

УДК 575.1:577.21:616.155.3:616-001.28

Н. А. Голярник¹✉, І. М. Ільєнко¹, Л. М. Зварич¹, М. О. Воробйов², Д. А. Бази́ка¹¹Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», вул. Юрія Ілленка, 53, Київ, 04050, Україна²КНП «Запорізький регіональний протипухлинний центр» Запорізької обласної ради, вул. Культурна, 177-а, м. Запоріжжя, 69040, Україна

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИКЛІН D1-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ УЧАСНИКІВ ЛІКВІДАЦІЇ НАСЛІДКІВ АВАРІЇ НА ЧАЕС ТА ОСІБ, ХВОРИХ НА ЗЛОЯКІСНІ НОВОУТВОРЕННЯ ПОРОЖНИНИ РОТА, РОТОВОЇ ТА ГОРТАННОЇ ЧАСТИН ГЛОТКИ

Мета. Дослідити особливості проліферативного потенціалу лімфоцитів периферичної крові учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС та осіб, хворих на злоякісні новоутворення порожнини рота, ротової та гортанної частин глотки, за рівнем експресії цикліну D1 та кількісними показниками клітинного циклу.

Матеріали і методи. Обстежено 294 чоловіків у віці ($58,47 \pm 7,32$) років, серед них: 215 учасників ліквідації наслідків аварії (ЛНА) на ЧАЕС 1986–1987 рр., дози зовнішнього опромінення 10,43–3623,31 мЗв; 49 осіб контрольної групи та 30 хворих на злоякісні новоутворення порожнини рота, ротової та гортанної частин глотки III, IVA та IVB стадій захворювання. Аналіз параметрів клітинного циклу і проліферативної активності лімфоцитів периферичної крові (ПК) проводили методом проточної цитометрії. Оцінювали розподіл клітин по G₀/G₁-, S- і G₂/M-фазах клітинного циклу в умовах *in vivo* та *in vitro*. Проліферативний потенціал аналізували за рівнем експресії цитоплазматичного білка цикліну D1.

Результати. Проведено оцінку проліферативного потенціалу лімфоцитів ПК учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС та осіб, хворих на злоякісні новоутворення порожнини рота. 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. Визначено збільшення пулу клітин у S- та G₂/M-фазах клітинного циклу, що характеризує високий проліферативний потенціал лімфоцитів ПК. Дані зміни найбільш виражені у підгрупі осіб, опромінених в дозі D > 500 мЗв, та у пацієнтів з онкологічною патологією.

Висновки. Встановлено позитивну лінійну залежність між дозою опромінення та кількістю клітин S-фази клітинного циклу у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозах D > 500 мЗв. Виявлені зміни циклін D1-залежної регуляції клітинного циклу та проліферативного статусу лімфоцитів залежать від дози опромінення, можуть бути проявом нестабільності геному і спричиняти ризики онкогенезу у віддаленому періоді після опромінення.

Ключові слова: клітинний цикл, циклін D1, онкологічна патологія, радіація, Чорнобиль.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2021. Вип. 26. С. 357–370. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-357-370

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

N. A. Golyarnik¹✉, I. N. Iliencko¹, L. M. Zvarych¹, M. O. Vorobyov², D. A. Bazyka¹

¹State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 53 Yuriia Illienka Str., Kyiv, 04050, Ukraine

²Municipal non-profit enterprise «Zaporizhzhia Regional Antitumor Center» Zaporizhzhia Regional Council, 177-a Kulturna Str., Zaporizhzhia, 69040, Ukraine

CHARACTERISTICS OF CYCLIN D1-MEDIATED REGULATION OF CELL CYCLE OF PERIPHERAL BLOOD LIMPHOCYTES OF CHORNOBYL CLEAN-UP WORKERS AND PERSONS WITH MALIGNANT NEOPLASMS OF THE ORAL CAVITY, OROPHARYNX AND LARYNGOPHARYNX

Objective: to explore proliferative potential of peripheral blood lymphocytes of Chernobyl clean-up workers and persons with malignant neoplasms of the oral cavity, oropharynx and laryngopharynx by level of expression of cyclin D1 and quantitative parameters of cell cycle.

Materials and methods. A total of 294 men aged (58.47 ± 7.32) were surveyed, 215 of them were Chernobyl clean-up workers (1986–1987), exposed at the dose range 10.43–3623.31 mSv; 49 persons of the control group and 30 persons with malignant neoplasms of the oral cavity, oropharynx and laryngopharynx at III, IVA and IVB stages of the disease. The analysis of parameters of cell cycle and proliferative activity of peripheral blood (PB) lymphocytes was performed using the flow cytometry. The evaluation of distribution of cells by G₀/G₁, S-, G₂/M cell cycle phases was done *in vivo* and in *in vitro*. Proliferative potential was analyzed by level of expression of cytoplasmic protein of cyclin D1.

Results. Proliferative potential of PB lymphocytes of Chernobyl clean-up workers and persons with malignant neoplasms of the oral cavity, oropharynx and laryngopharynx was assessed. 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 the Chernobyl clean-up workers. An increase in pool of cells in the S- and G₂/M-phases of cell cycle was detected, which characterizes high proliferative potential of PB lymphocytes. These changes are most pronounced in the subgroup of persons with a radiation dose of D > 500 mSv, and in persons with oncological pathology.

Conclusions. A positive linear dependence has been established between the radiation dose and the number of cells in the S-phase of cell cycle in the subgroup of Chernobyl clean-up workers with a radiation dose of D > 500 mSv. The detected changes of cyclin D1-dependent regulation of cell cycle and proliferative status of lymphocytes depend on the radiation dose, can be a manifestation of genome instability and be a cause for risks of oncogenesis, in a remote period after radiation exposure.

Key words: cell cycle, cyclin D1, oncological pathology, radiation, Chernobyl.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2021;26:357-370. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-357-370

ВСТУП

Одним із найбільш значущих біологічних ефектів дії іонізуючого випромінювання є ураження генетичних структур клітинного ядра, що призводить до утворення подвійних розривів ДНК. Ступінь пошкодження залежить від дози опромінення. Хромосомні аберації, делеції, транслокації зберігаються і після репарації ДНК та у віддаленому періоді після опромінення, що свідчить про неефективність роботи механізмів контролю репарації ДНК, сигнальної трансдукції, проліферації та регуляції клітинного циклу.

INTRODUCTION

One of the most significant biological effects of ionizing radiation is damage of genetic structures of the cell nucleus, which leads to the formation of DNA double-strand breaks. The damage rate depends on the dose. Chromosomal aberrations, deletions and translocations persist after DNA repair and in a remote period after radiation exposure, which indicates a violation of the control mechanisms of DNA repair, signal transduction, proliferation and cell cycle regulation.

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

Циклін D1, продукт гена *PRADI/CCND1* (11q13), який за допомогою мітогенних стимулів та циклін-залежної кінази 4 ініціює реалізацію клітинного циклу і регулює фазовий перехід G₁/S контрольної точки в нормі та при патології. Дестабілізація/пригнічення експресії цикліну D1 перешкоджає переходу клітин в S-фазу, тоді як ампліфікація *CCND1* та гіперекспресія цикліну D1 призводять до активації білка ретинобластоми, що прискорює прогресію через G₁-фазу, клітинну проліферацію та сприяє злоякісній трансформації. Порушення механізмів регуляції цикліну D1, його акумуляції та деградації, звільняє клітину від її традиційного контролю проліферації, призводить до прогресування клітинного циклу [1], може викликати нестабільність геному та онкотрансформацію [2].

