УДК 616.155.392:547.979.8+57.086.83:612.112:616-001.28

М. А. Пілінська✉, О. В. Шеметун, О. О. Талан, О. Б. Дибська, С. М. Кравченко, В. В. Шолойко

Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», вул. Юрія Іллєнка, 53, м. Київ, 04050, Україна

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ НА РІВЕНЬ ХРОМОСОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ В СОМАТИЧНИХ КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ ПРИ РОЗВИТКУ ПУХЛИНО-ІНДУКОВАНОГО ЕФЕКТУ СВІДКА

Мета: визначити вплив опромінених *in vitro* клітин крові пацієнтів з В-клітинною хронічною лімфоцитарною лейкемією (ХЛЛ) на рівень хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові (ЛПК) здорових осіб при розвитку пухлино-індукованого ефекту свідка.

Матеріали і методи. Застосовували окреме та спільне культивування ЛПК здорових осіб (клітини-свідки) з клітинами крові пацієнтів з ХЛЛ, опроміненими *in vitro* на G_0 стадії клітинного циклу γ-квантами ^{137}Cs в дозі 0,5 Гр (клітини-індуктори). Для сумісного культивування клітин використовували власну модельну систему спільного культивування ЛПК різностатевих осіб, розроблену для дослідження ефекту свідка на цитогенетичному рівні. Проводили аналіз рівномірно забарвлених хромосом з груповим каріотипуванням. Визначали частоту хромосомних аберацій в клітинах-індукторах та клітинах-свідках.

Результати. Встановили, що при сумісному культивуванні ЛПК здорових осіб з опроміненими клітинами крові пацієнтів з ХЛЛ середньогрупова частота аберацій хромосом в клітинах-свідках (5,18 ± 0,51 на 100 метафаз) статистично значуще перевищила як їх фоновий рівень, визначений при окремому культивуванні (1,52 ± 0,30 на 100 метафаз, $p < 0,001$)), так і цей показник при ко-культивуванні клітин-свідків з неопроміненими клітинами крові пацієнтів з ХЛЛ (3,31 ± 0,50 на 100 метафаз, $p < 0,01$).

Висновки. Сумісне культивування опромінених *in vitro* клітин крові пацієнтів з В-клітинною ХЛЛ з лімфоцитами периферичної крові умовно здорових осіб призводить до підвищення рівня хромосомної нестабільності в клітинах-свідках внаслідок синергізму між пухлино-індукованим та радіаційно- індукованим ефектами свідка.

Ключові слова: лімфоцити периферичної крові людини, В-клітинно хронічна лімфоцитарна лейкемія, іонізуюча радіація, хромосомна нестабільність, пухлино-індукований ефект свідка.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2020. Вип. 25. С. 353–361. doi: 10.33145/2304-8336-2020-25-353-361

✉ Пілінська Марія Андріївна, *e-mail: pww@ukr.net*

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2020. Вип. 25.

M. A. Pilinska✉, O. V. Shemetun., O. A. Talan, O. B. Dibska, S. M. Kravchenko, V. V. Sholoiko

State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 53 Yuriia Illienka St., Kyiv, 04050, Ukraine

STUDY THE EFFECTS OF IONIZING RADIATION ON THE LEVEL OF CHROMOSOME INSTABILITY IN HUMAN SOMATIC CELLS DURING THE DEVELOPMENT OF TUMOR-INDUCED BYSTANDER EFFECT

Objective: to determine the impact of the irradiated *in vitro* blood cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) on the level of chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes (PBL) from healthy persons during the development of tumor-induced bystander effect.

Materials and methods. Separate and joint cultivation of PBL from healthy persons (cells-bystanders) together with blood cells from CLL patients irradiated *in vitro* at the G_0 stage of the mitotic cycle by γ-quanta ^{137}Cs in a dose of 0.5 Gy ^{137}Cs (cells-inductors) was used. For joint cultivation our own model system for co-cultivation of PBL from individuals of different sex, designed by us to investigate the bystander effects at the cytogenetic level was used. Traditional cytogenetic analysis of uniformly painted chromosomes with group karyotyping was performed. The frequency of chromosome aberrations in cells-inductors and cells-bystanders as the markers of chromosome instability were determined.

Results. Found that at co-cultivation of PBL from healthy individuals with irradiated blood cells from CLL patients the middle group frequency of chromosome aberrations in the bystander cells (5.18 ± 0.51 per 100 metaphases, $p < 0.001$) was statistically significant higher than its background level determined at a separate cultivaton (1.52 ± 0.30 per 100 metaphases), and at co-cultivation with non-irradiated blood cells from CLL patients (3.31 ± 0.50 per 100 metaphases, $p < 0.01$).

Conclusions. Co-cultivation of *in vitro* irradiated blood cells from CLL patients with PBL from healthy persons leads to an increase in the level of chromosome instability in the bystander cells due to synergism between tumor-induced and radiation-induced bystander effects.

