

УДК 575.1:577.21:616.155.3:616-001.28

Н. А. Голярник✉, І. М. Ільєнко, Л. М. Зварич, Д. А. Бази́ка

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

## ПОРУШЕННЯ ЦИКЛІН D1-ЗАЛЕЖНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ УЧАСНИКІВ ЛІКВІДАЦІЇ НАСЛІДКІВ АВАРІЇ НА ЧАЕС У ВІДДАЛЕНОМУ ПЕРІОДІ ПІСЛЯ ОПРОМІНЕННЯ

**Мета:** визначити особливості проліферативного потенціалу лімфоцитів периферичної крові учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС за рівнем експресії цикліну D1 та кількісними показниками клітинного циклу у віддаленому періоді після опромінення.

**Матеріали і методи.** Об'єктом дослідження були лімфоцити периферичної крові (ПК) учасників ліквідації наслідків аварії (ЛНА) на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення (> 30 років). Обстежено 207 осіб чоловічої статі, із них 164 учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у діапазоні доз 10,43–3623,31 мЗв та 43 особи контрольної групи. Дослідження проліферативного потенціалу (ініціація клітинного циклу) та рівнів експресії цикліну D1 у лімфоцитах ПК проводили *in vitro* з використанням мікрометоду культивування лейкоцитів цільної крові з фітогемаглютиніном-Р (ФГА). Пробопідготовку виконували за стандартною методикою імунофлуоресцентного забарвлення внутрішньоклітинних білків з використанням реагентів FITC Mouse Anti-Human Cyclin D1 Antibody Set (BD, США). Параметри клітинного циклу досліджували шляхом забарвлення ядер клітин пропідію йодидом (Sigma, США) у режимі ДНК-гістограм з відокремленням G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-, S- та G<sub>2</sub>/M-регіонів (фази клітинного циклу) та Sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-регіону (ядра клітин у стані апоптозу). Аналіз проводили на проточному цитометрі FACSCalibur (BD, США).

**Результати та висновки.** Проведено кількісну оцінку проліферативного потенціалу лімфоцитів ПК учасників ЛНА на ЧАЕС за показниками клітинного циклу і рівнем експресії білка циклін D1 спонтанно та у короточасній культурі лімфоцитів *in vitro*. У віддаленому періоді після опромінення визначено підвищення рівня спонтанної експресії цикліну D1 і порушення циклін D1-залежної регуляції клітинного циклу лімфоцитів ПК після активації мітогеном. Підвищення рівня експресії цикліну D1 супроводжувалось збільшенням пулу клітин у S- та G<sub>2</sub>/M-фазах клітинного циклу, що характеризує високий проліферативний потенціал лімфоцитів ПК. Виявлено мітоген-індуковану затримку клітинного циклу лімфоцитів у G<sub>1</sub>/S-контрольній точці, скорочення S-фази. Дані зміни є проявом нестабільності геному, зумовлені дією радіації та залежать від дози опромінення. Отримані результати підтверджують гіпотезу, щодо значення рівнів експресії цикліну D1, як критеріїв проявів нестабільності геному та ризиків онкогенезу у віддаленому періоді після опромінення.

**Ключові слова:** клітинний цикл, проліферація, циклін D1, нестабільність геному, радіаційне опромінення, учасники ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС.

*Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2020. Вип. 25. С. 430–442. doi: 10.33145/2304-8336-2020-25-430-442*

✉ Голярник Наталія Анатоліївна, e-mail: golyarnik@ua.fm

N. A. Golyarnik✉, I. M. Ilyenko, L. M. Zvarych, D. A. Bazyka

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

## CHANGES OF CYCLIN D1-DEPENDENT REGULATION OF CELL CYCLE IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF CHORNOBYL CLEAN-UP WORKERS AT A REMOTE PERIOD AFTER RADIATION EXPOSURE

**Objective:** To study proliferative potential of peripheral blood lymphocytes of Chernobyl clean-up workers by level of expression of cyclin D1 and quantitative parameters of cell cycle at a remote period after radiation exposure.

**Materials and methods.** The research subject was the peripheral blood lymphocytes (PB) of Chernobyl clean-up workers 30–33 years after radiation exposure. A total of 207 men were surveyed, 164 of them were clean-up workers exposed in the dose range 10.43–3623.31 mSv and 43 persons of the control group. Analysis of proliferation potential (cell cycle initiation) and cyclin D1 expression in PB lymphocytes were performed *in vitro* by a micro method of whole blood leukocytes culture with phytohemagglutinine-P (PHA). Sample preparation was performed by a standard immunofluorescent assay for intracellular proteins using the FITC labelled Mouse Anti-Human Cyclin D1 Antibody Set. Cell distribution by cell cycle phases studied by propidium iodide DNA staining and analysis on FACSCalibur laser flow cytometer in histogram mode with separation of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-, S- and G<sub>2</sub>/M-regions and Sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-region (apoptotic cells).

**Results and conclusions.** An increase in the level of spontaneous cyclin D1 expression and disturbance of cyclin D1-dependent regulation of cell cycle of PB lymphocytes after mitogen activation were determined in a remote period after radiation exposure. An increase in the level of cyclin D1 expression was accompanied by increase in pool of cells in the S- and G<sub>2</sub>/M-phases of cell cycle which characterizes the high proliferative potential of PB lymphocytes. Mitogen-induced delay of cell cycle of lymphocytes in G<sub>1</sub>/S check point and reduction of S-phase was revealed. These changes are a manifestation of genomic instability caused by the effect of radiation and depend on the radiation dose. The results confirm the hypothesis about the significance of levels of cyclin D1 expression, as a criterion for manifestations of genome instability and risks of oncogenesis in a remote period after irradiation.

**Key words:** cell cycle, cell proliferation, cyclin D1, genome instability, radiation exposure, Chernobyl clean-up workers.

*Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2020;25:430-442. doi: 10.33145/2304-8336-2020-25-430-442*

### ВСТУП

Біологічні ефекти віддалених наслідків радіаційного опромінення, а також механізми їх довгострокового збереження недостатньо вивчені та залишаються пріоритетним напрямком досліджень сучасної медицини і радіобіології [1, 2].

Цитотоксична дія іонізуючої радіації (IP) реалізується через ураження генетичного і мембранного апарату клітини, модифікації експресії генів і метаболічної активності їх продуктів, що суттєво порушує клітинний гомеостаз [3–8]. Ступінь ураження залежить від дози опромінення. Хромосомні аберації, делеції, транслокації зберігаються і після репарації ДНК та у віддаленому періоді після опромінення, що свідчить про порушення механізмів контролю репарації ДНК, сигнальної трансдукції, апоптозу, проліферації та регуляції клітинного циклу [9–11].

### INTRODUCTION

The long-term biological effects of radiation exposure, as well as the mechanisms of their long-term preservation are insufficiently studied and remain a priority area of research in medicine and radiobiology [1, 2].

The cytotoxic effect of ionizing radiation (IR) is realized through damage of genetic and membrane apparatus of the cell, alteration of gene expression and metabolic activity of their products, significantly disturbance cell homeostasis [3–8]. The damage rate depends on the dose. Chromosomal aberrations, deletions and translocations persist after DNA repair and in a remote period after irradiation, which indicates a violation of the control mechanisms of DNA repair, signal transduction, apoptosis, proliferation and cell cycle regulation [9–11].

✉ Natalia A. Golyarnik, e-mail: golyarnik@ua.fm

Відомо, що в регуляції клітинного циклу після дії іонізуючої радіації задіяні два основні механізми: один забезпечується послідовною експресією білків – циклінів і утворенням комплексів CDK-циклін, а інший пов'язаний з експресією генів родини RAS [12].

