

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

Освітній ступінь — магістр

на тему: **«ТРАНСМЕМБРАННИЙ ПОТЕНЦІАЛ МІТОХОНДРІЙ ТА
ПРОДУКЦІЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ В ЛІМФОЦИТАХ
ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ НА РАК ЕНДОМЕТРІЮ ЗА
РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ КРОВІ ТА ДІЇ МЕТФОРМІНУ»**

Виконав: студент 2-го року навчання

Спеціальності

091 Біологія

Шевчук Ілля Олександрович

Керівники:

Главін О.А._____

кандидат біологічних наук

Білько Д. І._____

кандидат біологічних наук, доцент

Рецензент Талько В. В._____

Магістерська робота захищена

з оцінкою _____

Секретар ЕК Пахаренко М. В._____

«____» _____ 2022 р.

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ _____	4
ВСТУП _____	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ _____	10
1.1. Негативні ефекти впливу променевої терапії на немалігнізовані клітини та тканини _____	10
1.2. Інтенсивність продукції активних форм кисню й трансмембранний потенціал мітохондрій у ролі показників життєздатності клітин _____	12
1.3. Модифікація енергетичних процесів в мітохондріях та стану окисних процесів в клітинах за впливу метформіну _____	15
РОЗДІЛ 2. МЕТОДОЛОГІЯ ДОСЛІДЖЕННЯ _____	17
2.1. Матеріали для дослідження, обладнання, реактиви, лабораторний посуд і витратні матеріали _____	17
2.1.1. Матеріали для дослідження _____	17
2.1.2. Обладнання _____	17
2.1.3. Реактиви _____	18
2.1.4. Лабораторний посуд _____	19
2.1.5. Витратні матеріали _____	19
2.2. Приготування розчинів _____	20
2.3. Забір венозної крові і обробка зразків _____	22
2.4. Введення метформіну в зразки крові _____	22
2.5. Умови тест-опромінення крові _____	23
2.6. Виділення лімфоцитів периферичної крові. Підрахунок живих та загиблих лімфоцитів периферичної крові _____	24
2.7. Визначення трансмембранного потенціалу мітохондрій лімфоцитів периферичної крові _____	25
2.8. Визначення інтенсивності продукції активних форм кисню у лімфоцитах периферичної крові _____	28
2.9. Статистична обробка даних _____	29
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ _____	32
3.1. Результати дослідження _____	32
3.1.1. Склад експериментальних груп та клініко-морфологічні дані хворих на рак ендометрію _____	32

3.1.2. Порівняння показників інтенсивності продукції активних форм кисню і трансмембранного потенціалу мітохондрій в лімфоцитах периферичної крові умовно здорових осіб та хворих на рак ендометрію _____	34
3.1.3. Вплив тест-опромінення крові на рівень трансмембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивність продукції активних форм кисню у лімфоцитах периферичної крові умовно здорових осіб та хворих на рак ендометрію _____	37
3.1.4. Вплив метформіну на рівень трансмембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивність продукції активних форм кисню в лімфоцитах периферичної крові умовно здорових осіб та хворих на рак ендометрію _____	38
3.1.5. Вплив тест-опромінення крові на рівень трансмембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивність продукції активних форм кисню у лімфоцитах периферичної крові умовно здорових осіб та хворих на рак ендометрію за дії метформіну _____	40
3.1.6. Зв'язок між рівнем трансмембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивністю продукції активних форм кисню у лімфоцитах периферичної крові умовно здорових жінок та хворих на рак ендометрію за модифікуючої дії метформіну <i>ex vivo</i> _____	46
3.2. Узагальнення результатів _____	49
ВИСНОВКИ _____	52
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ _____	54

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК	— активні форми кисню
БТ	— брахіотерапія
ВР	— вільні радикали
ДМСО	— диметилсульфоксид
ЛПК	— лімфоцити периферичної крові
МФ	— метформін
РЕ	— рак ендометрію
ТМП	— трансмембранний потенціал мітохондрій.
УЗО	— умовно здорові особи
DCFH-DA	— 2'-7'дихлорфлуоресцин диацетат
JC-1	— флюорисцентний катіонний барвник, який використовується в дослідженнях з моніторингу енергетичної функції мітохондрій
PBS	— натрій-фосфатний буфер (з анг. P hosphate B uffered S aline)

ВСТУП

Існують вагомі причини вважати іонізуюче випромінювання небезпечним для живих клітин і тканин. Іонізуюче випромінювання здатне спричинити цілий спектр негативних наслідків, таких як виникнення шкірних променевих уражень й онкологічних захворювань, розвиток гострої променевої хвороби і відмова органів. Коли доза опромінювання порівняно з фоновим рівнем є високою, іонізуюче випромінювання завдає організму двох типів уражень — прямих та опосередкованих [1-3]. Пряме ураження тканин спостерігається в результаті поглинання енергії випромінювання молекулами-мішенями. При цьому відбувається іонізація та збудження атомів і молекул. Найбільше значення має іонізація (радіоліз) води. В результаті утворюються вільні радикали — атомарний водень (H°), гідроксильний радикал (OH°), гідропероксидний радикал (HO_2°), пероксид водню (H_2O_2). Час їхнього існування не перевищує 10^{-5} - 10^{-8} с. Вони реагують із біологічно активними молекулами, в першу чергу з їх вільними SH-групами. У результаті утворюються неактивні дисульфідні групи ($\text{S}=\text{S}$). Непрямі ураження виникають внаслідок змін структури ДНК, ферментів, білків тощо, індукованих реактивними продуктами радіолізу води або розчинених у ній речовин. В результаті може відбуватись пригнічення синтезу нуклеїнових кислот, активності ферментів, підвищення проникності біологічних мембран. В наслідок чого виникають порушення обмінних процесів і структурно-функціональні ушкодження клітин. Ці події лежать в основі ряду радіогенних негативних наслідків згаданих вище, зокрема виникнення радіогенного раку. Останній виникає тоді, коли клітини отримують сублетальні пошкодження, і ураження окремих мішеней всередині клітин прямим або непрямим чином спричиняють неконтрольовану проліферацію клітин [2-6].

Водночас іонізуюче випромінювання широко використовується в сфері медицини. Разом з хірургічним втручанням і хіміотерапією, радіаційна терапія є одним з основних методів, які застосовуються у ході лікування онкологічних захворювань. Так, приблизно 50% від усіх онкологічних хворих в США і Австралії проходять курс радіотерапії під час лікування від онкологічних захворювань [7-8], тоді як складає вона лише 5% від загальної середньостатистичної вартості лікування онкологічних захворювань [9]. У ході променевої терапії іонізуюче випромінювання спричиняє відповідь організму на клітинному та молекулярному рівнях. Перша пов'язана з тим, що клітини пухлини належать до типу активно проліферуючих клітин. Відповідно, вони є особливо вразливими до дії іонізуючого випромінювання. Друга ж пов'язана з активацією, так званого протипухлинного імунітету, затримкою клітинного циклу, змінами в процесах репарації ДНК та процесах контрольованої загибелі клітин (апоптоз) [2-3].

Однак, в зону терапевтичного ураження іонізуючого випромінювання неминуче потрапляють клітини із оточення пухлини, в тому числі клітини з пулу периферичної крові. Найбільш радіочутливими клітинами людини, що визнані біоіндикаторами опромінення є лімфоцити периферичної крові (ЛПК) і клітини кишкової крипти, які частіше, ніж інші після іонізуючого опромінення піддаються апоптозу [10-12], тоді як багато інших клітин після припинення дії іонізуючого випромінювання можуть продовжувати виконувати власні функції в організмі [13]. Однак, необхідно мати на увазі, що уникнення апоптозу клітиною, яка зазнала дії іонізуючого випромінювання, не є однозначно позитивним або негативним шляхом розвитку подій, оскільки у цьому випадку має значення виникнення та збереження навіть найменших хромосомних аберацій (точкові мутації), що може призвести до онкологічної трансформації клітини у майбутньому [14].

Рак ендометрію (РЕ) знаходиться на шостому місці по частоті випадків захворювань онкологічного профілю серед жінок у світі [15] та на другому

місці в Україні [16]. Лише в Україні припадає 17,3 випадки захворювання на РЕ на кожні 100 000 жінок [16]. Близько у 75% пацієнток даний тип онкопатології діагностується на етапі, коли він обмежений лише тілом матки [17]. Так, згідно з наведеними даними, у трьох з чотирьох випадків існує необхідність у високоперсоналізованому лікуванні, яке дозволило б мінімізувати ймовірність, ступінь і кількість побічних наслідків лікування РЕ, таких як подразнення шкіри в області лікування (зовнішнє опромінення), подразнення слизової оболонки вагіни (найпоширеніший побічний ефект брахітерапії), біль і виділення з вагіни тощо [18]. У світлі вищесказаного, пошук речовин, які захищатимуть здорові клітини від радіаційного ураження, не впливаючи на малігнізовані клітини, залишається однією з пріоритетних тем досліджень у радіобіології протягом останніх десятиліть.

Метформін (1,1-диметилбігуанід гідрохлорид) — лікарський засіб, який уже протягом більше, ніж шістдесяти п'яти років використовується як першочерговий лікарський засіб для лікування діабету 2 типу і преддіабетних станів. Відомо, що на позаклітинному рівні метформін (МФ) діє на рецептори цитокінів, інсуліну, інсуліноподібного фактору росту 1 і адипонектину, чим стимулює зменшення рівнів інсуліну, інсуліноподібного фактору росту-1 і лептинів. На внутрішньоклітинному рівні МФ інгібує запалення і активує АМФ-активуєму протеїнкіназу, яка у свою чергу інгібує мішень рапаміцину ссавців (mTOR) [19]. В ряді досліджень показано, що за впливу на ці та інші біохімічні процеси МФ володіє протипухлинним ефектом, модулює окислювальний стрес і сприяє апоптозу старіючих клітин, хоча механізми його протипухлинної дії та сприяння апоптозу старіючих клітин залишаються не до кінця зрозумілими [19, 20]. Перелічені ефекти МФ привертають увагу багатьох дослідників і з точки зору його застосування у медичній практиці з метою захисту здорових клітин від пошкоджень ДНК та побічних ефектів пов'язаних з променевою терапією. В чому і полягає актуальність даної роботи.

Мета роботи полягає у вивченні можливості використання показників трансмембранного потенціалу та продукції активних форм кисню в якості предикторів індивідуальної радіочутливості здорових клітин і тканин із оточення пухлини хворих на рак ендометрію, що зазнають дії іонізуючого випромінювання за променевої терапії, та з'ясуванні доцільності використання метформіну в ролі радіомодифікатора впливу рентгенівського випромінювання на клітини і тканини із оточення пухлини хворих на рак ендометрію.

Об'єктом дослідження є вплив рентгенівського тест-випромінювання на рівень трансмембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивність утворення активних форм кисню у лімфоцитах периферичної крові умовно здорових осіб та хворих на рак ендометрію за модифікуючої дії метформіну.

Предметом дослідження є рівень трансмембранного потенціалу мітохондрій і продукція активних форм кисню лімфоцитами периферичної крові умовно здорових осіб і хворих на рак ендометрію за рентгенівського тест-опромінення крові та модифікуючої дії метформіну.

Для досягнення поставленою мети нами були сформульовані наступні завдання:

- 1 Визначити і порівняти рівні трансмембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивності продукції активних форм кисню у лімфоцитах периферичної крові умовно здорових осіб та первинних хворих на рак ендометрію.
- 2 Проаналізувати зміни трансмембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивності продукції активних форм кисню у лімфоцитах периферичної крові хворих на рак ендометрію в залежності від розміру та ступеню диференціації пухлини.
- 3 Проаналізувати зміни трансмембранного потенціалу мітохондрій й інтенсивності продукції активних форм кисню у лімфоцитах

периферичної крові хворих на рак ендометрію після першого сеансу брахітерапії (доза опромінення — 6,0 Гр).

- 4 Дослідити вплив тест-опромінення у діапазоні доз 0,5 — 3,0 Гр на трансмембранний потенціал мітохондрій та інтенсивність продукції активних форм кисню у лімфоцитах периферичної крові хворих на рак ендометрію.
- 5 Дослідити зміни трансмембранного потенціалу мітохондрій й інтенсивності утворення активних форм кисню у лімфоцитах периферичної крові умовно здорових осіб та хворих на рак ендометрію в залежності від модифікуючої дії метформіну у концентраціях 2 мМ і 20 мМ *ex vivo*.
- 6 Проаналізувати зв'язок між трансмембранним потенціалом мітохондрій та інтенсивністю продукції активних форм кисню в лімфоцитах периферичної крові умовно здорових осіб і хворих на рак ендометрію, а також оцінити його зміну за модифікуючого впливу метформіну в концентраціях 2 мМ і 20 мМ *ex vivo*.

Експериментальну частину наукової роботи було виконано на базі відділу біологічних ефектів іонізуючого та неіонізуючого випромінювання Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Негативні ефекти впливу променевої терапії на немалігнізовані клітини та тканини

Вплив іонізуючого випромінювання на здорові тканини і онкологічно трансформовані клітини характеризується одночасно як негайними, так і довготривалими наслідками. Біологічні ефекти опромінення проявляються у запальних реакціях, активації протипухлинного імунітету, загибелі опромінених клітин, онкологічній трансформації клітин тощо. До ряду факторів, які визначають негайні і довготривалі біологічні ефекти опромінення належать: швидкість поділу опромінених клітин, тип опромінених клітин і тканин, стадія клітинного циклу на момент опромінення, рівень забезпечення місця опромінення кров'ю та киснем, доза і тип опромінення, а також їх розподіл у просторі і часі [3].

