3 раза.

У порівнянні з УЗО для ЛПК обстежених хворих на РШМ спостерігалась тенденція до зниження ТМП в 1,46 раза та достовірне ($p \leq 0,05$) зниження рівня продукції ВР у 2,84 раза (рис. 1). Проаналізовано наявність кореляції між рівнем продукції ВР у ЛПК та значеннями ТМП у цих клітинах. На відміну від жінок контрольної групи, для яких не було виявлено достовірної кореляції між показниками (рис. 2А; $r=0,300$; $n=21$), для обстежених хворих на РШМ виявлено достовірну ($p \leq 0,05$) кореляцію між інтенсивністю продукції лімфоцитами ВР та значеннями ТМП (рис. 2Б; $r=0,473$; $n=30$).

Значна частина хворих (41,9%) до проведення їх обстеження була прооперована. Для останніх не

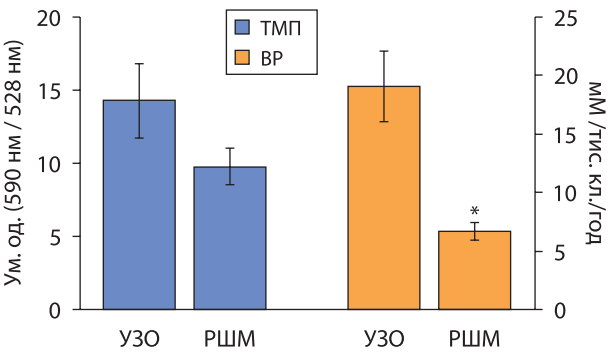


Рис. 1. Рівні ТМП та інтенсивності напрацювання ВР у ЛПК УЗО та хворих на РШМ до початку хіміопроменевої терапії

* — достовірна відмінність ($p \leq 0,05$) від групи контролю (УЗО).

було виявлено значної різниці як по інтенсивності напрацювання ВР, так і рівня ТМП у ЛПК. Рівень ТМП для підгрупи неоперованих хворих складав $10,79 \pm 1,87$ ум. од. і $8,37 \pm 1,47$ ум. од. для оперованих. Інтенсивність напрацювання ВР у ЛПК відповідно дорівнювала $7,08 \pm 0,98$ і $6,14 \pm 1,22$ мм/тис. кл./год. Також було проаналізовано наявність різниці по дослідженим показникам при поділі обстежених хворих на РШМ на підгрупи в залежності від ступеня розповсюдженості первинної пухлини T_1 або T_2 (рис. 3) та ступеня диференціювання пухлини G_2 або $G_{2/3-3}$ (рис. 4). В обох випадках достовірної різниці по значенням ТМП та продукції ВР між підгрупами не було виявлено. Однак, для хворих з більшим ступенем розповсюдженості первинної пухлини T_2 рівні ТМП та продукції ВР були вищими, відповідно, у 1,35 та 1,18 разів (див. рис. 3). Також, більш високі рівні цих показників були зафіксовані для хворих з більш високим ступенем диференціювання пухлини G_2 — для ТМП у 1,47 раза та у 1,19 раза для продукції ВР (див. рис. 4).

Рівні ТМП та продукції ВР у ЛПК було досліджено як у цьому дослідженні, так і попередньому [38], коли ці показники визначали у лімфоцитах хворих на РТМ. Більш репрезентативними підгрупами у цих дослідженнях були обстежені пацієнтки зі стадією пухлинного процесу $T_1N_0M_0$ та ступенем диференціювання пухлини G_2 — 12 хворих на РШМ та 11 хворих на РТМ. Тому, ми порівня-

Таблиця 2

Вміст формених елементів крові у хворих на РШМ до початку проведення променевої або/та хіміотерапії (відхилення від норми)