Циклін D1 – білок, продукт гена *CCND1*, локалізованого на 11-й хромосомі у локусі 11q13, є частиною молекулярного комплексу, що регулює клітинний цикл під час переходу клітин  $G_1/S$ -фази. Активація експресії цикліну D1 відбувається шляхом мітогенної сигналізації із залученням Ras/Raf білків та мітоген-активованих протеїнкіназ (MAPK, mitogen-activated protein kinase) [13] і регулюється як на транскрипційних, так і на посттрансляційних рівнях. Циклін D1 накопичується в ядрі в результаті інактивації PI3K (Phosphatidylinositol-3-OH kinase) та AKT (протеїнкіназа B) – залежного фосфорилування GSK-3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase 3 beta) [14]. Рівень цикліну D1 в ядрі нестабільний, змінюється протягом всього клітинного циклу; у нормі, рівень цикліну D1 збільшується під час  $G_0/G_1$ -фази і знижується, коли клітини вступають у S-фазу [15]. Диспропорційне накопичення цикліну D1 в ядрі супроводжується надмірною проліферацією клітин, що мають вкорочену  $G_1$ -фазу, та втратою ними здатності реагувати на фізіологічні чинники росту. Гіперекспресія цикліну D1 може бути результатом неконтрольованої ампліфікації гена *CCND1*, транслокації фрагментів хромосоми у 11q13 локусі, викликатися підвищеною чутливістю неопластичних клітин до зовнішніх сигналів [16] і бути наслідком порушення механізмів його деградації [17]. Радіаційно-індукована нестабільність геному, гіперекспресія гена *CCND1*, зміна вмісту білків-регуляторів клітинного циклу, а також наявність екзогенних і ендогенних чинників, що впливають на функціонування механізмів внутрішнього контролю, викликають порушення клітинного гомеостазу та лежать в основі неопластичної трансформації клітин [18, 19].

## МЕТА

Визначити особливості проліферативного потенціалу лімфоцитів периферичної крові учасників ліквідації наслідків аварії (ЛНА) на ЧАЕС за рівнем експресії цикліну D1 та кількісними показниками клітинного циклу у віддаленому періоді після опромінення.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом дослідження були лімфоцити периферичної крові (ПК) учасників ЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення (> 30 років). Обстеже-

It is known that two main mechanisms are involved in the regulation of cell cycle after radiation exposure. One is provided by sequential expression of proteins – cyclins and formation of CDK-cyclin complexes and other is related to expression RAS family gene [12].

Cyclin D1 protein is a product of *CCND1* gene that is localized on chromosome 11 at the 11q13 locus and is part of the molecular complex that regulates cell cycle during  $G_1/S$ -phase cell transition. Cyclin D1 expression is activated by mitogen signaling involving Ras/Raf proteins and mitogen-activated protein kinases [13] and is regulated at both transcriptional and post-translational levels. Cyclin D1 accumulates in the nucleus as a result of inactivation of PI3K (Phosphatidylinositol-3-OH kinase) and AKT (protein kinase B) – dependent phosphorylation of GSK3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase 3 beta) [14]. The level of cyclin D1 in the nucleus is unstable. It changes throughout the cell cycle; normally, the level of cyclin D1 increases during the  $G_0/G_1$ -phase and decreases when cells enter the S-phase [15]. Disproportionate accumulation of cyclin D1 in the nucleus is accompanied by excessive proliferation of cells that have a shortened  $G_1$ -phase and they lose the ability to respond to physiological growth factors. Overexpression of cyclin D1 may be the result of uncontrolled amplification of the *CCND1* gene, translocation of chromosome fragments at the 11q13 locus, caused by hypersensitivity of neoplastic cells to external signals [16] and be the result of disruption of its degradation mechanisms [17]. Radiation-induced genome instability, *CCND1* gene overexpression, changes in cell cycle regulatory proteins and the presence of exogenous and endogenous factors that affect the functioning of internal control mechanisms, disrupt cellular homeostasis and underlie the neoplastic transformation of cells [18, 19].

## OBJECTIVE

To study features of proliferative potential of peripheral blood lymphocytes of Chernobyl clean-up workers by level of expression of cyclin D1 and quantitative indicators parameters of cell cycle in a remote period after radiation exposure.

## MATERIALS AND METHODS

The object of study was PB lymphocytes of Chernobyl clean-up workers in a remote period after radiation exposure (> 30 years). A study was performed i

но 207 осіб чоловічої статі у віці ( $58,73 \pm 7,14$ ) років, із них 164 учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у діапазоні доз 10,43–3623,31 мЗв та 43 особи контрольної групи, доза опромінення яких не перевищувала значення природного фону. Для аналізу дозозалежних ефектів обстежені пацієнти, учасники ЛНА на ЧАЕС, були розподілені на три підгрупи: 1-ша підгрупа – 50 учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у діапазоні доз 10–100 мЗв ( $10 < D \leq 100$ ); 2-га підгрупа – 73 особи з дозою опромінення 103–498 мЗв ( $100 < D \leq 500$ ); 3-тя підгрупа – 41 особа з дозою опромінення 512–3623 мЗв ( $D \geq 500$  мЗв).

Критеріями виключення пацієнтів з обстеження були: наявність апластичних станів гемопоєзу, злоякісних новоутворень, тяжких соматичних захворювань у стадії загострення, обтяжений алергологічний анамнез, відмова пацієнтів від участі в обстеженні.

Визначення проліферативного потенціалу та експресії цикліну D1 у лімфоцитах ПК проводили з використанням мікрометоду культивування лейкоцитів цільної крові. Лейкоцити цільної крові стимулювали фітогемаглютиніном-Р (ФГА) в концентрації 10 мкг/мл і культивували у живильному середовищі RPMI-1640 з L-глутаміном та натрію гідрокарбонатом  $\text{NaHCO}_3$  (Sigma, США) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 100 мкг/мл гентаміцину в інкубаторі при 5 %  $\text{CO}_2$ , температурі – 37 °C і 95 % вологості у 96-лункових плоскодонних культуральних планшетах протягом 18 годин.

Спонтанний і мітоген-індукований рівні цикліну D1 у лімфоцитах ПК визначали за стандартною, рекомендованою виробником, методикою імунофлуоресцентного забарвлення внутрішньоклітинних білків з використанням реагентів FITC Mouse Anti-Human Cyclin D1 Antibody Set (BD, США), що включає FITC-кон'югати МКАТ миші Anti-Human Cyclin D1 та IgG1 – ізотиповий (негативний) контроль. Аналіз проводили на проточному цитометрі FACSCalibur (BD, США) за допомогою програмного забезпечення CellQuest Pro (BD, США) для 20 000 подій у режимі «Dot Histogram». Аналіз спонтанного та ФГА-індукованого розподілу клітин за фазами клітинного циклу проводили із забарвленням ядер клітин пропідію йодидом (Sigma, США) у робочій концентрації. Аналіз проводили у режимі ДНК-гістограм з відокремленням  $G_0/G_1$ -, S- та  $G_2/M$ -регіонів (фази клітинного циклу) та Sub- $G_0/G_1$  регіону (ядра клітин у стані апоптозу).

Результати статистично опрацювали у програмі Statistica 10.

on 207 male, aged ( $58,73 \pm 7,14$ ) 164 of them were Chernobyl accident clean-up workers exposed in the dose range 10,43–3623,31 mSv and 43 persons of the control group, radiation dose which did not exceed the natural background level. To analyze dose-dependent effect, the examined Chernobyl clean-up workers were divided into three subgroups: 1<sup>st</sup> subgroup – 50 Chernobyl clean-up workers, exposed in the dose range 10–100 mSv ( $10 < D \leq 100$ ); 2<sup>nd</sup> subgroup – 73 people with a dose in the range 103–498 mSv ( $100 < D \leq 500$ ); 3<sup>rd</sup> subgroup – 41 people with dose 512–3623 mSv ( $D \geq 500$  mSv).

