

РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

УДК 591.111.1:577.2:57.084.1:599.323.4:616-006.6:616.62:615.849:539.1.047

ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК И ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В РАННИЕ СРОКИ РАЗВИТИЯ ЛУЧЕВОГО ЦИСТИТА У КРЫС

© 2022 г. И. Н. Васильева^{1,*}, О. В. Корытов², С. Д. Иванов¹, А. Л. Семёнов¹,
В. Г. Беспалов¹, Л. И. Корытова²

¹ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² РНЦРХТ им. акад. А.М. Гранова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: iravasilyeva@hotmail.com

Поступила в редакцию 11.01.2021 г.

После доработки 15.12.2021 г.

Принята к публикации 22.12.2021 г.

Задачей настоящего исследования было выявление показателя, который будет изменяться в ближайшие сроки после облучения и может быть использован для ранней (в течение 6–24 ч) диагностики инициации цистита как осложнения, возникающего при лучевой терапии пациентов со злокачественными новообразованиями органов малого таза. Вновь разработанная нами модель радиационно-индуцированного цистита основана на однократном облучении области мочевого пузыря крыс на линейном ускорителе электронов “Axesse” (“Elekta”, Швеция) с энергией квантов 6 МэВ в дозе 25 Гр при мощности дозы 4.50 Гр/мин. Ранние эффекты оценивали по изменению в периферической крови общего количества лейкоцитов и их фракций, концентрации внеклеточной ДНК (вкДНК), а также холестерина, гамма-глутамилтрансферазы, мочевины и щелочной фосфатазы сыворотки через 6 и 24 ч после облучения. Через 6 ч после воздействия наблюдалось уменьшение общего числа лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов (16.06 ± 1.83 до 10.57 ± 1.06 ; 11.44 ± 1.30 до 5.84 ± 0.47 ; 0.51 ± 0.08 до 0.32 ± 0.03 ($\times 10^9/\text{л}$) соответственно), а спустя 24 ч снижалось также число гранулоцитов с 4.11 ± 0.57 до 2.14 ± 0.15 ($\times 10^9/\text{л}$). Через 6 и 24 ч после облучения наблюдалось повышение концентрации вкДНК сыворотки крови с 7.70 ± 0.55 до 11.20 ± 1.33 нг/мкл, нормализующееся к 48 ч, прошедшим после перенесенного воздействия. ВкДНК является показателем гибели клеток при локальном воздействии радиации и может быть перспективным ранним неинвазивным маркером развития лучевого цистита, что, вероятно, окажется важным в выборе средств профилактики возникновения лучевой патологии.

Ключевые слова: локальное облучение мочевого пузыря крыс, лучевой цистит, лейкоциты и их фракции, внеклеточная ДНК

DOI: 10.31857/S0869803122020102

Лучевая терапия при лечении больных злокачественными новообразованиями малого таза — предстательной железы, шейки матки, эндометрия и прямой кишки — в 5–15% случаев ее применения приводит к осложнениям в виде лучевого цистита [1, 2]. Даже при современных методах формирования поля облучения не всегда удается избежать ранних (<90 дней после начала терапии) и отсроченных (>90 дней) осложнений, поражающих мочевой пузырь. Разработка неинвазивного показателя для ранней диагностики лучевого цистита имеет исключительно важное значение, так как эта патология серьезно влияет на качество жизни.

Патофизиологию лучевого цистита связывают с гибелью клеток вследствие повреждения ДНК и увеличения проницаемости клеточных мембран.

Полагают, что к осложнениям приводит восприимчивость уротелия мочевого пузыря к радиационному поражению [3], а также снижение сосудистой и клеточной плотности как в уротелиальном, так и в гладкомышечном слоях мочевого пузыря [2]. В настоящее время в качестве одного из ранних неинвазивных (или минимально инвазивных) показателей, связанных с клеточной гибелью, рассматривается внеклеточная ДНК (вкДНК). Повышенные количества вкДНК свидетельствуют о наличии в организме очагов воспаления и являются маркерами патологий, в частности, предстательной железы как в клинике, так и в эксперименте [4].

