

О.А. Главін
Е.А. Дьоміна
В.М. Михайленко
Л.І. Маковецька

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

Ключові слова: рак
передміхурової залози,
периферична кров, лімфоцити,
вільнорадикальні процеси,
окисний метаболізм, аберації
хромосом, індивідуальна
радіочутливість.

ВИЗНАЧЕННЯ КОРЕЛЯЦІЙНИХ ЗВ'ЯЗКІВ МІЖ СТАНОМ ПРО- ТА АНТИОКСИДАНТНИХ ПРОЦЕСІВ В КРОВІ ХВОРИХ НА РАК ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ТА ХРОМОСОМНОЮ НЕСТАБІЛЬНІСТЮ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ

Мета: дослідити стан про- та антиоксидантних процесів і ступінь хромосомної нестабільності у клітинах периферичної крові хворих на рак передміхурової залози (РПЗ) до і після початку променевої терапії. **Об'єкт і методи:** у роботі використано зразки крові хворих на РПЗ ($n = 31$, дослідна група) та умовно здорових донорів ($n = 31$, група контролю). Застосовано біохімічні, цитогенетичні та статистичні методи дослідження. Визначали індуковану Fe^{2+} продукцію активних форм кисню (АФК), вміст сульфгідрильних груп білків і пептидів (SH-груп) та малонового діальдегіду (МДА) у плазмі крові, активність ферменту каталази в крові, загальну продукцію вільнорадикальних (ВР) сполук, кількість спонтанних (G_0 -тест) і радіаційно-індукованих (G_2 -тест) аберацій хромосом у лімфоцитах периферичної крові (ЛПК). **Результати:** у хворих на РПЗ виявлено підвищення рівня продукції АФК в 1,55 раза, зниження активності каталази в 1,45 раза, вмісту SH-груп — в 1,24 та МДА — в 1,12 раза. Рівень спонтанних аберацій хромосом у ЛПК перевищував середньопопуляційний в 2,84 раза. Зниження активності каталази корелювало із розмірами первинної пухлини та зменшенням вмісту SH-груп. Концентрація останніх корелювала із частотою спонтанних аберацій хромосом. Виявлено зворотний кореляційний зв'язок між індивідуальною радіочутливістю хворих (G_2 -тест) та продукцією ВР сполук у ЛПК після першої фракції терапевтичного опромінення. **Висновок:** одержані результати аргументують суттєву роль оксидативного стресу у формуванні хромосомної нестабільності нормальних клітин хворих на РПЗ.

Рак передміхурової залози (РПЗ) залишається одним із найпоширеніших злоякісних новоутворень серед чоловічого населення більшості країн світу [1, 2]. Статистика свідчить про постійне зростання частоти захворюваності на РПЗ та смертності від цієї патології, що визначає соціальну значущість проблеми. У структурі чоловічої онкологічної захворюваності в США РПЗ займає перше місце, у Великобританії він є другою після раку легені причиною летальності серед чоловіків від онкологічних захворювань [3].

Набуття клітинами ознак злоякісно трансформованих зазвичай супроводжується формуванням у них оксидативного стресу [4]. Пов'язані із ним пошкодження є важливим фактором у канцерогенезі передміхурової залози (ПЗ). У низці досліджень показано, що в якості маркера таких порушень у клітинах ПЗ можуть використовуватися зміни стану лімфоцитів периферичної крові (ЛПК). Продемонстровано

наявність кореляції між ступенем пошкоджень ДНК у ЛПК і клітинах ПЗ внаслідок дії реактивних форм кисню [5] та встановлено, що підвищена експресія гена людини *MutT*, який є молекулярним маркером оксидативного стресу в ЛПК, може бути фактором ризику виникнення РПЗ [6].

Ризик розвитку РПЗ може бути спадково детермінованим. Досліджено, що при захворюванні одного родича першої лінії ризик зростає у 2 рази, при захворюванні 2–3 осіб — у 5–10 разів [7].

Вибір методу лікування залежить від стадії захворювання (TNM-класифікація), суми балів за шкалою Глісона за даними біопсії, вихідного рівня простатоспецифічного антигена (ПСА), віку пацієнта, супутніх захворювань та ін. РПЗ належить до радіорезистентних пухлин. Цей стан пояснюють наявністю субпопуляції стовбурових клітин у пухлині, що здатні до самооновлення [8]. Саме ці клітини можуть зумовлювати початок утворення

ня більш диференційованих клітин РЗ, резистентних до променевої терапії (ПТ). Стівбурові клітини залози характеризуються експресією маркерів CD133 та CD44. Гени, що відповідають за експресію цих білків, пов'язані із підвищеним метастазуванням та активною репарацією ДНК [9].