Exclusion criteria of patients from the examination: the presence of aplastic conditions, malignant neoplasms, severe somatic diseases in the acute stage, aggravated allergic history, refusal of patients to participate in the examination.

Analysis of proliferation potential and cyclin D1 expression in PB lymphocytes were performed in vitro by a micromethod of culture whole blood leukocytes. PB leukocytes were stimulated with mitogen phytohemagglutinine-P (PHA) in a concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and cultured in RPMI-1640 Medium supplemented by L-glutamine and sodium hydrocarbonate  $\text{NaHCO}_3$  (Sigma, USA) with 10 % of fetal bovine serum (Sigma, USA), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of gentamicin in  $\text{CO}_2$  incubator at 37 °C, 5 % of  $\text{CO}_2$  and 95 % humidity. Incubation was performed in 96-well culture plates during 18 hours.

Spontaneous and mitogen-induced levels of cyclin D1 expression in PB lymphocytes were studied by a standard immunofluorescent assay for intracellular proteins using the FITC labelled Mouse Anti-Human Cyclin D1 Antibody Set (BD, USA) including FITC Mouse Anti-Human Cyclin D1 and FITC Mouse IgG1, – Isotype Control. Analysis was performed on laser flow cytometer FACSCalibur (BD, USA) using CellQuest Pro software (BD, USA) collecting 20,000 events in Dot Histogram mode. Analysis of spontaneous and PHA-induced cell distribution by phases of cell cycle was performed by staining cell nucleus of propidium iodide (Sigma, USA) at working concentration. Analysis was performed in DNA histograms mode with separation of  $G_0/G_1$ -, S- and  $G_2/M$ -regions (cell cycle phase) and Sub- $G_0/G_1$ -region (cell nucleus in a state of apoptosis).

Statistical analysis of the data was performed using the statistical package Statistica 10 using parametric methods.

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

За результатами дослідження спонтанного та мітоген-індукованого рівнів цикліну D1 в учасників ЛНА на ЧАЕС відмічено тенденцію до підвищення спонтанної продукції цикліну D1 у лімфоцитах ПК. У нормі проліферація лімфоцитів відбувається після активації антигенним чи мітогенним стимулом. У здорових осіб після стимуляції ФГА спостерігалось підвищення відносного рівня цикліну D1 у лімфоцитах ПК, тоді як у переважної більшості обстежених учасників ЛНА на ЧАЕС, після мітогенної стимуляції, рівень експресії цикліну D1 та проліферативної активності лімфоцитів у G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-фазі клітинного циклу знижувався (табл. 1).

Порушення механізмів регуляції клітинного циклу, в тому числі продукції цикліну D1, призводить до неконтрольованої проліферації клітин і корелює з онкогенезом. Гіперекспресію цикліну D1 пов'язують з розвитком та прогресією онкозахворювань, таких як неходжкінські злоякісні лімфоми [20], рак молочної залози, стравоходу, сечового міхура і легень [21–24]. Надвисокі рівні цикліну D1 призводять до примусової прогресії клітинного циклу до S-фази та індукції дволанцюгових розривів ДНК в опромінених (радіорезистентних) клітинах [25]. Водночас, існують повідомлення, що підвищені рівні цикліну D1 індукують апоптоз і сприяють клітинному старінню [26].

Наявність змін проліферації лімфоцитів ПК в учасників ЛНА на ЧАЕС підтверджується даними аналізу показників клітинного циклу. У віддаленому періоді після опромінення в учасників ЛНА на ЧАЕС характерним є незначне зниження вмісту клітин у G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-фазах клітинного циклу, що позначається на кількості проліферуючих клітин та клітин з тетраплоїдним набором ядерної ДНК. Так, у групі оп-

**RESULTS AND DISCUSSION**

There is a tendency to increase spontaneous production of cyclin D1 in PB lymphocytes in Chernobyl clean-up workers. Normally, most lymphocytes are not prone to active division; their proliferation begins after activation by antigenic or mitogenic stimulus. In almost healthy individuals increase relative level of cyclin D1 in PB lymphocytes after PHA stimulation is observed, whereas in the overwhelming majority of examined Chernobyl clean-up workers after mitogenic stimulation, level of cyclin D1 expression and proliferative activity of lymphocytes in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-phase of the cell cycle decreased (Table 1).

Violation of mechanisms of regulation of cell cycle including production of cyclin D1 leads to uncontrolled cell proliferation and correlates with oncogenesis. Overexpression cyclin D1 has been associated with development and progression of cancers such as non-Hodgkin's malignant lymphomas [20], breast, esophageal, bladder and lung cancers [21–24]. Over high levels of cyclin D1 not only lead to forced progression of cell cycle to S-phase, but also disrupt DNA replication, accompanied by induction of double-stranded DNA breaks in exposed (radioresistant) cells [25]. However, increased levels of cyclin D1 induce apoptosis and promote cellular aging [26].

Changes in proliferation of PB lymphocytes in Chernobyl clean-up workers are confirmed by analysis of cell cycle parameters. Insignificant decrease number of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-phase of cell cycle which affects number of proliferating cells and cells with a tetraploid set of nuclear DNA is observed in Chernobyl clean-up workers in a remote period after radiation. A statistically signif-

**Таблиця 1**

**Рівень спонтанної та мітоген-індукованої експресії цикліну D1 у лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС, (M ± SD)**

**Table 1**

**Level of spontaneous and mitogen-induced cyclin D1 expression in PB lymphocytes of Chernobyl clean-up workers, (M ± SD)**

Показник / Parameter	Експресія цикліну D1 у групах обстеження, % / cyclin D1 expression in study groups, %			
	n	Контроль / control	n	Учасники ЛНА на ЧАЕС Chernobyl accident clean-up workers
Спонтанна експресія Spontaneous expression	43	15,1 ± 13,5	164	18,5 ± 16,4 ↑
ФГА-індукована експресія PHA-induced expression	9	20,6 ± 13,6	69	15,7 ± 15,8 ↓

ромінених осіб встановлено статистично значуще підвищення спонтанного рівня лімфоцитів, що знаходяться у S-фазі клітинного циклу (12,2 %,  $p \leq 0,01$ ); середньогрупове значення спонтанного рівня проліферуючих лімфоцитів ПК ( $G_2/M$ -фаза клітинного циклу) становить 4,4 % та має тенденцію до підвищення ( $p = 0,055$ ); привертає увагу незначне збільшення відносного рівня клітин з пошкодженою/гіподиплоїдною ДНК – 1,2 % ( $p \leq 0,22$ ) у порівнянні з контрольною групою (табл. 2).

За даними порівняльного аналізу показників клітинного циклу лімфоцитів після індукції мітогеном, визначено, що частка проліферуючих клітин достовірно збільшилась у всіх досліджуваних групах. У учасників ЛНА на ЧАЕС рівень лімфоцитів, які перебувають у  $G_2/M$ -фазі клітинного циклу складає 11,6 % ( $p \leq 0,05$ ), тоді як у контрольній групі даний показник збільшився лише до 3,12 % ( $p \leq 0,05$ ) у порівнянні зі спонтанним рівнем (табл. 2).