Клініко-патологічні дослідження показали, що гіперекспресія цикліну D1 корелює з метастазуванням пухлини та несприятливим прогнозом в ряді випадків раку людини [3–5]. Рівні експресії цикліну D1 безпосередньо корелюють з розміром пухлини, метастазами в лімфатичні вузли та пізніми клінічними стадіями плоскоклітинного раку голови та шиї [4]. Науковці підтримують використання показника рівня експресії цикліну D1 як прогностичного індикатора для оцінки виживання пацієнтів з раком легенів та молочної залози [3]. В пухлинах аденокарциноми підшлункової залози, меланоми шкіри, раку ендометрія, колоректальної карциноми, лімфоми селезінки з клітин мантіїної зони циклін D1 впливає на місцеву інвазію, метастазування та прогноз перебігу захворювання [5]. Важливу роль цикліну D1 в онкогенезі підкреслює ефективність використання інгібіторів циклін-залежної кінази для лікування раку.

Таким чином, визначення рівнів експресії цикліну D1 в лімфоцитах периферичної крові (ПК), аналіз клітинного циклу і проліферативної активності в нормі, при онкологічній патології та в учасників ліквідації наслідків аварії (ЛНА) на ЧАЕС надасть важливу діагностично-прогностичну інформацію при онкологічній патології та сприятиме розкриттю деяких аспектів формування патологічних станів у віддаленому періоді після опромінення, спричинених радіогенними порушеннями механізмів молекулярно-генетичного контролю геномної стабільності.

МЕТА

Дослідити особливості проліферативного потенціалу лімфоцитів периферичної крові учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС та осіб, хворих на злоякісні новоутворення порожнини рота, ротової та

Cyclin D1 protein is a product of *PRADI/CCND1* (11q13) gene that with mitogenic stimuli and cyclin-dependent kinase 4, initiates realization of cell cycle and regulates the G₁/S-phase transition of the checkpoint in normal and pathology. Destabilization/inhibition of cyclin D1 expression prevents the transition of cells to S-phase, while the amplification of *CCND1* and overexpression of cyclin D1 lead to the activation of retinoblastoma protein, that accelerates the progression through the G₁-phase, cell proliferation and promotes malignant transformation. Disturbance of the cyclin D1 regulation mechanisms, its accumulation and degradation, deprives a cell from its proliferation control, leads to cell cycle progression [1], can cause a genome instability and malignant transformation [2].

Clinical and pathological studies have shown that cyclin D1 overexpression correlates with tumor metastasis and poor prognosis in some cases of human cancer [3–5]. Cyclin D1 expression levels are directly correlated with tumor size, lymph node metastases, and late clinical stages of head and neck squamous cell carcinoma [4]. Researchers support the use of cyclin D1 expression levels as a prognostic indicator to assess the survival of patients with lung and breast cancer [3]. In tumors of pancreatic adenocarcinoma, skin melanoma, endometrial cancer, colorectal carcinoma, splenic lymphoma from cells of the mantle zone cyclin D1 effects local invasion, metastasis and prognosis of the disease [5]. The important role of cyclin D1 in oncogenesis emphasizes the efficiency of using cyclin-dependent kinase inhibitors for cancer treatment.

So, determination of cyclin D1 expression levels in peripheral blood (PB) lymphocytes, analysis of cell cycle and proliferative activity in normal, in oncology pathology and in Chernobyl clean-up workers will provide important diagnostic and prognostic information in oncology pathology and will contribute to the disclosure of some aspects of the formation of pathological conditions in a remote period after radiation exposure, caused by radiogenic disorders of the mechanisms of molecular genetic control of genomic stability.

OBJECTIVE

To explore proliferative potential of peripheral blood lymphocytes of Chernobyl clean-up workers and persons with malignant neoplasms of the oral cavity, oropharynx and laryngopharynx by level of

гортанної частини глотки за рівнем експресії цикліну D1 та кількісними показниками клітинного циклу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Стан клітинного циклу та проліферативну активність лімфоцитів досліджували в учасників ЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення (> 30 років). Загалом обстежено 294 чоловіків у віці ($58,47 \pm 7,32$) років. Обстежено 215 учасників ЛНА на ЧАЕС (основна група), опромінених у діапазоні доз 10,43–3623,31 мЗв. Стан здоров'я учасників ЛНА на ЧАЕС характеризувався поліморбідністю. У всіх діагностовано від двох та більше захворювань соматичного характеру, без злякисних новоутворень. Основний діагноз пов'язувався з непухлинними захворюваннями бронхолегеневої системи, переважно хронічної форми. Обстежено 30 осіб, мешканців екологічно небезпечних районів Запорізької області, хворих на злякисні новоутворення порожнини рота, ротової та гортанної частини глотки III, IVA і IVB стадій захворювання, які були обстежені та проходили лікування у КНП «Запорізький регіональний протипухлинний центр» Запорізької обласної ради. Критерії включення хворих на злякисні новоутворення порожнини рота: патогістологічне підтвердження злякисного процесу, підтвердження додатковими методами обстеження стадій захворювання (III, IVA і IVB) без віддалених метастазів, відсутність попереднього спеціального лікування, наявність інформованої згоди на включення в дослідження. Критерії виключення хворих з дослідження: відсутність патогістологічного підтвердження злякисного процесу, наявність I та II стадій захворювання або віддалених метастазів, наявність конкуруючої тяжкої соматичної патології, вродженого імунodefіциту, відсутність інформованої згоди на включення в дослідження. Контрольну групу склали 49 осіб, доза опромінення, яких не перевищувала максимально допустиме значення природного фону.

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 та культивували у живильному середовищі RPMI-1640 з L-глутаміном та натрію гідрокарбонатом NaHCO_3 (Sigma, США) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 100 мкг/мл гентаміцину в інкубаторі при 5 % CO_2 , температурі – 37 °C і 95 % вологості у 96-лункових плоскодонних культуральних планшетах протягом 18 годин.

expression of cyclin D1 and quantitative parameters of cell cycle.

MATERIALS AND METHODS

The state of cell cycle and proliferative activity of lymphocytes were studied in Chernobyl clean-up workers in a remote period after radiation exposure (> 30 years). A study was performed on 294 male, aged (58.47 ± 7.32). 215 (main group) of them were Chernobyl clean-up workers exposed at the dose range 10.43–3623.31 mSv. The state of health of Chernobyl clean-up workers is characterized by polymorbidity. All were diagnosed with two or more diseases of a somatic nature without malignant neoplasms and aplastic transformations. The main diagnosis was associated with non-neoplastic diseases of the bronchopulmonary system, predominantly of a chronic form. 30 persons, residents of ecologically dangerous areas of Zaporizhzhia region, were examined. Persons with malignant neoplasms of the oral cavity, oropharynx and laryngopharynx at III, IVA and IVB stages of the disease (group of positive control), which were examined and treated at the «Zaporizhzhia Regional Antitumor Center». Criteria for inclusion of persons with malignant neoplasms of the oral cavity: pathological confirmation of the malignant process, confirmation by additional methods of examination of locally advanced III, IVA and IVB stages of the disease without distant metastases, lack of prior special treatment and informed consent to inclusion in the study. Criteria for exclusion of persons from the study: no pathological confirmation of the malignant process, the presence of stage I and II of the disease or distant metastases, the presence of competing severe somatic pathology, congenital immunodeficiency, and the lack of informed consent for inclusion in the study. The control group consisted of 49 people, the radiation dose of which did not exceed the maximum allowable natural background level.

Analysis of proliferation potential and cyclin D1 expression in PB lymphocytes were performed 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 with L-glutamine and sodium bicarbonate NaHCO_3 (Sigma, USA) with 10 % of fetal bovine serum (Sigma, USA), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of gentamicin in CO_2 incubator at 37 °C, 5 % of CO_2 and 95 % humidity in 96-well culture plates during 18 hours.

Спонтанний та 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 моноклональних антитіл 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 в режимі ДНК-гістограм з відокремленням G₀/G₁-, S- та G₂/M-регіонів (фази клітинного циклу) та Sub-G₀/G₁ регіону (ядра клітин у стані апоптозу).

