

MEDLINE.RU, ТОМ 21, РЕНТГЕНОЛОГИЯ И РАДИОЛОГИЯ, 16 МАЯ 2020

**РАННИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК И ДРУГИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ ОБЛАСТИ МОЧЕВОГО
ПУЗЫРЯ**

¹Васильева И.Н., ²Корытов О.В., ¹Беспалов В.Г., ¹Семенов А.Л., ¹Иванов С.Д.,
²Корытова Л.И.

¹*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова
Минздрава России, 197758, г. Санкт–Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68,
8–812–439–95–55 (4416), E–mail: iravasilyeva@hotmail.com*

²*Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. ак. А.М. Гранова
Минздрава России, 197758, г. Санкт–Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 70,
8–812–439–66–30, E–mail: olegkorytov@mail.ru*

Резюме. На модели лучевого цистита исследовано изменение числа форменных элементов крови, внеклеточной ДНК (внДНК) и некоторых других показателей – холестерина, гамма–глутамилтрансферазы, мочевины, триглицеридов (ТГ) и щелочной фосфатазы сыворотки крови в ранние сроки после локального облучения области таза самок крыс Вистар в дозе 25 Гр. Облучение области мочевого пузыря крыс проводили на линейном ускорителе электронов. Через 6 ч после воздействия наблюдалось уменьшение абсолютного числа лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, через 24 ч – гранулоцитов. Через 6 и 24 ч после облучения наблюдалось значимое повышение содержания внДНК сыворотки крови, нормализующееся через 48 ч. Облучение приводило к значимому снижению содержания ТГ сыворотки крови через 24 ч после воздействия, не меняя другие исследованные показатели метаболизма. По данным корреляционного анализа, относительное изменение содержания внДНК (0 ч против 6 ч) коррелировало с изменениями ТГ (0 ч против 24 ч), при отсутствии значимых корреляций со снижением числа форменных элементов крови.

Ключевые слова: локальное облучение, лучевой цистит, форменные элементы крови, внеклеточная ДНК, триглицериды.

EARLY CHANGES IN EXTRACELLULAR DNA AND OTHER PARAMETERS IN THE PERIPHERAL BLOOD DURING IRRADIATION OF THE BLADDER

¹Vasilieva I.N., ²Korytov O.V., ¹Bespalov V.G., ¹Semenov A.L., ¹Ivanov S.D., ²Korytova L.I.

¹*SBI «N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation*

²*Granov Russian Scientific Center of Radiology and Surgical Technologies of Ministry of Healthcare of the Russian Federation*

Abstract. On the model of radiation cystitis, the changes in the number of blood cells, extracellular DNA (exDNA) and some indicators of total blood metabolism in serum early after the local exposure of the pelvic area of female Wistar rats at a dose of 25 Gy were studied. The irradiation of the region of the bladder of rats was carried out on a linear electron accelerator. 6 h after the exposure, a decrease in the absolute number of leukocytes, lymphocytes, monocytes were observed, and 24 h – a decrease of granulocytes. At 6 and 24 hours after irradiation, a significant increase in serum exDNA content was observed with normalization after 48 h. Irradiation led to a significant decrease in serum triglycerides content after 24 h after exposure, without changing other studied metabolic parameters. According to the correlation analysis, the relative change in the content of exDNA (0 h vs 6 h) correlated with changes in triglycerides (0 h vs 24 h), in the absence of significant correlations with a decrease in the number of blood cells.

Key words: local radiation, radiation cystitis, blood cells, extracellular DNA, triglycerides.

Введение. Лучевой цистит является осложнением лучевой терапии при лечении злокачественных новообразований малого таза (например, предстательной железы, мочевого пузыря, шейки матки, эндометрия и рака прямой кишки) [1], которое регистрируется у 5–15% пациентов [2] и серьезно влияет на качество жизни.

В области таза размещено от 50 до 60 % всей костномозговой ткани [3]. В ряде случаев, например, при лечении рака шейки матки показана корреляция между дозой облучения и гематологической токсичностью [4]. В эксперименте, при облучении всего тела крыс в дозе 7 Гр [4] показано значимое снижение общих лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов и тромбоцитов через 1 сутки, сохраняющееся в течение 7 и 15 суток.