Key words: human peripheral blood lymphocytes, B-cell chronic lymphocytic leukemia, ionizing radiation, chromosomal instability, tumor-induced bystander effect.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2020;25:353-361. doi: 10.33145/2304-8336-2020-25-353-361

ВСТУП

До проявів універсального феномену bystander response як відповіді нормальних клітин-реципієнтів на взаємодію з пошкодженими клітинами-донорами належать радіаційно-індукований та пухлино-індукований ефекти свідка (radiation-induced та tumor-induced bystander effects – RIBE та TIBE відповідно), які відіграють суттєву роль у розвитку онкологічної патології людини [1–3]. Вважають, що RIBE збільшує ризик її виникнення, TIBE сприяє реалізації вторинних злоякісних новоутворень у онкологічних хворих, а сумісний генотоксичний вплив при реалізації обох ефектів може істотно обтяжувати прогноз для стану здоров'я і подальшого виживання таких пацієнтів, що потребує ретельного вивчення для розкриття механізмів виникнення вторинних пухлин радіаційного генезу внаслідок променевої терапії онкохворих [3–5].

INTRODUCTION

To the manifestations of the universal phenomenon of bystander response as the response of normal cells-recipients to the interaction with damaged cells-donors belong radiation-induced and tumor-induced bystander effects (RIBE and TIBE, respectively), which play an essential role in the development of human cancer [1–3]. It is believed that RIBE increases the risk of its occurrence, TIBE promotes the realization of secondary malignancies in cancer patients and the combined genotoxic exposure of both effects may significantly complicate the prognosis for the health and subsequent survival of such patients, which requires careful study to uncover the mechanisms of the occurrence of secondary tumors due to radiation therapy of cancer patients [3–5].

✉ Mariya A. Pilinska, *e-mail: pww@ukr.net*

Оскільки характерною ознакою RIBE та TIBE є зростання рівня геномної нестабільності в клітинах-свідках, нами з 2018 р. досліджуються наслідки взаємодії між злоякісними (неопроміненими чи опроміненими) та нормальними соматичними клітинами людини за цитогенетичними показниками стабільності геному. Як індуктор bystander сигналу використовуються малігнізовані клітини крові хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію (ХЛЛ), як клітини-реципієнти (свідки) – нормальні лімфоцити периферичної крові (ЛПК) умовно здорових осіб [6, 7]. Для визначення наслідків взаємодії між цими клітинами застосовується власна модельна система спільного культивування ЛПК, одержаних від осіб різної статі [8] .

На першому етапі досліджень встановлено, що сумісне культивування інтактних клітин крові хворих на ХЛЛ з ЛПК здорових осіб призводить до підвищення рівня хромосомної нестабільності в клітинах-свідках, яке є проявом пухлино-індукованого ефекту свідка [7].

МЕТА

Метою представленої публікації є визначення впливу клітин крові пацієнтів з ХЛЛ, опромінених γ-квантами ^{137}Cs *in vitro*, на рівень хромосомної нестабільності в ЛПК здорових осіб при розвитку пухлино-індукованого ефекту свідка.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для виконання досліджень сформували дві групи спостереження.

До групи порівняння включили 7 умовно здорових волонтерів з необтяженим анамнезом (5 жінок, 2 чоловіків), 6 з яких – люди середнього віку (36–59 років), одна особа – літнього віку (69 років). Всі обстежені заперечували свідомий контакт з іонізуючою радіацією та іншими мутагенними чинниками. В групу онкохворих включили 7 осіб з діагнозом В-клітинна ХЛЛ (5 чоловіків, 2 жінок), двоє з них – люди середнього віку (45 та 55 років відповідно), 5 – люди літнього віку (61–71 рік). Пацієнти з ХЛЛ проходили медичне обстеження в поліклініці ННЦРМ або у відділенні радіаційної гематології Інституту клінічної радіології ННЦРМ. Забір венозної крові в усіх пацієнтів здійснювали до початку лікування. Особи з обох груп брали участь в добровільних цитогенетичних обстеженнях після підписання інформованої згоди.

Згідно з алгоритмом класичного цитогенетичного тесту G_0-radiation sensitivity assay, зразки крові, одер-

As the characteristic feature of RIBE and TIBE is an increase in the level of genomic instability in bystander cells, since 2018 we are investigating the effects of the interaction between malignant (non-irradiated or irradiated) and normal human somatic cells by cytogenetic indicators of genome stability. As the inductor of the bystander signal malignant blood cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) are used, as recipient cells-bystanders normal peripheral blood lymphocytes (PBL) from conditionally healthy individuals are applied [6, 7]. To determine the consequences of the interaction between these cells the own model system for the co-cultivation of PBL obtained from individuals of different sexes is used [8].

In the first phase of our studies it was found that the co-cultivation of the intact blood cells from CLL patients with PBL of healthy subjects leads to an increase in the level of chromosome instability in the bystander cells, which is a manifestation of the tumor-induced bystander effect [7].

OBJECTIVE

The aim of the presented publication is to determine the impact of the irradiated *in vitro* by ^{137}Cs γ-quanta blood cells of CLL patients on the level of chromosome instability in the PBL of healthy persons during the development of tumor-induced bystander effect.

