

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

О. В. Шеметун✉, О. О. Талан, О. Б. Дибська, М. М. Єремєєва, М. А. Пілінська

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

ЦИТОГЕНЕТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЯВІВ УНІВЕРСАЛЬНОГО ЯВИЩА ЕФЕКТУ СВІДКА

Мета: встановити рівень хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові (ЛПК) здорових осіб та клітинах хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію (ХЛЛ) за умов їх сумісного культивування та визначити можливість індукції в них проявів універсального явища ефекту свідка.

Матеріали і методи. Дослідження виконане з застосуванням цитогенетичного аналізу рівномірно забарвлених хромосом ЛПК людини, що розрізнялись за цитогенетичними маркерами статі; наявністю онкологічної трансформації та опромінення *in vitro* ^{137}Cs в дозі 0,50 Гр за їх сумісного культивування.

Результати. Частота аберацій хромосом у ЛПК здорових осіб за культивування з кров'ю хворих на ХЛЛ складала 3,35 на 100 метафаз, перевищувала контрольну (1,48 на 100 клітин, $p < 0,01$), значуще не відрізнялась від показника у неопромінених Т-лімфоцитах крові хворих на В-клітинну ХЛЛ (3,18 на 100 клітин, $p > 0,05$) і була нижчою, ніж при ко-культивуванні з опроміненою кров'ю хворих на ХЛЛ (5,00 на 100 клітин, $p < 0,01$). В опроміненіх *in vitro* лімфоцитах крові хворих на ХЛЛ середньогруповий рівень аберацій хромосом при окремому культивуванні становив 12,36 на 100 метафаз і перевищував показник за ко-культивування з лімфоцитами здорових осіб (8,35 на 100 клітин, $p < 0,05$).

Висновки. У ЛПК здорових осіб за культивування з кров'ю хворих на ХЛЛ та у Т-лімфоцитах хворих на В-клітинну ХЛЛ розвивається пухлинно-індукований ефект свідка, цитогенетичним проявом якого є зростання частоти одиночних хроматидних фрагментів. Взаємодія опромінених клітин крові хворих на В-клітинну ХЛЛ з інтактними лімфоцитами здорових осіб спричиняє в останніх збільшення хромосомної нестабільності внаслідок розвитку радіаційно-індукованого ефекту свідка та призводить до зниження рівня хромосомної нестабільності в опромінених лімфоцитах хворих на ХЛЛ (ефекту порятунку). Підвищений рівень аберацій хроматидного типу в Т-лімфоцитах хворих на ХЛЛ при опроміненні *in vitro* є результатом розвитку в них радіаційно-індукованого ефекту свідка на тлі онкологічно-індукованого ефекту свідка.

Ключові слова: змішана культура лімфоцитів крові людини, іонізуюча радіація, хромосомна нестабільність ефект свідка.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2022. Вип. 27. С. 249–263. doi: 10.33145/2304-8336-2022-27-249-263

O. V. Shemetun✉, O. O. Talan, O. B. Dibska, M. M. Yermeeva, M. A. Pilinska

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

CYTOGENETIC STUDY OF MANIFESTATIONS OF THE UNIVERSAL PHENOMENON OF THE BYSTANDER RESPONSE

Objective: to establish the level of chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes (PBL) from healthy individuals and cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) under co-cultivation conditions and to determine the possibility of inducing manifestations of the universal phenomenon of bystander response in them.

Materials and methods. Cytogenetic analysis of uniformly stained chromosomes from human PBL, which differed by cytogenetic markers of sex; the presence of oncological transformation and in vitro irradiation of ^{137}Cs in a dose of 0.50 Gy under the conditions of their joint cultivation was performed.

Results. The frequency of chromosome aberrations in PBL from healthy individuals when co-cultured with the blood from CLL patients was 3.35 per 100 cells, exceeded the control (1.48 per 100 cells, $p < 0.01$), did not significantly differ from the rate in non-irradiated blood T-lymphocytes from patients with B-cell CLL (3.18 per 100 cells, $p > 0.05$) and was lower than when co-cultivated with irradiated blood from CLL patients (5.00 per 100 cells, $p < 0.01$). In irradiated in vitro blood lymphocytes from CLL patients, the mean group level of chromosome aberrations under separate cultivation was 12.36 per 100 cells and exceeded the indicator during their co-cultivation with lymphocytes from healthy individuals (8.35 per 100 cells, $p < 0.05$).

Conclusions. A tumor-induced bystander effect (TIBE) develops in PBL from healthy individuals when co-cultured with the blood from CLL patients and in T lymphocytes of B-cell CLL patients, the cytogenetic manifestation of which is an increase in the frequency of single chromatid fragments. The interaction of irradiated blood cells from CLL patients with lymphocytes from healthy individuals causes an increase in chromosomal instability in the latter due to the development of a radiation-induced bystander effect (RIBE) and leads to a decrease in the level of chromosomal instability in irradiated lymphocytes from CLL patients (rescue effect). An increase in the level of chromatid-type aberrations in T-lymphocytes of CLL patients during in vitro irradiation is a consequence of the development of RIBE against the background of TIBE.

Key words: mixed culture of human blood lymphocytes, ionizing radiation, chromosomal instability, bystander response.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2022;27:249-263. doi: 10.33145/2304-8336-2022-27-249-263

ВСТУП

Універсальний феномен ефекту свідка є системною відповіддю організму на генотоксичний стрес [1]. До його проявів належить радіаційно-індукований ефект свідка – вплив на інтактні клітини оточуючих клітин, що зазнали дії іонізуючого випромінювання; пухлинно-індукований ефект свідка – вплив на інтактні клітини малігнізованих клітин; ефект порятунку – дія інтактних клітин на пошкоджені онкологічним процесом/опроміненням клітини. Вивчення ефекту свідка проводилось, здебільшого, на моделях *in vitro* з використанням змішаних міжвидових культур чи сумісного культивування морфологічно/цитогенетично різних тканин людини, що розрізнялись за наявністю впливу генотоксичного чинника чи онкологічної трансформації. [2].

INTRODUCTION

The universal phenomenon of bystander response is the body's systemic response to genotoxic stress [1]. Its manifestations include the radiation-induced bystander effect – the effect on intact cells of surrounding cells exposed to ionizing radiation; tumor-induced bystander effect – the effect on intact cells of malignant cells; rescue effect – the action of intact cells on cells damaged by the oncological process/irradiation. The study of the bystander effect was carried out, for the most part, on *in vitro* models using mixed interspecies cultures or co-cultivation of morphologically/cytogenetically different human tissues, which differed in the presence of exposure to a genotoxic factor or oncological transformation [2].

✉ Olena V. Shemetun, e-mail: shemetun@ukr.net

Радіаційно-індукований ефект свідка є найбільш вивченим із зазначених проявів універсального феномену ефекту свідка. На генетичному рівні він проявляється генними мутаціями, хромосомними абераціями, геномною нестабільністю, які зберігаються тривалий час, що може сприяти розвитку радіаційно-індукованого канцерогенезу та реалізації вторинних злоякісних новоутворень у онкологічних хворих [3–7].

Пухлинно-індукований ефект свідка є нещодавно відкритим феноменом [1, 5]. Його індукція може сприяти розвитку вторинних злоякісних новоутворень у онкологічних хворих внаслідок синергізму генотоксичної дії малігнізованих клітин і впливу хіміо-/радіоонкотерапії злоякісних новоутворень [5, 8]. Розвиток пухлинно-індукованого ефекту свідка встановлено за сумісного культивування нормальних клітин людини з клітинами меланоми та аденокарциноми легень за показниками пошкодження геному [9, 10]. Як маркери розвитку пухлинно-індукованого ефекту свідка в дослідженнях використовували мікроядра, молекулярно-генетичні та цитогенетичні показники, клітини в стадії апоптозу.

