

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

Д. А. Курінний¹✉, С. Р. Рушковський², О. М. Демченко¹, М. Г. Романенко², Т. П. Лященко²,
М. А. Пілінська¹

¹Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», вул. Юрія Ілленка, 53, Київ, 04050, Україна

²Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, 01601, Україна

МОДИФІКАЦІЯ ОПРОМІНЕННЯМ ПУХЛИННО-ІНДУКОВАНОГО ЕФЕКТУ СВІДКА ПРИ СУМІСНО-РОЗДІЛЬНОМУ КУЛЬТИВУВАННІ ЛІМФОЦИТІВ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ЛІМФОЦИТАРНУ ЛЕЙКЕМІЮ З ЛІМФОЦИТАМИ ЗДОРОВИХ ДОНОРІВ

Мета: дослідити пухлинно-індукований ефект свідка, викликаний впливом клітин крові хворих на хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ), на нетрансформовані клітини-свідки (лімфоцити периферичної крові (ЛПК) умовно здорових осіб) та можливість його модифікації під впливом опромінення.

Матеріали і методи. Було проведено спільно-роздільне культивування зразків крові умовно здорових волонтерів та хворих на ХЛЛ за розробленою нами методикою з подальшою детекцією відносного рівня пошкодження ДНК за допомогою методу Comet assay.

Результати. Встановлено статистично значуще зростання ($p < 0,001$) рівня пошкоджень ДНК в культурах ЛПК умовно здорових осіб, після спільно-роздільного культивування з трансформованими клітинами хворих на ХЛЛ. Після опромінення було відмічене падіння рівня клітин з високим ступенем пошкоджень ДНК, що відбулось за рахунок зростання частоти клітин, що затримались в поділі на S-стадії клітинного циклу. Зростання апоптичної активності в культурах клітин-свідків було відмічено в усіх варіантах експерименту ($p < 0,001$).

Висновки. Вплив опромінених клітин крові хворих на ХЛЛ призводить до посилення маніфестації ефекту свідка в ЛПК умовно здорових осіб.

Ключові слова: пухлинно-індукований ефект свідка, лімфоцити периферичної крові, Comet assay, іонізуюче випромінювання.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2021. Вип. 26. С. 248–259. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-248-259

✉ Курінний Денис Аркадійович, e-mail: kurinnyi.d@gmail.com

D. Kurinnyi¹✉, S. Rushkovsky², O. Demchenko¹, M. Romanenko², T. Liashchenko², M. Pilinska¹

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

²Institute of Biology and Medicine, Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13 Volodymyrska Str., Kyiv 01601, Ukraine

MODIFICATION OF THE TUMOR-INDUCED BYSTANDER EFFECT BY IRRADIATION UNDER COCULTIVATION OF LYMPHOCYTES FROM PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA AND LYMPHOCYTES FROM HEALTHY DONORS

Objective: Study the tumor-induced bystander effect of blood cells from chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients on non-transformed bystander cells (peripheral blood lymphocytes (PBL) of conditionally healthy individuals) and the possibility of its modification after the impact of ionizing radiation.

Materials and methods. We carried out cocultivation and separate cultivation of blood samples from conditionally healthy volunteers and patients with CLL according to our technique. Using the Comet assay, the relative level of DNA damage was evaluated.

Results. A statistically significant increase ($p < 0.001$) in the level of DNA damage in PBL culture of conditionally healthy individuals after co-cultivation with malignant cells of CLL patients was observed. After irradiation, a drop in the level of cells with a high degree of DNA damage was noted, which was connected with an increase in the frequency of cells that were delayed in division at the S stage of the cell cycle. An increase in apoptotic activity in cultures of bystander cells was observed in all variants of the experiment ($p < 0.001$).

Conclusion. The influence of irradiated blood cells of patients with CLL results in an enhancement of the tumor-induced bystander effect manifestation in the PBL of conditionally healthy individuals.

Key words: tumor-induced bystander effect, peripheral blood lymphocytes, Comet assay, ionizing radiation.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2021;26:248-259. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-248-259

ВСТУП

Клітини, що зазнали пошкоджень, здатні індукувати різноманітні біологічні зміни в непошкоджених клітинах, які контактують з ними в єдиному оточенні безпосередньо або знаходячись на значній відстані від них. Даний феномен міжклітинних взаємодій отримав назву ефекту свідка (bystander effect). До його розвитку призводить вплив різних видів іонізуючого та неіонізуючого випромінювання, генотоксичних органічних сполук, іонів важких металів, наночасток, високих температур та інших стрес-факторів [1–4].