MATERIALS AND METHODS

Two groups of observations were formed to perform the research.

The group of comparison consisted from 7 conditionally healthy volunteers with unburdened anamnesis (5 female, two male), 6 of them were middle-aged (36–59 years old), one was elderly (69 years old). All persons denied conscious contact with ionizing radiation and other mutagenic factors. The group of onco-patients included 7 persons diagnosed with B-cell CLL (5 male, two female), two of them were middle-aged (45 and 55 years respectively) and 5 were elderly (61–71 years). CLL patients underwent medical examination in the NRCRM polyclinic or in the radiation hematology department of the NRCRM. Venous blood was collected from all CLL patients prior to treatment. Individuals from both groups participated in voluntary cytogenetic examinations after informed consent was signed.

According to the classic cytogenetic G_0-radiation sensitivity assay algorithm, whole blood samples from

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2020. Вип. 25.

жані від пацієнтів з ХЛЛ, опромінювали γ-квантами ^{137}Cs (випромінювач IBL-237C, потужність 2,34 Гр/хв) в дозі 0,5 Гр до початку культивування.

При проведенні цитогенетичних досліджень застосовували загальноприйняте окреме культивування ЛПК людини та сумісне культивування ЛПК умовно здорових осіб з опроміненими клітинами крові пацієнтів з ХЛЛ. Для сумісного культивування використовували розроблену нами власну експериментальну модель для вивчення радіаційно-індукованого ефекту свідка [8]. В змішаних культурах кров від кожної умовно здорової особи ко-культивували з кров'ю одного з пацієнтів з ХЛЛ протилежної статі. Клітини-свідки та клітини-індуктори розрізняли за наявністю чи відсутністю статевої чоловічої хромосоми Y.

Для цитогенетичного аналізу гепаринізовану венозну кров (по ~0,3 мл від кожної особи різної статі в змішаних культурах) культивували за напівмікрометодом у нашій модифікації. Окрему чи сумісну культуру ЛПК інкубували в живильному середовищі RPMI 1640 з L-глютаміном (Sigma, USA) без ембріональної телячої сироватки та антибіотиків, з фітогемаглютиніном (PHA, Difco-P, Sigma, USA) впродовж 48 годин (останні 2 години – з колцемідом; Colcemid, Sigma, USA), що дозволяло аналізувати клітини переважно першого культурального мітозу. Після гіпотонічної обробки (0,075 М розчином KCl) і фіксації (абсолютним етанолом та льодяною оцтовою кислотою у співвідношенні 3 : 1) одержували фіксовані клітинні осади, які зберігали у морозильній камері при температурі мінус 20 °С до моменту приготування препаратів метафазних хромосом.

Препарати метафазних хромосом фарбували барвником Гімза (Giemsa stain, Merck, Germany) для проведення традиційного цитогенетичного аналізу рівномірно забарвлених хромосом з груповим каріотипуванням.

Цитогенетичний аналіз проводили «всліпу», на зашифрованих препаратах, під мікроскопами зі збільшенням × 1000. Дешифровку результатів виконували після закінчення хромосомного аналізу всіх клітинних культур. При цитогенетичному аналізі враховували аберації хроматидного (одиночні ацентричні фрагменти, хроматидні обміни) та хромосомного (вільні парні фрагменти, ацентричні кільця, дицентричні та кільцеві хромосоми, аномальні моноцентрики) типів, які вірогідно можна розпізнати при груповому каріотипуванні на рівномірно пофарбованих препаратах метафазних хромосом.

Для кожної точки досліду розраховували відсоток аберантних метафаз та частоту аберацій хромосом на 100 метафаз. Дані по окремих точках досліду об'єднували в групи відповідно до дизайну дослід-

CLL patients were irradiated with ^{137}Cs γ-quanta (IBL-237C emitter, power 2.34 Gy/min) at a dose of 0.5 Gy prior to culturing.

In the course of cytogenetic studies the commonly accepted separate cultivation of human PBL and co-cultivation of PBL from healthy persons with irradiated blood cells of CLL patients were used. For co-cultivation our own experimental model for study the radiation-induced bystander effect was used [8]. In mixed cultures blood from each conditionally healthy individual was co-cultured with the blood of one from CLL patients of the opposite sex. Cells-bystanders and cells- inductors were distinguished by the presence or absence of the sexual male chromosome Y.

For cytogenetic analysis, heparinized whole venous blood (~0.3 ml from each individual of different sex in mixed cultures) was cultured by semimicromethod in our modification. Separate or joint PBL cultures were incubated in RPMI 1640 with L-glutamine (Sigma, USA) without embryonic calf serum and antibiotics, with phytohemagglutinin (PHA, Difco-P, Sigma, USA) for 48 hours (last 2 hours with Colcemid, Sigma, USA), which allowed to analyze cells mainly from the first culture mitosis. After hypotonic treatment (0.075 M KCl solution) and fixation (absolute ethanol and glacial acetic acid in a ratio of 3 : 1) fixed cell sediments were obtained, which were stored in the freezer at minus 20 °C until slides of metaphase chromosome were prepared.