Ефект порятунку, при якому внаслідок сигналів зворотного зв'язку малігнізовані/опромінені клітини зазнають впливу оточуючих інтактних клітин, за індукованим ефектом є протилежністю до радіаційно- та пухлинно-індукованого ефекту свідка [11]. Його індукція сприяє активації систем репарації та стабілізації геному клітин-свідків, що з одного боку є позитивним для організму, а з іншого – може знижувати ефективність лікування злоякісних пухлин під час променевої терапії онкологічної патології [12, 13].

Ми розпочали вивчення феномену ефекту свідка з дослідження радіаційно-індукованого ефекту свідка у 2005 році, коли була розроблена модельна система для вивчення його проявів на цитогенетичному рівні, що дозволила досліджувати взаємний вплив опромінених і неопромінених лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) людини за умов сумісного культивування [14, 15]. Із застосуванням цієї моделі встановлені цитогенетичні аспекти розвитку, персистенції та модифікації радіаційно-індукованого ефекту свідка та ефекту порятунку (названого нами зворотнім ефектом свідка) за умов сумісного культивування неопромінених та опромінених в дозі 1,00 та 0,25 Гр ЛПК [3, 16]. У 2018 році нами розпочато вивчення проявів універсального феномену ефекту свідка в інтактних лімфоцитах крові людини

The radiation-induced bystander effect is the most studied of the mentioned manifestations of the universal phenomenon of the bystander effect. At the genetic level, it is manifested by gene mutations, chromosomal aberrations, and genomic instability, which persist for a long time, and can contribute to the development of radiation-induced carcinogenesis and the realization of secondary malignant neoplasms in cancer patients [3-7].

The tumor-induced bystander effect is a recently discovered phenomenon [1, 5]. Its induction can contribute to the development of secondary malignant neoplasms in cancer patients due to the synergism of the genotoxic effect of malignant cells and the effect of chemo-/radiotherapy on malignant neoplasms [5, 8]. The development of the tumor-induced effect of the bystander was determined by the co-cultivation of normal human cells with melanoma and lung adenocarcinoma cells according to the indicators of genome damage [9, 10]. Micronuclei, molecular genetics, cytogenetic indicators, and cells in the stage of apoptosis were used as markers of the development of the tumor-induced bystander effect in the studies.

In the rescue effect, in which, as a result of feedback signals, malignant/irradiated cells are affected by the surrounding intact cells, the induced effect is the opposite of the radiation- and tumor-induced bystander effect [11]. Its induction contributes to the activation of repair systems and stabilization of the genome of bystander cells, which, on the one hand, is positive for the body, and on the other hand, it can reduce the effectiveness of treatment of malignant tumors during radiation therapy of oncological pathology [12, 13].

We began studying the phenomenon of the bystander effect by researching the radiation-induced bystander effect in 2005 when a model system was developed to study its manifestations at the cytogenetic level, which allowed us to investigate the mutual influence of irradiated and non-irradiated human peripheral blood lymphocytes (PBL) under conditions of co-cultivation [14, 15]. Using this model, the cytogenetic aspects of the development, persistence, and modification of the radiation-induced bystander effect and the rescue effect (called the reverse bystander effect) were established under the conditions of co-cultivation of non-irradiated and irradiated in a dose of 1.00 and 0.25 Gy PBL [3, 16]. In 2018, we began studying the manifestations of the universal phenomenon of the bystander effect in intact human

при їх взаємодії з онкотрансформованими клітинами крові осіб, хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію (ХЛЛ) [17–19].

МЕТА

Встановити рівень хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові здорових осіб та клітинах хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію за умов їх сумісного культивування та визначити можливість індукції в них проявів універсального явища ефекту свідка.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вивчення цитогенетичних проявів універсального феномену ефекту свідка виконано на ЛПК людини, що розрізнялись за цитогенетичними маркерами статі, наявністю онкологічної патології (В-клітинної ХЛЛ) та дією іонізуючого випромінювання *in vitro*.

До дослідження на основі поінформованої згоди були залучені сім умовно здорових осіб, які заперечували свідомий контакт з іонізуючою радіацією та іншими мутагенними чинниками, та сім осіб з діагнозом В-клітинної ХЛЛ, які проходили медичне обстеження в поліклініці ННЦРМ чи відділенні радіаційної гематології Інституту клінічної радіології ННЦРМ. Зразки крові хворих на ХЛЛ одержували до початку лікування.

При виконанні роботи виконували окреме культивування ЛПК здорових осіб для визначення в них фонового (контрольного) рівня аберацій хромосом при моделюванні радіаційно-/пухлинно-індукованого ефекту свідка; окреме культивування крові хворих на ХЛЛ (інтактної/опроміненої) для встановлення (фонового/індукованого) рівня аберацій хромосом при дослідженні ефекту порятунку; сумісне культивування ЛПК умовно здорових осіб та хворих на ХЛЛ (неопромінених/опромінених *in vitro*) для визначення цитогенетичного ефекту у клітинах-свідках і клітинах-індукторах при дослідженні пухлинно-/радіаційно-індукованого ефекту свідка та ефекту порятунку.

Опромінення крові хворих на ХЛЛ проводили γ -квантами ^{137}Cs (випромінювач IBL-237C, потужність 2,34 Гр/хв) перед культивуванням у дозі 0,50 Гр.

Цільну кров умовно здорових осіб та хворих на ХЛЛ культивували з використанням загальноживаного напівмікрометоду у нашій модифікації [18].

Моделювання ефекту свідка (пухлинно-індукованого, радіаційно-індукованого та ефекту порятунку) виконували із застосуванням розробленої нами модельної системи для дослідження радіаційно-інду-

blood lymphocytes during their interaction with malignant blood cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) [17–19].

OBJECTIVE

To establish the level of chromosomal instability in PBL from healthy individuals and cells from patients with B-cell CLL under co-cultivation conditions and to determine the possibility of inducing manifestations of the universal phenomenon of bystander response in them.

MATERIALS AND METHODS

The study of the cytogenetic manifestations of the universal phenomenon of the bystander response was carried out on human PBL which differed by cytogenetic markers of sex, the presence of oncological pathology (B-cell CLL), and irradiation *in vitro*.

Based on informed consent, seven healthy individuals denied conscious contact with ionizing radiation and other mutagenic factors, and seven individuals diagnosed with B-cell CLL who underwent a medical examination in the polyclinic of the NRCRM or the radiation hematology department of the NRCRM were involved in the study. Blood samples were collected from patients with CLL before treatment.

In the course of the studies, separate cultivation of PBL from healthy individuals was performed to determine the background (control) level of chromosome aberrations in them when simulating the radiation-/tumor-induced bystander effect; separate cultivation of blood from patients with CLL (intact/irradiated) to establish the (background/induced) level of chromosome aberrations when studying the rescue effect; co-cultivation of PBL from healthy individuals and CLL patients (unirradiated/irradiated *in vitro*) to determine the cytogenetic effect in bystander cells and inducer cells in the study of tumor/radiation-induced bystander effect and rescue effect.

CLL patients' blood was irradiated with γ -quanta of ^{137}Cs (emitter IBL-237C, power 2.34 Gy/min) in a dose of 0.50 Gy before culturing.

Whole blood from healthy individuals and CLL patients was cultured by the semi-micro method in our modification [18].

Modeling of the bystander effect (tumor-induced, radiation-induced, and rescue effect) was performed using the model system developed by us for the study of the radiation-induced bystander effect in human

кованого ефекту свідка в соматичних клітинах людини шляхом сумісного культивування крові умовно здорових осіб з кров'ю хворих на ХЛЛ, що розрізнялись за цитогенетичними маркерами статі [15].