Незважаючи на те, що опромінення низькими дозами радіації широко застосовується у всьому світі для діагностики багатьох захворювань за посередництва різноманітних технологій візуалізації, шкідливі наслідки впливу низьких доз радіації і їх ступінь складності, наприклад, у випадку комп'ютерної томографії і магнітно-резонансної томографії залишаються предметом дискусій [21].

Іншим прикладом є променева терапія. Хоча променева терапія є важливим методом лікування захворювань онкологічного профілю, пацієнти можуть страждати від широкого спектру побічних ефектів викликаних не прогресією пухлини, а саме променевою терапією. До можливих негативних наслідків променевої терапії належать: проблеми зі шкірою, зменшення

клітинного пулу крові, судом, проблеми із пам'яттю, набряки в області ясен, горла та шиї, вушні болі, нудота тощо [22-24].

Передбачається, що оскільки мітохондрії є місцем синтезу АФК, рівень АФК там приблизно вдвоє вищий, ніж в цитозолі, то мітохондрії можна вважати схильними до дисфункції органелами і водночас вразливими мішенями для іонізуючого випромінювання. Таким чином, навіть опромінення клітин низькими дозами здатне індукувати опосередкований АФК оксидативний стрес [25].

Серед досліджень, які не підтверджують шкідливого впливу радіації у низьких дозах на окремі показники виживаності клітин, слід згадати дослідження Tungjai та ін. Результати роботи Tungjai та ін свідчать про те, що одноразове іонізуюче опромінення малими дозами, а саме 0,2 Гр і меншими, не впливають на трансмембранний потенціал мітохондрій і рівень апоптозу лімфоцитів периферичної крові у короткотривалій перспективі [21].

У медичній практиці з метою запобігання або зменшення ступеню пошкодження здорових клітин і тканин до та/або після опромінення часто вдаються до застосування радіопротекторів і радіомітигаторів. Якщо до перших належать сполуки (у своїй більшості антиоксиданти), які призначені для зменшення ступеню ураження здорових тканин, викликаного радіацією, то другі, радіомітигатори, сприяють зменшенню шкідливого впливу іонізуючого випромінювання саме на радіочутливі клітини гемато-імунної системи.

Потенційним кандидатом на роль радіомодифікатора, що може бути застосованим для зменшення прояву негативних ефектів променевої терапії у рамках лікування РЕ є метформін гідрохлорид, відомий як метформін (МФ) [26-28].

1.2. Інтенсивність продукції активних форм кисню й трансмембранний потенціал мітохондрій у ролі показників життєздатності клітин

Мітохондрії відіграють важливу роль чи не у всіх процесах пов'язаних із онкогенезом, включаючи трансформацію клітин, ріст і прогресію пухлини, а також функціонування протипухлинного імунітету. Найбільшою мірою мітохондрії беруть участь у синтезі активних форм кисню (АФК) у ході окисного фосфорилювання — серії окисно-відновних реакцій у результаті яких синтезується АТФ. Мітохондрії використовують субстрати, які піддаються окисненню, для створення мембранного потенціалу у формі протонного градієнта через внутрішню мембрану мітохондрій [29].

У широкому розумінні, до АФК належать іони, радикали і молекули з неспареними електронами., які є продуктами або субстратом реакцій окиснення-відновлення, або електронного збудження атомів кисню. АФК залучені до процесів передачі сигналів, підтримки гомеостазу і контрольованої смерті клітини [30-32].

Усупереч безперервній продукції високореактивних форм кисню, клітини здатні підтримувати внутрішньоклітинний гомеостаз, завдяки ендогенній антиоксидантній системі, яка складається з ферментів, вітамінів і їх аналогів, мінералів, а також метаболітів, які можуть нейтралізовувати реактивні сполуки. Ендогенна антиоксидантна система людини включає: ферментативні антиоксиданти, до яких серед інших належать супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатіонпероксидаза (GPx) і тіоредоксин (Trx); неферментативні антиоксиданти, до яких належать вітаміни (вітаміни А, С і Е) або їх аналоги (коензим Q10 і флавоноїди), мінерали (селен і цинк) і метаболіти (білірубін і мелатонін). Примітно, що одночасно із підвищенням швидкості генерації АФК відбувається зростання

активності антиоксидантних ензимів з метою підтримки функцій мітохондрій та захисту критично важливих структур клітин від пошкоджень [33-35].

На рівні клітин і тканин, оксидативний стрес виникає при порушенні рівноваги між прооксидантними та антиоксидатними механізмами у сторону останніх. Оксидативний стрес пов'язаний із великою кількістю патологічних станів і старінням клітин, оскільки він веде до пошкодження ліпідів, білків, РНК і ДНК молекул [35-38]. У зв'язку з цим, окремо слід відмітити, що одне лише окиснення ліпідів може діяти як сигнал про загибель клітини, та ініціювати каскадну сигнальну реакцію, яка закінчується смертю клітини [31].

З однієї сторони, існує думка, що підвищення вмісту АФК може мати протипухлинну дію: підвищення вмісту АФК вважаються одним із механізмів неспецифічного імунітету з елімінації малігнізованих клітин, бактерій та паразитів. Підвищення вмісту АФК спричиняє активацію сигнальних шляхів асоційованих із виживанням клітин в стресових умовах: адаптацію клітин до гіпоксичного середовища та інших змін у метаболізмі. Так, деякі експериментальні методи терапії полягають в індукції збільшення продукції АФК. Ці методи базуються на припущенні, що підвищення рівня АФК вище певної межі може чинити цитотоксичну дію на малігнізовані клітини [39].

З іншої сторони, оксидативний стрес лежить в основі генерації онкогенних мутацій через пошкодження ДНК молекул [40, 41], активує проонкогенний ланцюг передачі сигналів, що полегшує прогресування захворювання, ангіогенез і виживання малігнізованих клітин [42], як опосередковано, так безпосередньо викликає метаболічні дисфункції. Яскравим прикладом служить той факт, що окислювальний стрес може безпосередньо викликати резистентність клітин до інсуліну та модифікувати метаболізм глюкози [43-47]. Розвиток окисного стресу пов'язаний із надлишковою генерацією різноманітних АФК, таких як пероксиди,

супероксиди, гідроксильний радикал, синглетний кисень і альфа-кисень. Однак, вимірювання цілого спектру реактивних речовин є трудомістким та вартісним. Тому визначення змін загальної продукції АФК представляє інтерес в якості можливого предиктора радіочутливості немалігнізовних клітин та тканин хворих на рак з метою прогнозування небажаних променевих ускладнень (наприклад, циститів і ректитів радіогенної природи, зниження рівня імунітету, виникнення вторинного раку), погіршення якості життя та прогнозу п'ятирічної виживаності пацієнтів при проведенні променевої терапії.

Трансmemбранний потенціал мітохондрій є важливим параметром енергетичної функції мітохондрій і використовується у ході дослідження функціонування мембран, їх транспортної функції, енергетичного обміну, продукції АФК [48, 49]. На різних дослідницьких моделях неодноразово було продемонстровано наявність позитивної кореляції між продукцією АФК і рівнями ТМП. Асоційований з гіперполяризацією ТМП, підвищений рівень утворення АФК веде до пошкодження мембран мітохондрій та, як наслідок, деполяризації та втрати функціональної активності [50, 51]. Трансmemбранний потенціал мітохондрій у ЛПК можливо визначити декількома шляхами, в тому числі з використанням флюорисцентного зонда JC-1, який має перевагу над іншими катіонними барвниками в тому, що він проникає в мітохондрії і змінює свої флуоресцентні властивості в залежності від його агрегації із мембраною [52]. В умовно здорових клітинах з високим трансmemбранним потенціалом мітохондрій JC-1 утворює комплекси з інтенсивною флуоресценцією червоним кольором. Однак в клітинах з низьким ТМП мітохондрій JC-1 залишається в мономерній формі, яка характеризується зеленою флуоресценцією. Таким чином, чим більша різниця у співвідношенні між червоною і зеленою флуоресценціями, тим більшою вважається поляризація мітохондріальної мембрани [48].

1.3. Модифікація енергетичних процесів в мітохондріях та стану окисних процесів в клітинах за впливу метформіну

Кожен етап розвитку і ремісії раку є результатом взаємодії між пухлиною та імунною системою організму. МФ вважається одним із тригерів процесу імуномодуляції, що супроводжується цитотоксичною дією CD8⁺ Т-лімфоцитів. А саме: МФ захищає CD8⁺ Т-лімфоцити від апоптозу. [53]. Передбачається також, що МФ здатен перешкоджати проліферації малігнізованих стовбурових клітин, які є порівняно із малігнізованими клітинами є більш резистентними до хіміо- і променевої терапії. У зв'язку з цим Hirsch та ін. запропонували гіпотезу, згідно з якою МФ вибірково видаляє малігнізовані стовбурові клітини шляхом активації AMPK й інгібування mTOR у малігнізованих стовбурових клітинах і таким чином покращує загальний ефект хіміо- і променевої терапії [54].

Існують також докази на користь того, що МФ є супресором мезенхімально-епітеального переходу, який у свою чергу вважається одним із ключових етапів в процесі метастазування раку [55].

У 2019 році, Sivalingam VN та ін. запропонували пояснення, чому МФ меншою мірою проявляє або узагалі не проявляє власні протипухлинні властивості у пухлинах з високим вмістом глюкози і низьким рівнем кисню. Беручи до уваги те, що гіперглікемія може спричинити клітинну гіпоксію шляхом збільшення продукції АФК у мітохондріях і послідуєчої супресії аквапорина-1 [56, 57], гіперглікемію прийнято розглядати як фактор, який веде до метастазів пухлини і збільшення показника смертності як короткотривалої, так і у тривалій перспективі для багатьох типів злоякісних новоутворень [56]. У світлі цього Sivalingam VN та ін. на прикладі РЕ показали, що МФ за гіпероглікемії і низького вмісту кисню збільшує активність біогенезису мітохондрій пухлини тіла матки і, таким чином, може

компенсувати власний же супресорний вплив на трансмембранний потенціал мітохондрій [58].

У контексті обговорення радіомодифікуючих ефектів МФ варто згадати роботу Cheki M. та ін., які експериментальним шляхом продемонстрували, що МФ за концентрацій в 10 і 50 μmM може володіти радіопротекторними властивостями. Про це свідчило зменшення долі лімфоцитів, які піддавалися апоптозу після опромінення приблизно на 23 і 46% відповідно [26]. Імовірно, МФ здатен інгібувати радіаційно-індуковану цитотоксичність і генотоксичність в лімфоцитах периферичної крові людини. Ряд клінічних досліджень прийшли до подібних висновків, проте, ефект у кількох випадках не був однозначним, навіть для однієї і тієї ж локалізації пухлини [59-62].

За даними метааналізу проведеного в 2017 році Meireles C. G. та іншими на основі 19 досліджень щодо використання МФ як препарату для застосування у ході комплексного лікування РЕ, дослідниками був встановлений зв'язок між МФ та реверсією атипової гіперплазії тіла матки в нормальний ендометрій. Пацієнти хворі на РЕ, які приймали МФ, в середньому мали більший відсоток виживання в порівнянні з пацієнтами, які не приймали МФ. Разом з тим, необхідно також відзначити, що приймання пацієнтами МФ в дослідженнях супроводжувалось зменшенням кількості біомаркерів пухлини [63].

РОЗДІЛ II.

МЕТОДОЛОГІЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали для дослідження, обладнання, реактиви, лабораторний посуд і витратні матеріали

Перед початком забору крові проводилося анкетування донорів, в ході якого в спеціальний журнал заносились дані, а саме ініціали та прізвище, рік народження. Уся інформація зберігалась в зашифрованому вигляді. У журналі також зазначалась інформація про контакти донорів із джерелами іонізуючого випромінювання, проживання в хімічно чи радіаційно забруднених територіях, наявність хронічних захворювань неонкологічного профілю.

Згідно з принципів і норм Гельсінської декларації (2008), однією з основних умов етично проведеного експерименту є наявність інформованої згоди донорів на участь у наукових дослідженнях. Експериментальна частина дослідження, включаючи етап отримання інформованої згоди на участь у наукових дослідженнях, була проведена відповідно до норм Гельсінської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації, [64].

2.1.1. Матеріали для дослідження

- венозна кров;
- суспензія з ЛПК у PBS з концентрацією 1 млн./мл;

2.1.2. Обладнання

- іономір И-130 (СРСР);
- магнітна мішалка;
- морозильна камера Atlant (Білорусь);
- холодильна камера Atlant (Білорусь);
- центрифуга Elmi (Латвія) з бакет-ротором та можливістю встановлення прискорення 400g;
- світловий мікроскоп ZEISS (Німеччина);
- вортекс ZX3 Velp Scientifica (Італія);
- інкубатор/термостат МІЗМА (Україна);
- автоматизований рідер Synergy HT (США);
- електронні ваги ТВЕС (Україна);
- автоматичні піпетки перемінного об'єму Biotech HTI (США) на 0,5-10 мкл, (для додавання JC-1), 10-100 мкл, 100-1000 мкл, 500-5000 мкл та багатоканальна на 10-300 мкл (для додавання PBS та DCFHDA у планшети).