Механізми, які відповідають за ефект свідка, є складними та не до кінця вивченими.

Найбільшу увагу приділяють вивченню ефекту свідка, спричиненого дією іонізуючого випромінювання (radiation induced bystander effect – RIBE), який має важливе значення для прогнозування віддалених медико-біологічних наслідків опромінення, в першу чергу, в радіаційній онкології. Прояв RIBE супроводжується посиленням синтезом цитокінів, генерацією вільних радикалів

INTRODUCTION

When the damaged and intact cells exist in a common environment, damaged cells are able to induce various biological alterations in intact cells both in direct contact with them and being at a considerable distance. This phenomenon of intercellular interactions is known as the bystander effect. The manifestation of the bystander effect is observed after the impact of various types of ionizing and non-ionizing radiation, genotoxic organic compounds, heavy metal ions, nanoparticles, high temperature and other stress factors [1–4].

The mechanisms that are responsible for the bystander effect are complex and not fully understood.

The main attention is paid to the study of the radiation induced bystander effect (RIBE), which is important for predicting the long-term medical and biological consequences of exposure, primarily in radiation oncology. The manifestation of RIBE is accompanied by enhanced synthesis of cytokines, the generation of free radicals (includ-

✉ Denys A. Kurinnyi, e-mail: kurinnyi.d@gmail.com

(у тому числі пероксидних) вторинних стрес-месенджерів (NO) та різноманітних некодуєчих РНК [5, 6].

Однак посилений синтез і викид в міжклітинний простір цих самих чинників є характерним для клітин злоякісних новоутворень, що призводить до розвитку в нормальних клітинах змін, які спостерігаються при RIBE. Ефект впливу малігнізованих клітин на нормальні отримав назву пухлинно-індукованого ефекту свідка (tumor-induced bystander effect – TIBE). Вважають, що TIBE може бути однією з причин розвитку вторинних злоякісних новоутворень у онкологічних хворих, а також суттєво впливати на розвиток побічних ефектів протипухлинної терапії [7–9].

Таким чином, дослідження особливостей взаємодії неопромінених та опромінених онкотрансформованих клітин людини з нормальними клітинами є актуальними з точки зору прогнозування наслідків розвитку хвороби і перспектив лікування.

МЕТА

Дослідити пухлинно-індукований ефект свідка, викликаний впливом клітин крові хворих на хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ), на нетрансформовані клітини-свідки (лімфоцити периферичної крові (ЛПК) умовно здорових осіб) та можливість його модифікації під впливом опромінення.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У роботі керувались положеннями Гельсінської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (2008 р.), яка передбачає інформовану згоду осіб на участь у проведенні відповідних досліджень, а також загальними принципами, ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики (2001 р.).

Зразки периферичної крові були отримані від 10 хворих на ХЛЛ. В якості контролю використовувались культури лімфоцитів, одержані від 10 умовно здорових волонтерів. Усі особи були залучені за умов поінформованої згоди.

Культивування лімфоцитів проводили протягом 48 год. Частину культур периферичної крові хворих на ХЛЛ опромінювали γ -квантами (випромінювач IBL-237C, потужність 2,34 Гр/хв) в дозі 0,5 Гр на 0 години культивування. Культивування опромінених і неопромінених культур лімфоцитів проводилось в ємностях, розділених мембраною з порами 1,0 мкм, що заповігало перемішуванню клітин, але дозволяло проходити біологічно-активним речовинам.

Для оцінки відносного рівня пошкодження ДНК використовували нейтральну версію Comet assay [10]. Приготування слайдів, лізис клітин і проведен-

ing peroxide), secondary stress messengers (NO) and various noncoding RNAs [5, 6].

However, enhanced synthesis and release of these factors into the extracellular space is characteristic of malignant neoplasm cells, which leads to the onset of alterations in normal cells that are observed in RIBE as well. The impact of malignant cells on normal cells is called the tumor-induced bystander effect (TIBE). It is believed that TIBE can be one of the reasons for the development of secondary tumors in cancer patients, as well as significantly influence on the induction of adverse effects of anticancer therapy [7–9].

Thus, the study of the features of the interaction of non-irradiated and irradiated malignant human cells with normal cells is topical in terms to predict the disease progression and the efficiency of anticancer treatment.