Препарати метафазних хромосом фарбували рівномірно барвником Гімза (Merck, Німеччина). Цитогенетичний аналіз виконували з груповим каріотипуванням під мікроскопами зі збільшенням $\times 1000$. Клітини-свідки і клітини-індуктори розрізняли за наявністю чи відсутністю статевої чоловічої Y хромосоми. Під час цитогенетичного аналізу враховували аберації хроматидного (одиначні ацентричні фрагменти, хроматидні обміни) та хромосомного (вільні парні фрагменти, ацентричні кільця, дицентричні та кільцеві хромосоми, аномальні моноцентрики) типів. Загалом при виконанні роботи проаналізовано 11 080 клітин.

Для кожної точки досліду розраховували відсоток аберантних метафаз і частоту аберацій хромосом на 100 метафаз. Дані по окремих точках досліду об'єднували в групи відповідно до дизайну дослідження 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 критерію Ст'юдента [20].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Цитогенетичний аналіз лімфоцитів крові здорових осіб показав, що пошкоджені клітини містили по одній аберації хромосом, внаслідок чого середня частота аберантних клітин та рівень аберацій хромосом становили 1,48 % (табл. 1). Частота аберацій хроматидного типу (одиначних фрагментів), що складала 75 % від загальної кількості пошкоджень хромосом, становила 1,11 на 100 клітин (табл. 2). Середньогруповий рівень аберацій хромосомного типу, які були представлені парними ацентричними фрагментами та аномальними моноцентриками, становив 0,37 на 100 метафаз. Парні фрагменти виявлені з частотою 0,32 на 100 метафаз. Середньогруповий рівень аномальних моноцентриків (стабільних обмінних аберацій, що накопичуються протягом життя людини), становив 0,05 на 100 метафаз. Всі визначені в лімфоцитах крові здорових осіб цитогенетичні показники відповідали їх спонтанним популяційним частотам [21], що дозволило використати їх як контроль при виконанні досліджень з вивчення універсального феномену ефекту свідка з використанням змішаної культури лімфоцитів крові людини.

somatic cells by co-culturing the blood from healthy individuals with the blood from CLL patients, which differed by cytogenetic markers of sex [15].

Metaphase chromosome preparations were stained uniformly with Giemsa dye (Merck, Germany). Cytogenetic analysis was performed with group karyotyping under microscopes with a magnification of $\times 1000$. Bystander cells and inducer cells were distinguished by the presence or absence of a male Y chromosome. During the cytogenetic analysis, aberrations of chromatid (single fragments, chromatid exchanges) and chromosomal (free double fragments, acentric rings, dicentric and ring chromosomes, abnormal monocentric) types were taken into account. In total, 11,080 cells were analyzed during the work.

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 combined 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 [20].

RESULTS AND DISCUSSION

Cytogenetic analysis of blood lymphocytes from healthy individuals showed that each damaged cell contained one chromosomal aberration, as a result of which the mean frequency of aberrant cells and the level of chromosomal aberrations was 1.48% (Table 1). The frequency of chromatid-type aberrations (single fragments), which accounted for 75% of the total number of chromosome damages, was 1.11 per 100 cells (Table 2). The mean-group level of chromosomal-type aberrations, which were represented by double acentric fragments and abnormal monocentrics, was 0.37 per 100 metaphases. Double fragments were detected with a frequency of 0.32 per 100 metaphases. The mean-group level of abnormal monocentrics (stable aberrations accumulating during a person's life) was 0.05 per 100 metaphases. All cytogenetic parameters determined in the blood lymphocytes of healthy individuals corresponded to their spontaneous population frequencies [21]. This made it possible to use them as controls in studies of the universal phenomenon of the bystander effect using a mixed culture of human blood lymphocytes.

Таблиця 1

Основні цитогенетичні показники при дослідженні пухлинно-/радіаційно-індукованого ефекту свідка та ефекту порятунку

Table 1

The main cytogenetic data in the study of tumor-/radiation-induced bystander effect and rescue effect

Варіанти досліджу	Кількість проаналізованих клітин	Частота аберантних клітин, %	Частота аберацій хромосом на 100 клітин	
			середня mean	мінімальна – максимальна minimum – maximum
Experimental variants	Number of cells	Frequency of aberrant cells, %	Frequency of chromosome aberration per 100 cells	
Ефект свідка / Bystander effect				
Контроль / Control	1900	1,48 ± 0,28	1,48 ± 0,28	1,00 – 2,00
Клітини-свідки ПІЕС ¹ Bystander cells TIBE ¹	1821	3,35 ± 0,42	3,35 ± 0,42	2,00 – 4,44
Клітини-свідки РІЕС ² Bystander cells RIBE ²	2340	4,74 ± 0,44	5,00 ± 0,45	4,55 – 6,00
Ефект порятунку / Rescue effect				
ХЛЛ (група порівняння) CLL (comparison group)	1070	3,08±0,53	3,18±0,54	1,84 – 5,33
ХЛЛ (опромінення <i>in vitro</i> , 0,50 Гр) CLL (irradiation <i>in vitro</i> , 0.50 Gy)	1036	11,49 ± 0,99	12,36 ± 1,02	11,00 – 14,00
Ефект порятунку ПІЕС ¹ Rescue effect TIBE ¹	1703	3,23 ± 0,43	3,35 ± 0,44	2,50 – 5,06
Ефект порятунку РІЕС ² Rescue effect RIBE ²	1210	8,35 ± 0,80	9,09 ± 0,83	7,66 – 9,78

Примітки. ¹Пухлинно-індукований ефект свідка; ²радіаційно-індукований ефект свідка.
Notes. ¹Tumor-induced bystander effect; ²radiation-induced bystander effect.

Таблиця 2

Частота аберацій хроматидного і хромосомного типу при дослідженні пухлинно-/радіаційно-індукованого ефекту свідка та ефекту порятунку

Table 2

Frequency of chromatid and chromosome type aberrations in the study of tumor-/radiation-induced bystander effect and rescue effect

Варіанти досліджу	Частота аберацій хромосом, на 100 клітин / Frequency of chromosome aberration per 100 cells				
	Хроматидного типу	Хромосомного типу / Chromosome type			
		ацентричні фрагменти	аномальні моноцентрики	дицентричні і кільцеві хромосоми	всього
Experimental variants	Chromatid type	acentric double fragments	abnormal monocentrics	dicentric and ring chromosomes	total
Ефект свідка / Bystander effect					
Контроль / Control	1,11 ± 0,24	0,32± 0,13	0,05± 0,05	0,00± 0,00	0,37± 0,14
Клітини-свідки ПІЕС ¹ Bystander cells TIBE ¹	2,31 ± 0,35	0,99 ± 0,23	0,05 ± 0,05	0,00 ± 0,00	1,04± 0,24
Клітини-свідки РІЕС ² Bystander cells RIBE ²	3,25 ± 0,37	1,62 ± 0,26	0,09 ± 0,06	0,04± 0,04	1,75± 0,27
Ефект порятунку / Rescue effect					
ХЛЛ (група порівняння) CLL (comparison group)	2,15± 0,44	0,75± 0,26	0,28± 0,16	0,00± 0,00	1,03± 0,31
ХЛЛ (опромінення <i>in vitro</i> , 0,50 Гр) CLL (irradiation <i>in vitro</i> , 0.50 Gy)	5,12 ± 0,68	4,44± 0,64	0,87± 0,29	1,93± 0,43	7,24± 0,81
Ефект порятунку ПІЕС ¹ Rescue effect TIBE ¹	2,00 ± 0,34	1,23 ± 0,27	0,12 ± 0,08	0,00 ± 0,00	1,35± 0,28
Ефект порятунку РІЕС ² Rescue effect RIBE ²	2,64 ± 0,46	4,13± 0,57	0,74 ± 0,25	1,57± 0,36	6,45± 0,71

Примітки. ¹Пухлинно-індукований ефект свідка; ²радіаційно-індукований ефект свідка.
Notes. ¹Tumor-induced bystander effect; ²radiation-induced bystander effect.