The slides were stained with Giemsa dye (Merck, Germany) for traditional cytogenetic analysis of uniformly painted chromosomes with group karyotyping.

Cytogenetic analysis was performed «blindly» on encrypted slides, under microscopes with magnification × 1000. The decryption of the results was performed after the end of chromosomal analysis of all cell cultures. In cytogenetic analysis the aberrations of chromatid (single acentric fragments, chromatid exchanges) and chromosome (free double fragments, acentric rings, dicentric and ring chromosomes, abnormal monocentrics) types were taken into account, which can probably be recognized by group karyotyping on uniformly stained preparations of metaphase chromosomes.

For each experiment point the percentage of aberrant metaphases and the frequency of chromosome aberrations per 100 metaphases were calculated. Data for individual points of the experiment were com-

ження з подальшим розрахунком середньогрупових значень і статистичних похибок. Знаходили різницю між середніми значеннями в окремих варіантах дослідження. Перевірку нульових гіпотез проводили на рівні значущості $p \leq 0,05$ за допомогою критерія Стьюдента [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

При окремому культивуванні ЛПК умовно здорових осіб (клітин-свідків) фонові частоти аберацій хромосом не відрізнялись поміж собою ($p > 0,05$), коливались в межах (1,05 ± 0,47) – (2,00 ± 0,81) на 100 метафаз і складали в середньому 1,52 ± 0,30 на 100 клітин, що відповідало популяційній частоті спонтанних пошкоджень хромосом у осіб середнього та літнього віку [10]. В усіх випадках значно переважали прості аберації хроматидного типу (виключно одиночні ацентричні фрагменти), які зустрічались з частотою 1,28 ± 0,28 на 100 клітин і складали 84 % від загальної кількості зареєстрованих пошкоджень хромосом, що також характерно для спонтанного хромосомного мутагенезу в ЛПК людини. Середньогруповий рівень аберацій хромосомного типу становив 0,24 ± 0,12 на 100 клітин. Майже в усіх випадках вони були представлені парними ацентричними фрагментами, частота яких по групі в середньому складала 0,18 ± 0,11 на 100 метафаз. В одному випадку серед 255 проаналізованих метафаз зафіксовано один аномальний моноцентрик 0,39 ± 0,39 на 100 клітин, що загалом складало 1 на 1647 проаналізованих метафаз і становило 0,06 ± 0,06 на 100 клітин по групі в середньому, що відповідало їхній популяційній частоті [10].

При окремому культивуванні клітин крові пацієнтів з ХЛЛ, опромінених in vitro γ-квантами ^{137}Cs в дозі 0,50 Гр (клітин-індукторів), розкид індивідуальних значень сумарної частоти аберантних клітин коливався від (10,00 ± 3,87) до (14,00 ± 4,91) % і становив (11,87 ± 1,33) % по групі в середньому, а сумарної частоти аберацій хромосом – від 12,00 ± 3,25 до 14,44 ± 2,57 на 100 метафаз та 13,46 ± 1,30 на 100 метафаз по групі в середньому, оскільки 57 % пошкоджених клітин містили по дві хромосомні аберації. Слід відзначити, що в усіх випадках спостерігали не тільки радіаційно-індукований цитогенетичний ефект, характерний для дії іонізуючого випромінювання в культурі ЛПК людини на G_0 стадії мітотичного циклу, а саме – перевищення спонтанної частоти асиметричних і симетричних обмінних аберацій, які є класичними цитогенетичними маркерами радіаційного впливу (дицентричні та кільцеві

bined into groups according to the study design, followed by the calculation of mean-group values and statistical errors. The difference between the mean-group values in the different study variants was determined. The null hypothesis was tested at a significance level of $p \leq 0.05$ using the Student's t-test [9].

RESULTS AND DISCUSSION

When the separate cultivation of PBLs of conditionally healthy individuals (cells-bystanders) the background frequencies of chromosome aberrations did not differ from each other ($p > 0.05$), ranging from 1.05 ± 0.47 to 2.00 ± 0.81 per 100 metaphases and were on average 1.52 ± 0.30 per 100 cells, which corresponded to the population frequency of spontaneous chromosome damages in middle-aged and elderly [10]. In all cases simple aberrations of the chromatid type (only single acentric fragments) which met with the frequency 1.28 ± 0.28 per 100 cells and constituted 84 % of the total number of the registered chromosomal lesions, which is also characteristic for spontaneous chromosomal mutagenesis in the human PBL. The mean-group level of chromosomal type aberrations was 0.24 ± 0.12 per 100 cells. In almost all cases they were represented by double acentric fragments with the mean-group frequency 0.18 ± 0.11 per 100 metaphases. In one case among the 255 metaphases analyzed one abnormal monocentric 0.39 ± 0.39 per 100 cells was recorded, which was a total of 1 per 1647 metaphases 0.06 ± 0.06 per 100 cells per group on average which corresponded to their population frequency [10].