OBJECTIVE

Study the tumor-induced bystander effect of blood cells from chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients on non-transformed bystander cells (peripheral blood lymphocytes (PBL) of conditionally healthy individuals) and the possibility of its modification after the impact of ionizing radiation.

MATERIALS AND METHODS

The research was held under the principles of the Declaration of Helsinki of the World Medical Association (2008) providing the subjects' informed consent to participate in corresponding studies, as well as by the general ethical principles adopted by the First National Congress of Ukraine on Bioethics (2001).

Peripheral blood samples were obtained from 10 CLL patients. As a control, we used cultures of lymphocytes obtained from 10 conditionally healthy volunteers (age 35–51 years, mean age – 43 years). The informed consent was obtained from all individuals.

The cultivation of lymphocytes was carried out for 48 h. Some cultures of the peripheral blood of patients with CLL were exposed to γ -ray (emitter IBL-237C, dose-rate 2.34 Gy/min) at a dose of 0.5 Gy on hour 0 of cultivation. The cocultivation of irradiated and non-irradiated cultures of lymphocytes was carried out in containers separated by a membrane with pores of 1.0 μm , which prevented mixing of cells, but allowed the passage of biologically active substances.

To evaluate the relative level of DNA damage, we used method of neutral single-cell gel electrophoresis (Comet assay) [10]. Slide preparation,

ня нейтрального кометного електрофорезу проводили за загальноприйнятою методикою [11]. Після електрофорезу препарати фарбували DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) в концентрації 2 мкг/мл та аналізували під люмінесцентним мікроскопом з приєднаною фотокамерою Canon D1000. Для кожного варіанту робили не менше трьох повторів і фотографували не менше 100 випадково обраних «комет» для кожного повтору (рис. 1). Зображення аналізували за допомогою програми Image J (imagej.nih.gov) з використанням плагіну OpenComet. В якості параметру для визначення відносного рівня пошкодження ДНК використовували показник «Tail Moment» (ТМ) [12], який вираховується як добуток довжини «хвоста» комети і фракції тотальної ДНК. ТМ враховує як частки найменшого розміру виявленої мігруючої ДНК (що відображено в довжині хвоста комети), так і кількість релаксованих/пошкоджених великих фрагментів ДНК (інтенсивність виходу ДНК у хвостову частину). «Атипові комети» (АК), які утворюються з клітин з високим рівнем фрагментації ДНК, аналізували окремо (рис. 1). Статистичну обробку даних проводили за загальноприйнятими методами [13].

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

При окремому культивуванні інтактних ЛПК умовно здорових волонтерів середній спонтанний рівень ТМ складав $4,30 \pm 0,40$. Отримані дані збігаються з результатами наших попередніх досліджень [14]. При спільно-роздільному культивуванні опромінених та неопромінених ЛПК умовно здорових осіб в клітинах-свідках спостерігали значне зменшення виходу ДНК порівняно з контрольним рівнем (середнє значення ТМ по групі – $1,86 \pm 0,24$, $p < 0,05$).

Дані, отримані нами, є досить несподіваними. Відомо, що при реалізації ефекту свідка в неоп-

cell lysis, and electrophoresis were performed according to the generally accepted technique [11]. After electrophoresis, the slides were stained with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) at a concentration of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and analyzed under a fluorescent microscope, connected with a Canon EOS 1000 D camera. For each variant, at least three repetitions were made and at least 100 randomly selected «comets» were photographed for each repetition (Fig. 1). The image was analyzed using the Image J program (imagej.nih.gov) using the OpenComet plugin. The Tail Moment (TM) index [12], calculated as the multiplication of the comet's tail length and the total DNA fraction, was used as a parameter to determine the relative level of DNA damage. TM takes into account both the fraction of the smallest fragments of migrating DNA (which is reflected in the length of the comet's tail) and the amount of relaxed/damaged large DNA fragments (the rate of DNA release into the tail). «Atypical comets» (AC), which are formed from cells with a high level of DNA fragmentation, were analyzed separately (Fig. 1). Statistical data processing was carried out using generally accepted methods [13].

RESULTS AND DISCUSSION

Under separate cultivation of intact PBLs from apparently healthy volunteers, the average spontaneous TM level was 4.30 ± 0.40 . The obtained data coincide with the results of our previous studies [14]. During cocultivation of irradiated and non-irradiated PBLs of conditionally healthy individuals, in the bystander cells a significant decrease in the DNA escape was observed in comparison with the control level (the average value of TM in the group was 1.86 ± 0.24 , $p < 0.05$).