В досліді з моделювання розвитку пухлинно-індукованого ефекту свідка при сумісному культивуванні крові здорових осіб з клітинами крові хворих на ХЛЛ лімфоцити здорових осіб були клітинами-свідками, що протягом часу культивування отримували сигнали від онкологічно трансформованих клітин. Середньогруповий рівень аберацій хромосом в клітинах-свідках складав 3,35 на 100 метафаз і перевищував відповідний контрольний показник, зареєстрований при їх окремому культивуванні ($p < 0,01$). Пошкодження хроматидного типу, які є маркерами хромосомної нестабільності, були представлені одиночними фрагментами. Їх середньогрупова частота (2,31 на 100 метафаз) перевищувала контрольний рівень ($p < 0,01$), що вказує на розвиток пухлинно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах крові умовно здорових осіб при їх кокультивуванні з кров'ю хворих на ХЛЛ. Аналіз індивідуальних рівнів аберацій хромосом хроматидного типу показав, що вони знаходились в межах від 1,33 до 3,70 на 100 метафаз (табл. 3). У шести з семи досліджених випадків спостерігали зростання цього показника порівняно з контрольним рівнем, що свідчить про індукцію пухлинно-індукованого ефекту свідка. Разом з тим, в лімфоцитах крові однієї особи (випадок 3) частота аберацій хроматидного типу не мала статистично значущої різниці з контролем ($p > 0,05$), що вказує на відсутність зростання хромосомної нестабільності і розвитку пухлинно-індукованого ефекту свідка. Аберації хромосомного типу були представлені аномальними моноцентриками на рівні, що не мав статистично значущої різниці з контрольним, та ацентричними фрагментами (парними фрагментами, ацентричними кільцями), частота яких перевищувала контрольну ($p < 0,05$). Зважаючи те, що частота ацентричних кілець та хромосомних аберацій обмінного типу статистично значуще не відрізнялись від контрольних, ми припускаємо, що частина зареєстрованих в клітинах-свідках парних фрагментів була наслідком подвійних хроматидних розривів і розвиток ефекту свідка не впливав на їх індукцію.

В дослідженні з моделювання розвитку радіаційно-індукованого ефекту свідка шляхом сумісного культивування крові умовно здорових осіб з опроміненими в дозі 0,50 Гр клітинами крові хворих на ХЛЛ було встановлено, що частота аберацій хромосом становила 4,74 %, рівень аберацій хромосом складав 5,00 на 100 клітин. Ці показники перевищували контрольні значення та результати, що були встановлені у клітинах-свідках при їх культивуванні

In an experiment on modeling the development of the tumor-induced bystander effect under co-cultivation of the blood from healthy persons with blood cells from CLL patients the lymphocytes of healthy persons were bystander cells that received signals from oncologically transformed cells during the cultivation period. The mean group level of chromosome aberrations in bystander cells was 3.35 per 100 metaphases and exceeded the control indicator under their separate cultivation ($p < 0.01$). Chromatid-type lesions, which are markers of chromosomal instability, were represented by single fragments. Their mean group frequency (2.31 per 100 metaphases) exceeded the control level ($p < 0.01$), which indicates the development of a tumor-induced bystander effect in blood lymphocytes from healthy individuals when they are co-cultivated with the blood from CLL patients. Analysis of individual levels of chromatid-type chromosome aberrations showed that they ranged from 1.33 to 3.70 per 100 metaphases (Table 3). In six out of seven studied cases, an increase in this indicator was observed compared to the control level, which indicates the induction of a tumor-induced bystander effect. However, in the blood lymphocytes of one person (case 3), the frequency of chromatid-type aberrations did not have a significant difference with the control ($p > 0.05$), which indicates the absence of an increase in chromosomal instability and the development of a tumor-induced bystander effect. Chromosomal-type aberrations were represented by abnormal monocentrics at a level that did not have a significant difference from the control, and acentric fragments (double fragments, acentric rings), the frequency of which exceeded the control ($p < 0.05$). Taking into account that the frequency of acentric rings and chromosomal aberrations of the exchange type did not differ significantly from the control ones, we assume that some of the double fragments registered in the bystander cells were the result of double chromatid breaks and the development of the bystander effect did not affect their induction.

In a study on modeling the development of the radiation-induced bystander effect by co-cultivated the blood from healthy individuals with blood cells from CLL patients irradiated in a dose of 0.50 Gy was established that the frequency of aberrant cells was 4.74%, the level of chromosome aberrations was 5.00 per 100 cells. These indicators exceeded the control values and the results that were established in bystander cells under cultivation with non-irradiated

Таблиця 3

Індивідуальні частоти аберацій хроматидного типу при дослідженні пухлинно-/радіаційно-індукованого ефекту свідка та ефекту порятунку

Table 3

Individual frequencies of chromatid-type aberrations in the study of tumor-/radiation-induced bystander effect and rescue effect

Варіанти досліджу Experimental variants	Обстежені особи / Examined persons						
	Здорові / Healthy individuals						
	1	2	3	4	5	6	7
Контроль / Control	1,67	1,50	1,50	1,00	1,00	1,00	0,60
Клітини-свідки ПІЕС ¹ Bystander cells TIBE ¹	2,44	3,70	1,33	2,46	1,60	1,82	2,40
Клітини-свідки РІЕС ² Bystander cells RIBE ²	3,86	2,40	3,14	3,67	3,00	3,33	3,00
	ХЛЛ / CLL						
	8	9	10	11	12	13	14
ХЛЛ (група порівняння) CLL (comparison group)	2,00	2,67	2,31	1,74	1,94	3,33	1,23
ХЛЛ (опромінення <i>in vitro</i> , 0,50 Гр) CLL (irradiation <i>in vitro</i> , 0.50 Gy)	3,73	5,71	4,67	4,67	5,63	5,00	6,00
Ефект порятунку ПІЕС ¹ Rescue effect TIBE ¹	1,79	3,48	1,82	2,81	1,92	2,00	1,20
Ефект порятунку РІЕС ² Rescue effect RIBE ²	3,72	4,17	2,86	4,17	0,85	2,22	1,93

Примітки. ¹Пухлинно-індукований ефект свідка; ²радіаційно-індукований ефект свідка.
Notes. ¹Tumor-induced bystander effect; ²radiation-induced bystander effect.

з неопроміненими клітинами крові хворих на ХЛЛ ($p < 0,01$). У спектрі хромосомних порушень, зафіксованих в клітинах-свідках, переважали прості аберації хроматидного типу – одиночні фрагменти, середньогруповою частотою яких становила 3,25 на 100 клітин і була вищою за показник, зареєстрований у клітинах-свідках у варіанті досліджу з моделювання пухлинно-індукованого ефекту свідка, що вказує на підвищення хромосомної нестабільності і розвиток в них радіаційно-індукованого ефекту свідка. Індивідуальні цитогенетичні показники частоти аберацій хроматидного типу знаходились в межах від 2,40 до 3,86 на 100 метафаз і в усіх випадках перевищували фоновий рівень, що вказує на розвиток радіаційно-індукованого ефекту свідка у крові всіх залучених до експерименту осіб. Разом з тим, у двох випадках (2, 7) не спостерігали статистично значущої зміни рівня аберацій хроматидного типу порівняно з варіантом досліджу з моделювання пухлинно-індукованого ефекту свідка.