2.1.3. Реактиви

- дистильована вода;
- стандарт-титр соляної кислоти;
- солі для приготування ізотонічного натрій-фосфатного буферу рН 7,4 (PBS): хлорид калію, дигідроортофосфат калію, хлорид натрію, динатрієвий водневий фосфат додекагідрат;
- реактиви для приготування збалансованого сольового розчину (натрію хлорид, калію хлорид, d-глюкоза, хлориду кальцію двох водний, HEPES);

- Histopaque-1077 Sigma-Aldrich (США);
- 0.5% розчин трипанового синього;
- барвник JC-1 MitoPT;
- барвник дихлоро-флуоресцеїн-діацетат (DCFH DA);
- диметилсульфоксид (ДМСО).
- стандарт титри на рН 1,68; 6,86 та 9,18 для калібрування іономіра.

2.1.4. Лабораторний посуд

- скляні стакани об'ємом 1000 та 50 мл;
- мірні колби об'ємом 1000 мл;
- пробірки для відбору зразків крові Vacutainer ("F.L. Medical", Італія) об'ємом 6 мл з антикоагулянтом Li-гепарин;
- камера Горяєва;
- шліфовані покривні скельця до камери Горяєва.
- центрифужні пробірки;
- штативи для центрифужних пробірок та пробірок типу Eppendorf.

2.1.5. Витратні матеріали

- 96-лункові планшети з плоским дном і можливістю вимірювання флюоресценції ($\text{ex}=485 \text{ nm}$; $\text{em}=528 \text{ nm}$; $\text{em}=590 \text{ nm}$);
- тканина марлева;
- наконечники для автоматичних піпеток перемінного об'єму 10-200 мкл, 100-1000 мкл та 500-5000 мкл;
- пластикові піпетки Пастера, 3 мл;
- пробірки типу Eppendorf, 1,5 мл;
- фільтрувальний папір.

2.2. Приготування розчинів

- 1 Ізотонічний натрій-фосфатний буфер (PBS). До скляного стакану (1 л) додавали солі: 0,245 г KH_2PO_4 (1,8 мМ); 0,201 г KCl (2,7 мМ); 8,007 г NaCl (137 мМ); 3,581 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ (10 мМ); після чого розчиняли солі в 800-900 мл дистильованої води. Вимірювання рН розчину виконували за допомогою іономіру та магнітної мішалки. Корегування рН розчину до 7,4 виконували шляхом додавання 0,1 н NaOH й 0,1 н HCl . Кінцевим етапом було доведення об'єму розчину до 1 літра, проціджування розчину через фільтрувальну перетинку та поміщення його до холодильника у щільно закритій посудині. Отриманий розчин використовувався для розведення зразків крові та лімфоцитів, відмивання суспензії лімфоцитів після їх виділення та видалення залишків барвника JC-1 .
- 2 DCFH-DA в ДМСО. Приготування маточного розчину DCFH-DA в ДМСО (10,3 мМ) відбувалося шляхом розчинення DCFH-DA в ДМСО із розрахунку 5 мг/мл. Після приготування розчин розливали в герметично закриті пробірки по 0,5-1,0 мл та поміщали у морозильну камеру температура в якій дорівнювала -18°C . При цьому уникали контакту готового розчину зі світлом.
- 3 Збалансований сольовий розчин (BSS). Для приготування збалансованого сольового розчину у скляній колбі об'ємом 200 мл змішували 117 мг натрію хлориду (10 мМ), 149 мг калію хлориду (10 мМ), 360,3 мг d-глюкози (10 мМ), 220 мг хлориду кальцію двох водного (0,3 мМ) та 476,6 мг HEPES (10 мМ). До отриманої суміші додавали дистильовану воду доводячи об'єм отриманого розчину до 1000 мл.
- 4 Вуглекислий натрій двохзаміщений. Приготування 100 мМ розчину вуглекислого натрію двохзаміщеного (50 мл) проводили розчиняючи

2.3. Забір венозної крові і обробка зразків

Отримання зразків венозної крові проводилося із використанням трьохкомпонентної системи забору крові. Відібрані 6,0 мл крові потрапляли у спеціальні вакутейнери із гепариновим напиленням. Гепаринове напилення дозволяє уникнути передчасного згортання крові. Відразу після потрапляння у вакутейнери кров піддавалася ретельному перемішуванню. Наступним етапом було нанесення маркування на вакутейнери. Воно включало присвоєння донору особистого номера та зазначення дати забору крові.

Важливим для проведення експерименту було дотримання оптимального температурного режиму при транспортуванні та зберіганні зразків крові до початку проведення експерименту, адже це впливає на кількість життєздатність клітин у зразку. Оптимальною температурою для зберігання зразків крові є 5-8°C.

Відбір зразків крові у хворих на РЕ проводили до початку лікування (променева та/або хіміотерапія) та через добу після першого сеансу брахітерапії (6 Гр).

2.4. Введення метформіну у зразки крові

Етап з введенням МФ до периферичної крові вимагав формування наступних зразків для досліджень: зразок без МФ, зразки з концентрацією МФ 2 мМ і 20 мМ. Внесення МФ до периферичної крові виконували шляхом додавання розчину метформін гідрохлориду в PBS до крові з досягненням концентрацій 2 і 20 мМ із розрахунку 50 мкл розчину МФ на 1 мл крові за 1 годину до початку тест-опромінення або виділення лімфоцитів (рис. 2.1.).

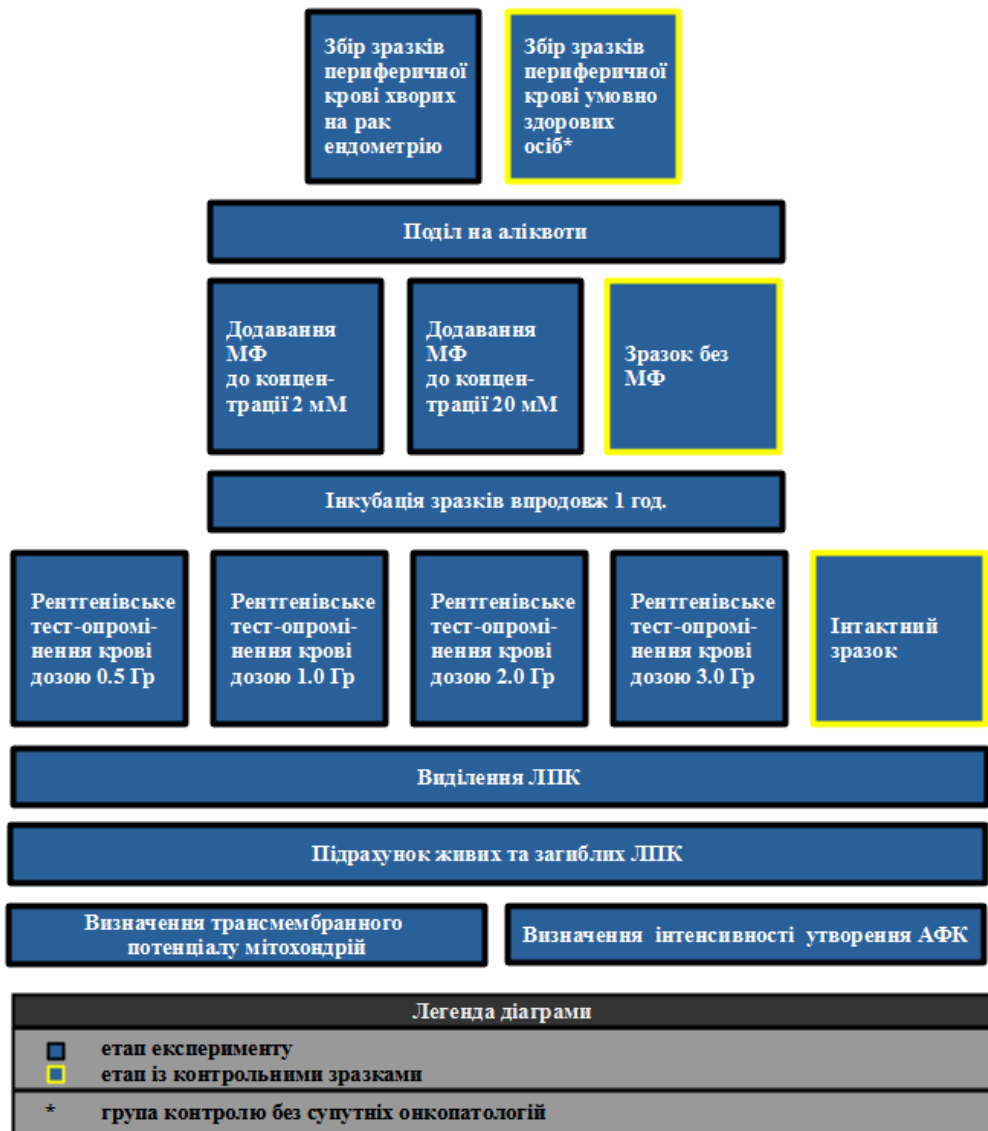


Рис. 2.1. Узагальнена схема експериментальної частини дослідження

2.5. Умови тест-опромінення крові

Рентгенівське тест-опромінення крові виконували в дозах 0,5; 1,0; 2,0; і 3,0 Гр. Тест-опромінення зразків крові виконували на рентгенівській установці РУМ-17 Національного інституту раку МОЗ України. Умови опромінення: напруга на трубці – 180 кВ, струм – 10 мА, фільтр – 0,5 мм Сu + 1 мм Аl, потужність дози опромінення – 0,55 Гр/хв.

2.6. Виділення лімфоцитів периферичної крові. Підрахунок живих та загиблих лімфоцитів периферичної крові

Класичним методом виділення ЛПК є центрифугування за градієнтом щільності. Виокремлені ЛПК в результаті диференційного центрифугування можуть бути використані у клінічних і наукових дослідженнях [65].

Виділення лімфоцитів проводили на Histopaque-1077 згідно інструкції виробника [66]. Histopaque-1077 розливали у пусті центрифужні пробірки в об'ємі, що дорівнював об'єму зразка крові для виділення лімфоцитів, але не менше, ніж по 1 мл. Розводили зразки крові PBS у співвідношенні 1:1 та перемішували. Далі розведений зразок крові обережно нашаровували піпеткою Пастера на шар Histopaque-1077, не допускаючи перемішування. Для нанесення іншого зразка піпетку Пастера, замінювали або промивали у PBS. Пробірки зі зразками обережно поміщали до центрифуги та центрифугували при 400 g протягом 40 хв. Якщо кількість пробірок із зразками була непарною при виділенні або промивці лімфоцитів розчином PBS, додавали додаткову пробірку із еквівалентним об'ємом дистильованої води або PBS. Кільце лімфоцитів, що знаходилося на межі між шарами Histopaque-1077 та розведеної плазми відбирали автоматичною піпеткою (3 рази по 200 мкл) та переносили їх у чисті пронумеровані пробірки. Туди ж автоматичною піпеткою або пластиковою піпеткою додавали PBS об'ємом 2,0 або 2,5 мл та перемішували вміст пробірки на вортексі. Пробірки із лімфоцитами у PBS центрифугували протягом 10-15 хв при 400 g. По закінченню роботи центрифуги, обережно нахилиючи пробірки до низу, виливали з пробірок надосадову рідину, залишаючи лімфоцити. Далі, повторили етап з очищенням лімфоцитів від Histopaque-1077. У наступну чергу, до пробірок з ЛПК додавали PBS об'ємом 1,0 мл, перемішували їх вміст на вортексі та в подальшому зберігали при 5-10°C. В лунки планшету вносили 75 мкл трипанового синього, потім перемішували зразок із

суспензією лімфоцитів протягом 30 секунд на вортексі та вносили 25 мкл суспензії клітин в лунку із барвником і знову ретельно перемішували суміш за допомогою автоматичної піпетки. Лімфоцити підраховували у 100 великих квадратах, або у 20 великих квадратах, що розміщуються у камері по діагоналі [67]. Клітини, що мали синє забарвлення ми рахували за загиблі. Після підрахунку клітин їх концентрацію ми розраховували за формулою (2.1).

(2.1)

$$Y = \frac{X \times R \times 100 \times 4000}{N \times 1600 \times 1000}$$

де: Y – загальна кількість клітин (кількість живих клітин або кількість загиблих клітин), млн./мл.; X – кількість підрахованих клітин; R – розведення зразку трипановим синім; N – кількість великих квадратів в яких було проведено підрахунок клітин; 100 – кількість великих квадратів в камері; 1000 – коефіцієнт перерахунку в млн. клітин на мл; 4000 та 1600 – коефіцієнти для підрахунку клітин згідно до розмірів та об’ємів великих квадратів камери Горяєва.

Після підрахунку кількості клітин суспензію лімфоцитів розводили у PBS до концентрації 1 млн./мл.

2.7. Визначення трансмембранного потенціалу мітохондрій лімфоцитів периферичної крові

Першим етапом визначення трансмембранного потенціалу мітохондрій було розведення суспензії лімфоцитів у PBS до концентрації 1 млн./мл (рис. 2.2) Далі перемішували розведену суспензію клітин, відбирали з неї



Рис.2.2. Схема визначення трансмембранного потенціалу мітохондрій

0,5 мл в окрему пробірку і додавали туди 5 мкл розмороженого барвника JC-1 у ДМСО до 0,5 мл та ретельно перемішували. Згідно інструкції від виробника MitoPT® JC-1, кожен набір із барвниками ми тримали подалі від сонячних променів і розморожувати не більше, ніж два рази [68]. Окрім лімфоцитів із JC-1, формували ще три контрольних зразка: лімфоцити без MitoPT JC-1, PBS, PBS з MitoPT JC-1. Інкубували лімфоцити у темряві протягом 20 хвилин за температури 37°C. Далі двічі відмивали клітини від залишків барвника 2,5 мл PBS з переосадженням клітин центрифугуванням (10 хв, 400 g) відбираючи надосадову рідину.

