

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.07.086>

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

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

ДУ “Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України”, Київ
E-mail: pww@ukr.net

Цитогенетичні ефекти в змішаній культурі клітин крові хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію з лімфоцитами крові здорових осіб

Представлено членом-кореспондентом НАН України В.А. Кунахом

З використанням власної експериментальної модельної системи для вивчення феномена bystander response в соматичних клітинах людини (спільне культивування лімфоцитів периферичної крові різностатевих донорів, що дає можливість розрізняти клітини-індуктори і клітини-свідки за наявністю або відсутністю статеві Y хромосоми) досліджено особливості взаємодії між малігнізованими і нормальними клітинами людини. Для досліджень було сформовано дві групи спостереження: група порівняння — сім умовно здорових добровольців, необтяжених анамнезом (п'ять жінок, двоє чоловіків), які заперечували свідомий контакт з іонізуючою радіацією та іншими мутагенними факторами, група онкохворих — сім осіб (п'ять чоловіків, двоє жінок) з діагнозом первинна В-клітинна хронічна лімфоцитарна лейкемія (ХЛЛ) до початку специфічної терапії. Встановлено, що кокультивування клітин крові осіб з діагнозом ХЛЛ (клітини-індуктори) з інтактними лімфоцитами периферичної крові здорових осіб (клітини-свідки) спричиняє підвищення частоти хромосомних аберацій в нормальних клітинах ($1,52 \pm 0,30$ і $3,31 \pm 0,50$ на 100 метафаз відповідно, $p < 0,001$), що підтверджує розвиток прямого пухлино-індукованого ефекту свідка.

Ключові слова: змішана культура лімфоцитів периферичної крові людини, хронічна лімфоцитарна лейкемія, аберації хромосом, пухлино-індукований ефект свідка.

Одним із проявів універсального феномену bystander response як відповіді нормальних клітин (свідків) на генотоксичний стрес, індукований клітинами-мішенями, є нещодавно відкритий прямий і зворотний пухлино-індукований ефект свідка (tumor-induced bystander effect (TIBE)) — результат взаємодії між здоровими та злоякісними клітинами [1, 2]. Здатність до індукції TIBE встановлено, зокрема, для клітин меланоми та аденокарциноми легенів за умов їх сумісного культивування з нормальними клітинами з різних тканин люди-

Цитування: Пілінська М.А., Шеметун О.В., Талан О.О., Дибська О.Б., Кравченко С.М., Шолойко В.В. Цитогенетичні ефекти в змішаній культурі клітин крові хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію з лімфоцитами крові здорових осіб. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2020. № 7. С. 86–93. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.07.086>

ни [3–5]. Як маркери розвитку ТІВЕ використовувались мікроядра, цитогенетичні та деякі молекулярно-генетичні показники, клітини в стадії апоптозу. Отримані результати свідчили про реальність маніфестації ТІВЕ за показниками пошкодження геному людини, що може мати несприятливі медичні наслідки. Зокрема, встановлено, що ТІВЕ сприяє розвитку вторинних злоякісних новоутворень у онкологічних хворих, ризик виникнення яких зростає в проліферуючих тканинах внаслідок синергізму обох системних ефектів – генотоксичної дії малігнізованих клітин і генотоксичного впливу медикаментозного лікування злоякісних новоутворень (хіміо- та радіоонкотерапії) [2, 6]. Водночас існує вірогідність посилення супресії малігнізованих клітин внаслідок активації абскопального ефекту за допомогою Т-клітинозалежних шляхів, особливо у відповідь на сумісну дію променевої та імунної онкотерапії [7].

Актуальність проблеми взаємодії злоякісних і нормальних клітин для здоров'я людини стимулювала наші дослідження в цьому напрямку, які досі проводилися тільки за кордоном. Нами з 2018 р. вивчається феномен ТІВЕ за деякими показниками пошкодження геному соматичних клітин людини. Як модель малігнізованих клітин-індукторів вперше використано гемопоетичні клітини хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію (ХЛЛ), а як клітини-свідки – нормальні лімфоцити периферичної крові (ЛПК) умовно здорових осіб. За допомогою молекулярно-генетичного методу кометного електрофорезу окремих клітин (comet assay) було встановлено, що спільно-роздільне культивування цих клітин призводить до збільшення рівня пошкоджень ДНК та апоптотичної активності в нормальних клітинах (подібно до прямого ТІВЕ) і до зниження рівня геномної нестабільності та пригнічення процесів апоптозу в клітинах-індукторах (подібно до зворотного ТІВЕ) [8]. Отримані результати свідчили про наявність взаємного впливу онкотрансформованих та нормальних соматичних клітин людини і підтвердили можливість індукції феномену ТІВЕ за молекулярно-генетичними показниками пошкодження геному. У даній роботі наведено результати цитогенетичного дослідження наслідків взаємодії цих клітин за умов їх сумісного культивування.