Полагают, что основным источником внеклеточной ДНК (внДНК) являются гемопоэтические клетки, погибшие путем апоптоза, некроза, фагоцитоза или иным

способом. Современные методологии позволяют судить о тканевой принадлежности внДНК [5], так, в крови у здоровых людей обнаружена преимущественно ДНК с эпигенетическими особенностями лимфоидных и миелоидных клеток. Ранее на модели ионизирующего облучения всего тела крыс с мощностью дозы 1,6 Гр/мин в диапазоне от 2 до 100 Гр было показано зависимое от дозы увеличение концентрации внДНК в плазме крови [6]. Была показана возможность использования количественного определения внДНК и ее фракций для оценки степени лучевого поражения организма и прогноза состояния облученных [6, 7, 8].

Радиоактивное излучение вызывает повреждение клеток непосредственно ионизацией ДНК и других клеточных мишеней и косвенно, через активные формы кислорода, которые вызывают разрушение мембранных липидов, приводя к образованию пероксидных радикалов [4, 7, 9]. Обнаружено повышение уровня холестерина и триглицеридов (ТГ) уже через 1 сутки после облучения всего тела крыс в дозе 7 Гр [4]. Отмечают также разнонаправленные изменения активности щелочной фосфатазы в крови – повышение через 1 и 7 суток, с понижением через 3 суток после облучения [4], повышение активности гамма–глутамилтрансферазы (ГГТ) через 15 суток после общего облучения крыс в дозе 6 Гр [9]. Повышение холестерина связывают с выходом его из тканей в результате разрушения клеточных мембран [4], повышение ТГ в сыворотке – со снижением его поглощения, в результате ингибирования активности гидролизующей его липазы [4]. Изменения активности щелочной фосфатазы и ГГТ в крови связывают с выделением этого фермента из различных органов в связи с нарушением кровообращения и о глубоких нарушениях печеночной и возможно, других тканей [4, 9]. Изменение активности щелочной фосфатазы и ГГТ рассматривают в качестве маркера снижения массы тела [10], вместе с ними исследуют мочевины в сыворотке крови, изменение которой обнаружено через 60 дней после облучения всего тела крыс [11].

Целью работы было исследование на модели лучевого цистита изменение числа форменных элементов крови, внДНК и некоторых других показателей – холестерина, ГГТ, мочевины, ТГ, щелочной фосфатазы сыворотки крови в ранние сроки после локального облучения области таза самок крыс Вистар в дозе 25 Гр.

Материалы и методы. Исследование проведено на 12–недельных крысах–самках Вистар (n=20), массой 210 ± 35 г «Рапполово». Было сформировано 2 группы: интактные (n=10) и подопытные (n=10). Работа осуществлена в соответствии с требованиями действующих стандартов по содержанию и использованию лабораторных животных.

Облучение области мочевого пузыря крыс осуществляли на линейном ускорителе электронов Ахессе фирмы Elekta (Швеция) с энергией квантов 6 МэВ в дозе 25 Гр.

Анестезированное животное помещали в специальное фиксирующее устройство на деке стола линейного ускорителя.

Кровь у крыс брали из периферической вены в интервалы через 0, 6 и 24 и 48 ч месяц после облучения в вакутейнеры с ЭДТА для получения цельной крови и в пластиковые пробирки без наполнителя для получения сыворотки, которую отделяли центрифугированием при 900 g в течение 30 мин при комнатной температуре.

Клинический анализ крови. Подсчет клеток крови (лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов) проводили на анализаторе «BC-2800Vet» фирмы Mindray (Китай).

Содержание вДНК в сыворотке крови определяли количественным сэндвич-иммуноферментным анализом с использованием набора Cell Death Detection ELISA kit фирмы Roche, Sigma-Aldrich-Rus (Россия). Метод был ранее опробован [12].

Определение показателей биохимического анализа крови (холестерин, гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ), мочевины, триглицериды, щелочная фосфатаза) проводили на анализаторе «Konelab 20» (фирма «Thermo Scientific», США).

Данные представлены как среднее $\pm$ SEM (стандартная ошибка среднего). Анализ проводился при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 7, значимость различий оценивалась по t-критерию Стьюдента, для поиска зависимостей между количественными данными вычислялся коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение. Локальное однократное облучение крысы в тазовой области в дозе 25 Гр приводило к значимому снижению числа форменных элементов крови (Таблица 1). Через 6 ч после воздействия наблюдалось уменьшение общего числа лейкоцитов крови, лимфоцитов, моноцитов, через 24 ч – гранулоцитов. Общее число лейкоцитов, число моноцитов также оставались значимо ниже через 24 ч после облучения.