У наступну чергу, перемішували клітини у 1 мл PBS з використанням вортекса і отримували суспензію лімфоцитів з концентрацією 0,5 млн/мл. Далі додавали у лунки чорного планшету по 100 мкл дослідних або контрольних зразків та проводили вимірювання флюоресценції при довжинах хвиль $\lambda_{ex}=485\text{ nm}$, $\lambda_{em}=528\text{ nm}$ та $\lambda_{ex}=485\text{ nm}$ $\lambda_{em}=590\text{ nm}$.

Вимірювання трансмембранного потенціалу мітохондрій здійснювали з використанням автоматичного рідера Sinergy HT (США). Обрахування виконували шляхом порівняння інтенсивності емісії J-агрегатів та J-мономерів: умовно здорові клітини, які містять мітохондрії з поляризованими внутрішніми мембранами, накопичують JC-1 на мембрані в той час як клітини з пошкодженою зовнішньою мембраною демонструють посилену зелену флюоресценцію, так як барвник не затримується в мембрані.

Рівень ТМП обраховували за співвідношенням флюоресценції при 590 нм та 528 нм за формулою (2.2)

(2.2)

$$Y = \frac{E_{590} - K_{590}}{E_{528} - K_{528}}$$

де: Y – значення трансмембранного потенціалу мітохондрій, ум. од; E_{590} – значення емісії дослідного зразка (забарвлені клітини) за довжиною хвилі 590 нм, ум. од.; E_{528} – значення емісії дослідного зразка (забарвлені клітини) за довжиною хвилі 528 нм, ум. од.; K_{590} – значення емісії контрольного зразка (незабарвлені клітини) за довжиною хвилі 590 нм, ум. од.; K_{528} – значення емісії контрольного зразка (незабарвлені клітини) за довжиною хвилі 528 нм, ум. од.

2.8. Визначення інтенсивності продукції активних форм кисню у лімфоцитів периферичної крові

Вимірювання інтенсивності утворення АФК виконувалось з використанням DCFH-DA (довжина хвиль – ex 485 нм, em 528 нм) на автоматизованому рідері Synergy HT (США). Вимірювання проводилося протягом 90 хвилин за температури в 37°C. Дані записувалися кожні 15 хвилин (рис. 2.3).

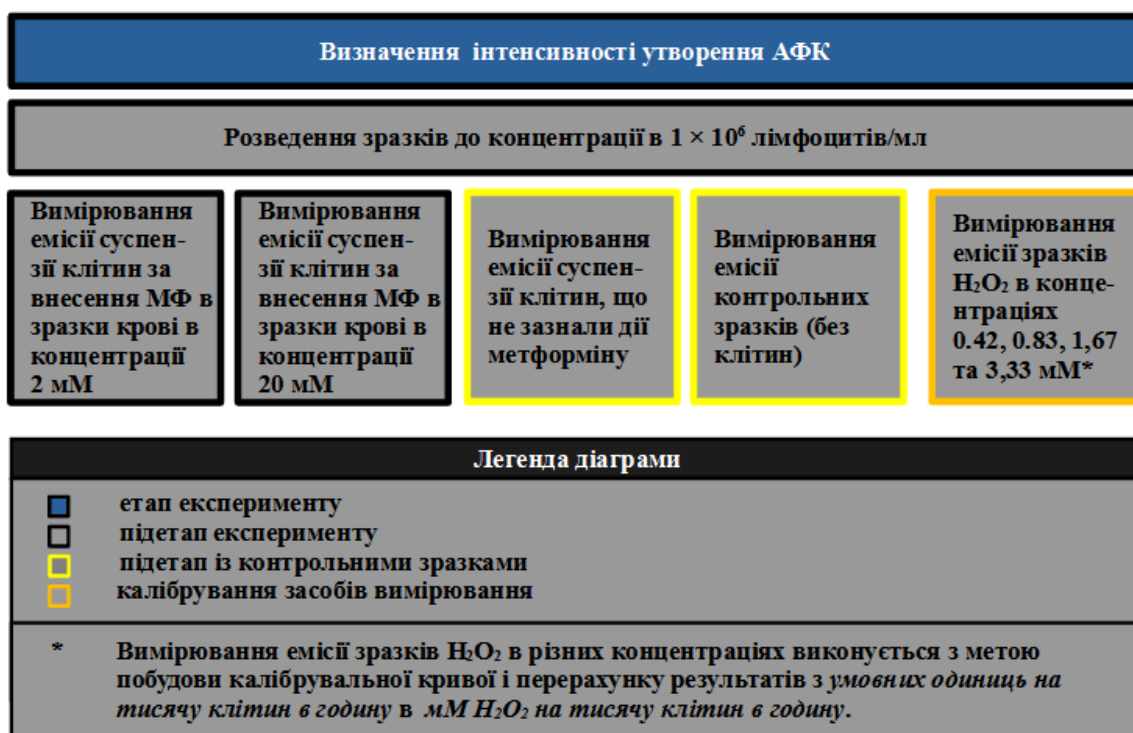


Рис.2.3. Схема визначення інтенсивності продукції АФК

В ході виконання дослідження в лунку чорного планшета з пласким дном для вимірювання флюоресценції вносилося по 100 мкл суспензії клітин у PBS з концентрацією клітин 1 млн./мл + 150 мкл PBS + 50 мкл DCFH-DA у BSS.

Додатковим етапом була побудова калібрувальної кривої і порівняння зростання флюоресценції зразків і розчинів перекису водню відомих концентрацій. Для цього у лунки планшету замість суспензії клітин додавали по 100 мкл перекису водню у фінальних концентраціях 0,42; 0,83; 1,67 та 3,33 мМ. Контролем слугували лунки в яких замість суспензії клітин вносилося 100 мкл PBS .

2.9. Статистична обробка даних

Математичний обрахунок та графічне представлення стандартних показників на основі отриманих даних були виконані з використанням програм: «OriginPro 2019», «LibreOffice Calc» та « Microsoft Excel».

Перевірку гіпотез на відповідність критерію нормального розподілу проводили за допомогою тесту Шапіро-Вілка [69] за формулою поданою нижче (2.3).

(2.3)

$$W = \frac{(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2},$$

де: W – критерій Шапіро-Вілка; x_i – значення x -змінної у вибірці.; $\bar{x}$ – середнє арифметичне значення x -змінної; a_i – коефіцієнт, які обираються в залежності від величини вибірки.

Перевірку на наявність достовірних відмінностей для одновибіркових (2.4) і парних даних (2.5) виконували із застосуванням t -критерію Стьюдента. Показники вважалися достовірними, якщо похибка дорівнювала або була меншою за 0,05 [70].

(2.4)

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - \mu_d}{s_p \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}}$$

де: t – t -значення; $\bar{x}$ – середнє арифметичне значення x -змінної; s – стандартне відхилення вибірки від середнього значення; μ_0 – бажане гіпотетичне середнє арифметичне значення вибірки; n_1 і n_2 – розміри вибірок, що порівнюються. Ступінь свободи дорівнює n_1+n_2-2 .

(2.5)

$$t = \frac{Z}{s} = \frac{\bar{X} - \mu}{\hat{\sigma}/\sqrt{n}}$$

де: t – t -значення; Z – стандартизована оцінка; $\bar{x}$ – середнє арифметичне значення x -змінної; s – стандартне відхилення вибірки від середнього значення; $\hat{\sigma}$ – це стандартне відхилення вибірки; μ – середнє арифметичне значення вибірки; n – розмір вибірки. Ступінь свободи в цьому тесті дорівнює $n - 1$.

Зв'язок між трансмембранний потенціалом й інтенсивністю продукції АФК у хворих на РЕ та УЗО обраховували за допомогою коефіцієнта Спірмана за формулою поданою нижче (2.6).

(2.6)

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

де: r – коефіцієнт кореляції.; x – значення x -змінної у вибірці.; $\bar{x}$ – середнє арифметичне значення x -змінної; y – значення y -змінної у вибірці; $\bar{y}$ – середнє арифметичне значення y -змінної.

РОЗДІЛ III.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Результати

3.1.1. Склад експериментальних груп та клініко-морфологічні дані хворих на рак ендометрію

До групи контролю входило 19 осіб без онкологічних захворювань в анамнезі. Віковий діапазон УЗО був у межах від 21 до 69 років. Середній вік УЗО дорівнював 49,2 роки.

До експериментальної групи хворих на РЕ входили 23 жінки віком від 33 до 73 років (середній вік — 61,6 роки) із підтвердженим діагнозом РЕ. Серед них більшість хворих (13 обстежених) за класифікацією TNM мали стадію захворювання $T_{1b}N_0M_0$ та помірну ступень диференціювання пухлини G_2 (17 обстежених) – див. таб. 3.1. Клініко-морфологічні дані хворих представлено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Клініко-морфологічні дані хворих на РЕ

Показник		Середній вік, роки	Кількість хворих	
			п	%
Обстежені хворі				
Загалом		61,6	23	100,0
Стадія захворювання, TNM	T _{is} N ₀ M ₀	59,5	1	4,3
	T _{1a} N ₀ M ₀	62,3	3	13,0
	T _{1b} N ₀ M ₀	62,6	13	56,5
	T ₂ N ₀ M ₀	56,5	4	17,4
	T ₃ N ₀ M ₀	73,0	1	4,3

	T ₄ N ₁ M ₁	56,0	1	4,3
Ступінь диференціювання пухлини, G	G _x	59,5	1	4,3
	G ₂	60,8	17	73,9
	G ₃	65,0	5	21,7
Після операції		58,1	20	87,0

Продовження табл. 3.1.

Примітки:

- 1 Т – розмір первинної пухлини.
- 2 N – наявність, відсутність та поширеність метастазів у локальних лімфатичних вузлах.
- 3 M – наявність чи відсутність віддалених метастазів.
- 4 Цифра справа від літери вказує на ступінь поширеності злоякісного новоутворення.

Розміри пухлин за класифікацією TNM у 16 хворих відповідали T₁, у чотирьох хворих — T₂, у одної хворої — T₃, у одної хворої — T₄, і ще в одної хворої було діагностовано передінвазивний рак 0 стадії (таб. 3.1).

Для 1 з 23 обстежених було відмічено наявність як локальних, так і віддалених метастазів. У 17 хворих пухлини характеризувались помірним ступенем диференціації та у п'яти пацієнтів пухлини — низьким ступенем диференціації. Операційне втручання з метою видалення первинної пухлини до відбору зразків крові було проведене у 20 з 23 пацієнтів (таб. 3.1).

У частини хворих на РЕ зразки периферичної крові брались як до початку променевої терапії, так і через одну добу після першого сеансу БТ у дозі 6 Гр (таб. 3.2). Усі хворі на РЕ після БТ були попередньо прооперовані. Середній вік хворих на РЕ після БТ дорівнював 60,8 років.

Таблиця 3.2.

Клініко-морфологічні дані хворих на РЕ після БТ

Показник		Середній вік, роки	Кількість хворих	
			п	%
Хворі після брахітерапії, 6 Гр				
Загалом		60,8	12	100,0
Стадія захворювання, TNM	T _{1a} N ₀ M ₀	63,5	2	16,7
	T _{1b} N ₀ M ₀	63,3	7	58,3
	T ₂ N ₀ M ₀	53,0	3	25,0
Ступінь диференціювання пухлини, G	G ₀	59,0	1	7,7
	G ₂	60,5	10	76,9
	G ₃	62,0	2	15,4
Після операції		60,8	13	100,0

3.1.2. Порівняння показників інтенсивності продукції активних форм кисню і трансмембранного потенціалу мітохондрій в лімфоцитах периферичної крові умовно здорових осіб та хворих на рак ендометрію

Середні значення показників ТМП та продукції АФК у ЛПК хворих на РЕ та УЗО представлено у табл. 3.3.

Встановлено, що рівень ТМП у хворих на РЕ на 24% вище ніж у УЗО, але відмінності не є достовірними, що може бути пов'язане із високою варіабельністю показника (коефіцієнти варіації відповідно 0,792 та 0,825).

Разом з тим, у хворих на РЕ у порівнянні із УЗО інтенсивність продукції АФК була вищою на 44% (таб. 3.3.).

Таблиця 3.3

Рівень ТМП (590 нм/528 нм) та інтенсивність продукції
АФК (мМ/тис. кл./год) у ЛПК УЗО й хворих на РЕ

Вибірка	Показник	Значення
Група контролю	ТМП	$16,673 \pm 3,680$
	Продукція АФК	$20,668 \pm 4,693$
Хворі на РЕ	ТМП	$19,316 \pm 3,372$
	Продукція АФК	$13,081 \pm 1,652$
Хворі на РЕ після БТ (6,0 Гр)	ТМП	$18,276 \pm 4,655$
	Продукція АФК	$12,899 \pm 2,089$

Проведення сеансу БТ не мало спостережуваного ефекту ні на рівень ТМП, ні на інтенсивність продукції АФК у ЛПК хворих на РЕ.