	Еритроцити, $\times 10^{12}/л$	Тромбоцити, $\times 10^9/л$	Лейкоцити, $\times 10^9/л$	Лімфоцити, %
мін. – макс.	3,0 – 5,5	45,0 – 484,0	1,9 – 11,1	20,0 – 40,0
Норма	3,8 – 4,5	170,0 – 320,0	4,0 – 9,0	18,0 – 40,0
Вище норми, %	18,8	37,5	6,3	—
Нижче норми, %	31,3	18,8	31,3	6,3

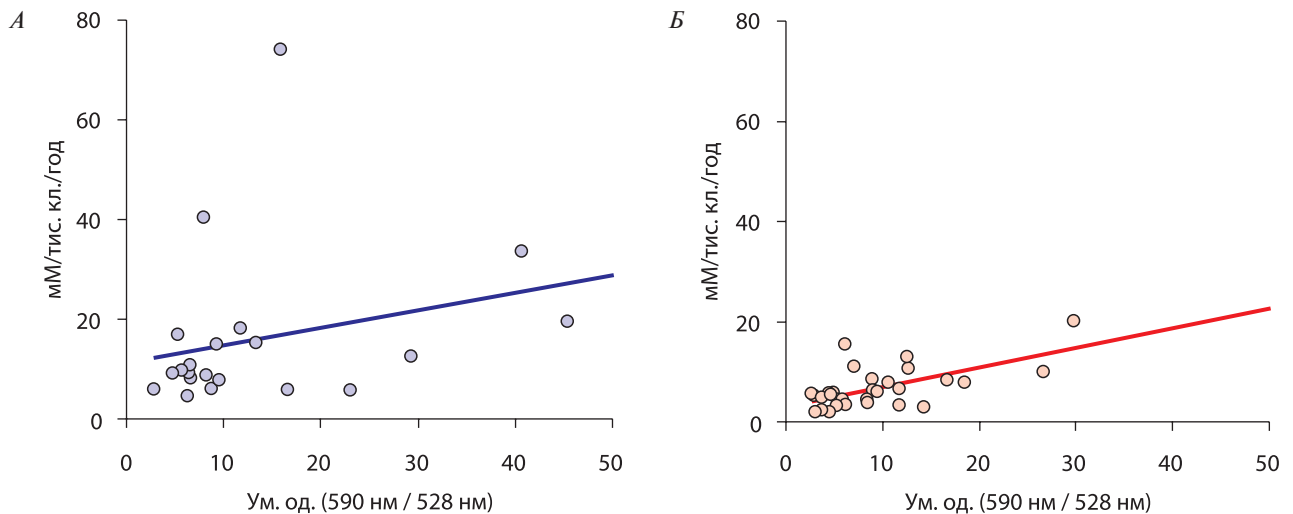


Рис. 2. Кореляційний зв'язок між індивідуальними значеннями ТМП та напрацюванням ВР у ЛПК УЗО (А) та хворих на РШМ (Б): О — індивідуальні показники; — — лінійний тренд

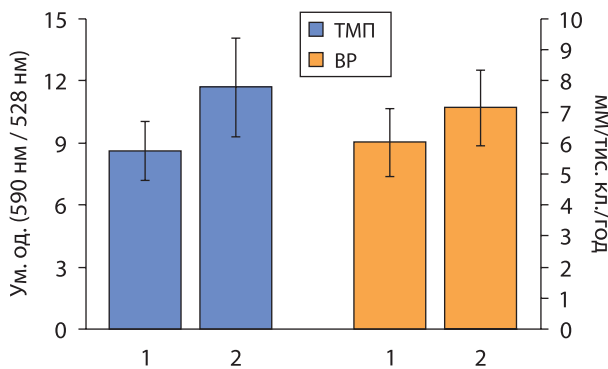


Рис. 3. Рівні ТМП та напрацювання ВР у ЛПК хворих на РШМ до початку хіміопроменевої терапії у залежності від ступеня розповсюдженості первинної пухлини: 1 — T_1 ; 2 — T_2