The data we have received is quite unexpected. It is known that when the bystander effect is manifest-

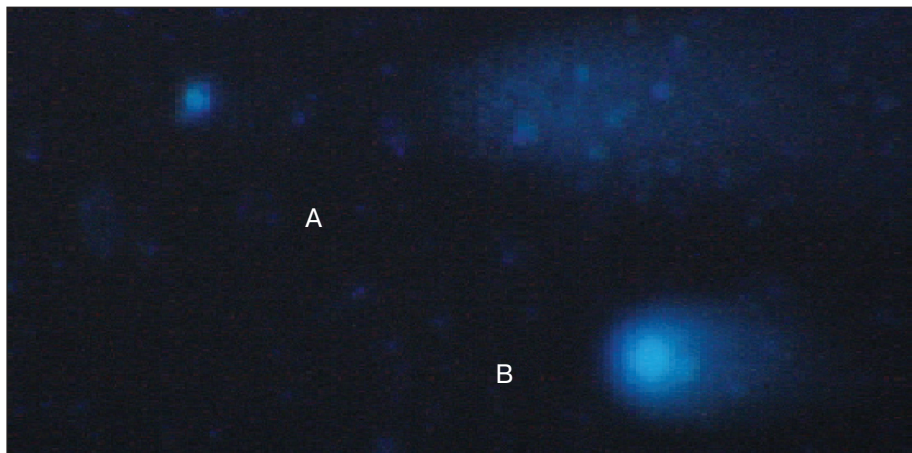


Рисунок 1. Типи «комет»: А – атипова «комета» (клітина в стані апоптозу); В – «комета» без збільшеної хвостової ділянки (нормальна клітина)

Figure 1. Types of «comets»: А – atypical «comet» (apoptotic cell), В – standard-tail «comet» (normal cell)

ромінених клітинах спостерігається збільшення рівня пошкоджень ДНК, генних мутацій та аберацій хромосом [15–18] і ми повинні були очікувати збільшення ТМ в клітинах-свідках.

Для більш детального аналізу було проведено дослідження частотного розподілу окремих клітин залежно від рівня міграції ДНК в агарозний гель. За показниками ТМ контрольних варіантів були встановлені граничні значення децилів (ТМ дорівнювали 0,76; 1,47; 2,63; 4,09; 5,32; 6,30; 7,52; 8,81; 11,06), які були обрані для формування груп при розрахунку частот ТМ в клітинах-свідках. Якщо значення ТМ дорівнювало граничному, «комету» відносили до наступної групи. Результати представлені на рисунку 2.

При аналізі даних привертає увагу як статистично значуще ($p < 0,01$) збільшення в культурах клітин-свідків частоти «комет» з низьким рівнем ТМ (групи 1 та 2), так і відсутність «комет» групи 10 (містить клітини з найвищим рівнем пошкоджень ДНК). Оскільки відомо, що при нейтральному варіанті «кометного» електрофорезу у клітин, які знаходяться в S-фазі, спостерігається значне зниження виходу ДНК в агарозний гель [14], то, вірогідно, така ситуація свідчить про наявність в культурі лімфоцитів-свідків значної кількості пошкоджених клітин, у яких спрацював checkpoint на S-фазі клітинного циклу. Саме цим можна пояснити значне зниження середнього значення ТМ в культурах клітин-свідків. Таким чином, особливістю прояву RIBE при спіль-

ed in unirradiated cells, an increase in the level of DNA damage, gene mutations, and chromosome aberrations is detected [15–18], and we should have expected an increase in TM in bystander cells.

For a more detailed analysis, we studied the frequency distribution of individual cells depending on the level of DNA migration in the agarose gel. The limit values of deciles were set according to the indicators of TM control variants (TM was 0.76; 1.47; 2.63; 4.09; 5.32; 6.30; 7.52; 8.81; 11.06) and were chosen to form groups for estimating frequencies of «comets» that have TM within the appropriate range. If the value of TM was equal to the boundary index, the «comet» was referred to the next group. The results are shown in Figure 2.