На сьогодні в багатьох країнах для лікування РЗ широко використовують контактну ПТ (брахітерапія). При цьому лікування пізніх променевих уражень органів малого таза залишається складним завданням, вирішення якого потребує індивідуального підходу. Врахування індивідуальної радіочутливості (ІРЧ) організму хворих, що впливає в свою чергу на радіочутливість нормальних клітин, які попадають у зону терапевтичного опромінення, сприяє мінімізації променевих ускладнень [10]. Променеві ускладнення виникають у випадках, коли для проведення терапевтичного опромінення хворих призначають високі разові і сумарні дози, що перевищують толерантність здорових тканин до опромінення. У цілому присвячені огляду цієї проблеми наукові праці мають описовий характер. У роботі [11] показана позитивна кореляція між ІРЧ клітин в умовах *in vitro* та ризиком розвитку побічних ефектів клітин тканин, що оточують пухлину, після ПТ, зокрема у хворих на РЗ. Водночас інші дослідники [12, 13] такої залежності не виявили. Виходячи з вищевикладеного, актуальною є оцінка ІРЧ хворих на РЗ, яка дозволить удосконалити персоналіфікацію їх лікування.

Мета роботи: пошук корелятивних зв'язків між спонтанним рівнем аберацій хромосом у ЛПК хворих на РЗ, їх ІРЧ та показниками, що відображають стан про- та антиоксидантних процесів у крові до та після першої фракції ПТ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єкт досліджень: ЛПК та плазма крові умовно здорових донорів і хворих на РЗ I–III стадії (до початку ПТ та після першої фракції терапевтичного опромінення 2,5 Гр). Пацієнти з РЗ (n = 31) перебували на лікуванні у Клінічній лікарні «Феофанія» Державного управління справами (Київ). Загальна клінічна характеристика обстежених хворих надана у табл. 1. Пацієнти з РЗ I стадії становили 9,6%; II — 45,2% та III — 45,2%. Гістологічна оцінка диференціювання пухлин за шкалою Глісона — від 5 до 9 балів, значення медіани показника по групі — 7 балів. В якості контролю використано матеріали 31 умовно здорового донора. Середній вік обстежених — 65,4 року (від 29 до 86 років). Усі обстежені дали інформовану згоду на використання їх біологічних матеріалів у дослідженні.

Периферичну кров збирали в стандартні стерильні пробірки Vacutainer об'ємом 6 мл із антикоагулянтом Li-гепарином. Зразки крові зберігали і транспортували при 5–10 °С. Плазму крові отримували центрифугуванням протягом 15 хв при 1000 об./хв. Виділення ЛПК виконували на Ficoll-Paque PLUS

згідно з інструкцією виробника (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Підрахунок кількості життєздатних клітин проводили за стандартною методикою, використовуючи суправітальне фарбування трипановим синім. Гемолізат отримували розведенням крові дистильованою водою в співвідношенні 1 : 800. Зразки крові, гемолізатів та ЛПК до їх використання зберігали при 3–5 °С, а зразки плазми заморожували у рідкому азоті.

Таблиця 1

Загальна клінічна характеристика хворих на РЗ

Показник	Кількість хворих	
	n	%
Загальна кількість хворих	31	100
Вік хворих, років		
Середній	65,4 ± 1,9	
Колівання віку	29–86	
Стадія РЗ за TNM		
I	3	9,6
II	14	45,2
III	14	45,2
Наявність метастазів у регіонарні лімфатичні вузли		
– (N0)	28	90,3
+ (N+)	3	9,7
Градація за Глісоном, балів		
5	1	3,3
6	8	26,7
7	13	43,3
8	5	16,7
9	3	10,00
Рівень ПСА, нг/мл		
≤ 10	37	74,1
> 10	33	25,9

Спектрометричні та флуоресцентні дослідження проводили із використанням рідера Sinergy-NT (Bio-Tek Instruments, США) та діодно-матричного спектрофотометра Agilent 8453 (Agilent, США). Провокативне опромінення виконували на рентгенівській установці РУМ-17 Національного інституту раку.

Для оцінки частоти і спектра спонтанних та радіаційно-індукованих пошкоджень геному культивування клітин крові (Т-лімфоцитів) та метафазний аналіз аберацій хромосом виконували відповідно до стандартного протоколу [14] з деякими модифікаціями [15].

ІРЧ хворих визначали за кількістю спонтанних (G_0 -тест) і радіаційно-індукованих (G_2 -тест) аберацій хромосом у ЛПК [16, 17]. Культуру клітин (Т-лімфоцитів) опромінювали в дозі 1,5 Гр у G_2 -період мітотичного циклу (46 год інкубації клітин). Метафазний аналіз хромосомних препаратів виконували в першому післяпроменевому мітозі (фіксація культури клітин на 52 год).

Загальну інтенсивність генерування вільнорадикальних (ВР) сполук у ЛПК визначали з використанням флуоресцентного зонда дихлоро-флуоресцеїн-діацетату (DCFDA, Sigma-Aldrich) [18, 19]. Інкубування клітин та вимірювання проводили при 37 °С кожні 7,5 хв впродовж 90 хв ($I_{ex} = 485$ нм, $I_{em} = 528$ нм). Вміст лунки: 100 мкл ЛПК у PBS (100 тис. клітин/лунку) + 150 мкл PBS + 50 мкл розчину DCFDA у збалансованому сольовому розчині

(кінцева концентрація 50 мкМ). Для підрахунків використовували проміжок часу 30–90 хв.