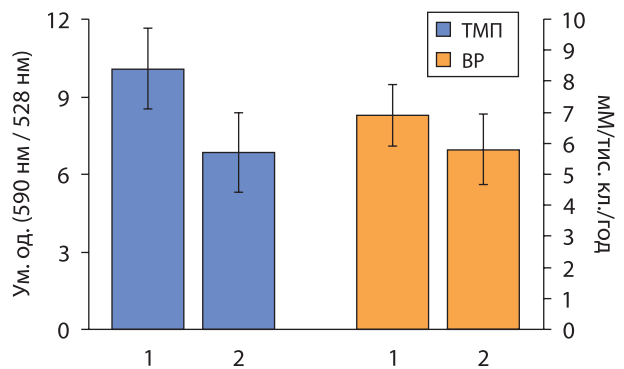


Рис. 4. Рівні ТМП та напрацювання ВР у ЛПК хворих на РШМ до початку хіміопроменевої терапії у залежності від ступеня диференціювання пухлини: 1 — G_2 ; 2 — $G_{2/3-3}$

ли зміни зазначених показників у їх лімфоцитах (рис. 5) та виявили істотну різницю. Для хворих на РШМ були більш вираженими відмінності по продукції ВР — достовірно ($p \leq 0,05$) зниження їх генерації у 3,13 раза порівняно з таким в УЗО та в 1,88 раза порівняно з хворими на РТМ, для яких продукція ВР була нижчою ніж у жінок контрольної групи в 1,66 раза. Також, у лімфоцитах хворих на РШМ спостерігалась тенденція до зниження ТМП у 1,63 раза при порівнянні з аналогічними показниками УЗО, чого не було виявлено у випадку хворих на РТМ.

Таким чином, було встановлено, що у хворих на РШМ спостерігається значне зниження рівня ТМП та інтенсивності загальної продукції ВР у ЛПК. Такі результати були дещо несподіваними. Зазвичай низький рівень ТМП під час мітохондріальної дисфункції пов'язаний із підвищеною продукцією АФК, а його стійке зниження

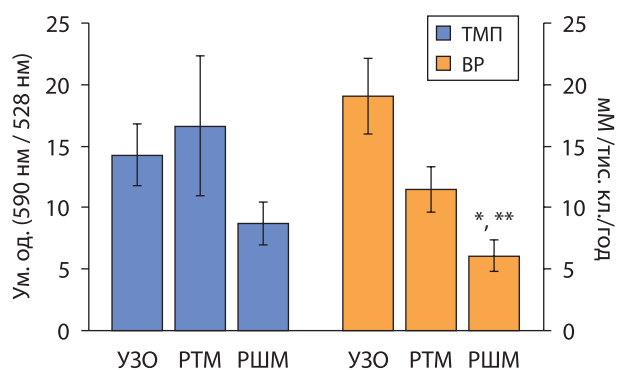


Рис. 5. Рівні ТМП та напрацювання ВР у ЛПК УЗО та хворих на РШМ і РТМ із стадією захворювання $T_1N_0M_0$ та ступенем диференціювання пухлини G_2 до початку хіміопроменевої терапії у порівнянні із групою УЗО

* — достовірна відмінність ($p \leq 0,05$) від групи контролю (УЗО);
** — достовірна відмінність ($p \leq 0,05$) від хворих на РТМ.