Результати статистично опрацювали у програмі Statistica 10.0. Застосовано дискрипційні методи статистичного аналізу, порівняльний аналіз з використанням *t*-критерію Стьюдента, кореляційний аналіз за Пірсоном.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Проведено дослідження спонтанного і мітоген-індукованого рівня цикліну D1 у лімфоцитах ПК здорових осіб, осіб зі злякисними новоутвореннями порожнини рота, ротової та гортанної частини глотки та учасників ЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення (табл. 1, 2). У пацієнтів з онкологічною патологією за середньогруповим значенням визначено статистично значуще ($p \leq 0,01$) підвищення рівня експресії цикліну D1. У 37 % пацієнтів даної групи визначається надлишкова експресія (≥ 20 %) цикліну D1, а у 27 % виявлено гіперекспресію (≥ 30 %) цикліну D1. Зважаючи на біологічні властивості цикліну D1, його значну роль у механізмах контролю проліферації, такий результат є очікуваним і узгоджується з даними інших дослідників [3]. Так, гіперекспресію цикліну D1 виявляють і пов'язують з розвитком та прогресією більшості онкозахворювань [3, 6–9]. У віддаленому періоді після опромінення в учасників ЛНА на ЧАЕС відмічено підвищення спонтанного рівня цикліну D1 у лімфоцитах ПК. Однак значущих розбіжностей між показниками експресії спонтанного і мітоген-індукованого рівня цикліну D1 у лімфоцитах ПК контрольної групи та учасників ЛНА на ЧАЕС не встановлено (табл. 1, 2).

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 G₀/G₁-, S- and G₂/M-regions (cell cycle phases) and Sub-G₀/G₁ region (cell nucleus in a state of apoptosis).

Statistical analysis of the data was performed using the statistical package Statistica 10. Applied: descriptive methods of statistical analysis, comparative analysis using Student's *t*-test, Pearson correlation analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

A study of spontaneous and mitogen-induced level of cyclin D1 in PB lymphocytes of healthy individuals, persons with malignant neoplasms of the oral cavity, oropharynx and laryngopharynx, and Chernobyl clean-up workers in a remote period after radiation exposure was carried out (Tables 1, 2). A statistically significant ($p \leq 0.01$) increase in the level of cyclin D1 expression was determined in patients with oncological pathology, according to the mean group value. Overexpression (≥ 20 %) of cyclin D1 was detected in 37 % of patients in this group, and overexpression (≥ 30 %) of cyclin D1 was detected in 27 %. Taking into account the biological properties of cyclin D1, its significant role in the mechanisms of proliferation control, such a result is expected and consistent with data of other researchers [3]. Thus, overexpression of cyclin D1 is detected and associated with the development and progression of most oncological diseases [3, 6–9]. An increase of spontaneous level of cyclin D1 in PB lymphocytes was detected in Chernobyl clean-up workers in a remote period after radiation exposure. However, significant differences between the expression of spontaneous and mitogen-induced levels of cyclin D1 in PB lymphocytes of the control group and Chernobyl clean-up workers were not found (Tables 1, 2).

Таблиця 1

Відносний рівень спонтанної експресії цикліну D1 у лімфоцитах ПК здорових осіб, осіб зі злякисними новоутвореннями порожнини рота, ротової та гортанної частин глотки та учасників ЛНА на ЧАЕС, (M ± SD)

Table 1

Relative level of spontaneous cyclin D1 expression in PB lymphocytes of healthy individuals, persons with oral, oropharyngeal, laryngopharyngeal cancer and Chornobyl clean-up workers, (M ± SD)

Показник Parameter	Групи обстеження / Groups		
	контроль (n = 49) control (n = 49)	учасники ЛНА на ЧАЕС (n = 215) Chornobyl clean-up workers (n = 215)	онкологічна патологія (n = 30) cancer (n = 30)
Циклін D1 / Cyclin D1, %	14,7 ± 13,1	18,6 ± 16,3	23,9 ± 10,7*

Примітка. *p ≤ 0,01 порівняно з контрольною групою.
Note. *p ≤ 0.01 vs control.

Таблиця 2

Відносний рівень мітоген-індукованої експресії цикліну D1 у лімфоцитах ПК здорових осіб, осіб зі злякисними новоутвореннями порожнини рота, ротової та гортанної частин глотки та учасників ЛНА на ЧАЕС, (M ± SD)

Table 2

Relative level of mitogen-induced cyclin D1 expression in PB lymphocytes of healthy individuals, persons with oral, oropharyngeal, laryngopharyngeal cancer and Chornobyl clean-up workers, (M ± SD)

Показник Parameter	Групи обстеження / Groups		
	контроль (n = 16) control (n = 16)	учасники ЛНА на ЧАЕС (n = 69) Chornobyl clean-up workers (n = 69)	онкологічна патологія (n = 28) cancer (n = 28)
Циклін D1 / Cyclin D1, %	19,7 ± 14,3	17,1 ± 15,9	16,8 ± 12,6

В нормі більшість лімфоцитів не схильні до активного поділу, їх проліферація починається після активації антигенним чи мітогенним стимулом. У практично здорових осіб спостерігається підвищення відносного рівня цикліну D1 в лімфоцитах ПК після стимуляції ФГА. Поряд з цим, порівняльний аналіз мітогенної стимуляції лімфоцитів ПК виявив зміни експресії цикліну D1 у лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС. Так, у переважній більшості обстежених учасників ЛНА на ЧАЕС та осіб з реалізованою онкологічною патологією після мітогенної стимуляції рівень експресії цикліну D1 знижувався. Ці зміни були виразнішими у групі пацієнтів зі злякисними новоутвореннями порожнини рота, ротової та гортанної частин глотки (рис. 1). Наявність змін проліферативних властивостей лімфоцитів в учасників ЛНА на ЧАЕС підтверджується даними аналізу показників клітинного циклу спонтанного і мітоген-індукованого рівнів лімфоцитів ПК (табл. 3).

До індукції мітогеном, у контрольній групі більшість лімфоцитів ПК ~ 84 % знаходяться у G₀/G₁-фазах клітинного циклу; тетраплоїдний набір ядерної ДНК (S-фаза) мають ~ 6,0 % лімфоцитів; ~ 0,91 % клітин проліферують – G₂/M-фаза

Normally, most lymphocytes are not prone to active division, their proliferation begins after activation by an antigenic or mitogenic stimulus. There is an increase in the relative level of cyclin D1 in PB lymphocytes after stimulation of PHA in practically healthy persons. In addition, a comparative analysis of mitogenic stimulation of PB lymphocytes revealed changes in the expression of cyclin D1 in Chornobyl clean-up workers. Thus, the level of cyclin D1 expression decreased after mitogenic stimulation in the vast majority of examined Chornobyl clean-up workers and persons with realized oncology pathology. These changes were more pronounced in group of persons with malignant neoplasms of the oral cavity, oropharynx and laryngopharynx (Fig. 1). The presence of changes in proliferative properties of lymphocytes in Chornobyl clean-up workers is confirmed by the analysis of cell cycle parameters of spontaneous and mitogen-induced levels of PB lymphocytes (Table 3).