Ацентричні парні фрагменти зареєстровані з частотою 1,62 на 100, що перевищувала фонову, проте не мала статистично значущої різниці з показником, зареєстрованим у клітинах-свідках при індукції пухлинно-індукованого ефекту свідка, що підтверджує правомірність викладеної нами вище думки щодо

blood cells from CLL patients ($p < 0.01$). Simple chromatid-type aberrations (single fragments) dominated the spectrum of chromosomal abnormalities in bystander cells with a group mean frequency of 3.25 per 100 cells, which was higher than in the tumor-induced bystander effect simulation experiment. This indicates an increase in chromosomal instability and the development of a radiation-induced bystander effect in them. Individual cytogenetic values of the frequency of chromatid-type aberrations ranged from 2.40 to 3.86 per 100 metaphases and in all cases exceeded the background level, which indicates the development of a radiation-induced bystander effect in the blood of all persons who participated in the experiment. However, in two cases (2, 7) no significant change in the level of chromatid-type aberrations was observed compared to modeling tumor-induced bystander effect.

The frequency of acentric double fragments was 1.62 per 100 cells, which exceeded the background level, but was not significantly different from the frequency in bystander cells when inducing a tumor-induced bystander effect. This confirms the validity of the opinion expressed above about the

походження частини цих пошкоджень внаслідок подвійних хроматидних розривів. Аберації обмінного типу (аномальні моноцентрики, дицентричні і кільцеві хромосоми) в клітинах-свідках зареєстровані з частотами, що істотно не відрізнялись від контрольних і не залежали від способу культивування клітин ($p > 0,05$).

Отримані результати вказують на зростання хромосомної нестабільності при взаємодії інтактних нормальних та опромінених онкотрансформованих клітин крові людини внаслідок розвитку радіаційно-індукованого ефекту свідка.

Особливої уваги заслуговує цитогенетичне дослідження лімфоцитів крові хворих на В-клітинну ХЛЛ. Це зумовлено використанням при виконанні роботи традиційного напівмікрометоду, що передбачає мітогенну стимуляцію малих Т-лімфоцитів, в яких визначали цитогенетичні показники. При розвитку В-клітинної ХЛЛ Т-лімфоцити отримували пошкоджуючий сигнал від малігнізованих В-лімфоцитів, тобто були клітинами-свідками розвитку пухлинно-індукованого ефекту свідка [17, 18]. Результати показали, що у хворих на ХЛЛ середньогрупова частота аберантних клітин (3,08 %) і аберацій хромосом (3,18 на 100 метафаз) перевищували значення контролю ($p < 0,01$) і не мали статистично значущої різниці з відповідними показниками в лімфоцитах крові здорових осіб при їх ко-культивуванні з кров'ю хворих на ХЛЛ ($p > 0,05$), що вказує на підвищену хромосомну нестабільність і підтверджує розвиток в них пухлинно-індукованого ефекту свідка *in vivo*. Аналіз спектру зареєстрованих у лімфоцитах хворих на ХЛЛ пошкоджень показав, що вони були представлені одиночними фрагментами, ацентричними фрагментами та аномальними моноцентриками, рівні яких не мали суттєвої різниці з відповідними показниками, отриманими в крові здорових осіб при розвитку пухлинно-індукованого ефекту свідка в умовах *in vitro* ($p > 0,05$). Індивідуальні частоти аберацій хроматидного типу у хворих на ХЛЛ знаходились в межах від 1,74 до 3,33 на 100 клітин та перевищували показники, зареєстровані в інтактних лімфоцитах здорових осіб. Отримані результати вказують на підвищену хромосомну нестабільність в Т-лімфоцитах периферичної крові осіб, хворих на ХЛЛ, за їх окремого культивування, що спричинено розвитком у них мутаційного процесу за рахунок онкологічно-індукованого ефекту свідка внаслідок впливу сигналів від злякано трансформованих В-клітин.

Цитогенетичний аналіз ЛПК хворих на ХЛЛ, опромінених *in vitro* в дозі 0,50 Гр, показав, що частота

origin of part of these damages due to double chromatid breaks. Aberrations of the exchange type (abnormal monocentric, dicentric, and ring chromosomes) were registered in bystander cells with a frequency that did not differ significantly from the control and did not depend on the method of cell cultivation ($p > 0.05$).

The obtained results indicate an increase in chromosomal instability under the co-cultivation of intact normal and irradiated malignant human blood cells due to the development of the radiation-induced bystander effect.

Cytogenetic research of blood lymphocytes from patients with B-cell CLL deserves special attention. This is due to the use of the traditional semi-micro method, which involves mitogenic stimulation of small T-lymphocytes, in which cytogenetic parameters were determined. During the development of B-cell CLL, T-lymphocytes received a damaging signal from malignant B-lymphocytes, i.e., to be bystander cells of the development of the tumor-induced bystander effect [17, 18]. The results showed that in CLL patients the mean group frequency of aberrant cells (3.08 %) and chromosome aberrations (3.18 per 100 metaphases) exceeded the control values ($p < 0.01$) and did not have a significant difference with the indicators in lymphocytes blood from healthy individuals when they are co-cultivated with the blood from CLL patients ($p > 0.05$), which indicates increased chromosomal instability and confirms the development of a tumor-induced bystander effect in them. The analysis of the spectrum of chromosomes damage in the CLL patient's lymphocytes showed that they were represented by single fragments, acentric fragments, and abnormal monocentrics, the levels of which do not differ from the indicators in the blood of healthy individuals under the development of the tumor-induced bystander effect *in vitro* ($p > 0.05$). Individual frequencies of chromatid-type aberrations in CLL patients ranged from 1.74 to 3.33 per 100 cells and exceeded the values in intact lymphocytes of healthy individuals. The obtained results indicate increased chromosomal instability of peripheral blood T-lymphocytes of CLL patients, which is caused by the development of an oncology-induced bystander effect in them due to the influence of signals from malignant transformed B-cells.

Cytogenetic analysis of irradiated *in vitro* in a dose of 0.50 Gy PBL from CLL patients showed

аберантних клітин в них складала 11,49 %. У всіх випадках були зареєстровані клітини, що містили більше одного пошкодження хромосом, внаслідок чого рівень аберацій хромосом дорівнював 12,36 на 100 метафаз і перевищив показники у групі здорових осіб та у групі порівняння з неопромінених хворих на ХЛЛ ($p < 0,001$). Аналіз цитогенетичних показників у окремих випадках засвідчив, що індивідуальні частоти аберацій хромосом знаходились в межах від 11,00 до 14,00 на 100 метафаз і не залежали від фонові частоти аберацій хромосом. Частота аберацій хроматидного типу (одиначних ацентричних фрагментів) становила 5,12 на 100 метафаз і перевищувала показники, зареєстровані у неопромінених клітинах осіб з ХЛЛ та групі порівняння ($p < 0,01$). Беручи до уваги, що пошкодження хроматидного типу є маркерами хромосомної нестабільності і їх рівень у лімфоцитах крові людини не зростає при дії радіації [22], можна припустити, що зареєстрований нами ефект є наслідком розвитку в Т-лімфоцитах крові хворих на ХЛЛ радіаційно-індукованого ефекту свідка на тлі онкологічно-індукованого ефекту свідка внаслідок впливу опромінених малігнізованих В-лімфоцитів.