може вказувати на порушення функціонування електрон-транспортного ланцюга [47]. За даним Sukumar M., et al. [48] такі лімфоцити мають більшу тривалість життя та підвищену протипухлинну активність у порівнянні з клітинами, які мають високий ТМП. Враховуючи те, що досліджені нами ЛПК хворих на РШМ, порівняно з лімфоцитами УЗО, поряд з низьким рівнем генерації ВР загалом мали значно підвищені рівні утворення супероксидного аніон-радикала [28] можна припустити, що у обстежених хворих відбувалась загибель ЛПК з більш високими рівнями утворення АФК та, у тому числі, цитотоксичного супероксидного аніон-радикала. Також зі значним підвищенням частки останнього можна пов'язати достовірну кореляцію між продукцією ВР у ЛПК хворих на РШМ та рівнем ТМП цих клітин, яка була відсутня у лімфоцитах УЗО контрольної групи. На користь такого припущення свідчать результати, отримані Kazbariene V., et al. [49] про те, що у хворих на РШМ знижено активність ферменту супероксиддисмутази, який перетворює супероксидний аніон-радикал у менш цитотоксичний перекис водню.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що ЛПК хворих на РШМ є істотно зміненими за показниками ТМП та генерації ВР ще до початку проведення хіміопроменевої терапії, а їх реакція на опромінення може бути відмінною від реакції лімфоцитів УЗО.

ВИСНОВКИ

1. Функціональний стан лімфоцитів хворих на РШМ до проведення хіміопроменевої терапії вже є зміненим за показниками величини ТМП та, особливо, продукції ВР, які є істотно нижчими ніж в УЗО групи контролю. Можливо у крові цих хворих відбувається відбір лімфоцитів із нижчим рівнем ТМП у зв'язку з їх більшої життєздатністю та загальним зменшенням продукції ВР, яке компенсує цитотоксичну дію підвищених рівнів генерації супероксидного аніон-радикала.

2. Спостерігається тенденція до підвищення рівня ТМП та продукції ВР у ЛПК хворих на РШМ із більш високим ступенем розповсюдженості (T_2 порівняно з T_1) та диференціювання (G_2 порівняно з $G_{2/3}+G_3$) первинної пухлини.

3. Зміни стану ЛПК хворих на РШМ зі стадією захворювання $T_1N_0M_0$ і ступенем диференціювання пухлини G_2 до початку хіміопроменевої терапії за показниками рівня продукції ВР та значеннями ТМП є більш вираженими ніж у хворих на РТМ, для яких зниження інтенсивності продукції ВР у лімфоцитах було менш вираженим, а істотних змін ТМП не спостерігалось.

4. Для ЛПК хворих на РШМ, як і для лімфоцитів раніше обстежених хворих на РТМ, встановлено достовірну кореляцію між рівнями ТМП і про-

дукції ВР, яка була відсутня для групи обстежених УЗО групи контролю.

5. Отримані результати є підґрунтям для оцінки негативного впливу хіміопроменевої терапії на нормальні клітини та тканини з оточення пухлини у хворих на РШМ.