При поділі обстежених хворих за ступенем диференціації пухлин, було встановлено тенденцію до зменшення ТМП із збільшенням ступеню диференціації пухлин. Так, у осіб зі ступенем диференціації G_3 рівень ТМП був на 22,8% нижчим у порівнянні із підгрупою пацієнтів зі ступенем диференціації G_2 . Для значень інтенсивності напрацювання АФК спостерігалась відсутність залежності показника від ступеню диференціації пухлини

Поділ обстежених на підгрупи T_{1a} , T_{1b} та T_{2-4} дозволив виявити наступну тенденцію: рівень ТМП був вищим у хворих підгрупи T_{2-4} і найменшим у хворих підгрупи T_{1a} з різницею в 2,06 рази. Така ж тенденція спостерігалась для продукції АФК: у підгрупі T_{2-4} її інтенсивність була у 2,32 рази вищою ніж у підгрупі T_{1a} . У підгрупі зі стадією захворювання T_{1b} рівні значень ТМП і продукції АФК мали проміжні значення у порівнянні із тими, що були визначені у хворих з підгруп T_{1a} та T_{2-4} (табл. 3.4).

Таблиця 3.4.

Рівень ТМП (590 нм/528 нм) та інтенсивність напрацювання ВР (мМ/тис. кл./год) у ЛПК хворих на РЕ в залежності від стадії захворювання та ступеню диференціювання пухлини.

Ознака	Підгрупа	Рівень ТМП	Продукція АФК
Стадія захворювання, TNM	T _{1a} N ₀ M ₀	13,658 ± 8,881	8,090 ± 1,099
	T _{1b} N ₀ M ₀	16,557 ± 4,321	12,404 ± 1,655
	T ₂ N ₀ M ₀	28,122 ± 6,347	18,796 ± 4,379
	T ₃ N ₀ M ₀		
Ступінь диференціювання пухлини, G	T ₄ N ₁ M ₁		
	G ₂	20,681 ± 4,791	14,066 ± 1,884
	G ₃	15,958 ± 3,952	13,620 ± 4,705

Примітки:

- Т – розмір первинної пухлини.
- N – наявність, відсутність та поширеність метастазів у локальних лімфатичних вузлах.
- M – наявність чи відсутність віддалених метастазів.
- G – ступінь диференціації пухлини.
- Цифра справа від літери вказує на ступінь поширеності або ступінь диференціації злоякісного новоутворення.

3.1.3. Вплив тест-опромінення крові на рівень трансмембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивність продукції активних форм кисню у лімфоцитах периферичної крові умовно здорових осіб та хворих на рак ендометрію

За тест-опромінення зразків крові хворих на РЕ та УЗО у діапазоні доз 0,5-3,0 Гр не виявлено достовірних змін ТМП та продукції АФК у ЛПК (таб. 3.5). Виходячи з отриманих результатів, є підстави вважати, що ці показники не можуть розглядатись як кандидати на роль предикторів індивідуальної радіочутливості немалігнізованих клітин і пухлин хворих на РЕ, які доцільно визначати з метою прогнозу виникнення ускладнень при проведенні променевої терапії цих хворих.

Таблиця 3.5.

Зміна рівнів ТМП й інтенсивності продукції АФК серед УЗО та хворих на РЕ в залежності від дози тест-опромінення

Доза тест-опромінення	Показник	УЗО	Хворі на РЕ
Без тест-опромінення	Рівень ТМП	17,700 ± 3,817	35,686 ± 6,529
	Продукція АФК	21,690 ± 4,053	18,325 ± 3,422
0,5 Гр	Рівень ТМП	19,161 ± 4,259	35,980 ± 5,666
	Продукція АФК	20,628 ± 3,366	16,278 ± 2,612
1,0 Гр	Рівень ТМП	18,333 ± 4,424	38,905 ± 6,189
	Продукція АФК	21,214 ± 3,636	18,329 ± 3,743
2,0 Гр	Рівень ТМП	17,044 ± 3,594	31,561 ± 4,437
	Продукція АФК	21,944 ± 3,757	18,239 ± 2,913
3,0 Гр	Рівень ТМП	18,887 ± 4,112	38,000 ± 5,082
	Продукція АФК	20,540 ± 2,943	21,511 ± 4,398

3.1.4. Вплив метформіну на рівень трансмембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивність продукції активних форм кисню в лімфоцитах периферичної крові умовно здорових осіб й хворих на рак ендометрію

Введення в зразки крові МФ не мало вираженого ефекту на рівень ТМП мітохондрій у ЛПК хворих на РЕ і УЗО. Однак, було відмічено тенденцію збільшення ТМП у ЛПК УЗО: за концентрації МФ 2 мМ ріст показника склав 3,4% і 15,4% за концентрації препарату 20 мМ. Для хворих на РЕ цей ефект був менш вираженим та практично відсутнім після проведення першого сеансу БТ у дозі 6 Гр (рис. 3.1.).

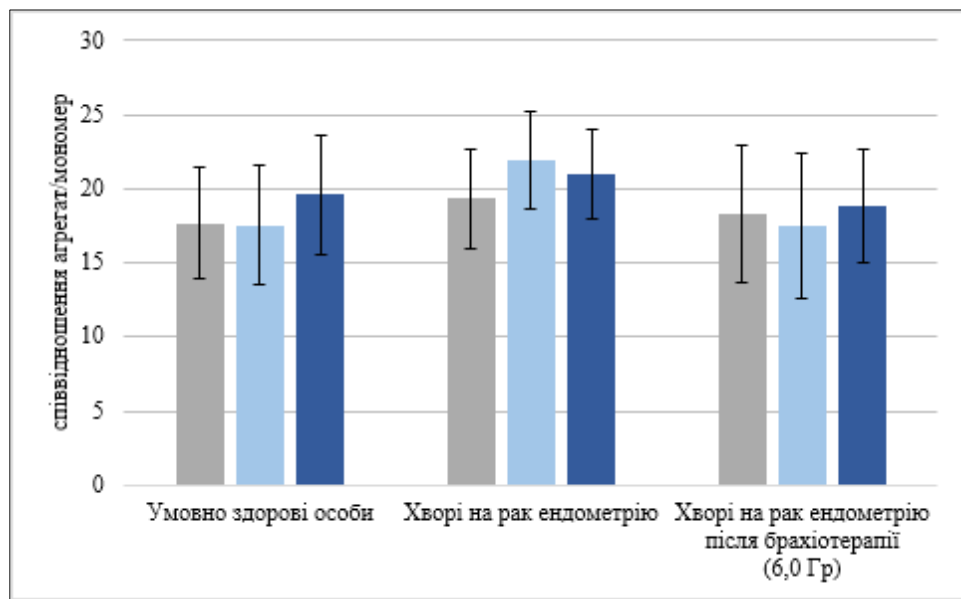


Рисунок 3.1. Рівень ТМП у ЛПК УЗО та хворих на РЕ за різних концентрацій МФ. Сірим кольором позначено контрольну групу (без МФ), блакитним — МФ у концентрації 2 мМ і синім — МФ у концентрації 20 мМ.

Не відмічено значного впливу МФ і на інтенсивність продукції АФК у лімфоцитах. Однак для ЛПК первинних хворих на РЕ було виявлено слабку тенденцію до зростання продукції АФК за дії препарату. Так, за концентрації

МФ 2 мМ продукція АФК була вищою лише на 4,2%, але за більш високої концентрації препарату (20 мМ) зростання складало 13,1% (рис. 3.2).

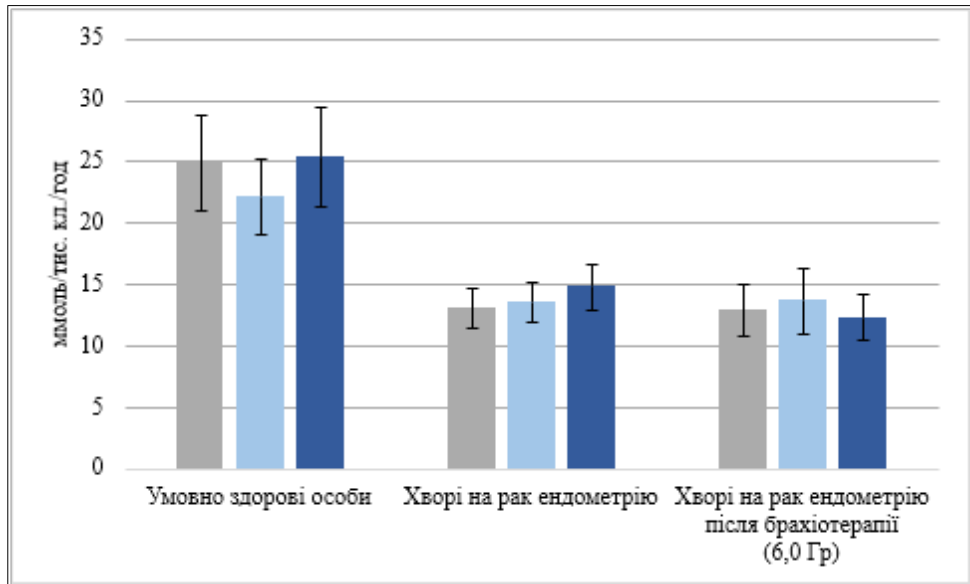


Рисунок 3.2. Інтенсивність продукції АФК у ЛПК УЗО й хворих на РЕ за різних концентрацій МФ. Сірим кольором позначено контрольну групу (без МФ), блакитним — МФ у концентрації 2 мМ і синім — МФ у концентрації 20 мМ.

Не спостерігалось також достовірної різниці у рівні ТМП та продукції АФК лімфоцитами у випадку внесення МФ у кров хворих на РЕ після 1-го сеансу БТ у дозі 6 Гр (таб. 3.6).

Таблиця 3.6.

Рівень ТМП (590 нм/528 нм) та інтенсивності продукції
АФК (мМ/тис. кл./год) у ЛПК УЗО та хворих на РЕ

Вибірка	Показник	Внесення МФ у зразки крові		
		Без МФ	2 мМ	20 мМ
Група контролю	ТМП	17,700 ± 3,817	17,569 ± 4,058	19,602 ± 4,049
	АФК	24,923 ± 3,861	22,121 ± 3,064	25,337 ± 4,029
Хворі на РЕ	ТМП	19,316 ± 3,372	21,934 ± 3,245	21,000 ± 3,033
	АФК	13,081 ± 1,652	13,625 ± 1,602	14,801 ± 1,831
Хворі на РЕ після БТ (6,0 Гр)	ТМП	18,276 ± 4,655	17,511 ± 4,938	18,832 ± 3,799
	АФК	12,899 ± 2,089	13,657 ± 2,615	12,315 ± 1,864

3.1.5. Вплив тест-опромінення крові на рівень трансмембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивність продукції активних форм кисню в умовно здорових осіб та хворих на рак ендометрію за модифікуючої дії метформіну

Оцінювання дії МФ, як можливого радіомодифікатора, проводили за його введення в зразки крові хворих на РЕ та УЗО в концентрації 2 та 20 мМ за годину до проведення тест-опромінення у діапазоні доз 0,5-3,0 Гр. Після цього проводили визначення рівню ТМП (таб. 3.7, таб. 3.8) та інтенсивності продукції АФК (таб. 3.7, таб. 3.8) у ЛПК. Результати за модифікуючого впливу МФ порівнювали з результатами отриманими лише за тест-опромінення крові у відповідної дозі.

Таблиця 3.7

Зміна рівня ТМП й інтенсивності продукції АФК серед УЗО в залежності від дози тест-опромінення і концентрації МФ

Доза тест-опромінення	Показник	Внесення МФ у зразки крові		
		Без МФ	2 мМ	20 мМ
Без тест-опромінення	ТМП	17,700 ± 3,817	17,569 ± 4,058	19,602 ± 4,049
	АФК	24,923 ± 3,861	22,121 ± 3,064	25,337 ± 4,029
0,5 Гр	ТМП	19,161 ± 4,259	20,905 ± 5,344	18,118 ± 4,623
	АФК	22,126 ± 2,764	19,801 ± 2,624	25,533 ± 4,594
1,0 Гр	ТМП	18,333 ± 4,424	22,539 ± 5,741	21,303 ± 4,791
	АФК	22,581 ± 3,129	21,359 ± 3,438	24,425 ± 3,913
2,0 Гр	ТМП	22,044 ± 3,594	21,568 ± 5,237	18,423 ± 3,883
	АФК	22,917 ± 3,347	20,034 ± 2,919	24,129 ± 3,637
3,0 Гр	ТМП	18,877 ± 4,112	22,394 ± 6,734	17,957 ± 4,132
	АФК	22,023 ± 2,753	19,147 ± 3,069	24,578 ± 3,664

Таблиця 3.8.