When analyzing the data, we took notice both of a statistically significant ($p < 0.01$) increase in the frequency of «comets» with a low TM level (groups 1 and 2) in the cultures of bystander cells (group 1 and 2), and the absence of «comets» in group 10 (contains cells with a high DNA damage). Because it is known for the cells in the S phase, the significant decrease of DNA exit in agarose gel under the neutral conditions of «comet» electrophoresis is observed [14], this situation probably indicates the presence of a considerable number of damaged cells in the culture of bystander lymphocytes, in which the checkpoint was triggered at the S phase of the cell cycle. This can explain the significant decrease in the average TM value in the cultures of bystander

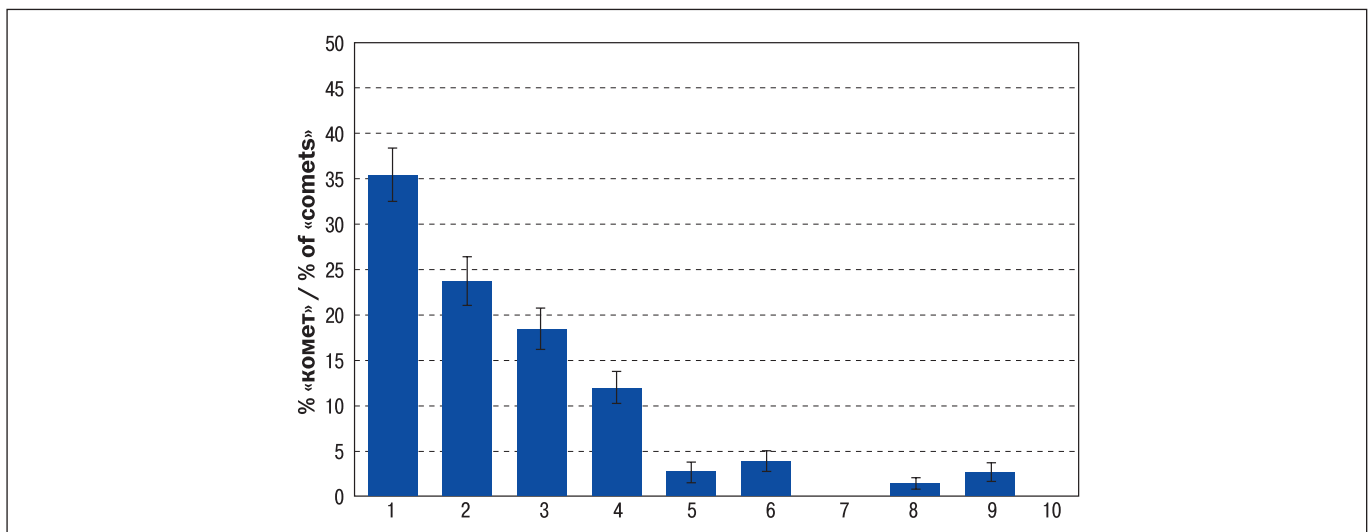


Рисунок 2. Частотний розподіл комет за значеннями ТМ в культурах клітин-«свідків» при сумісному культивуванні опромінених і неопромінених лімфоцитів умовно здорових волонтерів. По горизонталі – групи комет (див. пояснення у тексті). Для всіх груп 10 % є контрольним значенням

Figure 2. Frequency distribution of comets according to TM values in cultures of bystander cells during co-cultivation of irradiated and non-irradiated lymphocytes of conditionally healthy volunteers. Horizontally, the groups of comets are indicated (see explanation in the text). For all groups, 10 % is the control value

но-роздільному культивуванні немалігнізованих лімфоцитів є збільшення клітин з дуже високим рівнем пошкоджень ДНК, які не проходять checkpoint S/G₂, та, як наслідок, зупиняють поділ на цій стадії.

Після спільно-роздільного культивування з трансформованими клітинами хворих на ХЛЛ в культурах ЛПК умовно здорових осіб було встановлено зростання середньогрупового показника ТМ до $10,99 \pm 0,80$ ($p < 0,05$). Більш детальний частотний аналіз отриманих даних показав статистично значуще ($p < 0,001$) зростання частот комет двох груп – першої, що відповідає «кометам», в яких відсутній вихід ДНК в агарозний гель, та групи 10 ($p < 0,001$), яка відповідає клітинам з високим рівнем міграції ДНК (рис. 3). Ці результати вказують на чіткий розвиток пухлинно-залежного ефекту свідка (ТІВЕ) при спільно-роздільному культивуванні клітин хворих на ХЛЛ та ЛПК умовно здорових осіб, особливістю якого є зростання частоти клітин, що зупинились на S-фазі клітинного циклу (потенційно пошкоджені клітини, у яких спрацював механізм активації checkpoint-контролю) і клітин з високою частотою нерепарованих одно- та дво-ланцюгових розривів ДНК.