Робота виконана у рамках НДР “Дослідження впливу поєднаної променевої і хіміотерапії на генетичні та метаболічні зміни у лімфоцитах периферичної крові хворих на рак шийки матки” (№ держреєстрації 0121U113837).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; **71** (3): 209–49. doi: 10.3322/caac.21660.
2. Fedorenko Z, Michailovich Yu, Goulak L, et al. Cancer in Ukraine, 2022–2023. Incidence, mortality, activities of the oncological service. *Bull Natl Cancer Register Ukr*; Kyiv, 2024; (25): http://ncru.inf.ua/publications/BULL_25/index.htm. 07.06.2024 p. (in Ukrainian).
3. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®). Cervical Cancer. Version 3.2024 — May 6, 2024. <https://www.nccn.org/>. 07.06.2024 p.
4. De Ruysscher D, Niedermann G, Burnet NG, et al. Radiotherapy toxicity. *Nat Rev Dis Primers* 2019; **5** (1): 13. doi: 10.1038/s41572-019-0064-5.
5. Wang JS, Wang HJ, Qian HL. Biological effects of radiation on cancer cells. *Mil Med Res* 2018; **5** (1): 20. doi: 10.1186/s40779-018-0167-4.
6. Wei J, Wang B, Wang H, et al. Radiation-Induced Normal Tissue Damage: Oxidative Stress and Epigenetic Mechanisms. *Oxid Med Cell Longev* 2019; **30**: 10342. doi: 10.1155/2019/3010342.
7. 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.
8. Wang K, Tepper JE. Radiation therapy-associated toxicity: Etiology, management, and prevention. *CA Cancer J Clin* 2021; **71** (5): 437–54. doi: 10.3322/caac.21689.
9. Yamada T, Ishihara S, Kawai M, et al. Analysis of late adverse events and their chronological changes after radiation therapy for cervical cancer. *Nagoya J Med Sci* 2018; **80** (4): 487–96. doi: 10.18999/nagjms.80.4.487.
10. Gellrich J, Hakenberg OW, Oehlschlager S, Wirth MP. Manifestation, latency and management of late urological complications after curative radiotherapy for cervical carcinoma. *Onkologie* 2003; **26** (4): 334–40. doi: 10.1159/000072091.
11. 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.
12. Vitzthum LK, Heide ES, Park H, et al. Comparison of Hematologic Toxicity and Bone Marrow Compensatory Response in Head and Neck vs. Cervical Cancer Patients Undergoing Chemoradiotherapy. *Front Oncol* 2020; **10**: 1179. doi: 10.3389/fonc.2020.01179.
13. Lee S, Cho O, Chun M, et al. Association Between Radiation Tolerance of Lymphocytes and Clinical Outcomes in Cervical Cancer. *In Vivo* 2019; **33** (6): 2191–8. doi: 10.21873/invivo.11721.
14. Han X, Yang Q, Zhang J, Cao J. Correlation between changes in the number of peripheral blood lymphocytes and survival rate in patients with cervical cancer after radio-chemothe-