Таблица 1. Содержание вДНК, показателей клинического и биохимического анализа крови интактных крыс и в ранние сроки после локального облучения области малого таза в дозе 25 Гр.

Показатель		Интактные	Время после облучения	
			6 ч	24 ч
Общее число лейкоцитов крови	$\times 10^9$ мг/л	16,06 $\pm$ 1,83	10,57 $\pm$ 1,06*	10,74 $\pm$ 0,99*
Лимфоциты		11,44 $\pm$ 1,30	5,84 $\pm$ 0,47*	8,35 $\pm$ 0,93
Моноциты		0,51 $\pm$ 0,08	0,32 $\pm$ 0,03*	0,25 $\pm$ 0,03*
Гранулоциты		4,11 $\pm$ 0,57	4,40 $\pm$ 0,70	2,14 $\pm$ 0,15*

ВкДНК, нг/мкл	7,70±0,55	10,49±0,86*	11,2±1,33*
Холестерин, ммоль/л	1,15±0,09	1,14±0,09	1,36±0,12
ГГТ, ед/л	6,38±1,24	4,00±0,62	6,63±1,07
Мочевина, ммоль/л	10,96±1,78	8,56±1,43	6,70±0,34
Триглицериды, ммоль/л	2,21±0,10	1,47±0,29	1,44±0,13*
Щелочная фосфатаза, ед/л	137,5±24,0	123,2±30,2	135,7±24,1

*Различие с интактным контролем статистически достоверно, $p < 0,05$

Суммируя современные клинические данные по лейкопении при облучении органов малого таза, следует указать, что при еженедельном клиническом обследовании пациентов обнаружено максимальное снижение содержания лейкоцитов, нейтрофилов и тромбоцитов на третьей неделе лечения, после облучения в дозе не менее 30 Гр, фракционированной по 1,8 Гр ежедневно [3]. Несмотря на то, что снижение количества клеточных элементов после облучения широко известно, в большинстве случаев нелетального облучения оно является обратимым, при этом редукция числа лимфоцитов рассматривается как фактор снижения иммунитета, вносящий вклад в развитие осложнений [13], данные о раннем изменении показателей форменных элементов крови после облучения малого таза и возможность их изучения в качестве биомаркеров осложнений нами показаны впервые.

Уже в ранние сроки, через 6 ч и 24 ч после локального облучения в дозе 25 Гр наблюдалось значимое повышение содержания вкДНК в сыворотке крови (Таблица 1). Следует отметить, что через 48 ч после облучения содержание вкДНК снижалось до $8,55 \pm 0,73$ нг/мкл и не отличалось от $7,70 \pm 0,55$ нг/мкл у интактных животных. Нами обнаружено раннее пострadiационное повышение уровня вкДНК (Таблица 1), наступившее, по-видимому, в результате снижения числа лейкоцитов, однако по данным корреляционного анализа, значимых соотношений повышения содержания вкДНК и снижения числа форменных элементов крови выявлено не было.

Так, впервые обнаруженное нами дозозависимое увеличение содержания вкДНК в крови в ранние сроки после однократного облучения всего тела крыс [6, 7, 8] применимо также и при изучении ранних эффектов действия локального облучения, приближенного к используемому в клинике. Исследование вкДНК применяют для ранней оценки эффективности радиотерапии онкологических больных, так, отмечают увеличение концентрации вкДНК в крови уже через 4 ч после первого сеанса радиотерапии для пациентов с первичным раком печени или с метастазами [14], сохраняющееся и при современных методах лечения рака. Исследование вкДНК позволяет преодолеть

ограничения, связанные с гетерогенностью и пластичностью опухоли, и отражает динамику индивидуальной биологии опухоли [15]. В результате локального облучения при отсутствии значимых корреляций повышения уровня внДНК со снижением числа клеток крови, возможен вклад в общее содержание внДНК гибнущих клеток уротелия, гладкой мускулатуры детрузора и сосудов, подводящих к мочевому пузырю, которое возможно будет определить и диагностировать радиационный цистит, возникающий как осложнение при локальном облучении.