Вместе с тем в области таза размещено около 50% всей костномозговой ткани [5, 6]. В ряде случаев, например, при лечении рака шейки матки,

показана корреляция между дозой облучения и цитотоксичностью [5]. Однако при выполнении клинических исследований обычно рассматривают лишь количества форменных элементов крови в еженедельных образцах, сдаваемых пациентами до радиационной терапии и в процессе ее прохождения [5, 6].

При тотальном облучении крыс в дозе 7 Гр было показано значимое снижение общего числа лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов и тромбоцитов через 24 ч после воздействия, сохраняющееся на протяжении 7 и 15 сут [7]. Ранее в эксперименте, основанном на облучении всего тела крыс (от 2 до 100 Гр с мощностью дозы 1.6 Гр/мин), нами был установлен рост концентрации вкДНК в плазме крови в зависимости от дозы радиационного воздействия [8]. Рассматриваемый показатель возрастал в течение 1–5 ч после действия ионизирующего излучения, затем снижался и спустя 24 ч возвращался к исходным значениям (исключение составляют животные, облученные в дозе 100 Гр) [9]. Наблюдаемое увеличение концентрации вкДНК происходило за счет возрастания содержания специфических для апоптоза низкомолекулярных фрагментов [8, 9]. Возможность использования количественного определения вкДНК для оценки степени лучевого поражения организма и прогноза состояния пациентов, перенесших радиотерапию, рассмотрена в приведенных работах [8, 9]. Полагают, что основным источником вкДНК являются гемопоэтические клетки, погибшие путем апоптоза, некроза или иным способом. Современные технологии позволяют судить о тканевой принадлежности вкДНК путем сопоставления эпигенетических особенностей ДНК генома клеток и вкДНК [10, 11]. Так, вкДНК здоровых доноров происходит в основном из клеток миелоидного ряда: на 32% из ДНК гранулоцитов, на 30% из предшественников эритроцитов, 12% – из лимфоцитов, 11% – из моноцитов, кроме того, к источникам вкДНК относятся эндотелиальные клетки (9%), 1% – гепатоциты (1%) и 5% приходится на другие клетки организма [10, 11].

Ионизирующее излучение вызывает повреждение клеток как в результате прямого воздействия на ДНК и другие внутриклеточные компоненты, так и косвенного действия, опосредованного свободными радикалами. Последнее приводит к образованию пероксидных соединений в липидах и нарушению структуры клеточных мембран [7, 8, 12]. В результате увеличивается приток тканевого холестерина в сыворотку [7, 8, 12]. Возрастание уровня холестерина в сыворотке, обнаруживаемое через 1 сут после тотального облучения крыс в дозе 7 Гр, сохранялось также через 7 и 15 сут [7]. Кроме того, были отмечены разнонаправленные изменения активности щелочной фосфатазы в крови – повышение через 1 и 7 сут, с понижением

через 3 сут после облучения, что авторы объясняют выделением этого фермента из различных органов в связи с нарушением кровообращения [7].

Наряду с изменениями вышеупомянутых показателей, обнаружено возрастание активности гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) в более поздние сроки – через 15 сут после общего облучения крыс в дозе 6 Гр, что свидетельствовало о глубоких нарушениях печеночной и, возможно, других тканей [12]. Вместе с тем изменение активности щелочной фосфатазы и ГГТ рассматривают в качестве маркеров последующего снижения массы тела [13]. Наряду с оценкой активности щелочной фосфатазы исследовали мочевины в сыворотке крови, изменение концентрации которой было обнаружено через 60 дней после тотального облучения тела крыс [14]. Вышеперечисленные показатели “не обнаруживают” лучевое поражение в более ранние сроки после перенесенного воздействия радиации, в отличие от вкДНК, изменение концентрации которой происходит уже через 5–6 ч после облучения [8, 9].