Матеріали та методи. Для виконання досліджень сформували дві групи спостереження. До групи порівняння включили сім умовно здорових волонтерів з необтяженим анамнезом (п'ять жінок, двоє чоловіків), шість з яких – люди середнього віку (36–59 років), одна особа – літнього віку (69 років). Усі обстежені заперечували свідомий контакт з іонізуючою радіацією та іншими мутагенними чинниками. Групу онкохворих склали сім осіб з діагнозом первинний В-клітинний ХЛЛ (п'ять чоловіків, дві жінки), двоє з яких – люди середнього віку (45 та 55 років відповідно), п'ять – люди літнього віку (61–71 рік). Хворі на ХЛЛ проходили медичне обстеження в поліклініці ННЦРМ або у відділенні радіаційної гематології Інституту клінічної радіології ННЦРМ. Забір венозної крові в усіх пацієнтів було здійснено до початку лікування. Особи з обох груп брали участь у добровільних цитогенетичних обстеженнях після підписання інформованої згоди.

Під час проведення цитогенетичних досліджень застосовували загальноприйняте окреме культивування ЛПК умовно здорових осіб (клітини-свідки) і клітин крові хворих на ХЛЛ (клітини-індуктори) [9] та сумісне культивування цих клітин. Для сумісного культивування використовували розроблену і апробовану нами раніше експериментальну модельну систему для дослідження радіаційно-індукованого ефекту свідка в соматичних клі-

тинах людини (RIBE) [10]. У змішаних культурах кров від кожної умовно здорової особи кокультивували з кров'ю одного із хворих на ХЛЛ протилежної статі. У ході цитогенетичного аналізу клітини-свідки та клітини-індуктори розрізняли за наявністю чи відсутністю статевої чоловічої хромосоми Y.

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

Препарати метафазних хромосом фарбували барвником Гімза (Giemsa stain, "Merk", Німеччина) для традиційного цитогенетичного аналізу рівномірно забарвлених хромосом з груповим каріотипуванням.

Цитогенетичний аналіз проводили "всліпу", на зашифрованих препаратах, під мікроскопами зі збільшенням $\times 1000$. Дешифровку результатів виконували після закінчення хромосомного аналізу всіх клітинних культур. Під час цитогенетичного аналізу враховували аберації хроматидного (одиначні ацентричні фрагменти, хроматидні обміни) і хромосомного (вільні парні фрагменти, ацентричні кільця, дицентричні та кільцеві хромосоми, аномальні моноцентрики) типів, які вірогідно можна розпізнати методом групового каріотипування на рівномірно пофарбованих препаратах метафазних хромосом.

Загалом проаналізували 4465 метафаз, з яких: 1647 (235 метафаз на культуру) під час окремого культивування ЛПК здорових осіб для визначення спонтанного рівня аберацій хромосом у клітинах-свідках; 795 (113 метафаз на культуру) під час окремого культивування клітин крові хворих на ХЛЛ для визначення фонового рівня аберацій хромосом у клітинах-індукторах; 1192 (170 метафаз на культуру) під час сумісного культивування нормальних ЛПК здорових осіб і клітин крові хворих на ХЛЛ для визначення цитогенетичного ефекту в клітинах-свідках; 831 (119 метафаз на культуру) під час сумісного культивування нормальних ЛПК здорових осіб та клітин крові хворих на ХЛЛ для визначення цитогенетичного ефекту в клітинах-індукторах.

Для кожної точки дослідження розраховували відсоток аберантних метафаз і частоту аберацій хромосом на 100 метафаз. Дані по окремих точках дослідження 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. Для перевірки нульових гіпотез використовували критерій Ст'юдента [11].