Рівень індукованої іонами Fe^{2+} продукції активних форм кисню (АФК) у плазмі крові визначали з використанням барвника *N,N*-діетилпарафенілендіаміну (DEPPD) [20]. Реакцію проводили у 96-лунковому планшеті. Після 5 хв інкубації плазми крові при 37 °С (5 мкл в 145 мкл 0,1 М Na-ацетатного буфера рН 4,8) у лунки додавали по 50 мкл розчинів DEPPD та FeSO_4 в Na-ацетатному буфері (кінцеві концентрації відповідно 0,38 мкМ та 4,37 мкМ). Розвиток забарвлення вимірювали при 37 °С кожні 30 с впродовж 6 хв ($\lambda = 511$ нм). Для підрахунків використовували проміжок часу 1–4 хв. Інтенсивність утворення АФК перераховували у ммоль H_2O_2 на 1 л плазми крові за хвилину (ммоль/л/хв) за калібрувальною кривою.

Вміст малонового діальдегіду (МДА), кінцевого продукту перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) визначали у плазмі крові за методом [21]. До 200 мкл плазми крові додавали 100 мкл 0,05М трис-НСІ буфера (рН 7,4) та 300 мкл 10% розчину трихлороцтової кислоти. Суміш перемішували і через 1 год центрифугували 20 хв при 3000 об./хв. До надосадової рідини додавали рівну кількість 0,8% розчину 2-тіобарбітурової кислоти, витримували зразки 15 хв на водяній бані. Після охолодження оптичну густину проб вимірювали проти контролю (зразок без плазми крові) при $\lambda = 532$ нм. Вміст МДА розраховували на підставі молярного коефіцієнта поглинання ($\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$) та перераховували на кількість білка.

Активність каталази (КАТ) у гемолізатах крові визначали методом [22]. Реакцію проводили в пробірках, що містили 800 мкл 30 мМ H_2O_2 та 40 мкл гемолізату крові. Через 10 хв реакцію зупиняли додаванням 40 мкл 4% молібдату амонію. Забарвлення вимірювали при довжині хвилі 410 нм. Активність КАТ перераховували у ммоль H_2O_2 на 1 мл плазми крові за годину (ммоль/мл/год) з використанням калібрувальної кривої.

Визначення вмісту сульфгідрильних груп білків і пептидів в плазмі крові (SH-груп) проводили спектрофотометричним методом у модифікації [23]. Проба містила 90 мкл 0,1 М фосфатного буфера (рН 6,8) і 100 мкл плазми крові або фізіологічного розчину (контроль). Реакцію починали додаванням 4 мкл 1 мМ розчину 5,5'-дітіобіс (2-нітробензойної) кислоти в 10 мМ фосфатному буфері, рН 6,8. Вміст SH-груп в плазмі крові розраховували на підставі молярного коефіцієнта екстинкції ($\epsilon = 1,86 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) та виражали в мМ утвореного 2-нітро-5-тіобензоату.

Статистичну обробку результатів проводили згідно з [24] з використанням програм MS Excel та OriginPro 2015. Визначали загальні статистичні показники, оцінювали нормальність розподілу індивідуальних показників та розраховували коефіцієнти кореляції. Оскільки для більшості показників їх розподіл відрізнявся від нормального, достовірність розбіжностей між групами оцінювали

за непараметричними критеріями. При порівнянні значень контрольної та дослідних груп використовували критерій Mann — Whitney. Для визначення наявності достовірних змін у хворих на РПЗ після проведення першої фракції терапевтичного опромінення застосовували парний ранговий критерій Wilcoxon. При проведенні кореляційного аналізу використовували критерій Spearman. Достовірними розбіжності та наявність кореляційного зв'язку вважали при рівні значущості $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Концентрація ПСА в крові хворих на РПЗ до початку ПТ становила від 0,34 до 38,10 нг/мл (в середньому $8,38 \pm 1,95$ нг/мл) при нормі 0,00–4,00 нг/мл та рівні середніх показників у здорових чоловіків 1,27–1,40 нг/мл [25, 26]. Слід зазначити, що скринінг ПСА для виявлення РПЗ сприяє зниженню ризику смерті від цього захворювання, але гіпердіагностика внаслідок хибнопозитивних результатів може становити 20–50% [27]. Зауважимо, що ПСА — показник недостатньо об'єктивний для визначення чутливості пухлини до ПТ, залежить як від віку хворого, так і умов та часу його визначення [28].

У табл. 2 представлено результати визначення в плазмі крові донорів та хворих на РПЗ рівня АФК та МДА. Виявлено, що середній рівень Fe^{2+} -залежної продукції АФК в плазмі крові хворих на РПЗ достовірно перевищував такий показник у донорів контрольної групи в 1,55 раза ($p < 0,05$). Відмічено, що цей показник у хворих на РПЗ значно варіював — від 0,289 до 3,100 ммоль/л/хв, значення коефіцієнта варіації становило 0,617. Після першої фракції терапевтичного опромінення спостерігали зниження інтенсивності утворення АФК в 1,29 раза на рівні тенденції порівняно з показниками донорів та хворих на РПЗ до ПТ. Слід зазначити, що медіана цього показника у хворих після проведення першого терапевтичного опромінення була значно нижчою проти середньоарифметичного (0,575 проти 1,042 ммоль/л/хв), що, вірогідно, зумовлено зростанням частки пацієнтів із низьким рівнем Fe^{2+} -залежної продукції АФК (див. табл. 1).