Задачей настоящего исследования стало выявление показателя, который будет изменяться в ранние сроки после облучения и может быть использован для ранней (в течение 6–24 ч) диагностики инициации цистита как осложнения, возникающего при лучевой терапии пациентов со злокачественными новообразованиями органов малого таза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Экспериментальные животные. Исследование проведено на 12-недельных крысах-самках Вистар ($n = 20$, масса 210 ± 35 г) разводки ФГУП “Питомник Рапполово” РАМН (Ленинградская обл.), содержащихся в стандартных условиях вивария. Были сформированы две группы крыс: интактные ($n = 10$) и подопытные ($n = 10$). Работа была осуществлена в соответствии с требованиями действующих стандартов по содержанию и использованию лабораторных животных.

Облучение области мочевого пузыря крыс проводили с целью максимального приближения к адекватному источнику облучения, применяемому в настоящее время в клинической практике, и осуществляли на линейном ускорителе электронов “Axesse” (“Elekta”, Швеция) с энергией квантов 6 МэВ в дозе 25 Гр при мощности дозы 4.50 Гр/мин однократно. Анестезированное животное помещали в специальное фиксирующее устройство на деке стола линейного ускорителя. Разработанный способ позволил получить модели с близким к 98% выходом лучевых циститов [16].

Кровь у крыс брали из хвостовой вены в объеме 100 мкл через 0, 6 и 24, 48 ч, а также через 1 мес. после облучения в два вида пробирок: в ва-

Таблица 1. Концентрация клеток крови самок крыс в ранние сроки после локального облучения области малого таза в дозе 25 Гр**Table 1.** Concentration of blood cells in female rats in the early stages after local irradiation of the pelvic area at a dose of 25 Gy

Анализируемый показатель	Интактные животные	Время после облучения крыс	
		6 ч	24 ч
Общее число лейкоцитов, $\times 10^{-9}/\text{л}$	16.06 ± 1.83	$10.57 \pm 1.06^*$	$10.74 \pm 0.99^*$
Число лимфоцитов, $\times 10^{-9}/\text{л}$	11.44 ± 1.30	$5.84 \pm 0.47^*$	8.35 ± 0.93
Число моноцитов, $\times 10^{-9}/\text{л}$	0.51 ± 0.08	$0.32 \pm 0.03^*$	$0.25 \pm 0.03^*$
Число гранулоцитов, $\times 10^{-9}/\text{л}$	4.11 ± 0.57	4.40 ± 0.70	$2.14 \pm 0.15^*$

* Значения, статистически значимо отличающиеся от аналогичных в группе интактных животных, $p < 0.05$.

кутейнеры с ЭДТА для анализа цельной крови и в пластиковые пробирки без наполнителя для получения сыворотки, которую отделяли центрифугированием при 900 г в течение 30 мин при комнатной температуре.

Клинический анализ крови. Подсчет клеток крови (общего числа лейкоцитов, фракции лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов) проводили на анализаторе “BC-2800Vet” (“Mindray”, Китай).

Содержание вкДНК в сыворотке крови определяли количественным сэндвич-иммуноферментным анализом с использованием набора Cell Death Detection ELISA kit (“Roche, Sigma–Aldrich–Rus”, Россия). Он включал два вида антител мыши, выработанных на ДНК (одно- и двухнитевую) и гистоны (H1, H2A, H2B, H3 и H4), специфически связывающие моно- и олигонуклеосомы ядер эукариотических клеток (Cat. No.11 774 425 001, sigma –aldrich.com). В ходе определения в покрытые стрептовидином лунки микропланшетки добавляли по 20 мкл стандарта или пробы (сыворотка крови, предварительно центрифугированной для избавления от клеточного дербиса) и по 80 мкл иммунореагента. Планшетку накрывали парафильмом и инкубировали 2 ч при комнатной температуре и мягком перемешивании на шейкере “MiniRoker MR-1 VoiSan” (Латвия). После инкубации жидкость из лунок удаляли и промывали лунки 3 раза инкубационным буфером в количестве 250–300 мл. После тщательного удаления жидкости в каждую лунку добавляли по 100 мкл окрашивающего субстрата и инкубировали на шейкере около 15 мин, до развития окрашивания. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл останавливающего реакцию раствора. Измерение поглощения проб осуществляли при $\lambda = 450 \pm 10$ нм на планшете “Microplate ChroMate Reader” (“Awareness Technology Inc”, США). Концентрацию ДНК положительного контроля набора ELISA определяли на спектрофотометре “NanoPhotometer N-50” (“IMPLEN”, Германия). Были построены калибровочные кривые для количественного определения ДНК в опытных образцах, как описано ранее [4].