З метою з'ясування можливості посилення проявів ефекту свідка при накладенні ТІВЕ та RIBE, було проведено спільно-роздільне культивування ЛПК умовно здорових осіб з опроміненими клітинами крові хворих на ХЛЛ. В популяції клітин-свідків

cells. Thus, a feature of the manifestation of RIBE during co-cultivation of non-malignant lymphocytes is an increase in cells with a very high level of DNA damage that do not pass the S/G₂ checkpoint and, as a consequence, stop division at this stage.

After cocultivation PBL of conditionally healthy individuals with malignant cells of CLL patients, an increase in the mean level of TM was established (up to 10.99 ± 0.80 , $p < 0.05$). A more detailed frequency analysis of the obtained data showed a statistically significant ($p < 0.001$) increase in the frequencies of the «comets» that belong to two groups: the group 1, which corresponds to «comets» with no DNA exit in agarose gel, and group 10 ($p < 0.001$), which corresponds to cells with high level of DNA migration (Fig. 3). These results indicate the evident manifestation of the tumor-dependent bystander effect (TIBE) during cocultivation of cells collected from CLL patients and PBL of conditionally healthy individuals. The main features of TIBE were an increase in the frequency of cells arrested at the S phase of the cell cycle (heavily damaged cells in which the mechanism of checkpoint control is activated) and cells with a high frequency of unrepaired single- and double-strand DNA breaks.

In order to clarify the possibility of enhancing the manifestations of the bystander effect when TIBE and RIBE are overlapped, we carried out cocultivation of the PBL of conditionally healthy individuals with irradiated blood cells of patients with CLL. In the

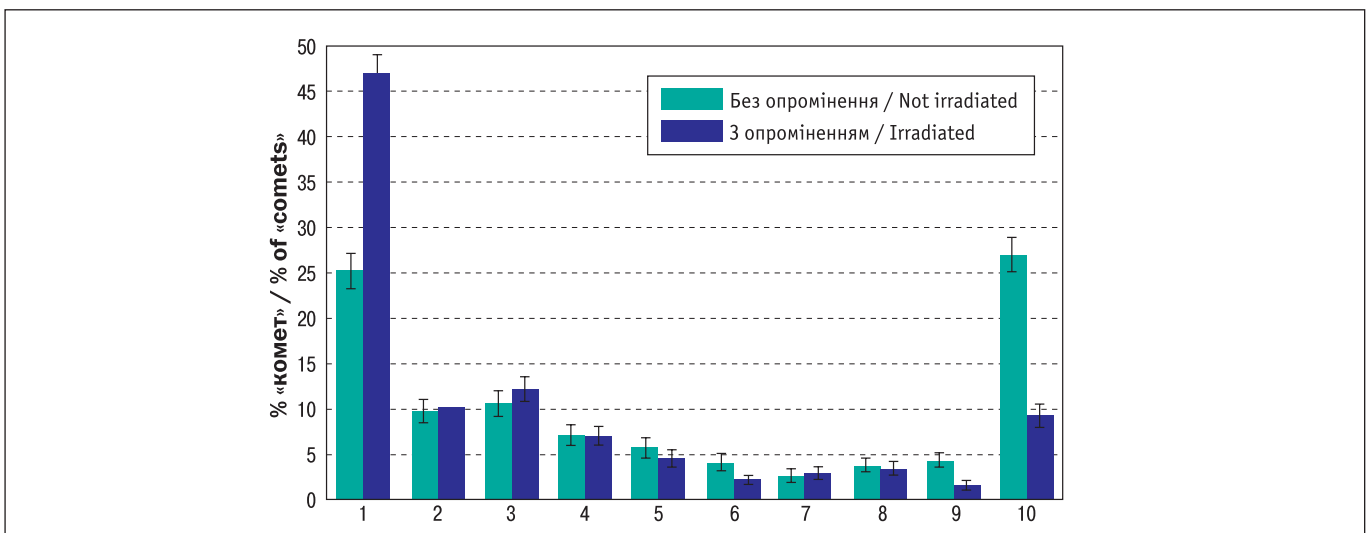


Рисунок 3. Зміна частотного розподілу «комет» за значеннями ТМ в культурах клітин-«свідків» при сумісно-роздільному культивуванні з неопроміненими і опроміненими культурами лімфоцитів хворих на ХЛЛ. По горизонталі – групи комет (див. пояснення у тексті); для всіх груп 10 % є контрольним значенням

Figure 3. Change in the frequency distribution of «comets» by TM values in cultures of bystander cells during co-cultivation with non-irradiated and irradiated cultures of lymphocytes of CLL patients

Horizontally, the groups of comets are indicated (see explanation in the text); for all groups, 10 % is the control value

встановлено статистично значуще ($p < 0,001$) зростання частоти «комет» першої групи порівняно з реалізацією як RIBE (рис. 2) так і TIBE (рис. 3). Рівень клітин, які мають велику кількість розривів ДНК (група 10), не відрізняється від контрольного значення.