Prior to mitogen induction, most PB lymphocytes in the control group (~84 %) are in the G₀/G₁-phases of cell cycle; tetraploid set of nuclear DNA (S-phase) have ~ 6.0 % of lymphocytes; ~ 0.91 % of cells proliferative the G₂/M-phase of cell cycle; 2.69 %

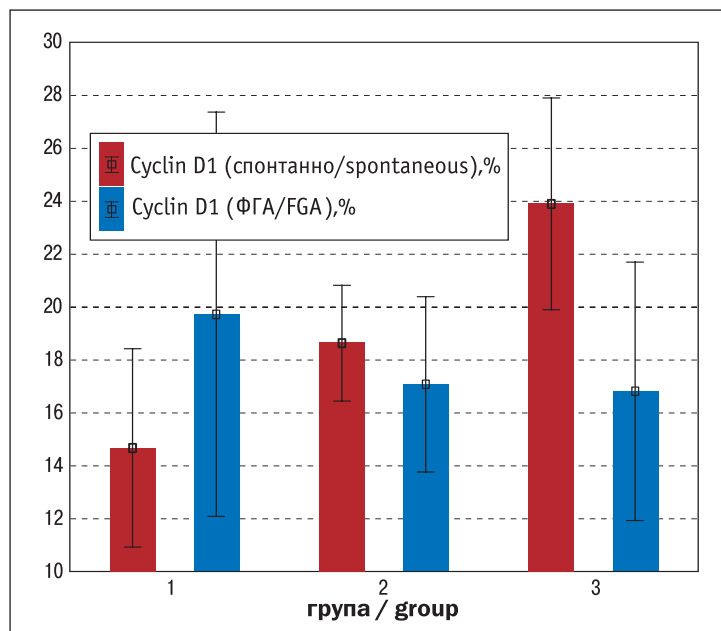


Рисунок 1. Відносний рівень спонтанної та мітоген-індукованої експресії цикліну D1 у лімфоцитах ПК осіб груп обстеження

1 – контрольна група, 2 – учасники ЛНА на ЧАЕС, 3 – група осіб з онкологічною патологією

Figure 1. Relative level of spontaneous and mitogen-induced expression of cyclin D1 in PB lymphocytes of persons in study group

1 – control group, 2 – Chernobyl clean-up workers, 3 – oncological pathology group

Таблиця 3

Показники клітинного циклу лімфоцитів ПК до та після індукції мітогеном у здорових осіб, осіб зі злякнісними новоутвореннями порожнини рота, ротової та гортанної частини глотки та учасників ЛНА на ЧАЕС, (M ± SD)

Table 3

Parameters of cell cycle of PB lymphocytes before and after mitogen induction in healthy individuals, persons with oral, oropharyngeal, laryngopharyngeal cancer and Chernobyl clean-up workers, (M ± SD)

Група / Group	n	Розподіл лімфоцитів за фазами клітинного циклу, % Distribution of lymphocytes by cell cycle phases, %				
		апоптоз/apoptosis	G ₀ / G ₁	S	G ₂ / M	
Контроль / control	спонтанно/spontaneous	35	2,7 ± 10,5	84,1 ± 13,5	6,1 ± 5,6	0,9 ± 1,6
	ФГА/PHA	18	4,4 ± 13,4	78,2 ± 20,9	11,7 ± 10,7***	5,6 ± 10,7***
Учасники ЛНА на ЧАЕС Chernobyl clean-up workers	спонтанно/spontaneous	167	2,3 ± 8,0	74,0 ± 27,3*	11,1 ± 11,7*	10,2 ± 24,2*
	ФГА/PHA	91	3,5 ± 11,6	77,7 ± 24,7	12,2 ± 10,5	8,9 ± 21,4
Онкологічна патологія / cancer	спонтанно/spontaneous	29	4,8 ± 5,4	86,3 ± 12,4	11,1 ± 8,6**	2,9 ± 6,2
	ФГА/PHA	28	5,6 ± 7,9	80,1 ± 22,1	9,5 ± 6,6	10,5 ± 20,6

Примітки. * $p \leq 0,05$ порівняно зі спонтанним рівнем в контрольній групі; ** $p \leq 0,01$ порівняно зі спонтанним рівнем в контрольній групі; *** $p \leq 0,05$ порівняно зі спонтанним рівнем в межах досліджуваної групи

Notes. * $p \leq 0.05$ vs spontaneous level in the control group; ** $p \leq 0.01$ vs spontaneous level in the control group; *** $p \leq 0.05$ vs spontaneous level within the study group

клітинного циклу; 2,69 % лімфоцитів з пошкодженою ДНК / гіподиплоїдні (апоптоз). В учасників ЛНА на ЧАЕС характерним є незначне зниження вмісту клітин у G₀/G₁-фазах клітинного циклу, що позначається на кількості проліферуючих клітин і клітин з тетраплоїдним набором ядерної ДНК. Так, у групі опромінених осіб встановлено статистично значуще підвищення спонтанного рівня лімфоцитів, що знаходяться у S- та G₂/M-фазах клітинного циклу ($p \leq 0,05$). Привертає увагу, що в групі пацієнтів з онкологічною патологією середньогрупове значення спонтанного рівня клітин S-фази також значно підвищене ($p \leq 0,01$) порівняно з контрольною групою (табл. 3).

of lymphocytes with damaged hypodiploid DNA (apoptosis). Chernobyl clean-up workers are characterized by a slight decrease in the content of cells in the G₀/G₁-phases of cell cycle, which affects the number of proliferating cells and cells with tetraploid sets of nuclear DNA. Thus, a statistically significant increase in spontaneous level of lymphocytes in the S- and G₂/M-phases of cell cycle ($p \leq 0.05$) was found in the group of exposed persons. It is noteworthy that in the group of persons with oncology pathology, the mean group value of spontaneous level of S-phase cells is also significantly increased ($p \leq 0.01$) compared with the control group (Table 3).

За даними аналізу клітинного циклу лімфоцитів після індукції мітогеном спостерігається підвищення проліферативного потенціалу лімфоцитів у всіх групах дослідження. Привертає увагу, що рівень активно проліферуючих клітин G_2/M -фази має тенденцію до підвищення, як у групі учасників ЛНА на ЧАЕС, так і в групі онкологічних хворих, в останній цей показник більш виражений. Однак статистично значущої різниці міжгрупових показників клітинного циклу після індукції мітогеном не виявлено (табл. 3).

Проведено порівняльний аналіз показників клітинного циклу лімфоцитів ПК до і після індукції мітогеном (табл. 3). Показано, що частка проліферуючих клітин достовірно збільшилась лише в осіб контрольної групи ($p \leq 0,01$). В учасників ЛНА на ЧАЕС рівень лімфоцитів, що перебувають у S -фазі клітинного циклу практично не змінювався, а кількість клітин у G_2/M -фазі дещо знизилась. Привертає увагу підвищення кількості активно проліферуючих клітин G_2/M -фази у групі осіб з онкологічною патологією, однак статистично значущої різниці показників клітинного циклу у групах учасників ЛНА на ЧАЕС та осіб зі злоякісними новоутвореннями порожнини рота, ротової та гортанної частини глотки не визначено у порівнянні зі спонтанним рівнем (табл. 3). Рівень лімфоцитів ПК в S -фазі після стимуляції ФГА також статистично значуще підвищився в осіб контрольної групи. У опромінених осіб даний показник залишається високим – 12,2 %. Зважаючи на факт накопичення клітин у S -фазі, це може відображати наявність пошкоджень ДНК і затримку клітинного циклу у G_1/S контрольній точці для здійснення репарації.

Для проведення детального аналізу дозозалежних ефектів, обстежені пацієнти, учасники ЛНА на ЧАЕС, були розподілені на три підгрупи залежно від дози опромінення. До 1-ї підгрупи увійшли 55 учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у діапазоні доз 10–100 мЗв ($10 < D \leq 100$), 2-гу підгрупу склали 85 осіб з дозою опромінення 103–498 мЗв ($100 < D \leq 500$), і, відповідно, 3-тю – 44 особи з дозою опромінення 512–3623 мЗв ($D \geq 500$ мЗв). Аналіз спонтанної експресії цитоплазматичного цикліну D1 в лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС залежно від дози опромінення показав підвищення середньогрупових значень відносного рівня цикліну D1 в усіх підгрупах осіб, які були опромінені внаслідок аварії на ЧАЕС, у порівнянні з контрольною групою (табл. 4). Значне підвищення спонтанної експресії цитоплазматичного цикліну

According to the analysis of cell cycle of lymphocytes after induction by mitogen, there is an increase in proliferative potential of lymphocytes in all study groups. It is noteworthy that the level of actively proliferating cells of the G_2/M -phase tends to increase, both in the group of Chernobyl clean-up workers and in the group of oncological patients, in the latter this indicator is more pronounced. However, statistically significant differences in intergroup parameters of cell cycle after induction by mitogen were not detected (Table 3).