Рівень лімфоцитів ПК в S-фазі після стимуляції ФГА також статистично значуще підвищився до 11,3 % ( $p \leq 0,05$ ) в осіб контрольної групи. У опромінених осіб даний показник практично не змінювався відносно спонтанного рівня (табл. 2). Привертає увагу те, що після стимуляції мітогеном у учасників ЛНА на ЧАЕС на фоні збільшення пулу проліферуючих клітин також значно підвищився рівень гіподиплоїдних клітин 4,4 % ( $p \leq 0,05$ ), тоді як у контрольній групі ініціація клітинного поділу супроводжувалася незначним зниженням відсотка апоптотичних/гіподиплоїдних клітин (табл. 2). Це

іcant increase in spontaneous level of lymphocytes in S-phase of cell cycle 12,2 % ( $p \leq 0,01$ ) was found in group of exposed patients; the average group value of spontaneous level of proliferating PB lymphocytes ( $G_2/M$ -phase of cell cycle) becomes 4,4 % and has tendency to increase ( $p = 0.055$ ); there is draws attention insignificant increase in relative level of cells with damaged / hypodiploid DNA – 1.2 % ( $p \leq 0.22$ ) compared with control group (Table 2).

According to comparative analysis of parameters of cell cycle lymphocytes after mitogenic stimulation, it was determined that the proportion of proliferating cells significantly increased in all study groups. The level of lymphocytes in  $G_2/M$ -phase of cell cycle in Chernobyl clean-up workers was 11,6 % ( $p \leq 0.05$ ) while in control group this parameter increased only to 3.1 % ( $p \leq 0.05$ ) compared to spontaneous level (Table 2).

The level of PB lymphocytes in S-phase after PNA stimulation also statistically significant increased to 11,3 % ( $p \leq 0.05$ ) in control group. This parameter practically did not change relative to spontaneous level in exposed patients (Table 2). It is noteworthy that after mitogenic stimulation the level of hypodiploid cells significantly increased to 4,4 % ( $p \leq 0.05$ ) against the background of increase in the pool of proliferating cells in Chernobyl clean-up workers, while in control group initiation of cell division was accompanied by insignificant decrease in percentage apoptot-

## Таблиця 2

Показники клітинного циклу спонтанного та мітоген-індукованого рівнів лімфоцитів ПК учасників ЛНА на ЧАЕС, ( $M \pm SD$ )

Table 2

Parameters of cell cycle of spontaneous and mitogen-induced level of PB lymphocytes in Chernobyl clean-up workers, ( $M \pm SD$ )

Показник клітинного циклу Parameter of cell cycle	Розподіл лімфоцитів по фазах клітинного циклу залежності від участі в ЛНА та мітогенної індукції, % Distribution of lymphocytes by cell cycle phases depending on participation in Chernobyl clean-up work and mitogen induction, %			
	Контроль / Control		Учасники ЛНА на ЧАЕС Chernobyl clean-up workers	
	спонтанно/spontaneous (n = 43)	ФГА/РНА (n = 9)	спонтанно/spontaneous (n = 164)	ФГА/РНА (n = 54)
Sub- $G_0/G_1$	0,7 ± 1,0	0,6 ± 0,7	1,2 ± 2,0	4,4 ± 13,4**
$G_0/G_1$	82,4 ± 13,7	79,3 ± 12,2	77,3 ± 19,4	73,7 ± 26,5
S	6,5 ± 5,2	11,3 ± 7,9**	12,2 ± 12,5*	13,2 ± 10,7
$G_2/M$	1,3 ± 2,0	3,1 ± 2,0**	4,4 ± 9,0	11,6 ± 24,2**

Примітки. \* –  $p \leq 0,01$  порівняно з контрольною групою; \*\* –  $p \leq 0,05$  порівняно зі спонтанним рівнем.  
Notes. \* –  $p \leq 0.01$  vs the control group; \*\* –  $p \leq 0.05$  vs the spontaneous level.

може бути проявом передчасного старіння лімфоцитів ПК.

Аналіз спонтанного рівня цикліну D1 у лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС залежно від дози опромінення показав підвищення середньогрупових значень у всіх підгрупах учасників ЛНА, порівняно з контрольною групою. Значне підвищення спонтанного рівня цикліну D1 у лімфоцитах ПК до 22,8 % ( $p \leq 0,01$ ) встановлено у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, які були опромінені у дозах  $D > 500$  мЗв. У осіб з дозою опромінення  $10 < D \leq 100$  мЗв та  $100 < D \leq 500$  мЗв даний показник був дещо підвищеним, однак не мав суттєвої різниці, порівняно з таким у контрольній групі, рис. 1.

Після ініціації клітинного поділу лімфоцитів ФГА у підгрупах учасників ЛНА на ЧАЕС з дозами опромінення  $10 < D \leq 100$  мЗв та  $D \geq 500$  мЗв спостерігалася тенденція до зниження рівня цикліну D1 у лімфоцитах ПК, однак статистично значущих результатів даного показника, порівняно зі спонтанним рівнем, не визначено, тоді як у контрольній групі рівень експресії цитоплазматичного цикліну D1 після стимуляції мітогеном зростає (табл. 3).

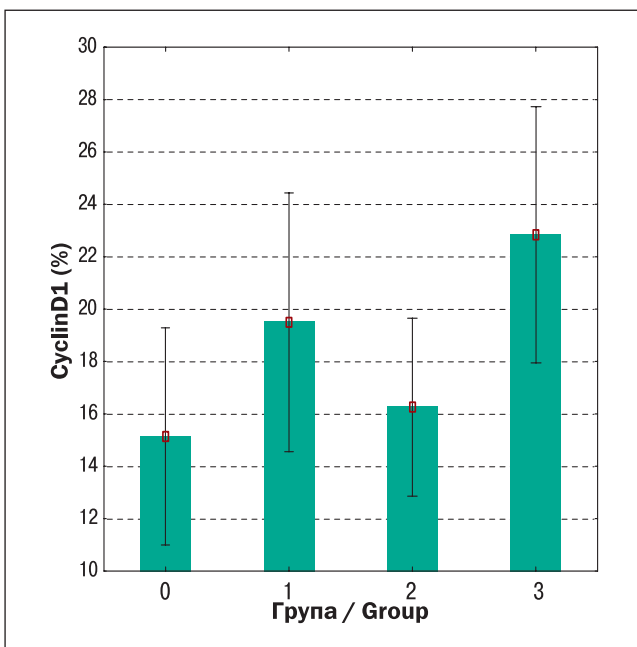
Зниження ФГА-індукованого рівня цикліну D1 на межі  $G_0/G_1$ -фази клітинного циклу (18 годин стимуляції ФГА), що передусім, відмічено у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС з дозою опромінення  $D > 500$  мЗв, вказує на можливість затримки клітинного циклу у  $G_1$ -фазі та  $G_1/S$ -інтервалі. Отримані дані вказують, що підвищена спонтанна експресія цикліну D1 обмежує можливості реагування лімфоцитів на мітогенний стимул і є проявом нестабільності геному лімфоцитів у віддаленому періоді після опромі-

ic/hypodiploid cells (Table 2). This may be a manifestation of premature aging of PB lymphocytes.

Analysis of spontaneous level of cyclin D1 in PB lymphocytes of Chernobyl clean-up workers depending on radiation dose, showed an increase in the average group values of this parameter in all subgroups of exposed patients as compared with control group. A significant increase in spontaneous level of cyclin D1 in PB lymphocytes to 22.8% ( $p \leq 0.01$ ) was found in the subgroup of Chernobyl clean-up workers, exposed  $D > 500$  mSv. This parameter was slightly increased in patients with a radiation dose of  $10 < D \leq 100$  and  $100 < D \leq 500$  mSv, but did not have significant differences compared to control group (Fig. 1).