Активність ферменту КАТ в крові хворих на РПЗ становила $19,86 \pm 1,45$ ммоль/мл/хв і була в 1,45 раза нижчою ($p < 0,05$), ніж в групі умовно здорових чоловіків. Також у хворих на РПЗ відмічали суттєву варіацію цього показника, коефіцієнт варіації був в 1,67 раза вищим, ніж у донорів. Після першої фракції ПТ спостерігали тенденцію до підвищення активності ферменту у 1,20 раза, але вона залишалася суттєво нижчою ($p < 0,05$) порівняно з показниками у донорів (див. табл. 2).

Відмічали суттєве зниження ($p < 0,05$) сумарного вмісту SH-груп в плазмі крові хворих на РПЗ порівняно із показником умовно здорових осіб ($0,319 \pm 0,010$ проти $0,385 \pm 0,018$ мМ відповідно). Терапевтичне опромінення пацієнтів майже не впливало на значення цього показника (табл. 3).

Таблиця 2

Інтенсивність продукції АФК та вміст МДА в плазмі крові донорів та хворих на РПЗ

Показник	Продукція АФК, ммоль/л/хв			Вміст МДА, мкмоль/г білка		
	Донори	Хворі на РПЗ		Донори	Хворі на РПЗ	
		До ПТ	Після 1-ї фракції ПТ		До ПТ	Після 1-ї фракції ПТ
Кількість досліджених зразків, n	20	27	16	27	29	15
Середньоарифметичне	0,866	1,347 ¹	1,042	27,31	24,43 ¹	25,46
Стандартна похибка	0,121	0,160	0,204	2,03	3,47	3,36
Медіана	0,667	1,479	0,575	24,29	18,42	21,81
Коефіцієнт варіації	0,623	0,617	0,784	0,386	0,765	0,512
Мінімальне значення	0,305	0,289	0,071	15,79	3,03	12,57
Максимальне значення	1,837	3,100	2,582	55,69	99,45	54,00
Діапазон, %	83,41	90,69	97,24	71,65	96,95	76,72

¹p < 0,05 порівняно з показниками донорів.

Таблиця 3

Активність ферменту КАТ в крові та вміст SH-груп в плазмі крові донорів та хворих на РПЗ

Показник	Активність КАТ, ммоль/мл/хв			Вміст SH-груп, мМ		
	Донори	Хворі на РПЗ		Донори	Хворі на РПЗ	
		До ПТ	Після 1-ї фракції ПТ		До ПТ	Після 1-ї фракції ПТ
Кількість досліджених зразків, n	31	26	19	26	27	20
Середньоарифметичне	28,87	19,86 ¹	23,87 ¹	0,385	0,319 ¹	0,340
Стандартна похибка	1,15	1,45	1,54	0,018	0,010	0,013
Медіана	30,56	17,31	24,27	0,336	0,318	0,337
Коефіцієнт варіації	0,222	0,372	0,280	0,242	0,168	0,172
Мінімальне значення	10,50	8,27	10,93	0,241	0,225	0,240
Максимальне значення	41,67	31,13	32,28	0,557	0,491	0,484
Діапазон, %	74,80	73,43	66,12	56,73	54,32	50,52

¹p < 0,05 порівняно з показниками донорів.

Інтенсивність процесів ПОЛ оцінювали за вмістом МДА в плазмі крові. У хворих на РПЗ його концентрація була достовірно нижчою (в 1,12 раза, p < 0,05), ніж у донорів. Варто відмітити значне (в 1,98 раза) зростання варіабельності цього показника в обстежених пацієнтів порівняно із контрольною групою. Після проведення ПТ у хворих відмічали підвищення вмісту МДА та зниження коефіцієнта варіації цього показника практично до контрольних значень (див. табл. 2).

У табл. 4 наведено результати дослідження інтенсивності генерування ВР сполук та оцінки частоти хромосомних аберацій у ЛПК. У групі хворих на РПЗ показники утворення ВР сполук майже не відрізнялися від контрольних значень. Як у хворих, так і у донорів медіана цього показника була відповідно в 1,35 та 1,29 раза нижчою порівняно з середніми значеннями. Основною відмінністю групи хворих на РПЗ у порівнянні з контрольною групою було значне зростання варіабельності показника, про що свідчить підвищення коефіцієнта варіації в 1,48 раза. Терапевтичне опромінення хворих в дозі 2,5 Гр призводило до збільшення продукції ВР сполук у ЛПК в 1,32 раза. Виявлені зміни мали характер тенденції,

оскільки внутрішньогрупова варіабельність цього показника після проведення опромінення залишалася на високому рівні (див. табл. 3).