A comparative analysis of cell cycle parameters of PB lymphocytes before and after induction by mitogen was carried out (Table 3). It was shown that the proportion of proliferating cells significantly increased only in the control group ($p \leq 0.01$). The level of lymphocytes in the S -phase of cell cycle did not change in Chernobyl clean-up workers, and the number of cells in the G_2/M -phase slightly decreased. The increase in the number of actively proliferating cells of the G_2/M -phase in the group with oncological pathology is noteworthy, but no statistically significant difference in cell cycle parameters in the groups of Chernobyl clean-up workers and persons with malignant neoplasms of the oral cavity, oropharynx and laryngopharynx with compared to spontaneous level (Table 3). The level of PB lymphocytes in the S -phase after PHA stimulation also statistically significantly increased in the control group. This parameter remains high – 12.2 % in exposed persons. Due to the accumulation of cells in the S -phase, this may reflect the presence of DNA damage and the delay of cell cycle at the G_1/S checkpoint for repair.

For a detailed analysis of dose-dependent effects, the examined Chernobyl clean-up workers, were divided into three subgroups depending on the radiation dose. The 1st subgroup included Chernobyl 55 clean-up workers exposed at the dose range of 10–100 mSv ($10 < D \leq 100$), 2nd subgroup consisted of 85 people with a radiation dose of 103–498 mSv ($100 < D \leq 500$), and accordingly, to the 3rd subgroup of 44 persons with a radiation dose of 512–3623 mSv ($D \geq 500$ mSv). Analysis of spontaneous expression of cytoplasmic cyclin D1 in lymphocytes of Chernobyl clean-up workers, depending on the radiation dose showed an increase in the mean group values of the relative level of cyclin D1 in all subgroups of exposed persons with the control group (Table 4). A significant increase in spontaneous expression of cytoplasmic cyclin D1 in PB lymphocytes, name-

Таблиця 4

Відносний рівень спонтанної експресії цикліну D1 у лімфоцитах ПК здорових осіб, осіб зі злоякісними новоутвореннями порожнини рота, ротової та гортанної частини глотки та учасників ЛНА на ЧАЕС залежно від дози опромінення, (M ± SD)

Table 4

The relative level of spontaneous cyclin D1 expression in PB lymphocytes of healthy individuals, persons with oral, oropharyngeal, laryngopharyngeal cancer and Chernobyl clean-up workers depending on radiation dose (M ± SD)

Група / group	n	Циклін D1/ Cyclin D1, %
Контроль / control	49	14,7 ± 13,1
Учасники ЛНА на ЧАЕС Chernobyl clean-up workers	10 < D ≤ 100 мЗв / mSv	19,9 ± 17,5
	100 < D ≤ 500 мЗв / mSv	16,8 ± 14,6
	D ≥ 500 мЗв / mSv	22,5 ± 15,3*
Онкологічна патологія / cancer	30	23,9 ± 10,7*

Примітка. *p ≤ 0,01 порівняно з контрольною групою
Note. *p ≤ 0,01 vs control group

D1 у лімфоцитах ПК, а саме 22,83 % (p ≤ 0,01) встановлено у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, які були опромінені в діапазоні доз від 500 мЗв до 3623 мЗв. У осіб з дозою опромінення 10 < D ≤ 100 мЗв та 100 < D ≤ 500 мЗв даний показник був дещо підвищеним, однак не відрізнявся суттєво від такого в контрольній групі (рис. 2).

Проведено порівняльний аналіз показників експресії цикліну D1 у лімфоцитах ПК до і після індукції мітогеном (табл. 5). У контрольній групі рівень експресії цитоплазматичного цикліну D1 після

ly 22.83 % (p ≤ 0.01) was found in a subgroup of Chernobyl clean-up workers, exposed at the dose range from 500 mSv to 3623 mSv. This parameter was slightly higher in persons with a radiation dose of 10 < D ≤ 100 mSv and 100 < D ≤ 500 mSv, but did not have a significant difference compared with that in the control group (Fig. 2).

A comparative analysis of cyclin D1 expression in PB lymphocytes before and after induction by mitogen was carried out (Table 5). The level of cytoplasmic cyclin D1 expression after mitogen stimula-

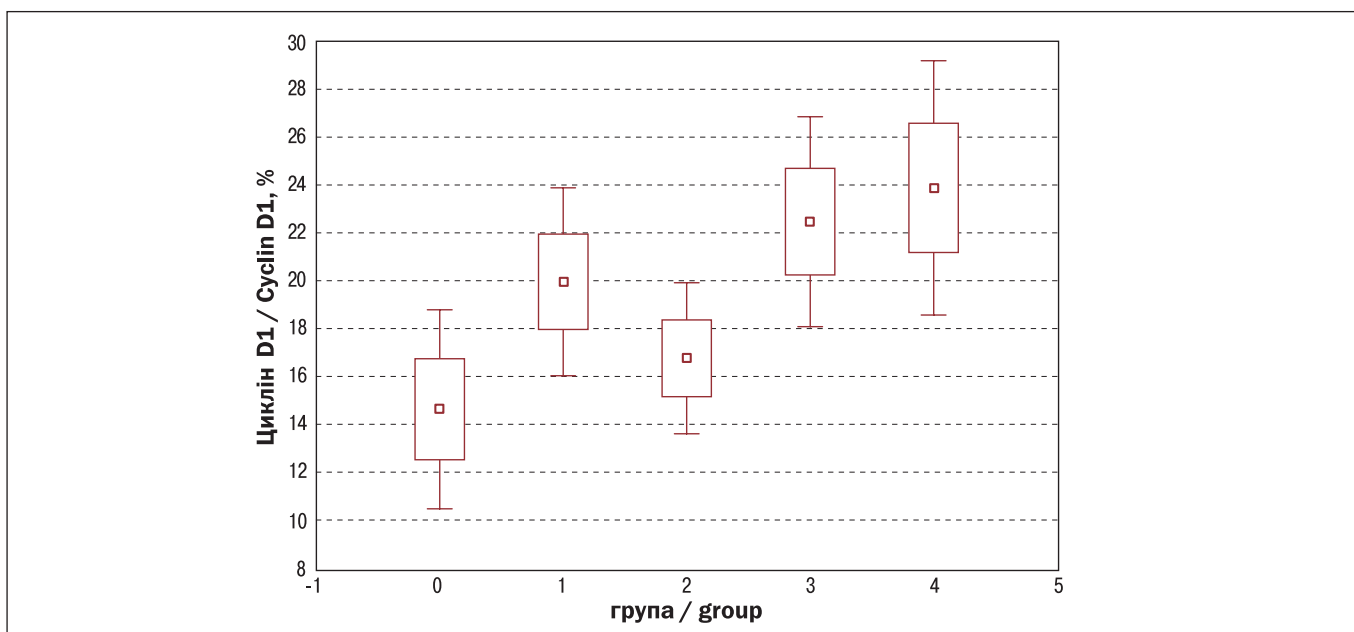


Рисунок 2. Відносний рівень спонтанної експресії цикліну D1 у лімфоцитах ПК осіб груп обстеження 0 – контрольна група; 1 – підгрупа учасники ЛНА на ЧАЕС (10 < D ≤ 100 мЗв); 2 – підгрупа учасники ЛНА на ЧАЕС (100 < D ≤ 500 мЗв); 3 – підгрупа учасники ЛНА на ЧАЕС (D ≥ 500 мЗв); 4 – група осіб з онкологічною патологією

Figure 2. Relative level of spontaneous cyclin D1 expression in PB lymphocytes of persons in study group 0 – control group, 1 – Chernobyl clean-up workers subgroup (10 < D ≤ 100 mSv), 2 – Chernobyl clean-up workers subgroup (100 < D ≤ 500 mSv), 3 - Chernobyl clean-up workers subgroup (D ≥ 500 mSv), 4 – cancer