Аберації хромосомного типу, що є маркерами дії іонізуючого випромінювання в культурі лімфоцитів крові людини на G_0 стадії мітотичного циклу, були представлені ацентричними парними фрагментами, аномальними моноцентриками, дицентричними та кільцевими хромосомами. Їх сумарний рівень складав 7,24 на 100 клітин і перевищував показник у лімфоцитах крові здорових осіб і неопромінених лімфоцитах крові осіб з ХЛЛ ($p < 0,001$). Парні ацентричні фрагменти становили 61 % від кількості зареєстрованих аберацій хромосомного типу і зустрічались з частотою 4,44 на 100 метафаз, що перевищувала показники неопромінених груп порівняння ($p < 0,05$). Рівень аномальних моноцентриків (транслокацій та інверсій) складав 0,87 на 100 метафаз і перевищував показник у групі умовно здорових осіб та неопромінених лімфоцитах хворих на ХЛЛ. Серед нестабільних цитогенетичних маркерів дії радіації виявлено дицентричні і кільцеві хромосоми. Їх сумарний рівень становив 1,93 на 100 метафаз, що узгоджується з показниками, отриманими іншими дослідниками при опроміненні лімфоцитів крові людини в умовах *in vitro* в дозі 0,50 Гр [22, 23]. Таким чином, цитогенетичний аналіз лімфоцитів крові хворих на ХЛЛ, опромінених *in vitro* в дозі 0,50 Гр, зареєстрував в них підвищений рівень маркерів дії радіації (аберацій хромосомного типу), що відпові-

that the frequency of aberrant cells in them was 11.49 %. In all cases, cells with more than one chromosomal damage were detected, as a result of which the level of chromosomal aberrations was 12.36 per 100 metaphases and exceeded the frequency in the group of healthy individuals and the comparison group of non-irradiated PBL from CLL patients ($p < 0.001$). Analysis of individual cytogenetic indicators showed that the frequency of chromosomal aberrations ranges from 11.00 to 14.00 per 100 metaphases and does not depend on the background frequency of chromosomal aberrations. The frequency of chromatid-type aberrations (single acentric fragments) was 5.12 per 100 metaphases and exceeded the rates in non-irradiated cells of CLL patients and the control group ($p < 0.01$). Given that chromatid-type damage is a marker of chromosomal instability, and their level in human blood lymphocytes does not increase under the influence of radiation [22], it can be assumed that the effect we registered is a consequence of the development of a radiation-induced bystander effect in T-lymphocytes of CLL patients against the background of the tumor-induced bystander effect.

Aberrations of the chromosomal type, which are markers of ionizing radiation of human blood lymphocytes at the G_0 stage of the mitotic cycle, were represented by acentric double fragments, abnormal monocentric, dicentric, and ring chromosomes. Their total level was 7.24 per 100 cells and exceeded the level in PBL of healthy individuals and non-irradiated PBL of CLL patients ($p < 0.001$). Double acentric fragments accounted for 61 % of the number of registered chromosomal-type aberrations that occurred with a frequency of 4.44 per 100 metaphases, which exceeded the indicators of non-irradiated comparison groups ($p < 0.05$). The level of abnormal monocentrics (translocations and inversions) was 0.87 per 100 metaphases and exceeded the rate in the group of healthy individuals and non-irradiated lymphocytes of CLL patients. Dicentric and ring chromosomes were found among the unstable cytogenetic markers of radiation exposure. Their total level was 1.93 per 100 metaphases, which is consistent with the indicators obtained by other researchers when irradiating human blood lymphocytes *in vitro* in a dose of 0.50 Gy [22, 23]. Thus, cytogenetic analysis of irradiated *in vitro* in a dose of 0.50 Gy PBL of CLL patients registered in them an increased level of irradiation markers (chromosomal type aberra-

дав отриманій дозі іонізуючого випромінювання, та маркерів хромосомної нестабільності (аберацій хроматидного типу), індукованих внаслідок синергізму розвитку онкологічно- та радіаційно-індукованого ефекту свідка.

Було досліджено можливість розвитку ефекту порятунку у лімфоцитах крові хворих на ХЛЛ (неопромінених/опромінених *in vitro*) внаслідок впливу сигналів зворотного зв'язку від інтактних клітин-свідків. При цитогенетичному аналізі неопромінених лімфоцитів крові хворих на ХЛЛ за їх ко-культивування з лімфоцитами здорових осіб встановлено, що рівень аберацій хромосом дорівнював 3,35 на 100 метафаз, статистично значуще не відрізнявся від результату цитогенетичного аналізу неопромінених лімфоцитів хворих на ХЛЛ за окремого культивування ($p > 0,05$) та перевищував показник групи порівняння зі здорових осіб ($p < 0,05$). Аналіз спектру зареєстрованих аберацій хромосом показав, що вони були представлені одиночними фрагментами, парними фрагментами та аномальними моноцентриками з частотами, що статистично значуще не відрізнялись від показників, отриманих у варіанті дослідження з окремим культивуванням лімфоцитів крові хворих на ХЛЛ ($p > 0,05$). Розкид індивідуальних частот аберацій хроматидного типу (від 1,79 до 3,48 на 100 метафаз) відповідав межам коливань цього показника при окремому культивуванні лімфоцитів крові хворих на ХЛЛ. Таким чином, отримані результати засвідчили відсутність впливу клітин крові умовно здорових осіб на цитогенетичні показники в неопромінених лімфоцитах хворих на ХЛЛ за умов їх сумісного культивування, що вказує на відсутність індукції ефекту порятунку.

Цитогенетичний аналіз опромінених *in vitro* в дозі 0,50 Гр лімфоцитів крові хворих на ХЛЛ за їх ко-культивування з лімфоцитами умовно здорових осіб показав, що частота абераційних клітин в них становила 8,35 на 100 метафаз, рівень аберацій хромосом дорівнював 9,09 на 100 метафаз. Вказані показники були нижчими за результати, отримані при цитогенетичному аналізі опромінених лімфоцитів хворих на ХЛЛ при їх окремому культивуванні ($p < 0,05$), хоча перевищували відповідні дані групи порівняння, що складалась зі здорових осіб ($p < 0,05$). Зниження рівня аберацій хромосом в опромінених лімфоцитах крові хворих на ХЛЛ за сумісного культивування з лімфоцитами здорових осіб відбувалося за рахунок зменшення частоти аберацій хроматидного типу (одиночних фрагментів) з 5,12 до 2,64 на 100 клітин ($p < 0,001$). Було зареєстровано зниження індивідуальних значень частоти аберацій хроматидного типу

tions), which corresponded to the received dose of ionizing radiation, and markers of chromosomal instability (chromatid type aberrations), induced as a result of the development of the tumor- and the radiation-induced bystander effect.

The possibility of the rescue effect development in the blood lymphocytes from CLL patients (unirradiated/irradiated *in vitro*) due to the influence of feedback signals from bystander cells was investigated. The level of chromosomal aberrations in non-irradiated blood lymphocytes from CLL patients when co-cultivated with lymphocytes from healthy individuals was 3.35 per 100 metaphases, did not differ from the result of their separate cultivation ($p > 0.05$) and exceeded the indicator in the group of healthy individuals ($p < 0.05$). Analysis of the spectrum of chromosome aberrations showed that they were represented by single fragments, double fragments, and abnormal monocentrics with frequencies that did not differ from the indicators under the separate cultivation of blood lymphocytes of CLL patients ($p > 0.05$). A scattering of individual frequencies of chromatid-type aberrations (from 1.79 to 3.48 per 100 metaphases) corresponded to the limits of fluctuations of this indicator under separate cultivation of blood lymphocytes of CLL patients. Thus, the absence of influence of blood cells from healthy persons on cytogenetic indicators in non-irradiated lymphocytes from CLL patients under their co-cultivation was established, which indicates the absence of the rescue effect.