After initiation of cell division of PHA-stimulated lymphocytes in subgroups of Chernobyl clean-up workers with radiation doses of  $10 < D \leq 100$  and  $D \geq 500$  mSv, there is a tendency to decrease the level of cyclin D1 in PB lymphocytes, but statistically significant results of this parameter have been not determined compared with spontaneous level while as level of cytoplasmic cyclin D1 expression increases after stimulation with mitogen in control group (Table 3).

Changes in proliferative potential under the influence of PHA such as decrease in the level of cyclin D1 at the boundary of  $G_0/G_1$ -phase of cell cycle (18 hours of PHA stimulation), which is primarily noted in subgroup of Chernobyl clean-up workers with a radiation dose  $D > 500$  mSv indicates the possibility of delays cell cycle in  $G_1$ -phase and  $G_1/S$ -interval, which is a manifestation of genome instability of lymphocyte in a remote period after radiation exposure. The arrest of cell cycle at  $G_1/S$ -



**Рисунок 1.** Відносний рівень спонтанної експресії цикліну D1 у лімфоцитах ПК осіб груп обстеження

- 0 – контрольна група;
- 1 – учасники ЛНА на ЧАЕС ( $10 < D \leq 100$  мЗв);
- 2 – учасники ЛНА на ЧАЕС ( $100 < D \leq 500$  мЗв);
- 3 – учасники ЛНА на ЧАЕС ( $D \geq 500$  мЗв).

**Figure 1.** Level of spontaneous cyclin D1 expression in PB lymphocytes of study group

- 0 – control group;
- 1 – Chernobyl clean-up workers ( $10 < D \leq 100$  mSv);
- 2 – Chernobyl clean-up workers ( $100 < D \leq 500$  mSv);
- 3 – Chernobyl clean-up workers ( $D \geq 500$  mSv).

### Таблиця 3

Відносний рівень спонтанної та мітоген-індукованої експресії цикліну D1 у лімфоцитах ПК в учасників ЛНА на ЧАЕС залежно від дози опромінення, (M ± SD)

### Table 3

The relative level of spontaneous and mitogen-induced cyclin D1 expression in PB lymphocytes in Chernobyl clean-up workers depending on the radiation dose, (M ± SD)

Група / Group	Відносний рівень цикліну D1, % / The relative level cyclin D1, %	
	спонтанно/spontaneous	ФГА/PHA
Контроль / control	15,1 ± 13,5	20,6 ± 13,7 ↑
10 < D ≤ 100 мЗв	19,5 ± 17,4	14,1 ± 13,9 ↓
100 < D ≤ 500 мЗв	16,3 ± 14,6	17,2 ± 16,6
D > 500 мЗв	22,8 ± 13,5*	16,8 ± 20,3 ↓

Примітка. \* –  $p \leq 0,01$  порівняно з контрольною групою.

Note. \* –  $p \leq 0.01$  vs the control group.

нення. Блок клітинного циклу у  $G_1/S$ -контрольній точці може здійснюватися при дволанцюгових розривах ДНК, невірній сегрегації хромосом, руйнуванні системи мікротрубочок або через незавершеність попереднього клітинного циклу з порушенням числа хромосом [27]. Клітина, яка пройшла контрольну точку запрограмована на реплікацію і більше не залежить від зовнішніх стимулів, що стосується й реакції на опромінення.

У віддалений період після опромінення в учасників ЛНА на ЧАЕС на фоні гіперекспресії цикліну D1, що є ознакою підвищеного проліферативного потенціалу лімфоцитів ПК, виявлено статистично значуще ( $p \leq 0,05$ ) збільшення числа клітин з тетраплоїдним набором ДНК, що знаходяться у S-фазі у всіх досліджуваних підгрупах. Також, у всіх підгрупах опромінених осіб спостерігалася тенденція до збільшення проліферуючих лімфоцитів, що знаходяться у  $G_2/M$ -фазі клітинного циклу, однак статистично значущий результат ( $p \leq 0,05$ ) отримано лише у групі учасників ЛНА на ЧАЕС з дозою опромінення  $D > 500$  мЗв (табл. 4).

Стимуляція лімфоцитів ПК мітогеном призвела до індукції клітинного поділу та підвищення кількості проліферуючих клітин у всіх обстежених осіб. У контрольній групі визначено статистично значуще ( $p \leq 0,05$ ) підвищення проліферативного потенціалу лімфоцитів після стимуляції мітогеном, тоді як у всіх підгрупах учасників ЛНА на ЧАЕС, простежувалася лише тенденція до збільшення активно проліферуючих лімфоцитів у S- та  $G_2/M$ -фазах клітинного циклу порівняно зі спонтанним рівнем. Найбільшу кількість лімфоцитів, що знаходяться у  $G_2/M$ -фазі клітинного циклу визначено у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС з дозою опромінення  $D > 500$  мЗв, однак значущої різниці даного показника у порівнянні з

checkpoint can occur with double-stranded DNA breaks, incorrect chromosome segregation, destruction of the microtubule system, or due to incompleteness of the previous cell cycle with a violation of the chromosome number [27]. A cell that has passed the «restriction point» is programmed to replicate and is no longer dependent on external stimuli.

A statistically significant ( $p \leq 0.05$ ) increase was revealed in cells with a tetraploid DNA in S-phase (active synthesis protein) with cyclin D1 overexpression, which is a sign of increased proliferative potential of PB lymphocytes in all studied subgroups of Chernobyl clean-up workers in remote period after radiation exposure. Also, there is a tendency to increase proliferating lymphocytes in  $G_2/M$ -phase of cell cycle in all exposed subgroups; however, statistically significant result ( $p \leq 0.05$ ) was obtained in group Chernobyl clean-up workers with a radiation dose  $D > 500$  mSv (Table 4).

Stimulation of PB lymphocytes by mitogen led to induction of cell division and increase number of proliferating cells in all examined patients. A statistically significant ( $p \leq 0.05$ ) increase in proliferative potential of lymphocytes after mitogenic stimulation was determined in control group, while there was a tendency to increase in actively proliferating lymphocytes in S – and  $G_2/M$ -phases of cell cycle by compared to spontaneous level in all subgroups of Chernobyl clean-up workers. The largest number of lymphocytes in  $G_2/M$ -phase of cell cycle was determined in exposed subgroup with a radiation dose  $D > 500$  mSv, however, no significant difference in this parame-



контрольною групою та спонтанним рівнем не виявлено (табл. 4).

Таким чином, в учасників ЛНА на ЧАЕС визначено підвищення рівня спонтанної експресії цикліну D1 та порушення циклін D1-залежної регуляції клітинного циклу лімфоцитів ПК після активації мітогеном. Підвищення рівня експресії цикліну D1 супроводжувалося збільшенням пулу клітин з тетраплоїдним набором ДНК (S-фаза) і подальшим надмірним виходом клітин у G<sub>2</sub>/M-фазу клітинного поділу. Дані зміни найбільш виражені у підгрупі осіб, опромінених у дозі D > 500 мЗв. Після індукції проліферації мітогеном відносний рівень цикліну D1 у лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС мав тенденцію до зниження. Кількість клітин у S- та G<sub>2</sub>/M-фазах клітинного циклу незначно підвищувалась. Такі тенденції простежувалися у підгрупах опромінених у дозах 10 < D ≤ 100 мЗв та D > 500 мЗв. В учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозі 100 < D ≤ 500 мЗв, рівень експресії цикліну D1 після мітогенної стимуляції практично не змінювався, рівень клітин у S-фазі знижувався, проте кількість клітин у G<sub>2</sub>/M-фазі активного поділу помітно підвищувалась. Це є ознакою скорочення S-фази, що може призводити до неефективної репарації та надлишку пошкоджених клітин у G<sub>2</sub>/M-фазі клітинного циклу. Водночас, підвищення у цій групі індукованого числа суб-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> клітин може свідчити про помилки активації з елімінацією ушкоджених клітин шляхом апоптозу.