Зміна рівня ТМП й інтенсивності продукції АФК серед хворих на РЕ в залежності від дози тест-опромінення і концентрації МФ

Доза тест-опромінення	Показник	Внесення МФ у зразки крові		
		Без МФ	2 мМ	20 мМ
Без тест-опромінення	ТМП	35,686 ± 6,529	36,304 ± 5,663	30,568 ± 6,187
	АФК	18,325 ± 3,422	19,978 ± 3,506	19,171 ± 4,396
0,5 Гр	ТМП	35,980 ± 5,666	43,262 ± 5,749	30,659 ± 5,246
	АФК	16,278 ± 2,612	19,378 ± 3,919	17,425 ± 3,550
1,0 Гр	ТМП	38,905 ± 6,189	36,537 ± 4,594	31,829 ± 3,409
	АФК	18,328 ± 3,743	17,217 ± 3,277	18,997 ± 3,501
2,0 Гр	ТМП	31,561 ± 4,437	44,700 ± 5,862	37,491 ± 2,796
	АФК	18,239 ± 2,913	17,564 ± 3,127	17,233 ± 2,814
3,0 Гр	ТМП	38,000 ± 5,082	45,653 ± 4,674	38,241 ± 6,213
	АФК	21,511 ± 4,398	16,893 ± 2,616	19,352 ± 3,594

Для ЛПК обстежених не було виявлено достовірних змін ТМП за внесення МФ у кров. Можна лише відмітити тенденцію до зростання його рівню за концентрації МФ 2 мМ та опромінення крові в дозах 1,0-3,0 Гр для УЗО (рис. 3.3.) та в дозах 2,0-3,0 Гр для хворих на РЕ (рис. 3.4). Для ЛПК групи УЗО зростання ТМП складало 18,6% - 26,5%, а для групи хворих на РЕ – 20,1-41,6%. Найбільший ефект МФ як для крові хворих на РЕ, так і УЗО зафіксовано за дози опромінення крові 2,0 Гр.

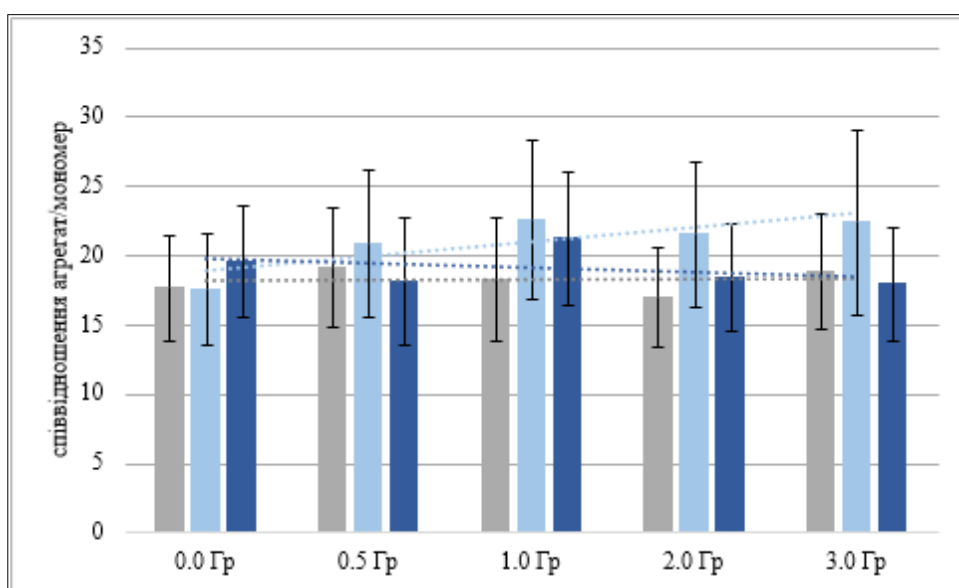


Рисунок 3.3. Зміна ТМП мітохондрій у ЛПК УЗО за опромінення зразків крові і додавання МФ. Сірим кольором позначено контрольну групу (без МФ), блакитним — МФ у концентрації 2 мМ і синім — МФ у концентрації 20 мМ.

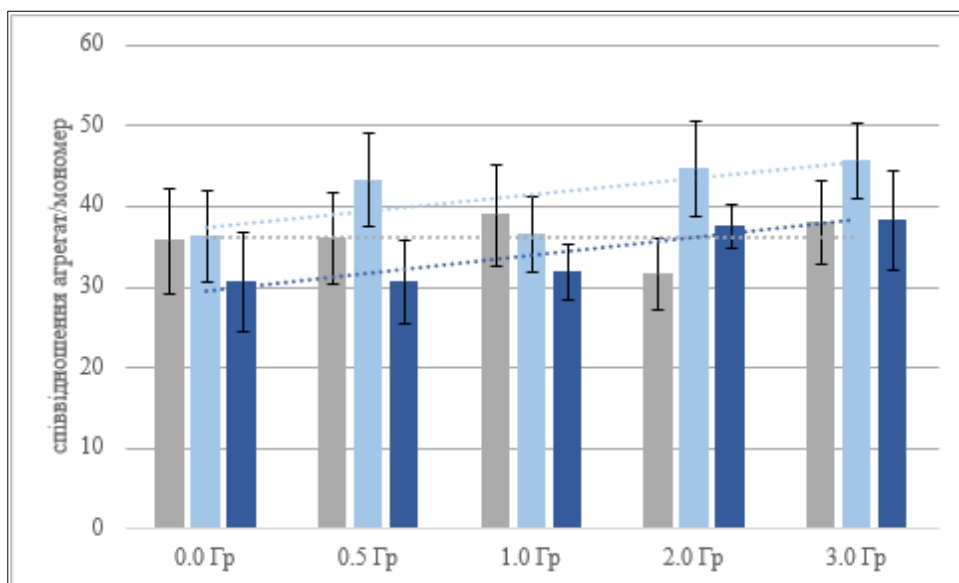


Рисунок 3.4. Зміна ТМП мітохондрій у ЛПК хворих на РЕ за опромінення крові і додавання МФ. Сірим кольором позначено контрольну групу (без МФ), блакитним — МФ у концентрації 2 мМ і синім — МФ у концентрації 20 мМ. Штрихованою лінією позначено лінії тренду: сірим кольором — контрольної групи (без МФ), блакитним — 2 мМ концентрації МФ і синім — 20 мМ концентрації МФ.

Не встановлено достовірних ефектів дії МФ за тест-опромінення крові відносно інтенсивності продукції лімфоцитами АФК. Однак, для обстежених групи УЗО можна відмітити тенденцію до підвищення продукції АФК (до 13,1%), яка була більш вираженою за концентрації препарату 2 мМ (рис. 3.5.). Для хворих на РЕ спостерігалась інша тенденція – за більш

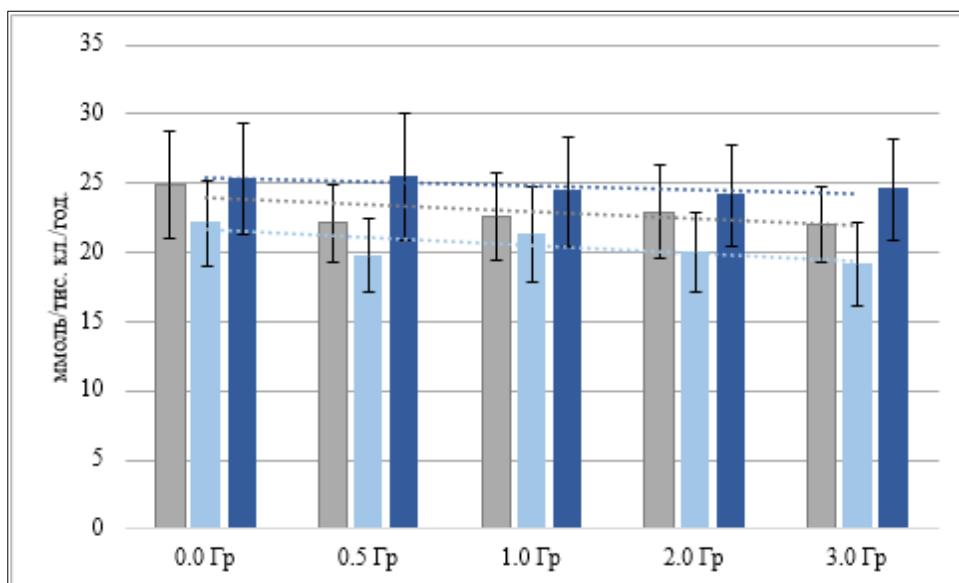


Рисунок 3.5. Зміна інтенсивності продукції АФК у ЛПК УЗО за опромінення крові і додавання МФ. Сірим кольором позначено контрольну групу (без МФ), блакитним — МФ у концентрації 2 мМ і синім — МФ у концентрації 20 мМ.

низьких доз тест-опроміненню спостерігалось деяке підвищення продукції АФК, та її зниження зі збільшенням дози опромінення (рис. 3.6.). Як і у випадку УЗО, зміни були більш вираженими за концентрації МФ 2 мМ – підвищення продукції АФК на 19,0% за дози 0,5 Гр та зниження на 21,5% за дози опромінення 3,0 Гр.

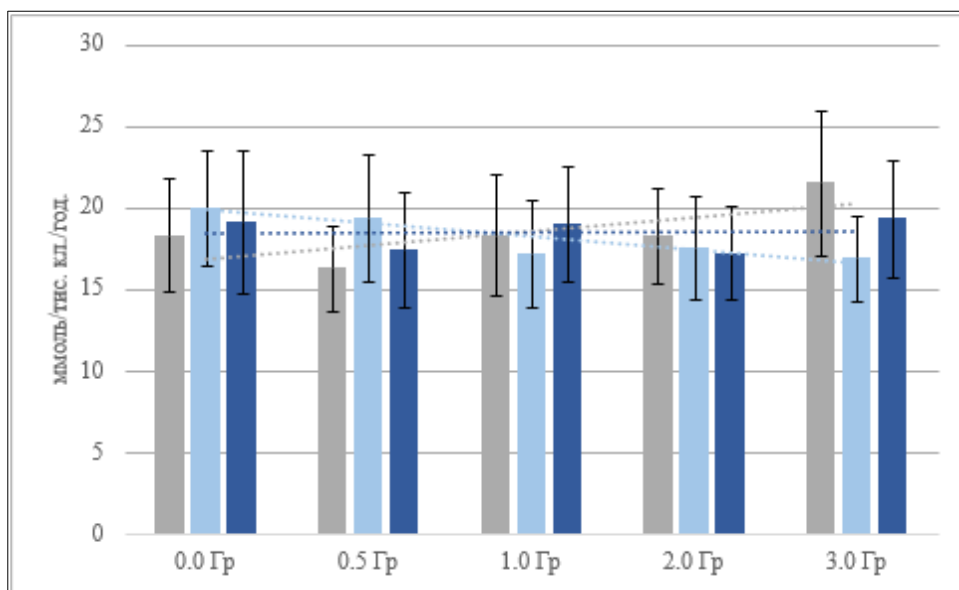


Рисунок 3.6. Зміна інтенсивності продукції АФК у ЛПК хворих на РЕ за опромінення крові і додавання МФ. Сірим кольором позначено контрольну групу (без МФ), блакитним — МФ у концентрації 2 мМ і синім — МФ у концентрації 20 мМ. Штрихованою лінією позначено лінії тренду: сірим кольором — контрольної групи (без МФ), блакитним — 2 мМ концентрації МФ і синім — 20 мМ концентрації МФ.

Бажаним є проведення подальшого дослідження цих ефектів дії МФ на більш репрезентативних вибірках обстежених з метою встановлення достовірності виявлених змін ТМП та продукції АФК у лімфоцитах за дії препарату.

У разі модифікуючого впливу МФ за тест-опромінення зразків крові хворих на РЕ та УЗО не було встановлено достовірних змін ТМП та продукції АФК у лімфоцитах. В той же час за дії МФ спостерігались наступні тенденції:

- Зростання рівню ТМП лімфоцитів за концентрації МФ в крові 2 мМ та тест-опромінення в дозах 1,0-3,0 Гр для УЗО та 2,0 — 3,0 Гр для хворих на РЕ. Найбільші зміни за дії препарату було зафіксовано за дози опромінення 2,0 Гр.

- Підвищення продукції АФК у лімфоцитах УЗО більш виражене за концентрації МФ 2 мМ (до 13,1%).
- Підвищення продукції АФК у лімфоцитах хворих на РЕ за дози опромінення крові в дозі 0,5 Гр, та її зниження зі збільшенням дози опромінення до 3,0 Гр. Як і у випадку УЗО, більш виражений ефект дії МФ спостерігався за його концентрації 2 мМ.

3.1.6. Зв'язок між рівнем трансмембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивністю продукції активних форм кисню у лімфоцитах периферичної крові умовно здорових жінок та хворих на рак ендометрію за модифікуючої дії метформіну *ex vivo*

Оскільки зміни ТМП мітохондрій пов'язують із змінами інтенсивності утворення вільнорадикальних сполук та розвитком окисного стресу було проаналізовано наявність кореляційного зв'язку між цими показниками у обстежених хворих на РЕ та УЗО та оцінено його зміни після проведення першого сеансу брахітерапії (6 Гр) і за впливу потенційного радіомітигатора МФ.

Зв'язок між рівнем ТМП мітохондрій та інтенсивністю продукції АФК у ЛПК УЗО був недостовірним. Коефіцієнт кореляції (r) дорівнював 0,341. За впливу МФ його значення зменшувалось. Ефект дії МФ був більш вираженим за його більшої високої концентрації — 20 мМ. Коефіцієнт кореляції дорівнював $r = -0,115$ (рис. 3.7).