Cytogenetic analysis of blood lymphocytes from CLL patients irradiated *in vitro* in a dose of 0.50 Gy under their co-cultivation with lymphocytes of healthy individuals showed that the frequency of aberrant cells in them was 8.35 per 100 metaphases, the level of chromosomal aberrations was equal to 9.09 per 100 metaphases. These indicators were lower than the results of cytogenetic analysis of irradiated lymphocytes of CLL patients during their separate cultivation ($p < 0.05$), although they exceeded the corresponding data of the comparison group of healthy individuals ($p < 0.05$). The decrease in the level of chromosomal aberrations in the irradiated blood lymphocytes from CLL patients when co-cultivated with lymphocytes from healthy individuals occurred due to a decrease in the frequency of chromatid-type aberrations (single fragments) from 5.12 to 2.64 per 100 cells ($p < 0.001$). A decrease in individual values of the frequency of chro-

у більшості випадків досліду (9, 10, 12, 13, 14) порівняно з даними, отриманими при окремому культивуванні опромінених лімфоцитів крові хворих на ХЛЛ. При цьому у випадках 8, 11 рятувального ефекту не зареєстровано, а у випадках 10, 12, 13, 14 частота аберацій хроматидного типу, не мала статистично значущої різниці з фоновим рівнем цих пошкоджень у клітинах крові хворих на ХЛЛ ($p > 0,05$). Пошкодження хромосомного типу склали переважну більшість (71 %) зареєстрованих аберацій хромосом, що притаманно для радіаційно-індукованого мутаційного процесу. Вони були представлені парними фрагментами, аномальними моноцентриками, дицентричними і кільцевими хромосомами. Їх рівень не залежав від способу культивування опромінених лімфоцитів крові хворих на ХЛЛ ($p > 0,05$).

Таким чином, при сумісному культивуванні опромінених *in vitro* в дозі 0,50 Гр лімфоцитів крові осіб, хворих на ХЛЛ, з лімфоцитами здорових осіб було зареєстровано ефект порятунку.

ВИСНОВКИ

За умов сумісного культивування лімфоцитів крові здорових осіб з клітинами хворих на В-клітинну ХЛЛ (неопроміненими/опроміненими *in vitro*) встановлено наступні цитогенетичні прояви універсального феномену ефекту свідка:

- у Т-лімфоцитах хворих на В-клітинну ХЛЛ та ЛПК здорових осіб при сумісному культивуванні з кров'ю хворих на ХЛЛ спостерігається розвиток пухлинно-індукованого ефекту свідка (*in vivo* та *in vitro* відповідно), цитогенетичним проявом якого є підвищена частота аберацій хроматидного типу (одиначних фрагментів);
- в опромінених *in vitro* в дозі 0,50 Гр Т-лімфоцитах крові осіб, хворих на В-клітинну ХЛЛ, та ЛПК здорових осіб при взаємодії з опроміненими онкотрансформованими клітинами зареєстровано розвиток радіаційно-індукованого ефекту свідка (*in vivo* та *in vitro* відповідно). Рівні аберацій хроматидного типу перевищували такі у варіантах досліду з моделювання пухлинно-індукованого ефекту свідка, що може свідчити про синергізм цих феноменів;
- в опромінених *in vitro* Т-лімфоцитах крові осіб, хворих на В-клітинну ХЛЛ, при сумісному культивуванні з ЛПК здорових осіб індукується ефект порятунку, що призводить до зниження рівня хромосомної нестабільності в опромінених клітинах.

matid-type aberrations was registered in most cases of the experiment (9, 10, 12, 13, 14) compared to the data obtained during separate cultivation of irradiated blood lymphocytes from CLL patients. At the same time, in cases 8, and 11, no rescue effect was registered, and in cases 10, 12, 13, and 14, the frequency of chromatid-type aberrations did not have a statistically significant difference with the background level of these damages in the blood cells of patients with CLL ($p > 0.05$). The vast majority (71 %) of registered chromosome aberrations were of the chromosomal type of damage, which is characteristic of the radiation-induced mutational process. They were represented by double fragments, abnormal monocentrics, dicentrics, and ring chromosomes. Their level did not depend on the method of cultivation of irradiated blood lymphocytes from CLL patients ($p > 0.05$).

Thus, under the co-cultivation of blood lymphocytes from CLL patients irradiated *in vitro* in a dose of 0.50 Gy with lymphocytes from healthy individuals, a rescue effect was registered.

CONCLUSIONS

The following cytogenetic manifestations of the universal phenomenon of the bystander response were established under the conditions of co-cultivation of blood lymphocytes of healthy individuals with cells of B-cell CLL patients (unirradiated/irradiated *in vitro*):

- in T-lymphocytes of patients with B-cell CLL and PBL from healthy people when co-cultivated with the blood from CLL patients, the development of a tumor-induced bystander effect was observed (*in vivo* and *in vitro*, respectively), the cytogenetic manifestation of which was an increase in the frequency of chromatid-type aberrations (single fragments);
- in T-lymphocytes of the blood from B-cell CLL patients irradiated in a dose of 0.50 Gy *in vitro* and PBL of healthy individuals when co-cultivated with irradiated malignant cells the development of a radiation-induced bystander effect (*in vivo* and *in vitro*, respectively) was registered. The levels of chromatid-type aberrations exceeded those in variants of the tumor-induced bystander effect experiment, which may indicate the synergism of these phenomena;
- in irradiated *in vitro* blood T-lymphocytes from B-cell CLL patients, when co-cultivated with PBL from healthy individuals, a rescue effect was induced, which led to a decrease in the level of chromosomal instability in irradiated cells.

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. Shemetun O. V., Pilinska M. A. Radiation-induced bystander effects – 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.
3. 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.
4. Shemetun O. V. Damage of chromosomes under irradiation of human blood lymphocytes and development of bystander effect. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2016. Вип. 21. P. 149–158.
5. 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.
6. Pilinska M. A., Shemetun O. V. Investigation of certain manifestations of bystander response phenomenon that may affect the development of human cancer pathology. *Biomed. J. Sci. & Tech. Res.* 2021. Vol. 33, no. 4. P. 25986-25987. doi: 10.26717/BJSTR.2021.33.005434.
7. Mechanisms of radiation bystander and non-targeted effects: implications to radiation carcinogenesis and radiotherapy / R. Yahyapour, E. Motevaseli, A. Rezaeyan et al. *Curr. Radiopharm.* 2018. Vol. 11, no. 1. P. 34–45. doi: 10.2174/1874471011666171229123130.
8. Molecular mechanism of bystander effects and related abscopal/cohort effects in cancer therapy / R. Wang, T. Zhou, W. Liu, L. Zuo. *Oncotarget.* 2018. Vol. 9, no. 26. P. 18637–18647. doi: 10.18632/oncotarget.24746.
9. Krzywon A., Widel M. Bystander Me45 melanoma cells increase damaging effect in UVC irradiated cells. *Photochem. Photobiol.* 2019. Vol. 95, no. 4. P. 1019–1028. doi: 10.1111/php.13080.
10. Damaging and protective bystander cross-talk between human lung cancer and normal cells after proton microbeam irradiation / S. Desai, A. Kobayashi, T. Konishi, M. Oikawa, B. N. Pandey. *Mutat. Res.* 2014. Vol. 763–764. P. 39-44. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.03.004.
11. Rescue effects in radiobiology: unirradiated bystander cells assist irradiated cells through inter-cellular signal feedback / S. Chen, Y. Zhao, W. Han et al. *Mutat. Res.* 2011. Vol. 706. P. 59–64. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2010.10.011.
12. Yu K. N. Radiation-induced rescue effect. *Radiat. Res.* 2019. Vol. 60, no. 2. P. 163–170. doi: 10.1093/jrr/rry109.
13. Mukherjee S., Chakraborty A. Radiation-induced bystander phenomenon: insight and implications in radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 2019. Vol. 95, iss. 3. P. 243–263. doi: 10.1080/09553002.2019.1547440
14. Shemetun O. V., Pilinska M. A., Talan O. A. Approaches to the detection of the radiation-induced «bystander effect» in human somatic cells at the cytogenetic level. *Ukr. Med. Visti.* 2005. Vol. 6, no. 1–2. P. 427.