Таблиця 4

Оцінка інтенсивності генерування ВР сполук та частоти хромосомних аберацій в ЛПК донорів та хворих на РПЗ

Показник	Продукція ВР сполук у ЛПК, ум. од./клітину/год			Спонтанні аберації (G ₀ -тест), аберацій/100 метафаз		Радіаційно-індуковані аберації (G ₂ -тест), аберацій/100 метафаз	
	Донори	Хворі на РПЗ		Хворі на РПЗ		Хворі на РПЗ	
		До ПТ	Після 1-ї фракції ПТ	До ПТ	Після 1-ї фракції ПТ	До ПТ	Після 1-ї фракції ПТ
Кількість досліджених зразків, n	31	22	18	20	10	23	10
Середньоарифметичне	33,55	32,87	43,55	8,53	12,50	19,29	17,70
Стандартна похибка	2,80	4,83	7,11	1,11	2,18	1,57	1,61
Медіана	26,03	24,36	34,14	9	13	18	18
Коефіцієнт варіації	0,465	0,688	0,693	0,583	0,551	0,389	0,288
Мінімальне значення	10,94	10,72	9,80	1	2	9	10
Максимальне значення	73,40	90,92	129,57	19	23	35,5	25
Діапазон, %	85,10	88,21	92,44	94,74	91,30	74,65	60,00

Результати цитогенетичного обстеження хворих показали, що спонтанний рівень аберацій хромосом становив $8,53 \pm 1,11$ аберацій/100 метафаз і, таким чином, перевищував значення середньопульційного показника в 2,84 раза (див. табл. 4). Терапевтичне опромінення пацієнтів у дозі 2,5 Гр призводило до статистично недостовірного зростання цього показника (в 1,47 раза). Водночас ІРЧ обстежених хворих за результатами хромосомного G₂-тесту залишалася майже незмінною.

Кореляційний аналіз результатів, отриманих при обстеженні хворих на РПЗ, показав наявність слабкого, але достовірного кореляційного зв'язку між концентрацією в крові ПСА та віком пацієнтів (r = 0,428; p < 0,05), а також рівнем ПСА та розповсюдженням метастазів у регіонарні лімфатичні вузли (r = 0,454; p < 0,05).

При порівнянні значень біохімічних показників крові в окремих пацієнтів із РПЗ до та після проведення терапевтичного опромінення виявлено тісну достовірну кореляцію для інтенсивності утворення АФК в плазмі крові (r = 0,806; p < 0,05) і активності КАТ (r = 0,781; p < 0,05). Для утворення ВР сполук у ЛПК цей зв'язок був значно слабшим (r = 0,512; p < 0,05), а у випадку вмісту SH-груп та МДА в плазмі крові він був відсутнім.

Слід відмітити наявність достовірного зворотно-го кореляційного зв'язку між активністю КАТ і стадією захворювання за класифікацією TNM (r = 0,454; p < 0,05) та, зокрема, розмірами і розповсюдженням первинної пухлини (r = 0,526; p < 0,05) до проведен-

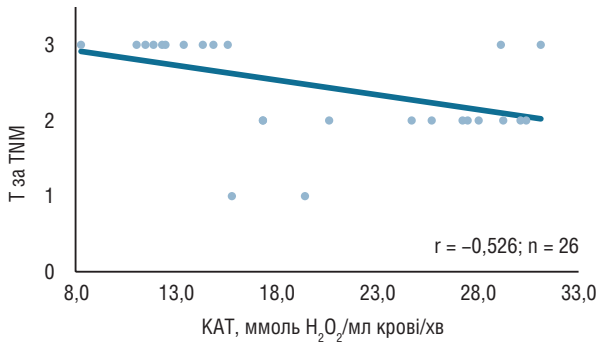


Рис. 1. Кореляційний зв'язок між розмірами і розповсюдженням первинної пухлини (за TNM) та активністю КАТ в крові до початку ПТ: • — показники окремих обстежених; — — лінійний тренд; r — коефіцієнт кореляції Spearman; n — кількість обстежених осіб

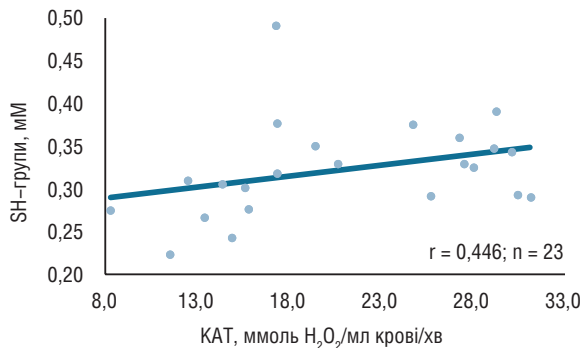


Рис. 2. Кореляційний зв'язок між вмістом SH-груп в плазмі та активністю КАТ в крові до початку ПТ: • — показники окремих обстежених; — — лінійний тренд; r — коефіцієнт кореляції Spearman; n — кількість обстежених осіб

ня ПТ (рис. 1). Зниження активності даного ферменту очікувано супроводжувалося виснаженням вмісту вільних SH-груп в плазмі крові ($r = 0,446$; $p < 0,05$) (рис. 2). Концентрація SH-груп достовірно корелювала із кількістю аберацій хромосом в ЛПК за G_0 тестом ($r = 0,734$; $p < 0,05$; рис. 3). Вважаємо, що зареєстрована кореляція зумовлена захисним ефектом SH-груп та виживанням клітин з генетичними пошкодженнями. Вищий рівень абераційних хромосом в ЛПК відмічався у хворих на РПЗ із метастазами у регіонарних лімфатичних вузлах ($r = 0,463$; $p < 0,05$). Також збільшена кількість абераційних хромосом у ЛПК корелювала із вищою концентрацією МДА в плазмі крові після проведення 1-ї фракції ПТ ($r = -0,845$; $p < 0,05$; рис. 4), що свідчить про інтенсифікацію процесів ПОЛ в крові таких пацієнтів.