Отже, у віддаленому періоді після опромінення, за умов гіперекспресії цикліну D1, існує ризик не-

ter was found in comparison with control group and spontaneous level (Table 4).

Thus, increase the level of spontaneous cyclin D1 expression and a violation of cyclin D1-dependent regulation of cell cycle of PB lymphocytes after activation by mitogen were found in Chernobyl clean-up workers. An increase the level of cyclin D1 expression is accompanied by an increase pool of cells with a tetraploid DNA (S-phase) and subsequent excessive release of cells into the G<sub>2</sub>/M-phase of cell division. These changes are most pronounced in subgroup with a radiation dose of D > 500 mSv. The relative level of cyclin D1 in PB lymphocytes of Chernobyl clean-up workers after induction of proliferation by mitogen tended to decrease. The number of cells in S- and G<sub>2</sub>/M-phases of cell cycle insignificant increased. Such tendencies can be observed in subgroups with a radiation dose of 10 < D ≤ 100 and D > 500 mSv. The level of cyclin D1 expression after mitogenic stimulation practically did not change, the level of cells in S-phase decreased, but number of cells in G<sub>2</sub>/M-phase of active division increased markedly in exposed Chernobyl clean-up workers at a dose of 100 < D ≤ 500 mSv. This is a sign of S-phase reduction, which can lead to inefficient repair and an excess of damaged cells in G<sub>2</sub>/M-phase of cell cycle. At the same time, an increase in the induced number of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cells in this group may indicate activation errors with elimination of damaged cells by apoptosis.

Thus, there is a risk of uncontrolled proliferation of lymphocytes, possibly early oncogenesis under

**Таблиця 4**

**Показники клітинного циклу спонтанного та мітоген-індукованого рівнів лімфоцитів ПК учасників ЛНА на ЧАЕС залежно від дози опромінення, (M ± SD)**

**Table 4**

**Parameters of cell cycle of spontaneous and mitogen-induced level of PB lymphocytes in Chernobyl clean-up workers depending on the radiation dose, (M ± SD)**

Група / Group		Показник клітинного циклу, % / Parameters of cell cycle, %			
		Sub-G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Контроль / control	спонтанно / spontaneous	0,7 ± 1,0	82,4 ± 13,6	6,5 ± 5,2	1,3 ± 2,0
	ФГА / PNA	0,6 ± 0,7	79,3 ± 12,1	11,3 ± 7,8**	3,1 ± 2,0**
10 < D ≤ 100 мЗв / mSv	спонтанно / spontaneous	1,0 ± 1,6	76,5 ± 20,7	13,3 ± 14,6*	4,5 ± 8,2
	ФГА / PNA	1,7 ± 1,8	72,5 ± 24,0	16,1 ± 12,2	10,6 ± 16,6
100 < D ≤ 500 мЗв / mSv	спонтанно / spontaneous	1,4 ± 2,4	76,8 ± 20,9	11,9 ± 12,8*	4,5 ± 9,8
	ФГА / PNA	6,0 ± 19,0	78,8 ± 26,4	9,1 ± 8,1	10,1 ± 25,4
D > 500 мЗв / mSv	спонтанно / spontaneous	0,8 ± 1,2	78,0 ± 17,1	11,9 ± 11,1*	5,2 ± 10,4*
	ФГА / PNA	1,0 ± 1,4	72,1 ± 30,0	13,4 ± 12,8	13,5 ± 28,7

Примітки: \* – p ≤ 0,05 порівняно з контрольною групою; \*\* – p ≤ 0,05 порівняно зі спонтанним рівнем.  
Notes: \* – p ≤ 0,05 vs the control group; \*\* – p ≤ 0,05 vs the spontaneous level.

контрольованої проліферації лімфоцитів, можливо, раннього онкогенезу. Додатковим доказом високого проліферативного потенціалу лімфоцитів ПК учасників ЛНА на ЧАЕС є накопичення лімфоцитів в S-фазі з подальшим надмірним рівнем активно проліферуючих клітин у G<sub>2</sub>/M-фазі клітинного циклу. З іншого боку, після мітогенної індукції визначено затримку клітинного циклу у межах G<sub>1</sub>/S контрольної точки, скорочення S-фази, що є проявом нестабільності геному лімфоцитів та має зв'язок з дозою опромінення.

## ВИСНОВКИ

1. У віддалений період після опромінення, в учасників ЛНА на ЧАЕС встановлено підвищення спонтанного рівня цикліну D1 і порушення циклін D1-залежної регуляції клітинного циклу лімфоцитів ПК після активації мітогеном.
2. В учасників ЛНА на ЧАЕС встановлено підвищення спонтанної кількості клітин в S- та G<sub>2</sub>/M-фазах клітинного циклу, що є свідченням підвищеної проліферативної активності лімфоцитів ПК у відповідь на ендогенні стимули. Дані зміни найбільш виражені у підгрупі осіб, опромінених у дозі D > 500 мЗв.
3. Виявлені паралельні зміни експресії цикліну D1 і просування лімфоцитів ПК по фазах клітинного циклу зі збільшенням експресії цикліну D1 у підгрупах учасників ЛНА з більшою дозою опромінення та зниженою мітоген-індукованою експресією з накопиченням клітин у G<sub>2</sub>/M-фазі, що може бути проявом нестабільності геному лімфоцитів у віддаленому періоді після опромінення.
4. Отримані результати підтверджують гіпотезу щодо значення рівнів експресії цикліну D1 як критеріїв проявів нестабільності геному та ризиків онкогенезу у віддаленому періоді після опромінення.

## Фінансування дослідження

Робота виконана у рамках планової НДР «Вивчення ролі транскрипційних та трансляційних змін молекулярного каскаду АТМ/СНЕСК2/Р53/РУМА у формуванні віддалених канцерогенних ефектів опромінення в імунній системі учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС (2019–2021)». № держреєстрації 0119U100697 за фінансування НАМН України.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. ICRP Publication 118: ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs – threshold

conditions of cyclin D1 overexpression in a remote period after radiation exposed. An additional evidence of high proliferative potential of PB lymphocytes of Chernobyl clean-up workers is accumulation of lymphocytes in S-phase, followed by an excessive level of actively proliferating cells in the G<sub>2</sub>/M-phase of cell cycle. On the other hand, a delay in cell cycle within the G<sub>1</sub>/S-checkpoint, a reduction in S-phase after mitogen induction is a manifestation of lymphocyte genome instability and depend on the radiation dose.

## CONCLUSIONS

1. Increase spontaneous level of cyclin D1 and disturbance of cyclin D1-dependent regulation of cell cycle of PB lymphocytes after mitogen activation is found in Chernobyl clean-up workers in a remote period after radiation exposure.
2. Increase in the spontaneous number of cells in S- and G<sub>2</sub>/M-phases of cell cycle was found in Chernobyl clean-up workers, which is evidence of an increased proliferative activity of PB lymphocytes in response to endogenous stimuli. These changes are most pronounced in the subgroup exposed at a dose of D > 500 mSv.
3. Revealed parallel changes in the cyclin D1 expression and the progression of PB lymphocytes through the cell cycle phases with an increase in the expression of cyclin D1 in the subgroups of Chernobyl clean-up workers with a higher radiation dose and decreased mitogen-induced expression with accumulation of cells in G<sub>2</sub>/M phase, could be a manifestation of genome instability of lymphocyte in a remote period after radiation exposure.
4. Obtained results confirm the hypothesis about the significance of cyclin D1 expression levels as criteria for manifestations of genome instability and risks of oncogenesis in a remote period after radiation exposure.