When the separate cultivation of blood cells of CLL patients irradiated in vitro with ^{137}Cs γ-quanta at a dose of 0.50 Gy (cells-inductors) the variation of the individual values of the total frequency of aberrant cells ranged from (10.00 ± 3.87) to (14.00 ± 4.91) % and was (11,87 ± 1,33) % by group on average. The total chromosome aberration frequency ranged from 12.00 ± 3.25 to 14.44 ± 2.57 per 100 metaphases and 13.46 ± 1.30 per 100 metaphases per group on average, as 57 % of damaged cells contained two chromosomal aberrations. It should be noted that in all cases was observed not only radiation-induced cytogenetic effect characteristic for the effect of ionizing radiation in the culture of human PBL in the G_0 stage of the mitotic cycle, namely, the excess of the spontaneous frequency of asymmetric and symmetric exchanges, which are classic cytogenetic markers of radiation

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2020. Вип. 25.

хромосоми – 1,57 ± 0,43 та 0,48 ± 0,24 на 100 метафаз відповідно; аномальні моноцентрики, які формуться за рахунок транслокацій та інверсій – 1,08 ± 0,36 на 100 метафаз) [11], але й зростання частоти простих аберацій хроматидного та хромосомного типів (одиночні ацентричні фрагменти – 5,66 ± 0,80 на 100 метафаз, вільні парні фрагменти – 4,09 ± 0,69 на 100 метафаз), які вважаються цитогенетичними маркерами геномної нестабільності [8].

При сумісному культивуванні інтактних нормальних ЛПК (клітини-свідки) з опроміненими клітинами крові хворих на ХЛЛ (клітини-індуктори) в клітинах-свідках в усіх випадках зросли індивідуальні значення сумарних частот аберацій хромосом з коливаннями від 4,35 ± 1,34 до 5,93 ± 1,44 на 100 метафаз, завдяки чому їх середньогрупова частота 5,18 ± 0,51 на 100 метафаз перевищила фоновий рівень – 1,52 ± 0,30 на 100 метафаз ($p < 0,001$). В спектрі хромосомних порушень, зафіксованих в клітинах-свідках, так, як і при окремому культивуванні, переважали прості аберації хроматидного і хромосомного типів (одиночні та парні ацентричні фрагменти – 3,17 ± 0,40 та 1,85 ± 0,31 на 100 метафаз відповідно), але рівні їх були вищі саме в змішаних культурах ($p < 0,01$), що свідчить про розвиток в клітинах-свідках хромосомної нестабільності.

Для оцінки внеску в дестабілізацію геному клітин-свідків впливу злоякісно-трансформованих клітин (TIBE) та іонізуючої радіації (RIBE) ми порівняли отримані дані з результатами нашого попереднього дослідження феномену TIBE за аналогічним алгоритмом [7]. Нами було встановлено, що при сумісному культивуванні ЛПК умовно здорових осіб з інтактними клітинами крові пацієнтів з ХЛЛ у 86 % випадків зросли індивідуальні рівні хромосомних аберацій в клітинах-свідках: (2,73 ± 1,55) – (4,39 ± 1,92) на 100 метафаз, що призвело до зростання їх середньогрупової частоти до 3,31 ± 0,50 на 100 метафаз, яка перевищувала таку при окремому культивуванні цих клітин – 1,52 ± 0,30 на 100 метафаз ($p < 0,001$), але була нижче, ніж при ко-культивуванні ЛПК умовно здорових осіб з опроміненими малігнізованими клітинами – 5,18 ± 0,51 на 100 метафаз ($p < 0,01$) (рис. 1).

Оскільки для стимуляції клітинного поділу в окремих і змішаних культурах ми традиційно використовували фітогемаглютинін, який не є мітогеном для малігнізованих В-лімфоцитів [12], цитогенетичний ефект при всіх варіантах експериментів міг бути зафіксований нами тільки в Т-лімфоци-

exposure (dicentrics and centric rings – 1.57 ± 0.43 and 0.48 ± 0.24 per 100 metaphases, respectively; abnormal monocenters formed by translocations and inversions – 1.08 ± 0.36 per 100 metaphases) [11], but also increasing the frequency of simple aberrations of chromatid and chromosome types (single acentric fragments – 5.66 ± 0.80 per 100 metaphases, free double fragments – 4.09 ± 0.69 per 100 metaphases), which considered the cytogenetic markers of genomic instability [8].

When the co-cultivation of intact normal PBLs (cells-bystanders) with irradiated blood cells of CLL patients (cells-inductors) the individual values of the total frequencies of chromosome aberrations in cells-bystanders were elevated in all cases with fluctuations from 4.35 ± 1.34 to 5.93 ± 1.44 per 100 metaphases and mean-group frequency 5.18 ± 0.51 per 100 metaphases which was higher than their background level – 1.52 ± 0.30 per 100 metaphases ($p < 0.001$). In the spectrum of chromosomal abnormalities revealed in the cells-bystanders, as under separate cultivation, simple aberrations of the chromatid and chromosome types prevailed (free single and double acentric fragments – 3.17 ± 0.40 and 1.85 ± 0.31 per 100 metaphases respectively), but their levels were higher namely in mixed cultures ($p < 0.01$), indicating the development of chromosome instability in the bystander cells.