Аналіз аберацій хромосом за G_2 -тестом, з одного боку, показав наявність достовірного, хоча і не дуже тісного, кореляційного зв'язку між зростанням ІРЧ хворих до проведення ПТ та поширенням захворювання: розмірами первинної пухлини ($r = 0,423$; $p < 0,05$) (рис. 5). З іншого боку, підвищена ІРЧ у хворих на РПЗ корелювала із наявністю метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах ($r = 0,488$; $p < 0,05$) та інтенсифікацією утворення ВР сполук у ЛПК у відповідь на проведення першої фракції ПТ ($r = -0,646$; $p < 0,05$; рис. 6).

Таким чином, у крові хворих на РПЗ до початку ПТ зареєстровано зниження активності ферменту антиоксидантного захисту КАТ, вмісту SH-груп на фоні інтенсифікації Fe^{2+} -залежної продукції АФК та незначного зниження інтенсивності процесів ПОЛ. Загалом це можна інтерпретувати як інтенсифікацію прооксидантних процесів у крові,

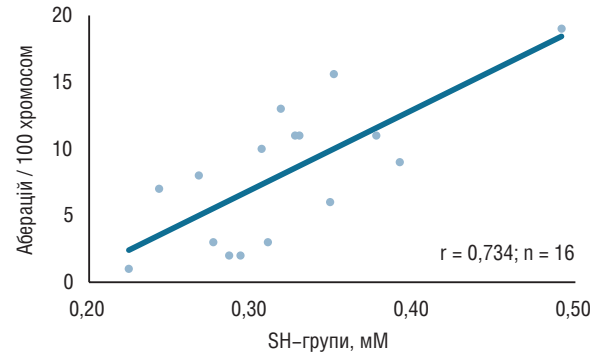


Рис. 3. Кореляційний зв'язок між кількістю аберацій хромосом в ЛПК (G_0 тест) та концентрацією сумарних SH-груп в плазмі крові у хворих на РПЗ до початку ПТ: • — показники окремих обстежених; — — лінійний тренд; r — коефіцієнт кореляції Spearman; n — кількість обстежених осіб

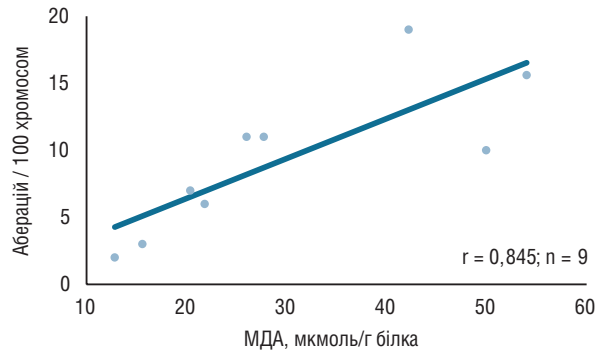


Рис. 4. Кореляційний зв'язок між кількістю аберацій хромосом в ЛПК (G_0 -тест) до початку ПТ хворих на РПЗ та концентрацією МДА у плазмі крові після першого опромінення: • — показники окремих обстежених; — — лінійний тренд; r — коефіцієнт кореляції Spearman; n — кількість обстежених осіб

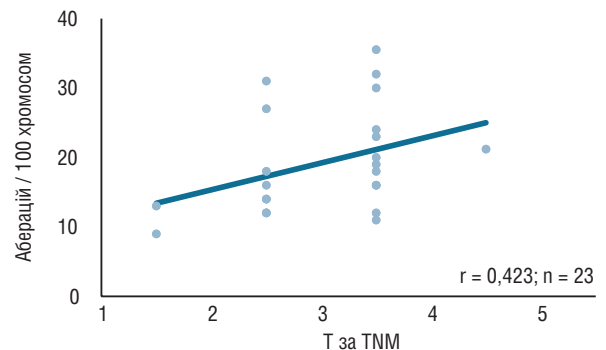


Рис. 5. Кореляційний зв'язок між кількістю аберацій хромосом в ЛПК (G_2 тест) та розмірами і розповсюдженням первинної пухлини у хворих на РПЗ (Т за TNM) до початку ПТ: • — показники окремих обстежених; — — лінійний тренд; r — коефіцієнт кореляції Spearman; n — кількість обстежених осіб