Результати та обговорення. У разі окремого культивування ЛПК умовно здорових осіб (потенційних клітин-свідків) фонові частоти аберацій хромосом не відрізнялись між собою ($p > 0,05$), коливались у межах $1,05 \pm 0,47$ – $2,00 \pm 0,81$ на 100 метафаз і становили в середньому $1,52 \pm 0,30$ на 100 клітин, що відповідало популяційній частоті спонтанних пошкоджень хромосом у осіб середнього та літнього віку [12].

В усіх випадках значно переважали прості аберації хроматидного типу (виключно одиничні ацентричні фрагменти), які зустрічалися з частотою $1,28 \pm 0,28$ на 100 клітин і становили 84 % загальної кількості зареєстрованих пошкоджень хромосом, що також характерно для спонтанного хромосомного мутагенезу в ЛПК людини. Середньогруповий рівень аберацій хромосомного типу становив $0,24 \pm 0,12$ на 100 клітин. Майже в усіх випадках вони були представлені парними ацентричними фрагментами, частота яких по групі в середньому становила $0,18 \pm 0,11$ на 100 метафаз. В одному випадку серед 255 проаналізованих метафаз зафіксовано один аномальний моноцентрик – $0,39 \pm 0,39$ на 100 клітин, що загалом складало 1 на 1647 проаналізованих метафаз і становило $0,06 \pm 0,06$ на 100 клітин по групі в середньому.

У разі окремого культивування клітин крові хворих на ХЛЛ (потенційних клітин-індукторів) розкид індивідуальних коливань частоти аберацій хромосом становив $1,43 \pm 1,00$ – $6,67 \pm 2,26$ на 100 метафаз і по групі в середньому – $2,89 \pm 0,59$ на 100 клітин, що статистично значуще ($p < 0,05$) перевищує такий у групі умовно здорових осіб і свідчить про підвищену хромосомну нестабільність у ЛПК хворих на ХЛЛ. Переважна більшість пошкоджень хромосом була представлена одиничними і парними ацентричними фрагментами ($1,89 \pm 0,48$ та $0,62 \pm 0,28$ на 100 метафаз відповідно по групі в середньому). У двох пацієнтів зафіксовано аномальні моноцентрики – $1,00 \pm 0,99$ та $1,90 \pm 1,33$ на 100 метафаз, що загалом складало 3 на 795 проаналізованих клітин ($0,38 \pm 0,22$ на 100 клітин по групі в середньому).

У результаті сумісного культивування ЛПК умовно здорових осіб з клітинами крові хворих на ХЛЛ у 86 % випадків виявлено зростання індивідуального рівня хромосомних аберацій у клітинах-свідках ($2,73 \pm 1,55$ – $4,39 \pm 1,92$ на 100 метафаз) і, як наслідок, підвищення їх середньогрупової частоти до $3,31 \pm 0,50$ на 100 метафаз, яка статистично значуще відрізнялася від такої у разі окремого культивування цих клітин ($1,52 \pm 0,30$ на 100 метафаз) ($p < 0,01$) (табл. 1).

Таблиця 1. Середньогрупова частота аберацій хромосом у ЛПК умовно здорових осіб (клітинах-свідках) за умов окремого культивування та в змішаній культурі з клітинами крові хворих на ХЛЛ (клітинами-індукторами)

Аберації хромосом	Частота аберацій хромосом, на 100 клітин	
	Окреме культивування (фоновий рівень)	Кокультівування з клітинами крові хворих на ХЛЛ (клітини-свідки)
Хроматидного типу	$1,28 \pm 0,28$	$2,31 \pm 0,42^*$
одиночні фрагменти	$1,28 \pm 0,28$	$2,23 \pm 0,41^*$
хроматидні обміни	$0,00 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,08$
Хромосомного типу	$0,24 \pm 0,12$	$1,00 \pm 0,28^*$
парні фрагменти	$0,18 \pm 0,11$	$0,92 \pm 0,27^*$
аномальні моноцентрики	$0,06 \pm 0,06$	$0,08 \pm 0,08$
дицентричні хромосоми	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
кільцеві хромосоми	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
Загалом	$1,52 \pm 0,30$	$3,31 \pm 0,50^*$

* Статистично значуща відмінність від контролю ($p < 0,05$ – $p < 0,01$)

Превалуючим типом пошкоджень хромосом залишалися прості аберації хроматидного типу — одиночні фрагменти ($2,31 \pm 0,42$ на 100 клітин по групі в середньому). В одному випадку зафіксовано аномальний моноцентрик, що загалом складало 1 на 1299 проаналізованих метафаз і в середньому становило $0,22 \pm 0,22$ на 100 клітин. Отримані дані підтвердили можливість індукції хромосомної нестабільності в нормальних інтактних соматичних клітинах людини онкологічно трансформованими клітинами того ж типу (ЛПК), тобто прямий феномен TIBE.