To evaluate the contribution into the destabilization of bystander cells genome the impact of malignantly transformed cells (TIBE) and ionizing radiation (RIBE) we compared obtained data with the results of our previous study of TIBE phenomenon by a similar algorithm [7]. We found that under co-cultivation of PBL of conditionally healthy persons with intact blood cells of CLL patients in 86% of cases increased individual levels of chromosome aberrations in bystander cells (2.73 ± 1.55) – (4.39 ± 1.92) on 100 metaphases were revealed, that led to the elevation of their mean group frequency till 3.31 ± 0.50 per 100 metaphases, which exceeded such under separate culturing of these cells – 1.52 ± 0.30 per 100 metaphases ($p < 0.001$), but was lower than under co-cultivation of bystander cells with irradiated malignant cells – 5.18 ± 0.51 per 100 metaphases ($p < 0.01$) (Fig. 1).

Because for the stimulation of cell division both in separate and mixed cultures we traditionally used phytohemagglutinin, which is not a mitogen for malignant B lymphocytes [12], the cytogenetic effect in all variants of experiments could be recorded only in T lymphocytes, which under the sepa-

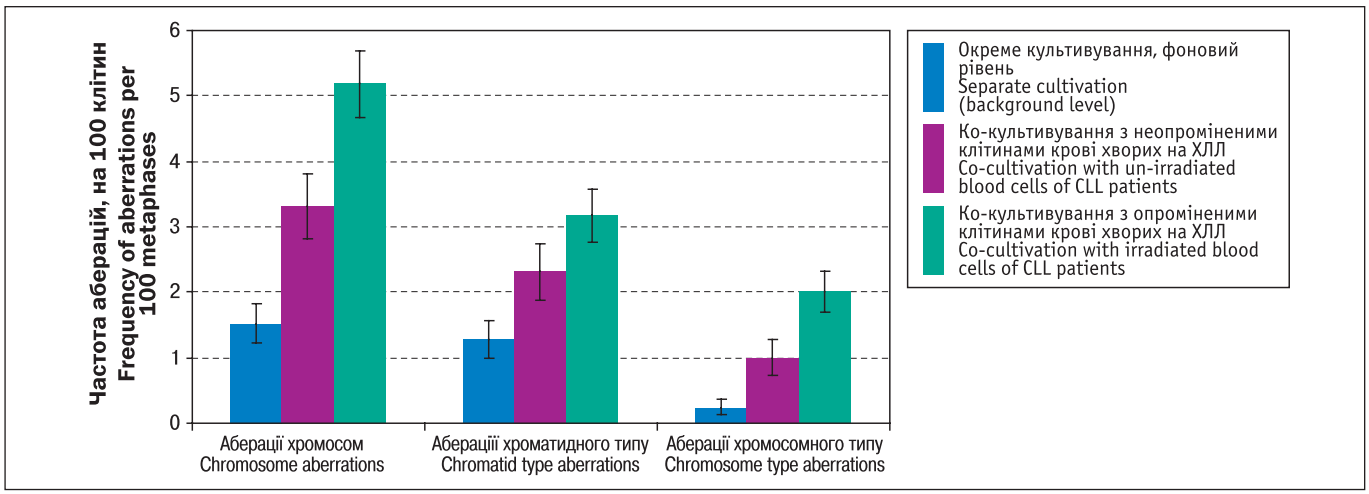

Рисунок 1. **Частота аберацій хромосом в клітинах-свідках (ЛПК умовно здорових осіб) при різних умовах культивування**

Figure 1. **The frequency of chromosome aberrations in cells-bystanders (PBL of relatively healthy individuals) under different conditions of cultivation**

тах, які при окремому культивуванні клітин неопроміненої крові пацієнтів з ХЛЛ могли бути первинними клітинами-свідками, що одержали bystander сигнал від малігнізованих В-лімфоцитів ще in vivo та/чи in vitro, а при сумісному культивуванні з нормальними ЛПК ставали вже клітинами-індукторами для ЛПК здорових осіб – вторинних клітин-свідків.

Опромінення крові пацієнтів з ХЛЛ призводило до підвищення частоти всіх типів хромосомних аберацій як в Т-лімфоцитах-індукторах при окремому культивуванні (внаслідок прямої мутагенної дії іонізуючої радіації та bystander сигналу з малігнізованих В-лімфоцитів), так і в Т-лімфоцитах-свідках зі змішаних культур (як наслідок сумісного генотоксичного впливу при розвитку обох феноменів – TIBE та RIBE).