Локальное облучение тазовой области крыс в дозе 25 Гр приводило к снижению содержания ТГ на 35 %, через 6 ч после воздействия, статистически достоверное ($p < 0,05$) через 24 ч (Таблица 1). Нами обнаружено, что содержание триглицеридов в сыворотке крыс оставалось пониженным и через 1 месяц после облучения, составляя $1,31 \pm 0,15$ ммоль/л по сравнению с $2,21 \pm 0,10$ ммоль/л у интактных ($p < 0,05$). По данным корреляционного анализа, относительное изменение содержания внеклеточной ДНК (0 ч против 6 ч) коррелировало с изменениями триглицеридов (0 ч против 24 ч): $\text{ТГ} = 0,32 + 0,08 * \text{внДНК}$ ($R = 0,78$, $p < 0,05$).

Значения других исследованных биохимических показателей – ГГТ, мочевины, щелочной фосфатазы в ранние сроки после локального облучения таза в дозе 25 Гр не менялись (Таблица 1).

В связи с усилением гибели клеток после воздействия радиации повышается количество продуктов их распада, разносимое кровотоком по всем системам организма и, по-видимому, способным взаимодействовать с различными тканями и органами. Отмечают, что внДНК опосредует как индуцируемый радиацией эффект свидетеля, так и адаптивный эффект [16], поскольку содержит окисленные азотистые основания, прежде всего 8-оксо-2'-дезоксигуанозин. Так, окисленная *in vitro* геномная ДНК человека вызывает те же эффекты, что и внеклеточная ДНК [17]. Было показано, что свободный 8-оксо-2'-дезоксигуанозин вызывает снижение в плазме крови ТГ при длительном, на протяжении 2 месяцев, интрагастральном введении мышам линий ККФн и db/db, генетически предрасположенным к ожирению и сахарному диабету-2-го типа, с признаками морфологических нарушений печени [18]. Аналогичный эффект был вызван при длительном, в течение двух недель, пероральном введении 8-оксо-2'-дезоксигуанозина мышам, нокаутным по гену аролипопротеину Е с лигированной сонной артерией и содержащимся на обогащенной липидами диете. Наряду со снижением уровня ТГ в плазме крови, наблюдали уменьшение площади склеротических бляшек [19]. Данные о ранних изменениях ТГ после локального облучения области малого таза получены нами впервые. В эпидемиологических исследованиях показано, что некоторые варианты

печеночной липазы значимо взаимосвязаны с уровнем 8-оксо-2'-дезоксигуанозина, а другие – с содержанием ТГ [20]. Дальнейшие исследования необходимы, чтобы ответить на вопрос, имеет ли обнаруженное действие защитный эффект или способствует развитию осложнений.

Заключение. К ранним эффектам облучения области мочевого пузыря крыс, максимально приближенным к применяемому в настоящее время в клинической практике, относится значимое повышение содержания внДНК сыворотки крови, с нормализацией через 48 ч, уменьшение общего числа лейкоцитов крови, лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов, обнаруживаемое через 6 ч или 24 ч после воздействия. Необычным было снижение содержания ТГ сыворотки крови через 24 ч после воздействия, без значимого изменения других исследованных показатели метаболизма. Наблюдалась корреляционная связь изменения содержания внДНК через 6 ч после облучения с изменениями ТГ через 24 ч, при отсутствии значимых корреляций со снижением числа форменных элементов крови. ВнДНК как показатель гибели клеток представляется перспективным ранним маркером развития лучевого цистита, который оставляет возможность обнаружения в ее составе погибших клеток из тканей мочевого пузыря, а также свидетельствует о возможности активного участия внДНК в развитии радиационной патологии.

Литература

1. Villeirs L., Tailly Th., Ost P. et al. Hyperbaric oxygen therapy for radiation cystitis after pelvic radiotherapy: systematic review of the recent literature // Int. J. Urology. 2020. Vol. 27, N 2. P. 98–107. doi: 10.1111/iju.14130.
2. Oscarsson N., Müller B., Rosen A. et al. Radiation-induced cystitis treated with hyperbaric oxygen therapy (RICH-ART): a randomized, controlled, phase 2–3 trial // Lancet Oncol. 2019. Vol. 20, N 11. P.1602–1614. doi: 10.1016/S1470–2045(19)30494–2.
3. Lee A.Y., Golden D.W., Bazan J.G. et al. Hematologic nadirs during chemoradiation for anal cancer: temporal characterization and dosimetric predictors // Int. J. Radiation Oncol. Biol. Phys. 2017. Vol. 97, N 2. P. 306–312. doi: 10.1016/j.ijrobp.2016.10.010.
4. Mohamed N.E., Ashour S.E. Role of ethanolic extract of Morus alba leaves on some biochemical and haematological alterations in irradiated male rats // Int. J. Radiat. Biol. 2018. Vol. 94, N 4. P.374–384. doi: 10.1080/09553002.2018.1433888.
5. Snyder M.W., Kircher M., Hill A.J. et al. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin // Cell. 2016. Vol. 164, № 1–2. P. 57–68. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.050.