Таблиця 5

Показники експресії цикліну D1 в лімфоцитах ПК до та після індукції мітогеном у здорових осіб, осіб зі злякисними новоутвореннями порожнини рота, ротової та гортанної частини глотки та учасників ЛНА на ЧАЕС залежно від дози опромінення, (M ± SD)

Table 5

Parameters of cyclin D1 expression of PB lymphocytes before and after mitogen induction in healthy individuals, persons with oral, oropharyngeal, laryngopharyngeal cancer and Chernobyl clean-up workers depending on the radiation dose, (M ± SD)

Група / group	Вміст лімфоцитів з експресією цикліну D1, % Distribution of lymphocytes with cyclin D1 expression, %	
	спонтанно / spontaneous	ФГА / PHA
Контроль / control	14,7 ± 13,1	19,7 ± 14,4
Учасники ЛНА на ЧАЕС Chernobyl clean-up workers	10 < D ≤ 100 мЗв / mSv	19,97 ± 17,5
	100 < D ≤ 500 мЗв / mSv	16,8 ± 14,6
	D > 500 мЗв / mSv	22,5 ± 15,3
Онкологічна патологія / cancer	23,9 ± 10,7	16,8 ± 12,6*

Примітка. *p ≤ 0,05 порівняно зі спонтанним рівнем
Note. *p ≤ 0,05 vs spontaneous level

стимуляції мітогеном зростає, тоді як у осіб з онкологічною патологією він достовірно знижується (p ≤ 0,05) (табл. 5). У опромінених осіб, рівні лімфоцитів ПК, що експресують циклін D1, у більшості випадків мають тенденцію до зниження. Так, тенденція зниження експресії цикліну D1 відмічена в підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС з дозою опромінення 10 < D ≤ 100 мЗв на 12 % та D > 500 мЗв на 17,5%. У підгрупі осіб з дозою опромінення 100 < D ≤ 500 мЗв даний показник практично не змінювався порівняно зі спонтанним рівнем (табл. 5). Зміни проліферативного потенціалу під дією ФГА, а саме зниження рівня цикліну D1 на межі G₀/G₁-фази клітинного циклу (18 год стимуляції ФГА), що передусім відмічається у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС з дозою опромінення D > 500 мЗв, вказують на можливість затримки клітинного циклу в межах G₁ періоду, G₁/S контрольної точки, що може бути проявом нестабільності геному лімфоцитів у віддаленому періоді після опромінення, оскільки зупинка клітинного циклу у G₁/S контрольній точці здійснюється в разі виявлення подвійних розривів ДНК, неправильної сегрегації хромосом, руйнування системи мікротрубочок або через незавершеність попереднього клітинного циклу – порушення числа хромосом [10]. Клітина, яка пройшла контрольну точку, запрограмована на реплікацію і більше не залежить від зовнішніх стимулів. Аналогічні зміни, але більш виражені, виявлені у групі пацієнтів з онкологічною патологією.

Порівняльний аналіз показників клітинного циклу лімфоцитів ПК після індукції мітогеном в

tion increases in the control group, while in persons with oncological pathology significantly decreases (p ≤ 0.05) (Table 5). The levels of PB lymphocytes expressing cyclin D1 in most cases tend to decrease in exposed persons. Thus, the tendency to decrease cyclin D1 expression was observed in the subgroup of Chernobyl clean-up workers with a radiation dose of 10 < D ≤ 100 mSv by 12 % and D > 500 by 17.5 %. This parameter did not change in comparison with the spontaneous level in the subgroup of persons with a radiation dose of 100 < D ≤ 500 mSv (Table 5). Changes in proliferative potential under the action of PHA, namely the decrease in the level of cyclin D1 at the boundary of the G₀/G₁-phase of cell cycle (18 h of PHA stimulation), which is observed in a subgroup of Chernobyl clean-up workers with a radiation dose of D > 500, indicates the possibility of delaying cell cycle within the G₁ period, G₁/S checkpoint, which may be a manifestation of genome instability of lymphocytes in the remote period after radiation exposure. Thus, the arrest of cell cycle at the G₁/S checkpoint is carried out in the case of detection of DNA double-strand breaks, incorrect segregation of chromosomes, destruction of the microtubule system or due to incompleteness of previous cell cycle [10]. The cell that has passed the checkpoint is programmed for replication and is more not dependent on external stimulus. Similar changes but more pronounced were found in the group of persons with oncological pathology.

Comparative analysis of PB lymphocyte cell cycle parameters after mitogen induction in the

учасників ЛНА на ЧАЕС залежно від дози опромінення наведено у табл. 6.

У віддалений період після опромінення в учасників ЛНА на ЧАЕС на фоні збільшення експресії цитоплазматичного білка цикліну D1, що є ознакою підвищеного проліферативного потенціалу лімфоцитів ПК, виявлено статистично значуще збільшення клітин з тетраплоїдним набором ДНК, що знаходяться у S-фазі (активного синтезу білка), у всіх досліджуваних підгрупах. Найвиразніші зміни даного показника виявлено у групі з онкологічною патологією. Поряд з цим, у підгрупах осіб, опромінених в дозах $100 < D \leq 500$ мЗв та $D > 500$ мЗв, визначено статистично значуще збільшення проліферуючих лімфоцитів, що знаходяться у G₂/M-фазі клітинного циклу, порівняно зі спонтанним рівнем в контрольній групі. Стимуляція лімфоцитів ПК ФГА призвела до індукції клітинного поділу і підвищення кількості проліферуючих клітин у всіх обстежених осіб. В осіб контрольної групи визначено статистично значуще підвищення проліферативного потенціалу лімфоцитів після стимуляції мітогеном, тоді як у опромінених осіб простежується лише тенденція до збільшення лімфоцитів у S- та G₂/M-фазах клітинного циклу порівняно зі спонтанним рівнем. Найбільшу кількість лімфоцитів, що знаходяться у G₂/M-фазі, визначено у підгрупі осіб, опромінених в дозі, що перевищує 500 мЗв, та у групі

Chornobyl clean-up workers, depending on the radiation dose are shown in Table 6.

A statistically significant increase in cells with a tetraploid set of DNA, which are in the S-phase (active protein synthesis) found against the background of increased expression of cytoplasmatic protein cyclin D1, which is a sign of increased proliferative potential of PB lymphocytes in all studied subgroups of Chornobyl clean-up workers in a remote period after radiation exposure. The most pronounced changes in this parameter were found in the group of positive control with oncological pathology. In addition, determined a statistically significant increase proliferating lymphocytes, which are in the G₂/M-phase of cell cycle in the subgroups of persons, exposed at the dose range $100 < D \leq 500$ mSv and $D > 500$ mSv, compared to the spontaneous level in the control group. Stimulation of PHA PB lymphocytes led to the induction of cell division and an increase in the number of proliferating cells in all surveyed persons. There was a statistically significant increase in proliferative potential of lymphocytes after stimulation with mitogen in the control group, while in irradiated persons, there was only a tendency to increase lymphocytes in the S- and G₂/M-phases of cell cycle compared to spontaneous level. The highest number of lymphocytes in the G₂/M-phase was found in the subgroup of persons, exposed at the dose range $D > 500$ mSv and in the

Таблиця 6

Показники клітинного циклу лімфоцитів ПК до та після індукції мітогеном в учасників ЛНА на ЧАЕС залежно від дози опромінення, (M ± SD)

Table 6

Parameters of cell cycle of PB lymphocytes before and after mitogen induction in Chornobyl clean-up workers depending on the radiation dose, (M ± SD)