## Funding

The work was performed within the planned research «Study of the role of transcriptional and translational changes of the molecular cascade АТМ/СНЕСК2/Р53/РУМА in the formation of long-term carcinogenic effects of radiation in the immune system of participants in the Chernobyl accident (2019–2021)». State registration #0119U100697 with funding from the NAMSof Ukraine.

## REFERENCES

1. ICRP publication 118: ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs –

- doses for tissue reactions in a radiation protection context. *Ann ICRP*. 2012. Vol. 41, No. 1–2. P. 1–322.
- Devic C., Ferlazzo M. L., Foray N. Influence of individual radiosensitivity on the adaptive response phenomenon: toward a mechanistic explanation based on the nucleo-shuttling of ATM protein. *Dose Response*. 2018. Vol. 16, no. 3. e1559325818789836. doi: 10.1177/1559325818789836.
  - Особливості експресії генів-регуляторів апоптозу та клітинного циклу лімфоцитів периферичної крові при порушеннях когнітивних функцій у учасників ліквідації наслідків аварії на Чорнобильській АЕС / І. М. Ільєнко, Д. А. Бази́ка, С. А. Чу́мак, К. М. Лога́новський. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології*. 2012. Вип. 17. С. 163–176.
  - Мазурик В. К. Радиационно-индуцируемая нестабильность генома: феномен, молекулярные механизмы, патогенетическое значение / В. К. Мазурик, В. Ф. Михайлов. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2001. Т. 41, № 3. С. 272–289.
  - Little J.B. Radiation-induced genomic instability. *Int. J. Rad. Biol.* 1998. Vol. 74, No. 6. P. 663–671.
  - Молекулярные и клеточные последствия аварии на ЧАЭС / И. И. Пелевина, Г. Г. Афанасьев, А. В. Алещенко [и др.]. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2011. Т. 51, № 1. С. 154–161.
  - Мониторинг частоты лимфоцитов, мутантных по генам T-клеточного рецептора, у ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС в отдалённый пострadiационный период / С. Г. Смирнова, Н. В. Орлова, И. А. Замулаева и др. *Радиация и риск*. 2012. Т. 21, № 1. С. 20–29.
  - Gene expression profiles in radiation workers occupationally exposed to ionizing radiation / A.L. Fachin, S. S. Mello, P. Sandrin-Garcia et al. *J. Rad. Res.* 2009. Vol. 50, no. 1. P. 61–71. doi: 10.1269/jrr.08034.
  - Deng C. X. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res.* 2006. Vol. 34, no. 5. P. 1416–1426. doi: 10.1093/nar/gkl010.
  - Маркина Т. Н., Аклеев А. В., Веремеева Г. А. Пролиферативная активность и клеточный цикл лимфоцитов периферической крови (ЛПК) человека в отдалённые сроки после хронического радиационного воздействия. *Радиация и риск*. 2011. Т. 20, № 1. С. 50–58.
  - Бондарчук И. А. Анализ роли репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптоза в радиационно-индуцированном адаптивном ответе клеток млекопитающих. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2003. Т. 43, № 1. С. 19–28.
  - Боженко В. К., Иванов А. В., Кулинич Т. М., Шишкин А. М. Влияние острого гамма облучения на изменение показателей клеточного цикла в культуре клеток линии 293 HEK. *Вестник РНЦ ПП МЗ РФ*. 2013. № 14. 15 с. URL: [http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v14/papers/shishkin\\_v14.pdf](http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v14/papers/shishkin_v14.pdf).
  - Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras / J. Filmus, A. I. Robles, W. Shi et al. *Oncogene*. 1994. Vol. 9, no. 12. P. 3627–3633.
  - threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. *Ann ICRP*. 2012;41(1-2):1-322.
  - Devic C, Ferlazzo ML, Foray N. Influence of individual radiosensitivity on the adaptive response phenomenon: toward a mechanistic explanation based on the nucleo-shuttling of ATM protein. *Dose Response*. 2018;16(3):1559325818789836. doi: 10.1177/1559325818789836.
  - Ilyenko I, Bazyka D, Chumak S, Loganovsky K. [Expression of gene-regulators of apoptosis and cell cycle in peripheral blood lymphocytes in cognitive impairment of Chernobyl clean-up workers]. *Probl Radiac Med Radiobiol*. 2012;17:163-176. Ukrainian.
  - Mazurik VK, Mikhailov VF. [Radiation-induced genome instability: phenomenon, molecular mechanisms, pathogenetic significance]. *Radiats Biol Radioecol*. 2001;41(3):272-289. Russian.
  - Little JB. Radiation-induced genomic instability. *Int J Rad Biol*. 1998;74(6):663-71.
  - Pelevina II, Afanas'ev GG, Aleshchenko AV, Antoshchina MM, Gotlib Vla, Konradov AA, et al. [Molecular and cellular consequences of the Chernobyl accident]. *Radiats Biol Radioecol*. 2011;51(1):154-161. Russian.
  - Smirnova SG, Orlova NV, Zamulaeva IA, Tkachenko NP, Lozobnoy NI, Kaplan MA, et al. [Monitoring of the frequency of lymphocytes with mutations at T-cell receptor locus in Chernobyl cleanup workers]. *Radiation and Risk*. 2012;21(1):20-29. Russian.
  - Fachin AL, Mello SS, Sandrin-Garcia P, Junta CM, Ghilardi-Netto T, Donadi EA, et al. Gene expression profiles in radiation workers occupationally exposed to ionizing radiation. *J Radiat Res*. 2009;50(1):61-71. doi: 10.1269/jrr.08034.
  - Deng CX. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res*. 2006 Mar;34(5):1416-1426. doi: 10.1093/nar/gkl010.
  - Markina T, Akleyev A, Veremeyeva G. [Proliferative activity and cell cycle of peripheral blood lymphocytes (PBL) at late time after chronic radiation exposure in man]. *Radiation and Risk*. 2011;20(1):50-58. Russian.
  - Bondarchuk I. [Analysis of the role of DNA repair, regulation of cell cycle and apoptosis in the radiation-induced adaptive response of mammalian cells]. *Radiats Biol Radioecol*. 2003 Jan-Feb;43(1):19-28. Russian.
  - Bozhenko V, Ivanov A, Kulnich T, Shishkin A. [Influence of acute gamma irradiation on cell cycle parameters in 293 HEK cell culture]. *Bulletin of the Russian Scientific Center of Roentgenoradiology Ministry of Health of the Russian Federation* [Internet]. 2013 Jun [cited 2019 Dec 4];14:[about 15 p.]. Available from: [http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v14/papers/shishkin\\_v14.pdf](http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v14/papers/shishkin_v14.pdf). Russian.
  - Filmus J, Robles AI, Shi W, Wong MJ, Colombo LL, Conti CJ. Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene*. 1994;9(12):3627-3633.
  - Alt JR, Cleveland JL, Hannink M, Diehl JA. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-de-