- rapy. Cancer Radiother 2021; **25** (1): 72–6. doi: 10.1016/j.canrad.2020.08.045.
15. **Zhao M, Gao Z, Gu X, et al.** Predictive significance of lymphocyte level and neutrophil-to-lymphocyte ratio values during radiotherapy in cervical cancer treatment. Cancer Med 2023; **12** (15): 15820–30. doi: 10.1002/cam4.6221.
 16. **Fu X, Tang J, Wen P, et al.** Redox interactions-induced cardiac toxicity in cancer therapy. Arch Biochem Biophys 2021; **708**: 108952. doi: 10.1016/j.abb.2021.108952.
 17. **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.free-radbiomed.2012.04.033.
 18. **Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D.** Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. Cancer Lett 2012; **327** (1–2): 48–60. doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.012.
 19. **Xu Q, Zhang H, Qin H, et al.** Norcantharidin Sensitizes Colorectal Cancer Cells to Radiotherapy via Reactive Oxygen Species-DRP1-Mediated Mitochondrial Damage. Antioxidants (Basel) 2024; **13** (3): 347. doi: 10.3390/antiox13030347.
 20. **McCann E, O’Sullivan J, Marcone S.** Targeting cancer-cell mitochondria and metabolism to improve radiotherapy response. Transl Oncol 2021; **14** (1): 100905. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100905.
 21. **Farhood B, Goradel NH, Mortezaee K, et al.** Intercellular communications-redox interactions in radiation toxicity; potential targets for radiation mitigation. J Cell Commun Signal 2019; **13** (1): 3–16. doi: 10.1007/s12079-018-0473-3.
 22. **Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, et al.** Mitochondrial membrane potential. Anal Biochem 2018; **552**: 50–9. doi: 10.1016/j.ab.2017.07.009.
 23. **Kawamura K, Qi F, Kobayashi J.** Potential relationship between the biological effects of low-dose irradiation and mitochondrial ROS production. J Radiat Res 2018; **59** (suppl 2): ii91–ii97. doi: 10.1093/jrr/rrx091.
 24. **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): 163–72. doi: 10.1007/s12192-019-01063-2.
 25. **Khan MS, Liu C, Meng F, et al.** X-rays Stimulate Granular Secretions and Activate Protein Kinase C Signaling in Human Platelets. Curr Issues Mol Biol 2023; **45** (7): 6024–39. doi: 10.3390/cimb45070380.
 26. **Shinomiya N, Kuno Y, Yamamoto F, et al.** Different mechanisms between premitotic apoptosis and postmitotic apoptosis in X-irradiated U937 cells. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000; **47** (3): 767–77. doi: 10.1016/s0360-3016(99)00517-9.
 27. **Lyng FM, Maguire P, Kilmurray N, et al.** Apoptosis is initiated in human keratinocytes exposed to signalling factors from microbeam irradiated cells. Int J Radiat Biol. 2006; **82** (6): 393–9. doi: 10.1080/09553000600803904.
 28. **Mikhailenko VM, Domina EA, Ivankova VS, et al.** Features of oxidative metabolism and genetic disorders in peripheral blood lymphocytes of primary cervical cancer patients. Exp Oncol 2022; **44** (3): 227–33. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-3.18486.
 29. **Du Z, Liu H, Huang X, et al.** Design and Synthesis of a Mitochondria-Targeting Radioprotectant for Promoting Skin Wound Healing Combined with Ionizing Radiation Injury. Pharmaceuticals (Basel) 2022; **15** (6): 721. doi: 10.3390/ph15060721.
 30. **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.
 31. **Lynam-Lennon N, Maher SG, Maguire A, et al.** Altered mitochondrial function and energy metabolism is associated with a radioresistant phenotype in oesophageal adenocarcinoma. PLoS One 2014; **9** (6): e100738. doi: 10.1371/journal.pone.0100738.
 32. **Wang Q, Liu C.** Mitophagy plays a “double-edged sword” role in the radiosensitivity of cancer cells. J Cancer Res Clin Oncol 2024; **150** (1): 14. doi: 10.1007/s00432-023-05515-2.
 33. **Taghizadeh-Hesary F, Houshyari M, Farhadi M.** Mitochondrial metabolism: a predictive biomarker of radiotherapy efficacy and toxicity. J Cancer Res Clin Oncol 2023; **149** (9): 6719–41. doi: 10.1007/s00432-023-04592-7.
 34. **Wei Y, Xiao G, Xu H, et al.** Radiation resistance of cancer cells caused by mitochondrial dysfunction depends on SIRT3-mediated mitophagy. FEBS J 2023; **290** (14): 3629–45. doi: 10.1111/febs.16769.
 35. **Domina EA.** Radiogenic cancer: Epidemiology and primary prevention. Kiyv: Naukova Dumka, 2016. 196 p. (in Russian).
 36. **Holub K, Vargas A, Biete A.** Radiation-induced lymphopenia: the main aspects to consider in immunotherapy trials for endometrial and cervical cancer patients. Clin Transl Oncol 2020; **22** (11): 2040–8. doi: 10.1007/s12094-020-02345-3.
 37. **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.
 38. **Glavin OA, Domina EA.** The level of mitochondrial transmembrane potential and intensity of free radical compounds formation in lymphocytes of endometrics cancer patients. Oncology 2022; **24** (1): 48–54. doi: 10.32471/oncology.2663-7928.t-24-1-2022-g.10202. (in Ukrainian).
 39. Product Information Histopaque®-1077 Hybri-Max™ (H8889) (https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/h8889pis.pdf). 07.06.2024 p.
 40. **Bokunyaeva NI, Zolotnitskaya RP.** Handbook of Clinical Laboratory Research Methods. Moscow: Medicine, 1975. 384 p. (in Russian).
 41. JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit Catalog Number KA1324 100 assays Version: 13. Abnova. https://www.abnova.com/upload/media/product/protocol_pdf/KA1324.pdf. 07.06.2024 p.
 42. MitoPT® JC-1 Assay Kit. F18-911-9-E MitoPT JC-1 Manual. indd <https://www.bio-rad-antibodies.com/static/uploads/ifu/ict944.pdf>. 07.06.2024 p.
 43. **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).
 44. **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. PMID: 18509546; PMCID: PMC2391079.
 45. **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.
46. Lakin GF. Biometrics. M.: Publishing House “Vysshaya shkola”, 1990. 352 p. (in Russian).
47. Miwa S, Kashyap S, Chini E, Zglinicki T. Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. J Clin Invest 2022; **132** (13): e158447. doi: 10.1172/JCI158447.
48. Sukumar M, Liu J, Mehta GU, *et al.* Mitochondrial Membrane Potential Identifies Cells with Enhanced Stemness for Cellular Therapy. Cell Metab 2016; **23** (1): 63–76. doi: 10.1016/j.cmet.2015.11.002.
49. Kazbariene B, Prasmickiene G, Krikstaponiene A, *et al.* Changes in the parameters of immune and antioxidant systems in patients with cervical cancer. Medicina (Kaunas) 2004; **40** (12): 1158–64. PMID: 15630341.