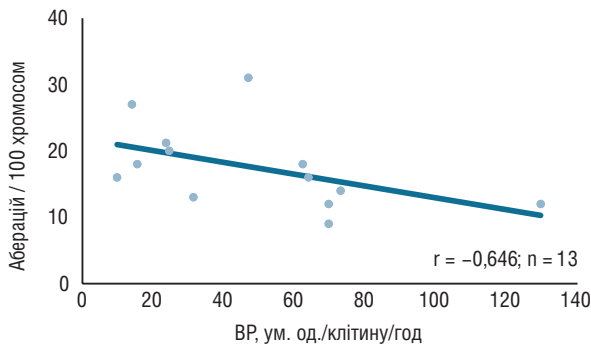


Рис. 6. Кореляційний зв'язок між кількістю абераций хромосомом в ЛПК (G_2 -тест) до початку ПТ хворих на РПЗ та утворенням ВР в ЛПК після першого опромінення: • — показники окремих обстежених; — — лінійний тренд; r — коефіцієнт кореляції Spearman; n — кількість обстежених осіб

що зумовлює формування оксидативного стресу. Заслуговує на увагу визначена нами кореляція між зниженням активності ферменту КАТ, виснаженням вмісту SH-груп та підвищенням спонтанної частоти абераций хромосомом у Т-лімфоцитах крові. Можливо, в подальшому це може слугувати додатковим критерієм проведення персоналізованої ПТ. Після 1-ї фракції терапевтичного опромінення відбувалася активація утворення ВР сполук у ЛПК. Тому деяке зниження рівня утворення АФК в плазмі крові та незначна активація КАТ не дають можливості зробити висновок про нормалізацію балансу прота антиоксидантних процесів у крові. Зміни інтенсивності продукції ВР сполук у ЛПК хворих зазначеної онкопатології після першої фракції ПТ зворотно корелюють із їхньою ІРЧ що, найімовірніше, відображає ступінь їх пошкодження під впливом іонізуючого випромінювання.

На ранніх стадіях розвитку РПЗ є гормонозалежним. Тому одним зі способів лікування є гормонотерапія з наступною ПТ. Вона мало впливає на спонтанну, тобто вихідну частоту цих клітин з ушкодженнями геному, але може підвищувати радіочутливість клітин. Тому дані, отримані нами після першої фракції терапевтичного опромінення хворих на РПЗ, були б більш інформативними, якби була можливість проводити обстеження пацієнтів ще до початку гормонотерапії [29].

ВИСНОВКИ

1. У крові хворих на РПЗ відбувається формування оксидативного стресу внаслідок підвищення утворення ВР сполук на фоні виснаження пулу вільних SH-груп і зниження активності ферменту КАТ. Це спостерігається на фоні підвищеного рівня абераций хромосомом у ЛПК і може свідчити про те, що зазначені процеси є однією зі складових формування генетичної нестабільності соматичних клітин у хворих онкологічного профілю.

2. Кореляція між високим рівнем ІРЧ хворих та зменшенням продукції ВР сполук у лімфоцитах крові внаслідок терапевтичного опромінення може

бути зумовлена різним ступенем радіаційного пошкодження цих клітин.

Робота виконувалася в рамках Цільової програми наукових досліджень НАН України «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів» (2017–2021 рр.).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Tsyb AF, Sviridov PV, Karjakin OB, *et al.* Brachytherapy in oncurology. Medical alphabet. Radiology-2 2008; (16): 12–5 (in Russian).
2. Schmitz S, Brzozowska K, Pinkawa M, *et al.* Chromosomal radiosensitivity analyzed by fish in lymphocytes of prostate cancer patients and healthy donors. Radiat Res 2013; **180** (5): 465–73.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin 2008; **58** (2): 71–96.
4. Nishikawa M. Reactive oxygen species in tumor metastasis. Cancer Lett 2008; **266** (1): 53–9.
5. Waters DJ, Shen S, Xu H, *et al.* Noninvasive prediction of prostatic DNA damage by oxidative stress challenge of peripheral blood lymphocytes. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007; **16** (9): 1906–10.
6. Liu Z, Wang LE, Strom SS, *et al.* Overexpression of hMTH in peripheral lymphocytes and risk of prostate cancer: a case-control analysis. Mol Carcinogenesis 2003; **36** (3): 123–9.
7. Montzka K, Heidenreich A. Castration-resistant prostate cancer: definition, biology and novel therapeutic intervention strategies. Ann Urol 2010; **1** (1): 29–34.
8. Chen X, Rycaj K, Liu X, Tang DG. New insights into prostate cancer stem cells. Cell Cycle 2013; **12** (4): 579–86.
9. Botchkina G, Ojima I. Prostate and colon cancer stem cells as a target for anti-cancer drug development. In: *Shostak S*, ed. Cancer Stem Cells: Theories and Practice. Rijeka, Croatia: InTech, 2011; 135–54.
10. Domina E, Philchenkov A, Dubrovskaya A. Individual response to ionizing radiation and personalized radiotherapy. Critical Rev Oncogenesis 2018; **23** (1–2): 69–92.
11. Lee TK, Allison RR, O'Brien KF, *et al.* Lymphocyte radiosensitivity correlated with pelvic radiotherapy morbidity. Int J Radiation Oncol Biol Phys 2003; **57** (1): 222–9.
12. Wang WD, Chen ZT, Li DZ, *et al.* Correlation between DNA repair capacity in lymphocytes and acute side effects to skin during radiotherapy in nasopharyngeal cancer patients. Clin Cancer Res 2005; **11** (14): 5140–5.
13. Lisowska H, Lankoff A, Wiczorek A, *et al.* Enhanced chromosomal radiosensitivity in peripheral blood lymphocytes of larynx cancer patients. Int J Radiation Oncol Biol Phys 2006; **66** (4): 1245–52.
14. Cytogenetic Dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergencies. Vienna: IAEA, 2011. 232 p.
15. Domina EA, Stakhovskyy EO, Safronova OV, *et al.* Biochemical and cytogenetic indices of peripheral blood lymphocytes in patients with prostate cancer. Rep NAS Ukraine 2018; (4): 102–9.
16. Domina EA, Ryabchenko NM, Druzhyna MO, *et al.* Cytogenetic method (G_2 -assay) for the determination of individual radiosensitivity of a person for the prevention of radiogenic cancer. Methodical Recommendations. Kyiv: 2007. 28 p. (in Ukrainian).
17. Chekhun VF, Stakhovskyy EO, Domina EA, *et al.* Determination of individual radiosensitivity of patients with prostate cancer. Materials of VII Congress of Ukrainian radiation oncologists. Ukr J Radiol 2017; Annex 3: 61–2.
18. Yao K, Wu W, Wang K, *et al.* Electromagnetic noise inhibits radiofrequency radiation-induced DNA damage and reactive oxygen species increase in human lens epithelial cells. Mol Vis 2008; **19** (14): 964–9.
19. 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.