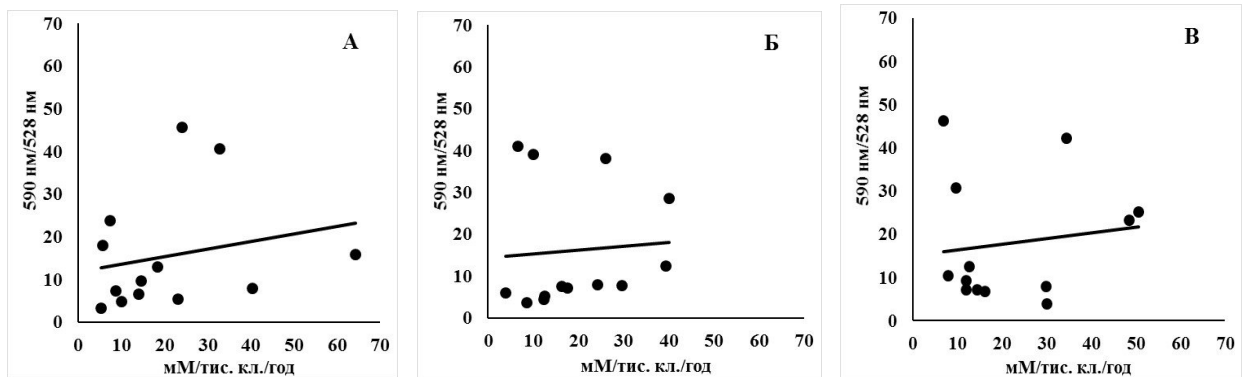


Рисунок 3.7. Кореляційний зв'язок між індивідуальними значеннями ТМП та напрацюванням АФК у ЛПК УЗО за модифікуючої дії МФ: А – без впливу МФ ($r=0,341$); Б – МФ 2 мМ ($r=0,280$); В – МФ 20 мМ ($r=-0,115$);
• – індивідуальні показники; — – лінійний тренд.

Для обстежених хворих на РЕ до початку лікування (променева та/або хіміотерапія), на відміну від жінок групи УЗО, було показано достатньо високий та достовірний рівень кореляції між значеннями ТМП та напрацюванням АФК ($r = 0,472$). Введення в зразки крові цих хворих МФ, як і у випадку УЗО, знижувало зв'язок між цими показниками. За меншої концентрації препарату цей зв'язок залишався достовірним ($r = 0,428$). За концентрації МФ 20 мМ, цього зв'язку не було зафіксовано — $r = -0,080$ (рис. 3.8).

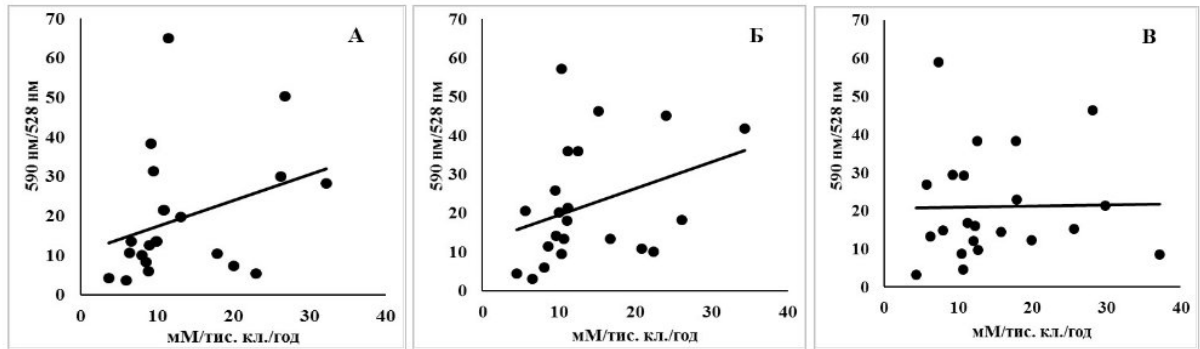


Рисунок 3.8. Зв'язок між індивідуальними значеннями ТМП та напрацюванням АФК у ЛПК хворих на РЕ до початку терапії за модифікуючої дії МФ: А – без впливу МФ ($r = 0,472$; $p \leq 0,05$); Б – МФ 2 мМ ($r = 0,428$; $p \leq 0,05$); В – МФ 20 мМ ($r = -0,080$); • – індивідуальні показники; — – лінійний тренд.

Після першого сеансу БТ (6 Гр) зв'язок між рівнями ТМП та продукції АФК ставав, ще більш міцним — $r=0,685$ ($r = 0,472$ до початку променевої терапії). Введення в кров МФ знижувало ступень зв'язку між цими показниками до значень $r=0,615$ за концентрації 2 мМ та до $r=0,594$ за концентрації 20 мМ. На відміну від хворих, що не зазнали терапевтичного опромінення, навіть за концентрації МФ 20 мМ зв'язок між ТМП та продукцією АФК у лімфоцитах залишався достовірним (рис. 3.9).

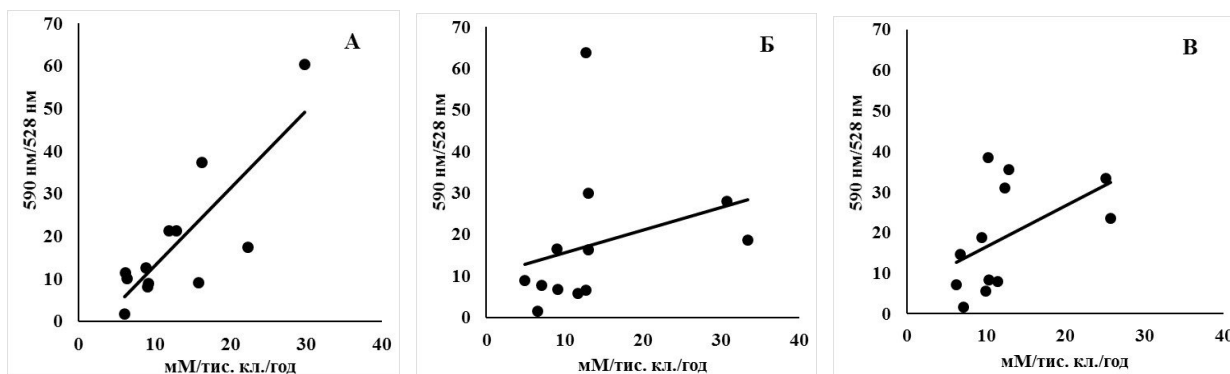


Рисунок 3.9. Кореляційний зв'язок між індивідуальними значеннями ТМП та напрацюванням АФК у ЛПК хворих на РЕ через добу після першого сеансу БТ за модифікуючої дії МФ: А – без додаткового впливу МФ ($r = 0,685$; $p \leq 0,05$); Б – МФ 2 мМ ($r = 0,615$; $p \leq 0,05$); В – МФ 20 мМ ($r = 0,594$; $p \leq 0,05$); • – індивідуальні показники; — – лінійний тренд

3.2. Узагальнення результатів

Утворення АФК, яке пов'язане як з опроміненням, так і функціонуванням мітохондрій, відіграє значиму роль у модуляції виживання клітин, загибелі клітин, диференціації, передачі сигналів клітинами та синтезі молекул пов'язаних із запаленням [71, 72]. Підвищення рівня ТМП у здорових клітинах призводить до збільшення інтенсивності генерації АФК, що у свою чергу може призводити до мітохондріальної дисфункції [73]. Таким чином, опромінення може лежати в основі загибелі ЛПК через зміну ТМП [74, 75]. ТМП вважається одним з індикаторів онкогенезу: збільшення вмісту АФК, які в ендогенному середовищі людини в основному продукуються мітохондріями, спостерігається у малігнізованих клітинах [76]. Оскільки як естроген, так мітохондріальна дисфункція можуть слугувати джерелами збільшення продукції АФК, окислювальний стрес з більшою частотою зустрічається у клітинах хворих на РЕ, ніж у здорових жінок. Підвищений синтез АФК, зміни у окисно-відновному балансі та дизрегуляція

процесів передачі сигналів АФК є загальними ознаками пухлинної прогресії та резистентності до лікування [77].

Отримані в ході дослідження результати свідчать про те, що інтенсивність продукції АФК на 44% була нижчою в ЛПК хворих на РЕ. Спостерігалась тенденція до зростання рівня ТМП у ЛПК хворих на РЕ, однак, відмінності між хворими та УЗО не були достовірними, що може бути пов'язаним із високою міжіндивідуальною варіабельністю внутришньогрупових показників. Для хворих на РЕ коефіцієнт варіації дорівнював 0,792 і 0.825 для УЗО.

Групування даних отриманих від первинних хворих на РЕ на підгрупи за стадією захворювання, згідно з класифікацією TNM, та за ступенем диференціації пухлини дозволило встановити наявність наступних тенденцій:

- Зменшення ТМП із збільшенням розміру пухлини.
- Зменшення ТМП із збільшенням ступеню диференціації пухлини.
- Збільшення інтенсивності продукції АФК із збільшенням розміру пухлини.
- Збільшення інтенсивності продукції АФК із збільшенням ступеню диференціації пухлини .

У лімфоцитах УЗО та хворих на РЕ, статистично достовірних відмінностей у значеннях ТМП та інтенсивності продукції АФК за дії рентгенівського випромінювання виявлено не було.

Внесення МФ в зразки крові УЗО та хворих на РЕ до та після БТ (6,0 Гр) також не зумовило достовірних змін в інтенсивності продукції АФК та рівні ТМП у ЛПК. Натомість, виявлено тенденції:

- 1 За внесення МФ у зразки крові УЗО спостерігалась тенденція до збільшення ТМП у ЛПК. Ріст ТМП склав 3,4% і 15,4% для 2 мМ і 20 мМ концентрацій МФ відповідно.

- 2 За внесення МФ у зразки крові хворих на РЕ спостерігалась тенденція до збільшенням інтенсивності продукції АФК у ЛПК. Ріст показника склав 4,2% і 13,1% для 2 мМ і 20 мМ концентрацій МФ відповідно.

У результаті тест-опромінення зразків крові на фоні модифікуючої дії МФ не було виявлено виражених змін рівня ТМП й інтенсивності продукції АФК у ЛПК. У той же час, спостерігалися тенденції:

- 1 Збільшення ТМП у опроміненних зразках з 2 мМ концентрацією МФ.
- 2 Збільшення інтенсивності продукції АФК у опроміненних зразках з 2 мМ концентрацією МФ.

За умов тест-опромінення зразків крові дозами 0,5 Гр, 2,0 Гр, та 3,0 Гр ТМП досягав своїх максимальних значень за концентрації МФ 2 мМ. Отримані дані після опромінення не суперечать і разом з тим не підтверджують результати отримані Cheki M. та ін. які показали, що радіомодифікуючі ефекти МФ проти цитотоксичних та генотоксичних наслідків, спричинених іонізуючим випромінюванням найбільшою мірою проявляються у культивованих ЛПК людини за опромінення у діапазоні доз 1,35 Гр та 1,42 Гр [26].

Показано, що на відміну від УЗО, у хворих на РЕ інтенсивність продукції АФК у ЛПК достовірно корелює зі змінами ТМП. Після початку терапевтичного опромінення цей зв'язок стає більш помітним у зв'язку з чим дає можливість розглядати ці показники, в якості додаткових маркерів ризику розвитку оксидативного стресу та пошкодження нормальних клітин та тканин з оточення пухлини за променевої терапії хворих на РЕ. МФ зменшував ступінь зв'язку між продукцією АФК та рівнем ТМП *ex vivo*, що, ймовірно, можна пов'язати з антиоксидантними ефектами препарату.

Отримані результати увійшли до складу відомчої науково-дослідної теми досліджень відділу біологічних ефектів іонізуючого та неіонізуючого випромінювання ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

ВИСНОВКИ

- 1 Встановлено, що інтенсивність продукції вільних радикалів була на 44% нижчою у групі первинних хворих на рак ендометрію у порівнянні із групою умовно здорових осіб. Виявлено тенденцію до підвищення трансмембранного потенціалу мітохондрій у лімфоцитах периферичної крові первинних хворих на рак ендометрію.
- 2 Показано наявність тенденції до зниження рівня трансмембранного потенціалу мітохондрій та підвищення продукції активних форм кисню у лімфоцитах периферичної крові з прогресією раку ендометрію.
- 3 Проведення сеансу брахіотерапії у дозі 6 Гр істотно не впливало на рівень трансмембранного потенціалу мітохондрій та продукцію активних форм кисню у лімфоцитах периферичної крові хворих на рак ендометрію.
- 4 Не виявлено дозозалежних змін рівнів трансмембранного потенціалу мітохондрій та продукції активних форм кисню у лімфоцитах периферичної крові хворих на рак ендометрію та умовно здорових осіб за тест-опромінення зразків крові в діапазоні доз 0,5-3,0 Гр. Це свідчить про неможливість використання цих показників в ролі предикторів радіочутливості здорових тканин і клітин людини, що зазнають дії радіації за променевої терапії.
- 5 Внесення метформіну в зразки крові у концентраціях 2 мМ та 20 мМ не викликало достовірних змін трансмембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивності продукції активних форм кисню у лімфоцитах периферичної крові хворих на рак ендометрію та умовно здорових осіб.
- 6 Застосування метформіну *ex vivo* знижує зв'язок між рівнем трансмембранного потенціалу у лімфоцитах периферичної крові та

продукцією клітинами активних форм кисню. Ефект дії препарату був більш вираженим за його застосування в концентрації 20 мМ.