Група / Group		Показник клітинного циклу, % Parameters of cell cycle, %			
		апоптоз/apoptosis	G ₀ / G ₁	S	G ₂ / M
Контроль / control	спонтанно/spontaneous	2,7 ± 10,5	84,1 ± 13,5	6,1 ± 5,6	0,9 ± 1,6
	ФГА/PHA	4,4 ± 13,4	78,2 ± 20,9	11,7 ± 10,7***	5,6 ± 10,7***
10 < D ≤ 100 мЗв / mSv	спонтанно/spontaneous	1,2 ± 2,1	76,6 ± 23,3	12,4 ± 14,0*	6,0 ± 15,6
	ФГА/PHA	1,4 ± 1,7	76,8 ± 23,2	14,0 ± 11,9	8,6 ± 15,4
100 < D ≤ 500 мЗв / mSv	спонтанно/spontaneous	2,8 ± 4,9	68,4 ± 34,0**	9,8 ± 11,3*	17,1 ± 32,8**
	ФГА/PHA	4,3 ± 15,9	81,8 ± 23,2?	9,2 ± 9,0	7,1 ± 21,4
D > 500 мЗв / mSv	спонтанно/spontaneous	3,6 ± 16,3	77,5 ± 21,8	10,9 ± 10,8*	7,3 ± 17,9*
	ФГА/PHA	0,8 ± 1,4	77,4 ± 27,9	11,5 ± 11,7	0,4 ± 25,6
Онкологічна патологія / cancer	спонтанно/spontaneous	4,8 ± 5,4	86,3 ± 12,4	11,2 ± 8,6**	2,9 ± 6,2
	ФГА/PHA	5,6 ± 7,9	80,1 ± 22,1	9,5 ± 6,6	10,5 ± 20,6

Примітки. *p ≤ 0,05 порівняно зі спонтанним рівнем в контрольній групі; **p ≤ 0,01 порівняно зі спонтанним рівнем в контрольній групі; ***p ≤ 0,05 порівняно зі спонтанним рівнем в межах досліджуваної групи

Notes. *p ≤ 0.05 vs spontaneous level in the control group; **p ≤ 0.01 vs spontaneous level in the control group; ***p ≤ 0.05 vs spontaneous level within the study group

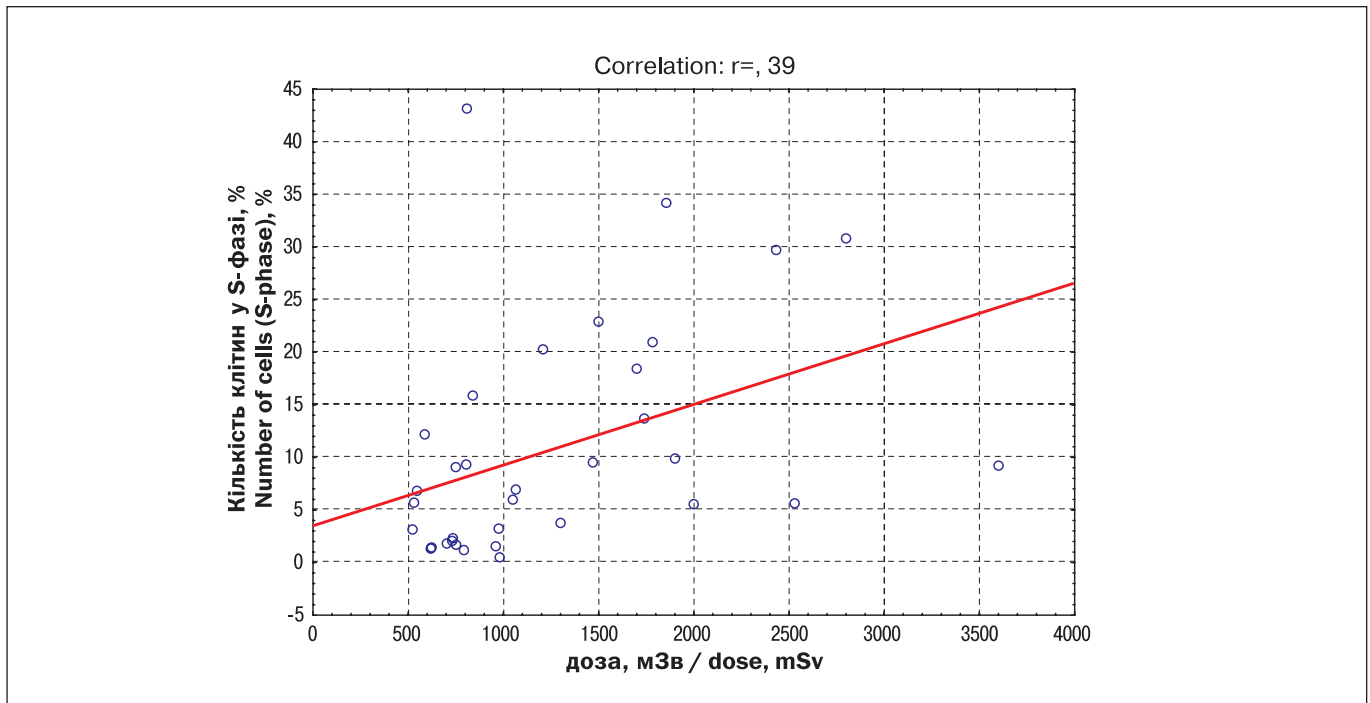


Рисунок 3. Кореляція між дозою опромінення та рівнем лімфоцитів ПК (S-фаза) у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС з дозою опромінення $D > 500$ мЗв

Figure 3. Correlation between the radiation dose and the level of PB lymphocytes (S-phase) in a Chernobyl clean-up workers subgroup with a radiation dose $D > 500$ mSv

пацієнтів з онкологічною патологією, однак достовірної різниці у порівнянні з контрольною групою не виявлено (табл. 6).

Проведено статистичний аналіз залежності доза–ефект у всіх підгрупах учасників ЛНА на ЧАЕС. Кореляційний аналіз не виявив залежності між рівнем експресії цикліну D1 в лімфоцитах ПК та дозою опромінення у всіх підгрупах учасників ЛНА на ЧАЕС. Виявлено позитивну лінійну залежність слабкої сили між дозою опромінення і кількістю клітин S-фази клітинного циклу ($r = 0,39$; $p < 0,05$) у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозах $D > 500$ мЗв (рис. 3).

Отже, у віддаленому періоді після опромінення, за умов гіперекспресії цикліну D1, існує ризик неконтрольованої проліферації лімфоцитів з подальшою онкотрансформацією. 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_2/M -фазі клітинного циклу. З іншого боку, виявлені зміни проліферативного статусу після мітогенної індукції можуть вказувати на затримку клітинного циклу у межах G_1/S контрольної точки, скорочення S-фази, що є проявом нестабільності геному лімфоцитів, та залежать від дози опромінення.

group of patients with oncological pathology, but no significant difference compared with the control group (Table 6).

A statistical analysis of the dose-effect relationship was performed in all subgroups of Chernobyl clean-up workers. Correlation analysis did not reveal a relationship between the level of cyclin D1 expression in PB lymphocytes and the radiation dose in all subgroups of Chernobyl clean-up workers. A positive linear dependence of the weak force between the radiation dose and the number of cells in the S-phase of cell cycle ($r = 0.39$; $p < 0.05$) was revealed the Chernobyl clean-up workers, exposed at the dose range $D > 500$ mSv (Fig. 3).

Thus, there is a risk of uncontrolled proliferation of lymphocytes under conditions of cyclin D1 overexpression in the remote period after radiation exposed with subsequent malignant transformation. An additional evidence of high proliferative potential of PB lymphocytes of Chernobyl clean-up workers is accumulation of lymphocytes in the S-phase followed by an excessive level of actively proliferating cells in the G_2/M -phase of cell cycle. On the other hand, detected changes in proliferative status after mitogenic induction may indicate cell cycle delay within the G_1/S checkpoint, a reduction in S-phase, which is a manifestation of lymphocyte genome instability and depend on the radiation dose.