Измерение величин показателей биохимического анализа крови (холестерина, ГГТ, мочевины, щелочной фосфатазы) проводили на анализаторе “Konelab 20” (“Thermo Scientific”, США).

Данные представлены как среднее и стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Анализ проводился при помощи программного обеспечения Graph-Pad Prism 7, значимость различий оценивалась по непараметрическому U -критерию и параметрическому t -тесту Стьюдента. С целью выявления возможных зависимостей между вариациями количественных данных использовали коэффициент корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ранние сроки после локального однократно облучения тазовой области крыс происходило значимое снижение числа форменных элементов крови по сравнению с аналогичными показателями у интактных животных (табл. 1). Через 6 ч после воздействия наблюдалось уменьшение общего числа лейкоцитов крови, лимфоцитов, моноцитов, которое в наблюдаемый период оставалось ниже, чем у интактных крыс. Снижение числа гранулоцитов было зарегистрировано позднее – через 24 ч после радиационного воздействия.

Широко используемый в мировой литературе системный биомаркер воспалительных процессов в организме на основании определения отношения числа нейтрофилов к числу лимфоцитов (ОНЛ) крови [17, 18] в нашем эксперименте у интактных животных составил 0.359 отн. ед., через 6 ч после облучения он возрастал более чем в 2 раза – 0.753 отн. ед., но уже через 24 ч снижался до контрольного уровня и составлял 0.256 отн. ед.

Уже в ранние сроки, через 6 ч и 24 ч после локального облучения в дозе 25 Гр наблюдалось значимое повышение концентрации вкДНК в сыворотке крови (табл. 2). Следует отметить, что через 48 ч после облучения концентрация вкДНК снижалась до 8.55 ± 0.73 нг/мкл, что не отличалось от величины показателя у интактных животных. Определены также корреляции повышения

Таблица 2. Изменение биохимических показателей крови самок крыс в ранние сроки после однократного облучения мочевого пузыря в дозе 25 Гр**Table 2.** Changes in the biochemical parameters of the blood of female rats in the early stages after a single irradiation of the bladder at a dose of 25 Gy

Показатель	Интактные крысы	Облученные крысы, время после воздействия	
		6 ч	24 ч
вкДНК, нг/мкл	7.70 ± 0.55	10.49 ± 0.86*	11.20 ± 1.33*
Общий 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
Щелочная фосфатаза, ед/л	137.5 ± 24.0	123.2 ± 30.2	135.7 ± 24.1

*Различие с интактным контролем статистически значимо, $p < 0.05$.

концентрации вкДНК со снижением числа форменных элементов крови: с общим числом лейкоцитов ($R^2 = 0.9522$), с числом лимфоцитов ($R^2 = 0.627$), моноцитов ($R^2 = 0.9951$), гранулоцитов ($R^2 = 0.3174$).

Такое раннее пострадиационное повышение уровня вкДНК, по-видимому, обусловлено апоптозом лейкоцитов. Однако значительная корреляция наблюдается с числом моноцитов, фракция которых весьма малочисленна. Возможно, это связано с фагоцитированием выделяющейся вкДНК. Следует упомянуть, что, в отличие от человека, грызуны имеют лимфоидный тип кроветворения и в профиле клеточного состава крови преобладают (60–70%) лимфоциты, более радиочувствительные, по сравнению с гранулоцитами у человека. Поэтому выявленные для грызунов корреляции могут отличаться от наблюдаемых у человека.