Отримані результати дозволяють припустити, що застосована нами модельна система для вивчення впливу іонізуючої радіації на рівень хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини при розвитку пухлино-індукованого ефекту свідка, в якій клітинами-індукторами були опромінені in vitro клітини цільної крові пацієнтів з В-клітинною ХЛЛ, а клітинами-свідками – інтактні Т-лімфоцити крові здорових осіб, може бути прийнятною для дослідження не тільки первинних, але й вторинних проявів феномену bystander response, що є актуальним завданням подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

Сумісне культивування опромінених in vitro клітин крові пацієнтів з В-клітинною хронічною лімфоцитарною лейкемією (клітин-індукторів) з лімфоцита-

rate cultivation of the non-irradiated blood from CLL patients could be the primary bystander cells that received bystander signal from malignant B-lymphocytes even in vivo and/or in vitro, and when co-cultured with normal PBL they became already cells-inducers for the PBL of healthy individuals – secondary cells-bystanders.

The in vitro irradiation of the blood from CLL patients led to the elevated frequency of all types of chromosome aberrations both in T-lymphocytes-inducers in separate cultures (due to direct mutagenic effect of ionizing radiation and bystander signal from malignant B lymphocytes) and in T-lymphocytes-bystanders in joint cultures (as a consequence of compatible genotoxic effects in the realization of both phenomena – TIBE and RIBE).

The results obtained allowed to suggest that used by us model system to study the effect of ionizing radiation on the level of chromosome instability in human somatic cells in the development of tumor-induced bystander effect in which the inducer cells were irradiated in vitro in whole blood PBL of patients with B-cell CLL and bystander cells were intact T-PBL of healthy individuals, it may be acceptable to study not only the primary but also the secondary manifestations of the bystander response phenomenon, which is an urgent task of further investigations.

CONCLUSIONS

Co-cultivation of in vitro irradiated blood cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (cells-inductors) with intact peripheral blood lym-

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2020. Вип. 25.

ми периферичної крові умовно здорових осіб (клітин-свідків) призводить до підвищення рівня хромосомної нестабільності в клітинах-свідках внаслідок синергізму між пухлино- та радіаційно- індукованими ефектами свідка.

phocytes of conditionally healthy individuals (cells-bystanders) leads to an increase in the level of chromosome instability in bystander cells due to the synergism between the tumor- and radiation- induced bystander effects.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Verma N., Tiku A. B. Significance and nature of bystander responses induced by various agents. *Mutat. Res.* 2017. Vol. 773. P. 104–121. doi: 10.1016/j.mrrev.2017.05.003.
2. Burdak-Rothkamm S., Rothkamm K. Radiation-induced bystander and systemic effects serve as a unifying model system for genotoxic stress responses. *Mutat. Res.* 2018. Vol. 778. P. 13–22. doi: 10.1016/j.mrrev.2018.08.001.
3. Shemetun O. V., Pilinska M. A. Radiation-induced bystander effect – modeling, manifestation, mechanisms, persistence, cancer risks (literature review). *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2019. Вип. 24. P. 65–92. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-65-92.
4. Wang R, Zhou T, Liu W, Zuo L.. Molecular mechanism of bystander effects and related abscopal/cohort effects in cancer therapy. *Oncotarget*. 2018. Vol. 9, no. 26. P. 18637–18647. doi: 10.18632/oncotarget.24746.
5. Djomina E. A. Early and late radiation effects in healthy tissues of oncologic patients under therapeutic irradiations. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2017. Вип. 22. P. 23–37.
6. Evaluation of the interaction between malignant and normal human peripheral blood lymphocytes under cocultivation and separate cultivation / D. A. Kurinnyi, S. R. Rushkovsky, O. M. Demchenko et al. *Cytol. Genet.* 2020. Vol. 54, no. 2. P. 124–129. https://doi.org/10.3103/S0095452720020103
7. Cytogenetic effects in mixed culture of blood cells from patients with chronic lymphocytic leukemia with blood lymphocytes of healthy individuals / M. A. Pilinska, O. V. Shemetun., O. A. Talan et al. *Dop Nac Acad Nauk Ukr.* 2020. no. 7. P. 86-93. https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.07.086
8. Shemetun O. V., Talan O. A., Pilinska M. A. [Cytogenetic features of induction and persistence the bystander effect in human blood lymphocytes]. *Cytol. Genet.* 2014. Vol. 48, no. 4. P. 51–58.
9. Атраментова Л. А. Дизайн и статистика (биологические исследования). Харьков. : НТМТ, 2014. 255 с.
10. Талан О. О. Цитогенетичні показники при спонтанному та радіаційно-індукованому соматичному хромосомному мутагенезі в осіб різного віку : автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.15 / Талан Оксана Олексіївна. Київ, 2012. 20 с.
11. Djomina E. A. The dependence of dose/effects in human radiation *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2019. Вип. 24. P.235–249. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-235-249.
12. Сладкова Е. А., Скоркина М. Ю., Шамрай Е. А. Особенности митогенного ответа лимфоцитов периферической крови больных лимфолейкозом. *Журн. мед.-биол. исследований.* 2018. Т. 6, № 2. С. 165-173. doi: 10.17238/issn 2542–1298. 2018.6.2.165.