ВИСНОВКИ

1. В учасників ЛНА на ЧАЕС та у пацієнтів з онкологічною патологією встановлено підвищення спонтанного рівня цикліну D1 та порушення циклін D1-залежної регуляції клітинного циклу лімфоцитів ПК після активації мітогеном.
2. У віддалений період після опромінення в учасників ЛНА на ЧАЕС визначено збільшення кількості клітин у S- та G₂/M-фазах клітинного циклу, що є проявом підвищеної проліферативної активності лімфоцитів ПК. Дані зміни найбільш виражені у підгрупі осіб, опромінених в дозі D > 500 мЗв, та у пацієнтів зі злякисними новоутвореннями порожнини рота, ротової та гортанної частини глотки III, IVA і IVB стадій захворювання.
3. Встановлено позитивну лінійну залежність слабкої сили між дозою опромінення та кількістю клітин S-фази клітинного циклу ($r = 0,39$; $p < 0,05$) у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозах D > 500 мЗв.
4. Виявлені зміни циклін D1-залежної регуляції клітинного циклу і проліферативного статусу лімфоцитів залежать від дози опромінення та є проявом нестабільності геному, що може потенціювати ризики онкогенезу у віддалений період після опромінення.

Інформація про фінансування

Робота виконана в рамках планової НДР «Вивчення ролі транскрипційних та трансляційних змін молекулярного каскаду *ATM/CHEK2/P53/PUMA* у формуванні віддалених канцерогенних ефектів опромінення в імунній системі учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС (2019–2021 рр.)», № держреєстрації 0119U100697 за фінансування НАМН України.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation / J. R. Alt, J. L. Cleveland, M. Hannink, J. A. Diehl. *Genes Dev.* 2000. Vol. 14, no. 24. P. 3102–3114. doi: 10.1101/gad.854900.
2. Qie S. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment / S. Qie, J. A. Diehl. *J. Mol. Med.* 2016. Vol. 94, no. 12. P. 1313–1326. doi: 10.1007/s00109-016-1475-3.
3. Cyclin D as a therapeutic target in cancer / E. A. Musgrove, C. E. Caldon, J. Barraclough et al. *Nat. Rev. Cancer.* 2011. Vol. 8, no. 11. P. 558–572. doi: 10.1038/nrc3090.
4. Thomas G. R., Nadiminti H., Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Exp. Pathol.* 2005. Vol. 6, no. 86. P. 47–363. doi: 10.1111/j.0959-9673.2005.00447.x.

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 and in persons with oncological pathology.
2. An increase in the number of cells in the S- and G₂/M-phases of the cell cycle was detected in Chernobyl clean-up workers in a remote period after irradiation, which is evidence of an increased proliferative activity of PB lymphocytes. These changes are most pronounced in the subgroup exposed at a dose D > 500 mSv, and in persons with malignant neoplasms of the oral cavity, oropharynx and laryngopharynx at III, IVA and IVB stages of the disease.
3. A positive linear dependence of the weak force was found between the radiation dose and the number of cells in the S-phase of cell cycle ($r = 0.39$; $p < 0.05$) in the subgroup of Chernobyl clean-up workers, which a radiation dose D > 500 mSv.
4. The revealed changes in cyclin D1-dependent regulation of cell cycle and proliferative status of lymphocytes depend on the radiation dose and are a manifestation of genome instability, which can enhance risks of oncogenesis in a remote period after radiation exposure.

Funding

The work was a part of the «Study of the role of transcriptional and translational changes in the molecular cascade *ATM/CHEK2/P53/PUMA* in the formation of long-term carcinogenic radiation effects in immune system of the ChNPP accident clean-up workers (2019–2021)» project, State Reg. №0119U100697 for financing from the NAMS of Ukraine.

REFERENCES

1. Alt JR, Cleveland JL, Hannink M, Diehl JA. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev.* 2000;14(24):3102-3114. doi: 10.1101/gad.854900.
2. Qie S, Diehl JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med.* 2016;94(12):1313-1326. doi: 10.1007/s00109-016-1475-3.
3. Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;8(11):558-572. doi: 10.1038/nrc3090.
4. Thomas GR, Nadiminti H, Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol.* 2005;6(86):47-363. doi: 10.1111/j.0959-9673.2005.00447.x.

5. Diehl J. A., Ponugoti B. Ubiquitin-dependent proteolysis in G1/S phase control and its relationship with tumor susceptibility. *Genes Cancer*. 2010. Vol. 1, no. 7. P. 717–724. doi: 10.1177/1947601910382902.
6. 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.
7. Sutherland R. L., Musgrove E. A. Cyclin D1 and mammary carcinoma: new insights from transgenic mouse models. *Br. Cancer Res*. 2002. Vol. 4, no. 1. P. 14–17. doi: 10.1186/bcr411
8. 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. doi: 10.1038/sj.bjc.6690661.
9. Alao J. P. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol. Cancer*. 2007. Vol. 6, no. 1. P. 24. doi: 10.1186/1476-4598-6-24.
10. 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. doi: 10.1128/MCB.18.2.1055.
5. Diehl JA, Ponugoti B. Ubiquitin-dependent proteolysis in G1/S phase control and its relationship with tumor susceptibility. *Genes Cancer*. 2010;1(7):717-724. doi: 10.1177/1947601910382902.
6. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003;36(3):131-149. doi: 10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x.
7. Sutherland RL, Musgrove EA. Cyclin D1 and mammary carcinoma: new insights from transgenic mouse models. *Br Cancer Res*. 2002;4(1):14-17. doi: 10.1186/bcr411
8. 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;81(1):127-132. doi: 10.1038/sj.bjc.6690661.
9. Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer*. 2007;6(1):24. doi: 10.1186/1476-4598-6-24.
10. Lanni JS, Jacks T. Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol Cell Biol*. 1998;18(2):1055-1064. doi: 10.1128/MCB.18.2.1055.

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, ORCID: 0000-0002-8760-5859

Ільєнко Ірина Миколаївна, доктор біологічних наук, старший дослідник, завідувач лабораторії імуноцитології відділу клінічної імунології, Інститут клінічної радіології, ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України» (ННЦРМ), м. Київ, , ORCID: 0000-0003-4405-0328

Зварич Лілія Миколаївна, молодший науковий співробітник лабораторії імуноцитології відділу клінічної імунології, Інститут клінічної радіології, ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України» (ННЦРМ), м. Київ, , ORCID: 0000-0003-1805-1319

Воробйов Микола Олегович, лікар-радіолог КНП «Запорізький регіональний протипухлинний центр» Запорізької обласної ради, м. Запоріжжя

Базика Дмитрій Анатолійович, доктор медичних наук, академік НАМНУ, генеральний директор ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України» (ННЦРМ), м. Київ, , ORCID: 0000-0001-9982-5990

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Natalia A. Golyarnik, Ph.D., Department of Clinical Immunology, Laboratory of immunocytology, Institute for Clinical Radiology, State Institution «National Research Centre for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine, ORCID: 0000-0002-8760-5859

Iryna N. Ilienko, Dr. Sci., Laboratory of immunocytology, Institute for Clinical Radiology, State Institution «National Research Centre for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Department of Clinical Immunology, Kyiv, Ukraine, ORCID: 0000-0003-4405-0328

Liliia M. Zvarych, Department of Clinical Immunology, Laboratory of immunocytology, Institute for Clinical Radiology, State Institution «National Research Centre for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine, ORCID: 0000-0003-1805-1319

Mykola O. Vorobyov, Municipal non-profit enterprise «Zaporizhzhia Regional Antitumor Center» Zaporizhzhia Regional Council, Zaporizhzhia, Ukraine

Dimitry A. Bazyka, MD, Prof., Department of Clinical Immunology, Institute for Clinical Radiology, State Institution «National Research Centre for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine, ORCID: 0000-0001-9982-5990