Відомо, що в малігнізованих гемопоетичних клітинах (лімфоцити периферичної крові) хворих на ХЛЛ спостерігається значне збільшення синтезу цитокінів (TNF α), інтерлейкінів (IL-16) і моноклональних хемокинів (CCL3) [19–21]. Ми вважаємо, що вплив цитокінів є тригером процесів, які відбуваються в ЛПК умовно здорових осіб. Оскільки TNF- α є одним з ключових елементів запуску радіаційно-індукованого ефекту свідка [22, 23], вірогідно, що вплив неопромінених трансформованих клітин призводить до розвитку в клітинах-свідках умовно здорових осіб аналогічних процесів. У відповідь на активний вплив TNF- α з клітин-індукторів сигналу, в клітинах-свідках відбувається зростання синтезу NO, який є вторинним стрес-месенджером [24]. В свою чергу, збільшення концентрації NO в клітинах-свідках може призводити до виникнення одноланцюгових розривів ДНК, та, як наслідок, розвитку геномної нестабільності [25–27]. Клітини з високим рівнем геномних пошкоджень не проходять чутливий checkpoint S-стадії, що було виявлено в нашому дослідженні.

Отже, при частотному аналізі розподілу «комет» за параметром TM нами було виділено 2 групи (групи 1 та 10), зміни яких найбільш явно характеризують різноманітні прояви ефекту свідка.

Одним з важливих наслідків реалізації ефекту свідка, який спостерігається при міжклітинній взаємодії між клітинами-індукторами та клітинами-свідками, є зміна апоптичної активності в культурах взаємодіючих клітин [28].

Апоптичні клітини, у яких відбувається фрагментація ДНК чітко детектуються при Comet assay у нейтральних умовах як «атипові комети» (рис. 1).

Нами було проведено порівняння трьох ключових параметрів, а саме частоти «комет», що відповідають клітинам на S-стадії клітинного циклу (група 1), частоти «комет» з високим рівнем розривів ДНК (група 10) та частоти клітин в стані апоптозу (рис. 4). Як видно з наведених даних, частота клітин в стані апоптозу зростає, при наявності міжклітинної взаємодії (RIBE, TIBE, RIBE+TIBE), в усіх варіантах експерименту порівняно з показниками групи контролю. Відмічені коливання зна-

population of bystander cells, a statistically significant ($p < 0.001$) increase in the frequency of «comets» of the first group was detected in comparison with the realization both RIBE (Fig. 2) and TIBE (Fig. 3). The rate of cells that have a high level of DNA breaks (group 10) was not differ from the control value.

It is known that in malignant hematopoietic cells (peripheral blood lymphocytes) of patients with CLL, there is a significant increase in the synthesis of cytokines (TNF α), interleukins (IL-16) and monoclonal chemokines (CCL3) [19–21]. We assume that the effect of cytokines is a trigger for the processes that occur in the PBL of conditionally healthy individuals. Since TNF- α is one of the key elements for initiation of the radiation-induced bystander effect [22, 23], it is likely that the influence of non-irradiated transformed cells may cause the development of similar processes in bystander cells in conditionally healthy individuals. In response to the active influence of TNF- α from the signal inducer cells, the enhancement of NO synthesis, which is a secondary stress messenger, occurs in bystander cells, [24]. Also, an increase in the concentration of NO in bystander cells can lead to the induction of single-stranded DNA breaks, and, as a consequence, the progress of genomic instability [25–27]. Cells with a high level of genomic damage do not pass the accurate S stage checkpoint, which was found in our study.

Thus, the frequency analysis of «comets» distribution by TM parameter showed the two groups (group 1 and 10), changes in which most clearly characterize various manifestations of bystander effect.

One of the important consequences of the bystander effect, which is observed during intercellular interaction between inducer cells and bystander cells, is a modification of apoptotic activity in cultures of communicating cells [28].