14. Alt J. R., Cleveland J. L., Hannink M., Diehl J. A. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev.* 2000. Vol. 14, no. 24. P. 3102–3114. doi: 10.1101/gad.854900.
15. Glycogen synthase kinase 3 has a limited role in cell cycle regulation of cyclin D1 levels / K. Yang, Y. Guo, W. C. Stacey et al. *BMC Cell Biol.* 2006. Vol. 7, no. 33. 20 p. doi: 10.1186/1471-2121-7-33.
16. Bieche I., Franc B., Vidaud D., Lidereau R. Analyses of MYC, ERBB2 and CCND1 genes in benign and malignant thyroid follicular cell tumors by real-time polymerase chain reaction / *Thyroid.* 2001. Vol. 11, no. 2. P. 147–152. doi: 10.1089/105072501300042802.
17. Mirk/dyrk1B kinase destabilizes cyclin D1 by phosphorylation at threonine 288 / Y. Zou, D. Z. Ewton, X. Deng et al. *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, no. 26. P. 27790–27798. doi: 10.1074/jbc.M403042200.
18. Cyclin D1 overexpression in thyroid carcinomas: relation with clinico-pathological parameters, retinoblastoma gene product and Ki67 labeling index / F. Basolo, M. A. Caligo, A. Pinchera et al. *Thyroid.* 2000. Vol. 10, no. 9. P. 741–746. doi: 10.1089/thy.2000.10.741.
19. Гузь О. О. Особливості експресії цикліну D1 у пухлинах щитоподібної залози фолікулярного походження. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія.* 2015. № 2. С. 21–25.
20. Cyclin D3 is a predictive and prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma / M. Filipits, U. Jaeger, G. Pohl et al. *Clin. Cancer Res.* 2002. Vol. 8, no. 3. P. 729–733.
21. Cyclin D as a therapeutic target in cancer / E. A. Musgrove, C. E. Caldon, J. Barraclough et al. *Nat. Rev. Cancer.* 2011. Vol. 11, No. 8. P. 558–572. doi: 10.1038/nrc3090.
22. Vermeulen K., Van Bockstaele D. R., Berneman Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003. Vol. 36, no. 3. P. 131–149. doi: 10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x.
23. Ravikumar G., Ananthamurthy A. Cyclin D1 expression in ductal carcinoma of the breast and its correlation with other prognostic parameters. *J. Cancer Res. Ther.* 2014. Vol. 10, no 3. P. 671–675. doi: 10.4103/0973-1482.138135.
24. Cyclin D1 overexpression is an indicator of poor prognosis in resectable non-small cell lung cancer / J. S. Keum, G. Kong, S. C. Yang et al. *Br. J. Cancer.* 1999. Vol. 81, no. 1. P. 127–132.
25. Cyclin D1 overexpression perturbs DNA replication and induces replication-associated DNA double-strand breaks in acquired radioresistant cells / T. Shimura, Y. Ochiai, N. Noma et al. *Cell Cycle.* 2013. Vol. 12, no. 5. P. 773–782. doi: 10.4161/cc.23719.
26. Atadja P., Wong H., Veillete C., Riabowol K. Overexpression of cyclin D1 blocks proliferation of normal diploid fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 1995. Vol. 217, no. 2. P. 205–216.
27. Lanni J. S., Jacks T. Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol. Cell Biol.* 1998. Vol. 18, no. 2. P. 1055–1064.
- pendent cellular transformation. *Genes Dev.* 2000; 14(24):3102-3114. doi: 10.1101/gad.854900.
15. Yang K, Guo Y, Stacey WC, Harwalkar J, Fretthold J, Hitomi M, et al. Glycogen synthase kinase 3 has a limited role in cell cycle regulation of cyclin D1 levels. *BMC Cell Biol.* 2006;7:33. doi: 10.1186/1471-2121-7-33.
16. Bieche I, Franc B, Vidaud D, Lidereau R. Analyses of MYC, ERBB2 and CCND1 genes in benign and malignant thyroid follicular cell tumors by real-time polymerase chain reaction. *Thyroid.* 2001; 11(2):147-152. doi: 10.1089/105072501300042802.
17. Zou Y, Ewton DZ, Deng X, Mercer SE, Friedmant E. Mirk/dyrk1B kinase destabilizes cyclin D1 by phosphorylation at threonine 288. *J Biol Chem.* 2004;279(26):27790-27798. doi: 10.1074/jbc.M403042200.
18. Basolo F, Caligo MA, Pinchera A, Fedeli F, Baldanzi A, Miccoli P, et al. Cyclin D1 overexpression in thyroid carcinomas: relation with clinico-pathological parameters, retinoblastoma gene product and Ki67 labeling index. *Thyroid.* 2000 Sep;10(9):741-746. doi: 10.1089/thy.2000.10.741.
19. Guz O. [Peculiarities of cyclin D1 expression in thyroid tumours of follicular origin]. *Clinical Endocrinology and Endocrine Surgery.* 2015;2:21-25. Ukrainian.
20. Filipits M, Jaeger U, Pohl G, Stranzl T, Simonitsch I, Kaider A, et al. Cyclin D3 is a predictive and prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2002;8(3):729-733.
21. Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL, et al. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(8):558-572. doi: 10.1038/nrc3090.
22. Vermeulen K, Van Bockstaele DR., Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003 Jun;36(3):131-149. doi: 10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x.
23. Ravikumar G, Ananthamurthy A. Cyclin D1 expression in ductal carcinoma of the breast and its correlation with other prognostic parameters. *J Cancer Res Ther.* 2014;10(3):671-675. doi: 10.4103/0973-1482.138135.
24. Keum JS, Kong G, Yang SC, Shin DH, Park SS, Lee JH, et al. Cyclin D1 overexpression is an indicator of poor prognosis in resectable non-small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 1999 Sep; 81(1):127-132.
25. Shimura T, Ochiai Y, Noma N, Oikawa T, Sano Y, Fukumoto M. Cyclin D1 overexpression perturbs DNA replication and induces replication-associated DNA double-strand breaks in acquired radioresistant cells. *Cell Cycle.* 2013 Mar;12(5):773-782. doi: 10.4161/cc.23719.
26. Atadja P, Wong H, Veillete C, Riabowol K. Overexpression of cyclin D1 blocks proliferation of normal diploid fibroblasts. *Exp Cell Res.* 1995;217(2):205-216.
27. Lanni JS, Jacks T. Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol Cell Biol.* 1998;18(2):1055-1064.

**ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ**

**Голярник Наталія Анатоліївна**, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії імуноцитології відділу клінічної імунології, Інститут клінічної радіології, ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України» (ННЦРМ), м. Київ.

**Ільєнко Ірина Миколаївна**, доктор біологічних наук, старший дослідник, завідувач лабораторії імуноцитології відділу клінічної імунології, Інститут клінічної радіології, ННЦРМ, м. Київ.

**Зварич Лілія Миколаївна**, молодший науковий співробітник лабораторії імуноцитології відділу клінічної імунології, Інститут клінічної радіології, ННЦРМ, м. Київ.

**Базика Дмитрій Анатолійович**, доктор медичних наук, академік НАМНУ, генеральний директор ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», м. Київ.

**INFORMATION ABOUT AUTHORS**

**Natalia A. Golyarnik**, Ph.D., State Institution «National Research Centre for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Department of Clinical Immunology, Laboratory of immunocytology, Institute for Clinical Radiology, Kyiv, Ukraine

**Iryna N. Iliencko**, Dr. Sci., State Institution «National Research Centre for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Department of Clinical Immunology, Laboratory of immunocytology, Institute for Clinical Radiology, Kyiv, Ukraine

**Liliia M. Zvarych**, State Institution «National Research Centre for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Department of Clinical Immunology, Laboratory of immunocytology, Institute for Clinical Radiology, Kyiv, Ukraine

**Dimitry A. Bazyka**, MD, prof., State Institution «National Research Centre for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Department of Clinical Immunology, Institute for Clinical Radiology, Kyiv, Ukraine

*Стаття надійшла до редакції 23.06.2020*

*Received: 23.06.2020*