Водночас сумісне культивування нормальних і малігнізованих ЛПК людини не спричинило статистично значущої зміни ($p > 0,05$) як індивідуальних частот ($2,51 \pm 0,94$ — $5,00 \pm 2,18$ на 100 метафаз), так і середньогрупового рівня ($3,19 \pm 0,51$ на 100 метафаз) аберацій хромосом в клітинах-індукторах (табл. 2). Не змінилися ні спектр хромосомних пошкоджень, ні їх частота порівняно з одержаними в результаті окремого культивування клітин крові хворих на ХЛЛ, що свідчить про відсутність зворотного феномену TIBE (rescue effect) за цитогенетичними показниками пошкодження геному за умов застосованої нами моделі для його дослідження.

Таким чином, з використанням раніше розробленої нами експериментальної моделі для вивчення феномену RIBE в соматичних клітинах людини встановлено, що сумісне культивування клітин крові хворих на первинний В-клітинний ХЛЛ (клітини-індуктори) з ЛПК здорових осіб (клітини-свідки) призводить до підвищення рівня хромосомної нестабільності в клітинах-свідках, що аналогічно прямому (пошкоджувальному) феномену TIBE. Однак кокультивування нормальних і малігнізованих ЛПК людини не спричинило статистично значущої зміни рівня аберацій хромосом у клітинах-індукторах, тобто зворотного (рятувального) феномену TIBE (rescue effect). Оскільки для стимуляції клітинного поділу в окремих і змішаних культурах ЛПК ми традиційно використовували фітогемаглютинін, який не є мітогеном для В-лімфоцитів [13], цитогенетичний ефект міг бути зафіксований тільки в Т-лімфоцитах. Саме ці клітини під час окремого культивування крові пацієнтів з

Таблиця 2. Частота аберацій хромосом у клітинах крові хворих на ХЛЛ (клітинах-індукторах) за умов окремого культивування та в змішаній культурі з ЛПК умовно здорових осіб

Аберації хромосом	Частота аберацій хромосом, на 100 клітин	
	Окреме культивування (клітини хворих на ХЛЛ)	Кокультивування з кров'ю умовно здорових осіб (клітини-індуктори)
Хроматидного типу	$1,89 \pm 0,48$	$2,10 \pm 0,42$
одиночні фрагменти	$1,89 \pm 0,48$	$2,10 \pm 0,42$
хроматидні обміни	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
Хромосомного типу:	$1,00 \pm 0,35$	$1,09 \pm 0,30$
парні фрагменти	$0,62 \pm 0,28$	$0,92 \pm 0,28$
аномальні моноцентрики	$0,38 \pm 0,22$	$0,17 \pm 0,12$
дицентричні хромосоми	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
кільцеві хромосоми	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
Загалом	$2,89 \pm 0,59$	$3,19 \pm 0,51$

діагнозом В-клітинний ХЛЛ виступали як первинні клітини-свідки, які могли одержати пошкоджуючий сигнал від малігнізованих В-лімфоцитів ще *in vivo*, про що свідчить підвищена частота аберацій хромосом в ЛПК хворих на ХЛЛ – $2,89 \pm 0,59$ проти $1,52 \pm 0,30$ на 100 клітин у ЛПК здорових осіб.