Концентрация холестерина через 24 ч после облучения проявляла лишь тенденцию к повышению: 1.36 ± 0.12 ммоль/л у облученных крыс по сравнению с 1.15 ± 0.09 ммоль/л в группе интактных животных. Более высокое возрастание этого показателя до 1.43 ± 0.11 ммоль/л наблюдалось лишь через 1 мес. после лучевого воздействия. Другие измеренные нами биохимические показатели – ГГТ, мочевины и щелочная фосфатаза в ранние сроки после облучения мочевого пузыря крыс в дозе 25 Гр значимо не менялись (табл. 2), что согласуется с вышеприведенными данными других авторов [7, 12–14]. Корреляции между изменением концентраций вкДНК и биохимическими показателями характеризовались $R^2 = 0.3919$ для общего холестерина, $R^2 = 0.0585$ для ГГТ, $R^2 = 0.9352$ для мочевины, $R^2 = 0.1863$ для щелочной фосфатазы. Относительно высокая корреляция между изменением содержания мочевины и вкДНК, по-видимому, связана с катаболизмом нуклеотидов.

Через 8–10 нед. после локального облучения области таза в дозе 25 Гр у животных развивался лучевой цистит, что было зафиксировано на основании макро- и микроскопических показателей, таких как тенденции к потере массы тела, к повышению ректальной температуры, к увеличению удельной плотности и снижению рН мочи, появление в моче белка и крови, увеличение в моче числа лейкоцитов, увеличение в крови абсолютного количества лейкоцитов и гранулоцитов. Уже через 6–8 нед. зафиксировано появление признаков постлучевого цистита в виде нарастания пиурии, микро- и макрогематурии и протеинурии; увеличение в крови абсолютного количества лейкоцитов и гранулоцитов [15, 16].

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было установлено, что локальное воздействие на область таза, а именно мочевого пузыря крыс, электронов высоких энергий в дозе 25 Гр приводило к уменьшению общего числа лейкоцитов крови, количества лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов, что наблюдалось в ранние сроки – 6–24 ч, после радиационного воздействия. Эти результаты согласуются с известными данными о первичной реакции системы крови на тотальное облучение крыс в дозе 7 Гр [7]. Через 24 ч после воздействия γ -излучения наблюдали снижение общего числа лейкоцитов до 30% по сравнению с контролем [7]. В наших экспериментах была отмечена редукция гемцитологического показателя до 67%. Это согласуется с данными, что в области таза размещено около 50% костномозговой ткани, подвергаемой воздействию ионизирующих излучений при лучевой терапии онкологических больных со злокачественными образованиями такой локализации [5].

Обобщая современные клинические данные о лейкопении при облучении органов малого таза, следует отметить, что еженедельное клиническое обследование пациентов выявило максимальное

снижение содержания лейкоцитов, нейтрофилов и тромбоцитов только на 3-й неделе лечения, после воздействия в дозе не менее 30 Гр (доза на фракцию 1.8 Гр ежедневно) [5]. Гипофракционирование курса радиотерапии вызывало уменьшение выраженности падения общего числа лейкоцитов [6]. Однако по данным оценки вкДНК факт воздействия и дозовая нагрузка могут быть определены уже через 5 ч, в это время лимфопения развивается в существенно более поздний период, спустя 2–3 дня после облучения в небольших дозах [8].

Исследование вкДНК было использовано для ранней оценки эффективности лучевой терапии у онкологических больных. Описано повышение концентрации вкДНК в крови уже через 4 ч после первого сеанса лучевой терапии у пациентов с первичным раком печени или с метастазами [20]. Этот эффект сохраняется даже при использовании современных методов лечения онкологических больных, например, при селективной внутренней терапии с направленной доставкой меченных иттрием-90 микросфер [21].