6. Vladimirov V.G., Belokhvostov A.S., Sherlina S.S. et al. Extracellular DNA level in the blood of irradiated rats // *Int. J. Radiat. Biol.* 1992. Vol. 62, № 6. P.667–671. doi: 10.1080/09553009214552611
7. Vasilyeva I.N. Low-molecular-weight DNA in blood plasma as an index of the influence of ionizing radiation // *Ann. NY Acad. Sci.* 2001. Vol. 945. P.221–228. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03889.x
8. Vasilyeva I., Bepalov V., Baranova A. Radioprotective combination of α -tocopherol and ascorbic acid promotes apoptosis that is evident by release of low-molecular weight DNA fragments into circulation // *Int. J. Radiat. Biol.* 2015. Vol. 91, N 11. P.872–877. doi: 10.3109/09553002.2015.1087066.
9. Ashry O.M., Hussein E.M., Abd El-Azime A.SH. Restorative role of persimmon leaf (*Diospyros kaki*) to gamma irradiation induced oxidative stress and tissue injury in rats / *Int. J. Radiat. Biol.* 2017. Vol. 93, N 3. P. 324–329. doi: 10.1080/09553002.2016.1254831.
10. Liu J., Au Yeng Sh.L., Kwok M.K. et al. The effect of liver enzyme on bone composition: a mendelian randomization study / *PLoS ONE*. 2020. Vol. 15, N 2. 18 p. doi: 10.1371/journal.pone.0228737.
11. Lenarczyk M., Kronenberg A., Mader M. et al. Age of exposure to radiation determined severity of renal and cardiac disease in rats / *Radiat. Res.* 2019. Vol. 192, N1. P. 63–67. doi: 10.1667/RR15043.
12. Vasilyeva I.N., Bepalov V.G., Von J.D. et al. Cell-free DNA plasma levels differ in age-specific pattern in healthy rats and castrated with testosterone-induced benign prostatic hyperplasia / *Int. J. Genomics*. 2019. 6 p. doi: 10.1155/2019/8173630.
13. Brengues M., Lapierre A., Bourcier C. et al. T lymphocytes to predict radiation-induced late effects in normal tissues / *Expert Rev Mol Diagn.* 2017. Vol.17, N 2. P.119–127. doi: 10.1080/14737159.2017.1271715.
14. Holdenrieder S., Stiber P. Clinical use of circulating nucleosomes / *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2009. Vol. 46, N 1. P.1–24. doi: 10.1080/10408360802485875.
15. Holdenrieder S. Liquid Profiling of Circulating Nucleic Acids as a Novel Tool for the Management of Cancer Patients / *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016. Vol. 924. P.53–60. doi: 10.1007/978-3-319-42044-8_11.
16. Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V. et al. Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells / *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013. doi: 10.1155/2013/649747.
17. Kostyuk S.V., Ermakov A.V., Alekseeva A.Yu. et al. Role of extracellular DNA oxidative modification in radiation induced bystander effects in human endotheliocytes / *Mut. Res.* 2012. Vol. 729, N 1–2. P. 52–60. doi: 10.16/j.mrfmmm.2011.09.005.

18. Ko S.H., Lee J.K., Lee H.J. et al. 8-Oxo-2'-deoxyguanosine ameliorates features of metabolic syndrome in obese mice / *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. Vol. 443, N 2. P. 610–616. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.018.
19. Huh J.Y., Son D.J., Lee Y. et al. 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine prevents plaque formation and inhibits vascular smooth muscle cell activation through Rac1 inactivation / *Free Radic. Biol. Med.* 2012. Vol. 53, N 1. P.109–121. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.023.
20. Teng M.-Sh., Wu S., Hsu L.A. et al. Pleiotropic association of LIPS variants with lipid and urinary 8-hydroxy deoxyguanosine levels in a Taivanese populations / *Lipids Health Dis.* 2019. Vol. 18, N 1. P.111. doi: 10.1186/s12944-019-1057-9.