У змішаних культурах такі Т-лімфоцити стали вже клітинами-індукторами, які ініціювали вторинний пошкоджувальний ефект свідка в нормальних ЛПК здорових осіб (secondary induced bystander effect) [14], що підтверджується зростанням частоти аберацій хромосом у клітинах-свідках з $1,52 \pm 0,30$ до $3,31 \pm 0,50$ на 100 клітин. Проте нами не виявлено впливу нормальних ЛПК на стабільність хромосом у Т-клітинах-індукторах (rescue effect), що потребує подальшого дослідження.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Verma N., Tiku A. B. Significance and nature of bystander responses induced by various agents. *Mutat. Res.* 2017. **773**. P. 104–121. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.05.003>
2. Burdak-Rothkamm S., Rothkamm K. Radiation-induced bystander and systemic effects serve as a unifying model system for genotoxic stress responses. *Mutat. Res.* 2018. **778**. P. 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.08.001>
3. Krzywon A., Widel M. Bystander Me45 melanoma cells increase damaging effect in UVC irradiated cells. *Photochem. Photobiol.* 2019. **95**, № 4. P. 1019–1028. <https://doi.org/10.1111/php.13080>
4. Desai S., Kobayashi A., Konishi T., Oikawa M., Pandey B.N. Damaging and protective bystander cross-talk between human lung cancer and normal cells after proton microbeam irradiation. *Mutat. Res.* 2014. **763–764**. P. 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.03.004>
5. Ghosh S., Ghosh A., Krishna M. Role of ATM in bystander signaling between human monocytes and lung adenocarcinoma cells. *Mutat. Res.* 2015. **794**. P. 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.10.003>
6. 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. P. 18637–18647. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24746>
7. Batson S.A., Breazzano M.P., Milam R.W., Shinohara E., Johnson D.B., Daniels A.B. Rationale for harnessing the abscopal effect as potential treatment for metastatic uveal melanoma. *Int. Ophthalmol. Clin.* 2017. **57**. P. 41–48. <https://doi.org/10.1097/IO.0000000000000152>
8. Курінний Д.А., Русшковський С.Р., Демченко О.М., Шолойко В.В., Пілінська М.А. Оцінка взаємодії між малігнізованими та нормальними лімфоцитами периферичної крові людини при їх спільно-роздільному культивуванні. *Цитологія і генетика.* 2020. **54**, № 2. С. 45–50.
9. Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. Хромосоми человека : атлас. Москва: Медицина, 1982. 263 с.
10. Шеметун О.В., Пілінська М.А. Радіаційно-індукований ефект свідка – моделювання, прояви, механізми розвитку, персистенція, онкологічні ризики (огляд літератури). *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології.* 2019. Вип. 24. С. 65–92. <https://doi.org/10.33145/2304-8336-2019-24-65-92>
11. Атраментова Л.А. Дизайн и статистика (биологические исследования). Харьков: НТМТ, 2014. 255 с.
12. Талан О.О. Цитогенетичні показники при спонтанному та радіаційно-індукованому соматичному хромосомному мутагенезі в осіб різного віку : Автореф. дис. ... канд. біол. наук / ННЦРМ НАМН України. Київ, 2012. 20 с.
13. Сладкова Е.А., Скоркина М.Ю., Шамрай Е.А. Особенности митогенного ответа лимфоцитов периферической крови больных лимфолейкозом. *Журн. мед.-биол. исследований.* 2018. **6**, № 2. С. 165–173. <https://doi.org/10.17238/issn 2542-1298. 2018.6.2.165>
14. Kanagaraj K., Rajan V., Pandey B.N., Thayalan K., Venkatachalam P. Primary and secondary bystander effect and genomic instability in cells exposed to high and low linear energy transfer radiations. *Int. J. Radiat. Biol.* 2019. **95**, № 12. P. 1648–1658. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1665208>