INVESTIGATION OF THE TRANSMEMBRANE POTENTIAL OF MITOCHONDRIA AND THE GENERATION OF FREE RADICAL COMPOUNDS IN LYMPHOCYTES OF CERVICAL CANCER PATIENTS

O.A. Glavin¹, E.A. Domina¹, V.S. Ivankova²,
T.V. Khrulenko², I.V. Prokopenko¹, L.I. Makovetska¹

¹ R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology National Academy
of Sciences of Ukraine,

² State Nonprofit Enterprise National Cancer
Institute, Ministry of Health of Ukraine,
Kyiv, Ukraine

Summary. Important indicators that reflect changes in the functional state of non-malignant cells from the tumor environment and can be used as predictors of the occurrence of complications as a result of radiation and chemo radiation therapy are the level of polarization of the mitochondrial membrane and the intensity of production of reactive forms of oxygen and nitrogen (free radical compounds, FR). **Aim:** To investigate changes in the mitochondrial transmembrane potential (TMP) and the intensity of FR formation in peripheral blood lymphocytes (PBL) of cervical cancer (CC) patients before the chemo radiation therapy. **Object and methods:** In the study used peripheral blood samples of 26 patients with CC before starting chemo radiation therapy and 29 apparently healthy individuals (AHI, control group). PBL isolation was performed on Histopaque®-1077. The level of TMP in lymphocytes was determined using the dye JC-1, the intensity of FR formation using the dye DCFH-DA. **Results:** It was shown that the tendency to lower TMP (by 1.46 times) and significantly lower FR formation (by 2.84 times) was observed in the PBL of patients with CC. In the examined patients with a greater degree of the size of the primary tumor and its' invasion (T_2 compared to T_1)

or a greater degree of tumor differentiation (G_2 compared to $G_{2/3-3}$), the TMP level was higher (by 1.35 and 1.47 times, respectively). In CC patients, in contrast to AHI, a significant correlation was found between the TMP level and the intensity of FR formation ($r=0.473$). It has been shown that in the PBL of CC patients with the stage of the tumor process $T_1N_0M_0$ and the degree of the tumor differentiation G_2 , the level of TMP and the intensity of BP formation are significantly lower (by 1.91 times and 1.88 times, respectively) than in similar patients with uterine cancer, who has been examined before. **Conclusions:** The functioning of lymphocytes of patients with CC before chemo radiation therapy is already changed according to the indicators of TMP value and FR formation, which are significantly lower than in AHI lymphocytes. In contrast to the control group, a significant correlation was found between the TMP levels and BP formation in the PBL of the examined CC patients. It has been shown that in CC patients with a disease stage of $T_1N_0M_0$ and a G_2 tumor differentiation degree changes in the level of TMP and the FR formation are more pronounced than in a similar group of patients with uterine cancer. The obtained results are background for evaluating the changes occurring in the cells from the tumor environment after radiation therapy.

Keywords: Cervical cancer, peripheral blood lymphocytes, transmembrane potential of mitochondria, free radicals.

Адреса для листування:

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

Одержано: 10.06.2024