Несмотря на то что снижение количества клеточных элементов после радиационного воздействия 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 [19]. Вместе с тем такой показатель воспаления как ОНЛ продемонстрировал нестабильность. Уже к 24 ч ОНЛ нормализовался, хотя инициация воспалительного процесса в организме вполне могла иметь место, так как другим повреждающим воздействиям экспериментальные животные больше не подвергались.

В нашем эксперименте уменьшение общего числа лейкоцитов и их фракций в крови сопровождалось повышением уровня вкДНК в сыворотке крови уже через 6 ч после локального воздействия. Таким образом, возрастание концентрации вкДНК в крови, обнаруженное нами через 6 ч после однократного облучения всего тела крысы [8, 9], может быть применено при обнаружении ранних цитотоксических эффектов местного облучения.

Исследование циркулирующей в биологических жидкостях ДНК позволяет преодолеть ограничения, связанные с гетерогенностью и пластичностью опухоли, и отражает динамику индивидуальной биологии опухоли [22]. В результате локального облучения у человека вклад в общее содержание вкДНК может происходить не только от апоптоза лейкоцитов, но и от распада генетического материала умирающих клеток уротелия, гладких мышц детрузора и сосудов, ведущих к мочевому пузырю. Обнаружение этого генетическо-

го материала, вероятно, позволит диагностировать лучевой цистит, возникающий как осложнение при локальном облучении.

Увеличение уровня холестерина в сыворотке крови, зарегистрированное нами, а также другими авторами [7], является более поздним индикатором развития лучевой патологии, чем показатель изменения концентрации вкДНК. Это связывают с содержанием вкДНК окисленных азотистых оснований, прежде всего 8-оксигуанидина (8-оксо-2'-дезоксигуанозин) [24]. Отмечают, что вкДНК опосредует как индуцируемый радиацией эффект свидетеля, так и адаптивный эффект [23]. Так, окисленная *in vitro* геномная ДНК человека вызывает те же эффекты, что и вкДНК [25].