Надійшло до редакції 30.03.2020

REFERENCES

1. Verma, N. & Tiku, A. B. (2017). Significance and nature of bystander responses induced by various agents. *Mutat. Res.*, 773, pp. 104-121. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.05.003>
2. Burdak-Rothkamm, S. & Rothkamm, K. (2018). Radiation-induced bystander and systemic effects serve as a unifying model system for genotoxic stress responses. *Mutat. Res.*, 778, pp. 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.08.001>
3. Krzywon, A. & Widel, M. (2019). Bystander Me45 melanoma cells increase damaging effect in uvc irradiated cells. *Photochem. Photobiol.*, 95, No. 4, pp. 1019-1028. <https://doi.org/10.1111/php.13080>
4. Desai, S., Kobayashi, A., Konishi, T., Oikawa, M. & Pandey, B. N. (2014). Damaging and protective bystander cross-talk between human lung cancer and normal cells after proton microbeam irradiation. *Mutat. Res.*, 763-764, pp. 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.03.004>
5. Ghosh, S., Ghosh, A. & Krishna, M. (2015). Role of ATM in bystander signaling between human monocytes and lung adenocarcinoma cells. *Mutat. Res.*, 794, pp. 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.10.003>
6. Wang, R., Zhou, T., Liu, W. & Zuo, L. (2018). Molecular mechanism of bystander effects and related abscopal / cohort effects in cancer therapy. *Oncotarget*, 9, No. 26, pp. 18637-18647. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24746>
7. Batson, S. A., Breazzano, M. P., Milam, R. W., Shinohara, E., Johnson, D. B. & Daniels, A. B. (2017). Rationale for harnessing the abscopal effect as potential treatment for metastatic uveal melanoma. *Int. Ophthalmol. Clin.*, 57, pp. 41-48. <https://doi.org/10.1097/IIO.0000000000000152>
8. Kurinny, D. A., Rushkovsky, S. R., Demchenko, O. M., Sholayko, V. V. & Pilinska, M. A. (2020). Evaluation of the interaction between malignant and normal human peripheral blood lymphocytes during their joint-separation cultivation. *Cytol. Gen.*, 54, No. 2, pp. 45-50 (in Ukrainian).
9. Zakharov, A. F., Beniush, V. A., Kuleshov, N. P. & Baranovskaya, L. I. (1982). *Human chromosomes: Atlas. Moscow: Meditsina* (in Russian).
10. Shemetun, O. V. & Pilinskaya, M. A. (2019). Radiation-induced witness effect - modeling, manifestations, mechanisms of development, persistence, oncological risks (literature review). *Problems of Radiation Medicine and Radiobiology*, Iss. 24, pp. 65-92 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.33145/2304-8336-2019-24-65-92>
11. Atramentova, L. A. (2014). *Design and statistics (biological research). Kharkiv: NTMT* (in Russian).
12. Talan, O. O. (2012). *Cytogenetic indices for spontaneous and radiation-induced somatic chromosomal mutagenesis in persons of different ages. (Extended abstract of candidate thesis). National Research Center for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine* (in Ukrainian).
13. Sladkova, E. A., Skorkina, M. Yu. & Shamray, E. A. (2018). Features of mitogenic response of peripheral blood lymphocytes in patients with lymphocytic leukemia. *Journal of Medical and Biological Research*, 6, No. 2, pp. 165-173 (in Russian). <https://doi.org/10.17238/issn2542-1298.2018.6.2.165>
14. Kanagaraj, K., Rajan, V., Pandey, B. N., Thayalan, K. & Venkatachalam, P. (2019). Primary and secondary bystander effect and genomic instability in cells exposed to high and low linear energy transfer radiations. *Int. J. Radiat. Biol.*, 95, No. 12, pp. 1648-1658. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1665208>

Received 30.03.2020

*M.A. Pilinska, O.V. Shemetun.,
O.A. Talan, O.B. Dibська,
S.M. Kravchenko, V.V. Sholoiko*

National Research Center for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine, Kyiv
E-mail: pww@ukr.net

CYTOGENETIC EFFECTS IN MIXED CULTURE OF BLOOD CELLS FROM PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA WITH BLOOD LYMPHOCYTES OF HEALTHY INDIVIDUALS

Using our own experimental model system to study the bystander response phenomenon in somatic human cells (co-culturing peripheral blood lymphocytes of donors of different gender, which makes it possible to distinguish cells-inductors and bystander cells by the presence or absence of male sex chromosome Y), we studied the fea-

tures of the interaction between malignant and normal human cells. To carry out the research, two observation groups were formed. The comparison group included 7 conditionally healthy volunteers with an uncomplicated anamnesis (5 female, two male) who denied conscious contact with ionizing radiation and other mutagenic factors. The group of cancer patients included 7 persons (5 male, two female) with a diagnosis of primary B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) before the start of specific therapy. It was found that co-cultivation of blood cells from CLL patients (cells-inductors) with intact peripheral blood lymphocytes of healthy individuals (bystander cells) leads to an increase in the frequency of chromosomal aberrations in normal cells (1.52 ± 0.30 and 3.31 ± 0.50 per 100 metaphases, respectively, $p < 0.001$), which confirms the development of the direct tumor-induced bystander effect (TIBE).

Keywords: *mixed culture of human peripheral blood lymphocytes, chronic lymphocytic leukemia, chromosome aberration, tumor-induced bystander effect.*