Аналіз отриманих результатів дозволяє зробити висновок про необхідність подальших досліджень з вивчення радіомодифікуючих ефектів метформіну в злоякісно нетрансформованих клітинах хворих онкологічного профілю.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- 1 Mothersill C, Seymour C. Old Data — New Concepts: Integrating "Indirect Effects" Into Radiation Protection. *Health Physics*. 2018 Jul;115(1):170–8.
- 2 Yang TC, Georgy KA, Mei M, Durante M., Craise, LM. Radiogenic cell transformation and carcinogenesis. *ASGSB bulletin : publication of the American Society for Gravitational and Space Biology*. 1995;8(2): 106–112.
- 3 Havránková R.. Biological effects of ionizing radiation. *Biologické účinky ionizujícího záření. Casopis lékařů českých*. 2020;159(7-8): 258–260.
- 4 Marazziti D, Piccinni A, Mucci F, Baroni S, Loganovsky K, Loganovskaja T. Ionizing radiation: brain effects and related neuropsychiatric manifestations. *Problemy radiatsiinoi medytsyny ta radiobiologii*. 2016;21: 64–90.
- 5 Ng AK, Travis LB. Radiation Therapy and Breast Cancer Risk. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2009 Nov;7(10):1121–8.
- 6 Santivasi WL, Xia F. Ionizing Radiation-Induced DNA Damage, Response, and Repair. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014 Jul 10;21(2):251–9.
- 7 Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer*. 2005;104:1129-1137
- 8 Begg AC, Stewart FA, Vens C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:239-253
- 9 Barnett GC, West CM, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE, Pharoah PD,

- Burnet NG. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:134-142
- 10 Radford IR, Murphy TK, Radley JM, Ellis SL. Radiation Response of Mouse Lymphoid and Myeloid Cell Lines. Part II. Apoptotic Death is Shown by all Lines Examined. *International Journal of Radiation Biology*. 1994 Jan;65(2):217–27.
- 11 Tauchi H, Sawada S. Analysis of Mitotic Cell Death Caused by Radiation in Mouse Leukaemia L5178Y Cells: Apoptosis is the Ultimate Form of Cell Death Following Mitotic Failure. *International Journal of Radiation Biology*. 1994 Jan;65(4):449–55.
- 12 Merritt AJ, Allen TD, Potten CS, Hickman JA. Apoptosis in small intestinal epithelia from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after γ -irradiation. *Oncogene*. 1997 Jun 12;14(23):2759–66.
- 13 MIURA Y. Oxidative Stress, Radiation-Adaptive Responses, and Aging. *Journal of Radiation Research*. 2004;45(3):357–72.
- 14 Maier P, Wenz F, Herskind C. Radioprotection of normal tissue cells. *Strahlentherapie und Onkologie*. 2014 Mar 18;190(8):745–52.
- 15 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018 Sep 12;68(6):394–424.
- 16 Fedorenko Z, Michailovich Yu, Goulak L, Gorokh Ye, Ryzhov A, Soumkina O, Koutsenko L. Bulletin of the National Cancer Registry of Ukraine №23, 2020-2021 [Internet]. 2022. Available from:

http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_23/index_e.htm

- 17 Sohaib SA, Houghton SL, Meroni R, Rockall AG, Blake P, Reznick RH.
Recurrent endometrial cancer: patterns of recurrent disease and assessment of prognosis. *Clin Radiol*. 2007;62(1):28–34. discussion 5–6.
- 18 Endometrial Cancer Treatment (PDQ®)–Patient Version [Internet]. National Cancer Institute. Cancer.gov; 2019. Available from:
<https://www.cancer.gov/types/uterine/patient/endometrial-treatment-pdq>
- 19 Barzilai N, Crandall JP, Kritchevsky SB, Espeland MA. Metformin as a Tool to Target Aging. *Cell Metabolism* [Internet]. 2016 Jun;23(6):1060–5.
Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413116302297>
- 20 Cha J-H, Yang W-H, Xia W, Wei Y, Chan L-C, Lim S-O, et al. Metformin Promotes Antitumor Immunity via Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation of PD-L1. *Molecular Cell* [Internet]. 2018 Aug [cited 2019 Nov 7];71(4):606-620.e7. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276518305999>
- 21 Tungjai M, Phathakanon N, Rithidech KN. Effects of Medical Diagnostic Low-dose X Rays on Human Lymphocytes. *Health Physics*. 2017 May;112(5):458–64.
- 22 Mavrogenis AF, Megaloikonomos PD, Panagopoulos GN, Papagelopoulos PJ, Theophanides T, Anastassopoulou J. Side Effects of Radiation in Bone and Cartilage: An FT-IR Analysis. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*. 2015;25(4):289–95.
- 23 Henni M, Ali D. Effets indésirables de la radiothérapie. *La Revue du praticien*. 2012;62(4):461–466.

- 24 Fernandes A, Oliveira A, Soares R, Barata P. The Effects of Ionizing Radiation on Gut Microbiota, a Systematic Review. *Nutrients*. 2021 Aug 29;13(9):3025.
- 25 Shimura T, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. Severe mitochondrial damage associated with low-dose radiation sensitivity in ATM- and NBS1-deficient cells. *Cell Cycle*. 2016 Mar 3;15(8):1099–107.
- 26 Cheki M, Shirazi A, Mahmoudzadeh A, Bazzaz JT, Hosseinimehr SJ. The radioprotective effect of metformin against cytotoxicity and genotoxicity induced by ionizing radiation in cultured human blood lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2016 Oct;809:24–32.
- 27 Wang B, Dong J, Xiao H, Li Y, Jin Y, Cui M, et al. Metformin fights against radiation-induced early developmental toxicity. *Science of The Total Environment*. 2020 Aug;732:139274.
- 28 Mortezaee K, Shabeeb D, Musa AE, Najafi M, Farhood B. Metformin as a Radiation Modifier; Implications to Normal Tissue Protection and Tumor Sensitization. *Current Clinical Pharmacology*. 2019 Mar 13;14(1):41–53.
- 29 Gottlieb E, Armour SM, Harris MH, Thompson CB. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. 2003 May 22;10(6):709–17.
- 30 Daenen K, Andries A, Mekahli D, Van Schepdael A, Jouret F, Bammens B. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology*. 2018 Aug 13;34(6):975–91.
- 31 Su L-J, Zhang J-H, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and

- Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [Internet]. 2019 Oct 13 [cited 2020 Jan 28];2019:1–13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6815535/>
- 32 Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020 Mar 30;
- 33 Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery* [Internet]. 2013 Nov 29 [cited 2019 Jun 20];12(12):931–47. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrd4002>
- 34 Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013;2013:1–11.
- 35 Aguilar TAF, Navarro BCH, Pérez JAM. Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress. A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2. 2016 Dec 21;
- 36 Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*. 2018 Apr;Volume 13:757–72.
- 37 Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000 Nov;408(6809):239–47.
- 38 Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology* [Internet]. 2019 Jul [cited 2020 Jan 28];25:101084. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231718309017>

- 39 Raza MH, Siraj S, Arshad A, Waheed U, Aldakheel F, Alduraywish S, et al. ROS-modulated therapeutic approaches in cancer treatment. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2017 Jun 24;143(9):1789–809.
- 40 Liou G-Y, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research* [Internet]. 2010 Jan [cited 2019 Sep 27];44(5):479–96. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3880197/>
- 41 Roy K, Wu Y, Meitzler Jennifer L, Juhasz A, Liu H, Jiang G, et al. NADPH oxidases and cancer. *Clinical Science*. 2015 Mar 27;128(12):863–75.
- 42 Kumari S, Badana AK, G MM, G S, Malla R. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomarker Insights*. 2018 Jan;13:117727191875539.
- 43 Gardner CD, Eguchi S, Reynolds CM, Eguchi K, Frank GD, Motley ED. Hydrogen Peroxide Inhibits Insulin Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Experimental Biology and Medicine*. 2003 Jul;228(7):836–42.
- 44 Maechler P, Jornot L, Wollheim CB. Hydrogen Peroxide Alters Mitochondrial Activation and Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1999 Sep 24;274(39):27905–13.
- 45 Dokken BB, Saengsirisuwan V, Kim JS, Teachey MK, Henriksen EJ. Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2008 Mar;294(3):E615–21.
- 46 Maddux BA, See W, Lawrence JC, Goldfine AL, Goldfine ID, Evans JL. Protection Against Oxidative Stress--Induced Insulin Resistance in Rat L6 Muscle Cells by Micromolar Concentrations of α -Lipoic Acid. *Diabetes*. 2001 Feb 1;50(2):404–10.

- 47 Singh I, Carey AL, Watson N, Febbraio MA, Hawley JA. Oxidative stress-induced insulin resistance in skeletal muscle cells is ameliorated by gamma-tocopherol treatment. *European Journal of Nutrition*. 2008 Sep 18;47(7):387–92.
- 48 Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2022 Mar 8];50(2):98–115. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3115691/>
- 49 Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1998 Aug;1366(1-2):151–65.
- 50 Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* [Internet]. 2003 Oct 15 [cited 2019 Nov 6];552(2):335–44. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2343396/>
- 51 Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters* [Internet]. 1997 Oct 13 [cited 2020 Jan 31];416(1):15–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579397011599>
- 52 Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *BIO-PROTOCOL*. 2019;9(1).
- 53 Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E, Udon H. Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015 Jan

- 26;112(6):1809–14.
- 54 Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsiichlis PN, Struhl K. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Research* [Internet]. 2009 Oct 1 [cited 2022 Apr 1];69(19):7507–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19752085/>
 - 55 Wang Y, Wu Z, Hu L. Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype, Metformin, and Survival for Colorectal Cancer Patients with Diabetes Mellitus II. *Gastroenterology Research and Practice*. 2017;2017:1–10.
 - 56 Scappaticcio L, Maiorino MI, Bellastella G, Giugliano D, Esposito K. Insights into the relationships between diabetes, prediabetes, and cancer. *Endocrine*. 2016 Dec 31;56(2):231–9.
 - 57 Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*. 2011 Jan 24;11(2):85–95.
 - 58 Sivalingam VN, Latif A, Kitson S, McVey R, Finegan KG, Marshall K, et al. Hypoxia and hyperglycaemia determine why some endometrial tumours fail to respond to metformin. *British Journal of Cancer*. 2019 Dec 10;122(1):62–71.
 - 59 Spratt DE, Zhang C, Zumsteg ZS, Pei X, Zhang Z, Zelefsky MJ. Metformin and Prostate Cancer: Reduced Development of Castration-resistant Disease and Prostate Cancer Mortality. *European Urology* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2020 Dec 11];63(4):709–16. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0302283812014728>
 - 60 Zaorsky NG, Shaikh T, Ruth K, Sharda P, Hayes SB, Sobczak ML, et al. Prostate cancer patients with unmanaged diabetes or on insulin have worse

- outcomes and toxicities after treatment with radiation therapy. *Clinical genitourinary cancer* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2022 Apr 8];15(2):326-335.e3. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7592603/>
- 61 Liu X, Li J, Schild SE, Schild MH, Wong W, Vora S, et al. Statins and Metformin Use Is Associated with Lower PSA Levels in Prostate Cancer Patients Presenting for Radiation Therapy. *Journal of Cancer Therapy*. 2017;08(02):73–85.
- 62 Ranasinghe WKB, Williams S, Ischia J, Wetherell D, Baldwin G, Shulkes A, et al. Metformin may offer no protective effect in men undergoing external beam radiation therapy for prostate cancer. *BJU International*. 2019 Apr 23;123:36–42.
- 63 Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013;2013:1–11.
- 64 Williams J. The Declaration of Helsinki and public health. *Bulletin of the World Health Organization*. 2008 Aug 1;86(8):650–1.
- 65 Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 1968; 97: 77–89.
- 66 Histopaque [Internet]. [cited 2022 Jun 9]. Available from:
https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/h8889pis.pdf

- 67 Любина АЯ., Ильичева ЛП, Катасонова ТВ, Петросова СА.
Клинические лабораторные исследования. Медицина. 1984.
- 68 MitoPT JC-1 Assay [Internet]. ImmunoChemistry Technologies. [cited 2022 Jun 2]. Available from: <https://immunochemistry.com/product/mitopt-jc-1-assay-kit/>
- 69 SHAPIRO SS, WILK MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika [Internet]. 1965 Dec 1;52(3-4):591–611. Available from: <https://academic.oup.com/biomet/article/52/3-4/591/336553>
- 70 Lakin GF. Biometriia. Vysshiaia Shkola. 1980.
- 71 Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II – editorial review. Current Opinion in Nephrology and Hypertension. 2005 Mar;14(2):125–31.
- 72 Mueller CFH, Laude K, McNally JS, Harrison DG. Redox Mechanisms in Blood Vessels. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2005 Feb;25(2):274–8.
- 73 Ambrose M, Gatti RA. Pathogenesis of ataxia-telangiectasia: the next generation of ATM functions. Blood. 2013 May 16;121(20):4036–45.
- 74 Ogawa Y, Nishioka A, Kobayashi T, Kariya S, Hamasato S, Saibara T, et al. Radiation-induced apoptosis of human peripheral T cells: Analyses with cDNA expression arrays and mitochondrial membrane potential assay. International Journal of Molecular Medicine. 2001 Jun 1.
- 75 Averbeck D, Rodriguez-Lafrasse C. Role of Mitochondria in Radiation Responses: Epigenetic, Metabolic, and Signaling Impacts. International Journal of Molecular Sciences. 2021 Oct 13;22(20):11047.

- 76 Kim S-M, Hwang K-A, Choi K-C. Potential roles of reactive oxygen species derived from chemical substances involved in cancer development in the female reproductive system. *BMB Reports*. 2018 Nov 30;51(11):557–62.
- 77 Kumari S, Badana AK, G MM, G S, Malla R. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomarker Insights*. 2018 Jan;13:117727191875539.