Таким образом, уровень вкДНК в ранние сроки после облучения является более стабильным показателем по сравнению с гемцитологическими параметрами, что может быть применено для создания неинвазивного маркера ранней диагностики развития лучевого цистита, а в перспективе — использовано для выбора средств профилактики возникновения лучевой патологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На новой модели лучевого цистита был определен ряд показателей — число лейкоцитов и их фракций в крови, уровни вкДНК, холестерина, ГГТ, мочевины и щелочной фосфатазы сыворотки на ранних стадиях после однократного локального облучения в дозе 25 Гр области таза крыс-самок линии Вистар. Ранними эффектами применения техники облучения области мочевого пузыря крысы, максимально приближенной к применяемой в настоящее время в клинической практике, является уменьшение общего числа лейкоцитов, количества лимфоцитов и моноцитов в крови, обнаруживаемое в течение 6–24 ч после воздействия. В те же сроки наблюдалось значимое повышение содержания вкДНК сыворотки крови. Этот параметр изменяется более значительно, чем цитологический. ВкДНК является показателем гибели клеток при локальном воздействии радиации и может быть перспективным ранним неинвазивным маркером развития лучевого цистита, что окажется полезным в перспективе для выбора средств профилактики возникновения лучевой патологии. Остается возможность обнаружения в составе вкДНК компонентов погибших клеток ткани мочевого пузыря, свидетельствующих об избыточном повреждении тканей при облучении, что может быть использовано для ранней диагностики лучевого цистита.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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. V. 2. P. 98–107.
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. V. 11. P. 1602–1614.
 3. *Zwaans B.M.M., Lamb L.E., Bartolone S. and Nicolai H.E. et al.* Cancer survivorship issues with radiation and hemorrhagic cystitis in gynecological malignancies // *Int. Urol. Nephrol.* 2018. V. 10. P. 1745–1751.
 4. *Vasilyeva I.N., Bespalov 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. 8173630.
 5. *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. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2017. V. 97. № 2. P. 306–312.
 6. *Sanguineti G., Giannarelli D., Petrongari M.G. et al.* Leukotoxicity after moderately hypofractionated radiotherapy versus conventionally fractionated dose escalated radiotherapy for localized prostate cancer: a secondary analysis from a randomized study // *Radiat. Oncol.* 2019. V. 14. № 23.
 7. *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. V. 94. № 4. P. 374–384.
 8. *Васильева И.Н., Беспалов В.Г.* Выделение внеклеточной ДНК после введения радиозащитной комбинации α -токоферола и аскорбиновой кислоты // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2015. Т. 55. № 5. С. 495–500. [*Vasilyeva I.N., Bespalov V.G.* Release of extracellular DNA after administration of radioprotective combination of α -tocopherol and ascorbic acid // *Radiats. Biol. Radioecol.* 2015. V. 55. № 5. P. 495–500 (In Russ.)]
 9. *Васильева И.Н., Подгорная О.И., Беспалов В.Г.* Нуклеосомная фракция внеклеточной ДНК как показатель апоптоза // *Цитология.* 2015. Т. 57. № 2. С. 87–94. [*Vasilyeva I.N., Podgornaya O.I., Bespalov V.G.* Nucleosome fraction of extracellular DNA as the index of apoptosis // *Tsitologiya.* 2015. V. 57. № 2. P. 87–94 (In Russ.)]
 10. *Moss J., Magenheimer J., Neiman D. et al.* Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease // *Nature Commun.* 2018. V. 9. 5068.
 11. *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. V. 164. № 1–2. P. 57–68.
 12. *Ashry O.M., Hussein E.M., Abd El-Azime A.S.H.* Restorative role of persimmon leaf (*Diospyros kaki*) to gamma irradiation induced oxidative stress and tissue injury in rats // *Int. J. Radiat. Biol.* 2017. V. 93. № 3. P. 324–329.
 13. *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. V. 15. № 2. P. e0228737.
 14. *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. V. 192. № 1. P. 63–67.
 15. *Корытов О.В., Корытова Л.И., Понежа Т.Е. и др.* Способ моделирования лучевого цистита: Патент РФ № 2676431, декабрь, 2018. [*Korytov O.V., Korytova L.I., Ponezha T.E. et al.* Method for modeling radiation cystitis Patent RF № 2676431, December 2018. (In Russ.)]
 16. *Корытов О.В., Корытова Л.И., Ахметзянов А.Р. и др.* Экспериментальные модели радиационно-индуцированного цистита у лабораторных животных // *Вопросы онкологии.* 2019. Т. 65. № 3. С. 337–341. [*Korytov O.V., Korytova L.I., Akhmetzyanov A.R. et al.* Experimental models of radiation-induced cystitis in laboratory animals // *Voprosy onkologii.* 2019. T. 65. № 3. С. 337–341 (In Russ.)]
 17. *Ocana A., Nieto-Jiménez C., Pandiella A., Templeton A.J.* Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies // *Mol. Cancer.* 2017. V. 16. № 1. P. 137–143.
 18. *Guner A., Kim H.I.* Biomarkers for Evaluating the Inflammation Status in Patients with Cancer // *J. Gastric Cancer.* 2019. V. 19. № 3. P. 254–277.
 19. *Bregues M., Lapierre A., Bourcier C. et al.* T lymphocytes to predict radiation-induced late effects in normal tissues // *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 2017. V. 17. № 2. P. 119–127.
 20. *Holdenrieder S., Stiber P.* Clinical use of circulating nucleosomes // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2009. V. 46. № 1. P. 1–24.
 21. *Fehr Y., Holdenrieder S., Hoffman R.-Th. et al.* Circulating nucleosomes in cancer patients with liver metastases undergoing selective internal radiation therapy using Yttrium-90 labelled microspheres: Circulating nucleic acids in plasma and serum / Ed. P.B. Gahan. Dordrecht Heidelberg London New York: Springer, 2009. P. 91–96.
 22. *Holdenrieder S.* Liquid Profiling of Circulating Nucleic Acids as a Novel Tool for the Management of Cancer Patients // *Adv. Experim. Med. Biol.* 2016. V. 924. P. 53–60.
 23. *Ермаков А.В., Конькова М.С., Костюк С.В., Вейко Н.Н.* “ДНК-сигнальный” путь, обеспечивающий развитие радиационного эффекта свидетеля в клетках человека // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2011. Т. 51. № 6. С. 651–659. [*Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V., Veiko N.N.* DNA-signaling pathway mediating development of a radiation induced bystander effect in human cells // *Radiats. Biol. Radioecol.* 2011. V. 51. № 6. P. 651–659 (In Russ.)]
 24. *Черников А.В., Гудков С.В., Усачева А.М., Брусков В.И.* Экзогенный 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозин: биомедицинские свойства, механизмы действия, терапевтический потенциал // *Успехи биол. химии.* 2017. Т. 57. С. 267–302. [*Chernikov A.V., Gudkov S.V., Usacheva A.M., Bruskov V.I.* Eksogenny 8-okso-7,8-2'-desoksiganidin: biomedicinskie svoistva, mechanism deistviya, teranevticheskiy potencial // *Uspehi biologicheskoi khimii.* 2017. V. 57. P. 267–302 (In Russ.)]
 25. *Kostyuk S.V., Ermakov A.V., Alekseeva A.Yu. et al.* Role of extracellular DNA oxidative modification in radiation induced bystander effects in human endothelial cells // *Mutat. Res.* 2012. V. 729. № 1–2. P. 52–60.