20. 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.

21. Lvovskaya EA, Volchegorovsky IA, Shemyakov SA, *et al.* Spectrophotometric determination of the final products of lipid peroxidation. *Questions Med Chem* 1991; **37** (4): 92–3 (in Russian).

22. Korolyuk MA, Ivanova LI, Mayorova IG. Method for the determination of catalase activity. *Laboratory Work* 1988; № 1: 16–9 (in Russian).

23. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol* 1994; **233**: 380–5.

24. Lakin GF. *Biometrics*. Moscow: «High School», 1990. 352 p. (in Russian).

25. Mustafa M, Horuz R, Celik M, Kucukcan A. Is there an association between serum prostate-specific antigen values and serum testosterone levels in healthy men? *Korean J Urol* 2014; **55** (7): 465–8.

26. Elzanaty S, Rezanezhad B, Dohle G. Association between serum testosterone and psa levels in middle-aged healthy men from the general population. *Curr Urol* 2017; **10** (1): 40–4.

27. Fenton JJ, Weyrich MS, Durbin S, *et al.* Prostate-specific antigen-based screening for prostate cancer: a systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US) 2018 May; Report № 17-05229-EF-1.

28. Minaeva NG, Parshkov EM, Golivets TP, *et al.* Evaluation of individual radiosensitivity of prostate cancer to radiation treatment by the level of prostate specific antigen. *Radiat Biol. Radioecol* 2009; **49** (4): 444–8 (in Russian).

29. Donovan MJ, Coedon-Carlo C. Predicting high-risk disease using biomarkers. *Curr Opin Urol* 2013; **2** (3): 245–51.

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

O.A. Glavin, E.A. Domina, V.M. Mikhailenko,
L.I. Makovetska

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

Summary. Objective: to investigate the intensity of pro- and antioxidant processes in blood and the degree of chromosomal instability in peripheral blood cells of patients with prostate cancer (PC) before and after ra-

diotherapy. **Object and methods:** research was performed on blood of 31 patients with PC (experimental group) and 31 healthy donors (control group) with the use of biochemical, cytogenetic and statistical methods. The Fe^{2+} induced production of reactive oxygen species (ROS), the content of sulfhydryl groups of proteins and peptides (SH-groups) and malonic dialdehyde (MDA) in blood plasma; the activity of the catalase in blood; the total production of free radical compounds (FRC), the number of spontaneous (G_0 -assay) and radiation induced chromosome aberrations (G_2 -assay) in the peripheral blood lymphocytes (PBL) were determined. **Results:** in patients with PC, the level of ROS products was increased by 1.55 times but the activity of catalase, the concentration of SH-groups and MDA level were reduced by 1.45; 1.24 and 1.12 times, respectively. The number of spontaneous chromosomal aberrations in the PBL exceeded the average population level by 2.84 times. Reduced catalase activity correlated with the size of the primary tumor and the decrease in the content of SH-groups. The level of SH-groups correlated with the amount of spontaneous chromosomal aberrations. The inverse correlation between the individual radiosensitivity of patients (G_2 -assay) and the production of FR in the PBL after the first fraction of therapeutic irradiation was revealed. **Conclusion:** the obtained results suggest the essential role of oxidative stress in the formation of chromosomal instability of normal cells of patients with PC.

Key Words: prostate cancer, peripheral blood, lymphocytes, free-radical processes, oxidative metabolism, chromosome aberrations, individual radiosensitivity.

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

Отримано: 07.05.2019