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. Shemetun OV, Pilinska MA. Radiation-induced bystander effects – 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.
3. Shemetun OV, Talan OA, Pilinska MA. Cytogenetic features of induction and persistence the bystander effect in human blood lymphocytes. *Cytol Genet.* 2014;48(4):51-58.
4. Shemetun OV. Damage of chromosomes under irradiation of human blood lymphocytes and development of bystander effect. *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2016;21:149-158.
5. 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.
6. Pilinska MA, Shemetun OV. Investigation of certain manifestations of bystander response phenomenon that may affect the development of human cancer pathology. *Biomed J Sci & Tech Res.* 2021;33(4):25986-25987. doi: 10.26717/BJSTR.2021.33.005434.
7. Yahyapour R, Motevaseli E, Rezaeyan A, Abdollahi H, Farhood B, Cheki M, et al. Mechanisms of radiation bystander and non-targeted effects: implications to radiation carcinogenesis and radiotherapy. *Curr Radiopharm.* 2018;11(1):34-45. doi: 10.2174/1874471011666171229123130.
8. 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
9. Krzywon A, Widel M. Bystander Me45 melanoma cells increase damaging effect in UVC irradiated cells. *Photochem Photobiol.* 2019;95(4):1019-1028. doi: 10.1111/php.13080 4.
10. Desai S, Kobayashi A, Konishi T, Oikawa M, Pandey BN. Damaging and protective bystander cross-talk between human lung cancer and normal cells after proton microbeam irradiation. *Mutat Res.* 2014;763-764:39-44. doi:10.1016/j.mrfmmm.2014.03.004.
11. Chen S, Zhao Y, Han W, Chiu SK, Zhu L, Wu L, Yu KN. Rescue effects in radiobiology: unirradiated bystander cells assist irradiated cells through inter-cellular signal feedback. *Mutat Res.* 2011; 706:59-64. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2010.10.011.
12. Yu K N. Radiation-induced rescue effect. *Radiat Res.* 2019;60(2):163-170. doi: 10.1093/jrr/rry109.
13. Mukherjee S, Chakraborty A. Radiation-induced bystander phenomenon: insight and implications in radiotherapy. *Int J Radiat Biol.* 2019;95(3):243-263. doi: 10.1080/09553002.2019.1547440.
14. Shemetun OV, Pilinska MA, Talan OA. [Approaches to the detection of the radiation-induced «bystander effect» in human somatic cells at the cytogenetic level]. *Ukr Med Visti.* 2005;6(1-2):427. Ukrainian

15. Шеметун О. В., Талан О. А., Пілінська М. А. Модель дослідження радіоіндукованого ефекту спостерігача за допомогою лімфоцитів периферичної крові людини. *Журнал Національної академії медичних наук України*. 2006. Т. 12, №. 3. С. 556–65.
16. Шеметун О. В. Цитогенетичні аспекти розвитку та персистенції радіаційно-індукованого ефекту свідка в соматичних клітинах людини : автореф. дис. ... д-ра мед. Наук : 03.00.15 / Олена Володимирівна Шеметун. Київ, 2019. 44 с.
17. Цитогенетичні ефекти в змішаній культурі клітин крові хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію з лімфоцитами крові здорових осіб / М. А. Пілінська, О. В. Шеметун, О. О. Талан та ін. *Доповіді Національної академії наук України*. 2020. № 7. С. 86–93. doi: 10.15407/dopovidi2020.07.086.
18. Study the effects of ionizing radiation on the level of chromosome instability in human somatic cells during the development of tumor-induced bystander effect / M. A. Pilinska, O. V. Shemetun, O. A. Talan et al. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2020. Vol. 25. P. 353–361. doi: 10.33145/2304-8336-2020-25-353-361.
19. Study of modification by astaxanthin the cytogenetic manifestations of the bystander response phenomenon in human blood lymphocytes / M. A. Pilinska, O. V. Shemetun, O. A. Talan et al. *Exp. Onc.* 2021. Vol. 43, no. 2. P. 173–176. doi: 10.32471/exp-oncol.2312-8852.vol-43-no2.16301.
20. Атраментова Л. А. Дизайн и статистика (биологические исследования). Харьков : НТМТ, 2014. 255 с.
21. Frequency of spontaneous and radiation-induced chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of individuals of different ages / O. V. Shemetun, O. A. Talan, O. M. Demchenko et al. *Cytology and Genetics*. 2018. Vol. 52, no 6. P. 461–466. DOI: 10.3103/S0095452718060117
22. Djomina E. A. The dependence of dose/effects in human radiation cytogenetics. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2019. Vol. 24. P. 235–249. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-235-249.
23. «Dose–effect» calibration dependence by frequency of unstable chromosomal exchanges in human lymphocytes in acute gamma irradiation by ¹³⁷Cs in low doses for biological dosimetry / V. A. Kurochkina, L. K. Bezdrobna, T. V. Tsyganok, I. A. Khomych. *Nucl. Phys. At. Energy*. 2021. Vol. 22, iss. 2. P. 167–173. doi: 10.15407/jnpae2021.02.167
15. Shemetun OV, Talan OA, Pilinska MA. [Model for radioinduced bystander effect research with the help of human peripheral blood lymphocytes]. *Journal of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine*. 2006;12(3):556-565. Ukrainian.
16. Shemetun OV. [Cytogenetic aspects of the development and persistence of radiation-induced bystander effect in human somatic cells] : [thesis dissertation]. Kyiv; 2019. 44 p.
17. 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. Ukrainian. doi: 10.15407/dopovidi2020.07.086.
18. Pilinska MA, Shemetun OV, Talan OA, Dibska OB, Kravchenko SM, Sholoiko W. Study the effects of ionizing radiation on the level of chromosome instability in human somatic cells during the development of tumor-induced bystander effect. *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2020;25:353-361. doi: 10.33145/2304-8336-2020-25-353-361.
19. Pilinska MA, Shemetun OV, Talan OA, Dibska OB, Talko W. Study of modification by astaxanthin the cytogenetic manifestations of the bystander response phenomenon in human blood lymphocytes. *Exp Oncol.* 2021;43(2):173-176. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no2.16301.
20. Atramentova LA. [Design and statistics (biological research)]. Kharkiv: NTMT; 2014. 255p. Russian.
21. Shemetun OV, Talan OA, Demchenko OM, Kurinnyi DA, Papuga MS, Pilinska MA. Frequency of spontaneous and radiation-induced chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of individuals of different ages. *Cytol Genet.* 2018;52(6):461-466. doi: 10.3103/S0095452718060117.
22. 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.
23. Kurochkina VA, Bezdrobna LK, Tsyganok TV, I. A. Khomych IA. [«Dose – effect» calibration dependence by frequency of unstable chromosomal exchanges in human lymphocytes in acute gamma irradiation by ¹³⁷Cs in low doses for biological dosimetry]. *Nucl Phys At Energy.* 2021;22(2):167-173. doi: 10.15407/jnpae2021.02.167.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

Шеметун Олена Володимирівна – доктор медичних наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії цитогенетики відділу медичної генетики Інституту експериментальної радіології ННЦРМ, м. Київ, Україна

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

Дибська Олена Борисівна – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії цитогенети-

INFORMATION ABOUT AUTHORS

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

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

Olena B. Dibska – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of the Cytogenetic Laboratory, Department of

ки відділу медичної генетики, Інститут експериментальної радіології ННЦРМ, м. Київ, Україна

Єремєєва Марія Миколаївна – провідний інженер лабораторії цитогенетики відділу медичної генетики, Інститут експериментальної радіології ННЦРМ, м. Київ, Україна

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

Medical Genetics, Experimental Radiology Institute NRCRM

Mariya M. Yermeeeva – Senior Engineer of the Cytogenetic Laboratory, Department of Medical Genetics, Experimental Radiology Institute NRCRM

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

Стаття надійшла до редакції 31.08.2022

Received: 31.08.2022