Changes in the Concentration of Extracellular DNA and Leukocytes in the Peripheral Blood in the Early Stages of Development of Radiation Cystitis in Rats

I. N. Vasilyeva^{a, #}, O. V. Korytov^b, S. D. Ivanov^a, A. L. Semenov^a, V. G. Bespalov^a, and L. I. Korytova^b

^a *N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, St.-Petersburg, Russia*

^b *A.M. Granov Russian Scientific Center for Radiology and Surgical Technologies, St.-Petersburg, Russia*

[#] *E-mail: iravasilyeva@hotmail.com*

The objective of this study was to identify an indicator that will change early after irradiation and can be used for early (within 6–24 hours) diagnosis of cystitis initiation as a complication arising from radiation therapy of tumor carriers in the pelvic area. On a newly developed model of radiation-induced cystitis, irradiation of the rat urinary bladder area was carried out on a linear electron accelerator Axesse (Elekta, Sweden) with a quantum energy of 6 MeV at a dose of 25 Gy at a dose rate of 4.50 Gy/min once. Early effects after a single local irradiation at a dose of 25 Gy to the pelvic region in female rats was assessed by the change in the peripheral blood of the total number of leukocytes and their fractions, the concentration of extracellular DNA (exDNA), as well as cholesterol, gamma–glutamyltransferase, urea, serum alkaline phosphatase after 6 and 24 hours after irradiation. 6 h after exposure, there was a decrease in the total number of leukocytes from 16.06 ± 1.83 to 10.57 ± 1.06 ($\times 10^9/L$), lymphocytes from 11.44 ± 1.30 to 5.84 ± 0.47 , monocytes from 0.51 ± 0.08 to 0.32 ± 0.03 , and after 24 hours the number of granulocytes also decreased from 4.11 ± 0.57 to 2.14 ± 0.15 . 6 and 24 h after irradiation, an increase in the concentration of exDNA in blood serum was observed from 7.70 ± 0.55 ng/ μ L to 11.20 ± 1.33 ng/ μ L, which then returned to normal by 48 hours. ExDNA is an indicator of cell death under local exposure to radiation and can be a promising early non-invasive marker of the development of radiation cystitis, useful in the future for the selection of means for preventing the onset of radiation pathology.

Keywords: local irradiation of rat urinary bladder, radiation cystitis, leukocytes and their fractions, extracellular DNA