REFERENCES

1. Verma N, Tiku AB. Significance and nature of bystander responses induced by various agents. *Mutat Res.* 2017;773:104-121. doi: 10.1016/j.mrrev.2017.05.003.
2. Burdak-Rothkamm S, Rothkamm K. Radiation-induced bystander and systemic effects serve as a unifying model system for genotoxic stress responses. *Mutat Res.* 2018;778:13-22. doi: 10.1016/j.mrrev.2018.08.001.
3. Shemetun OV, Pilinska MA. Radiation-induced bystander effect – modeling, manifestation, mechanisms, persistence, cancer risks (literature review). *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2019;24:65-92. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-65-92.
4. Wang R, Zhou T, Liu W, Zuo L.. Molecular mechanism of bystander effects and related abscopal/cohort effects in cancer therapy. *Oncotarget*. 2018;9(26):18637-18647. doi: 10.18632/oncotarget.24746.
5. Djomina EA. Early and late radiation effects in healthy tissues of oncologic patients under therapeutic irradiations. *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2017;22:23-37.
6. Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Demchenko OM, Sholoiko W, Pilinska MA. Evaluation of the interaction between malignant and normal human peripheral blood lymphocytes under cocultivation and separate cultivation. *Cytol Genet.* 2020;54(2):124-129. https://doi.org/10.3103/S0095452720020103
7. Pilinska MA, Shemetun OV, Talan OA, Dibska OB, Kravchenko SM, Sholoiko W. Cytogenetic effects in mixed culture of blood cells from patients with chronic lymphocytic leukemia with blood lymphocytes of healthy individuals. *Dop Nac Acad Nauk Ukr.* 2020;7:86-93. https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.07.086
8. Shemetun OV, Talan OA, Pilinska MA. Cytogenetic features of induction and persistence of radiation-induced bystander effect in human lymphocytes. *Cytol Genet.* 2014;48(4):51-58.
9. Atramentova LA. [Design and statistics (biological research)]. Kharkov: NTMT; 2014. 255 p. Russian.
10. Talan OO. [Cytogenetic parameters in spontaneous and radiation-induced somatic chromosomal mutagenesis in people of different ages: author. dis. ... cand. biol. sciences]. Kyiv: NRCRM, NAMS of Ukraine; 2012. 20 c.
11. Djomina EA. The dependence of dose/effects in human radiation cytogenetics. *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2019;24:235-249. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-235-249.
12. Sladkova EA, Skorkina MYu, Shamrai EA. [Mitogenic response of peripheral blood lymphocytes in patients with lymfocytic leukaemia]. *Journal of Medical and Biological Research.* 2018;6(2):165-173. doi: 10.17238/issn 2542-1298. 2018.6.2.165. Russian.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

Пілінська Марія Андріївна, доктор медичних наук, професор, головний науковий співробітник лабораторії цитогенетики відділу медичної генетики, Інститут експериментальної радіології ННЦРМ, м. Київ

Шеметун Олена Володимирівна, доктор медичних наук, старший науковий співробітник, завідувачка лабораторії цитогенетики відділу медичної генетики, Інститут експериментальної радіології ННЦРМ, м. Київ

Талан Оксана Олексіївна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії цитогенетики відділу медичної генетики, Інститут експериментальної радіології ННЦРМ, м. Київ

Дибська Олена Борисівна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії цитогенетики відділу медичної генетики, Інститут експериментальної радіології ННЦРМ, м. Київ

Кравченко Сергій Миколаєвич, лікар-гематолог поліклініки радіаційного реєстру клінко-епідеміологічного реєстру і консультативної допомоги, Інститут клінічної радіології ННЦРМ, м. Київ

Шолойко Валентина Василівна, науковий співробітник відділення радіаційної онкогема-тології та трансплантації стовбурових клітин Інститут клінічної радіології ННЦРМ, м. Київ

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Mariya A. Pilinska, Doctor of Medical Sciences, professor, Chief Researcher of the Cytogenetic Laboratory, Department of Medical Genetics, Experimental Radiology Institute NRCRM, Kyiv, Ukraine

Olena V. Shemetun, Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher, Head of the Cytogenetic Laboratory, Department of Medical Genetics, Experimental Radiology Institute NRCRM, Kyiv, Ukraine

Oksana O. Talan, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of the Cytogenetic Laboratory, Department of Medical Genetics, Experimental Radiology Institute NRCRM, Kyiv, Ukraine

Olena B. Dibska, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of the Cytogenetic Laboratory, Department of Medical Genetics, Experimental Radiology Institute NRCRM, Kyiv, Ukraine

Sergiy M. Kravchenko, Hematologist, Polyclinic of the Radiation Register, Clinico-epidemiological Register and Consultative Assistance, Clinical Radiology Institute NRCRM, Kyiv, Ukraine

Valentyna V. Sholoiko, Research Fellow, Department of Radiation Oncohematology and Stem Cell Transplantation, Clinical Radiology Institute NRCRM, Kyiv, Ukraine

Стаття надійшла до редакції 14.04.2020 *Received: 14.04.2020*