Using Comet assay under neutral conditions, apoptotic cells, in which extreme DNA fragmentation occurs, are clearly detected as «atypical comets» (Fig. 1).

We compared three key parameters, namely, the frequency of «comets» corresponding to cells at the S stage of the cell cycle (group 1), frequency of «comets» with high level of DNA breaks (group 10), and frequency of apoptotic cells (Fig. 4). As can be seen from the data presented, if there were intercellular interaction (RIBE, TIBE or RIBE + TIBE), the frequency of cells in a state of apoptosis was heightened in all variants of the experiment compared with the rates in the control group. The average values var-

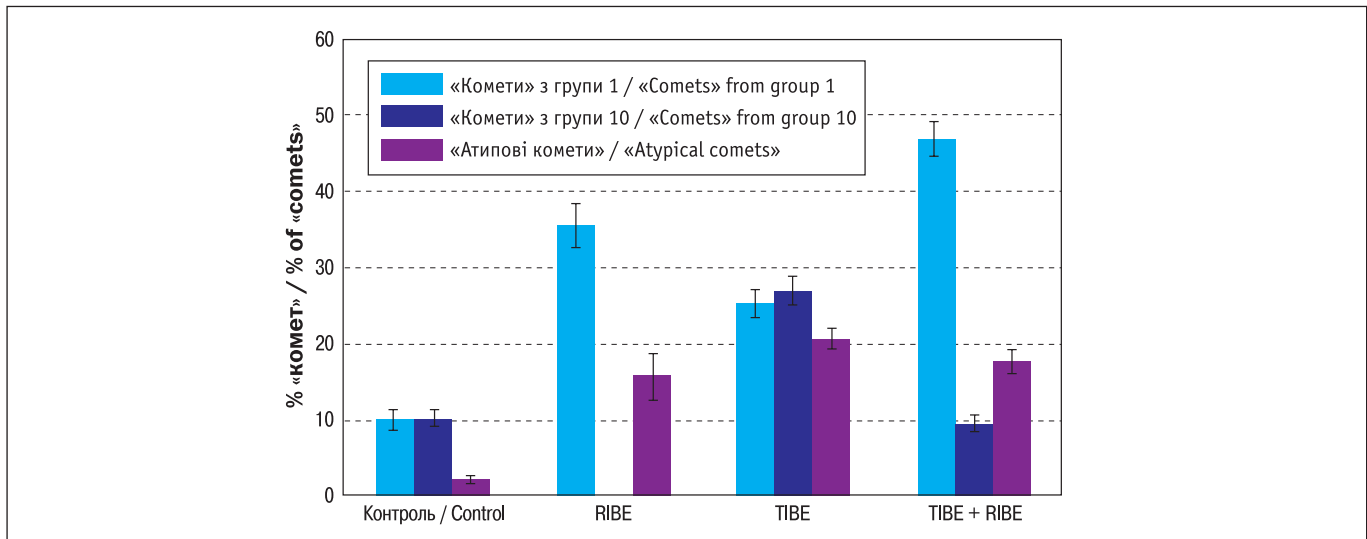


Рисунок 4. Частоти «комет», що відповідають клітинам на S-стадії клітинного циклу (група 1), клітинам з високим рівнем розривів ДНК (група 10) та клітинам у стані апоптозу («атипові комети») при прояві ефекту «свідка» різного генезу

RIBE – радіаційно індукований ефект «свідка», TIBE – ефект «свідка», індукований малігнізованими клітинами, RIBE + TIBE – ефект «свідка», індукований опроміненними малігнізованими клітинами

Figure 4. Frequencies of «comets» corresponding to cells at the S-stage of the cell cycle (group 1), cells with a high level of DNA breaks (group 10) and apoptotic cells («atypical comets») when the bystander effect of different genesis is manifested

RIBE – radiation-induced bystander effect, TIBE – bystander effect induced by malignant cells, RIBE + TIBE – bystander effect induced by irradiated malignant cells

ходяться в межах від $(1,96 \pm 0,49)$ % на 100 клітин (група контролю) до $(15,87 \pm 2,64)$ % (RIBE); $(20,42 \pm 1,92)$ % (TIBE); $(17,59 \pm 1,69)$ % (RIBE+TIBE) на 100 клітин по групі в середньому відповідно. В той же час слід відмітити, що різниця частот клітин в стані апоптозу в культурах клітин-свідків (при реалізації RIBE, TIBE, RIBE+TIBE) не є статистично значущою ($p > 0,05$).

На відміну від односпрямованого зростання показників апоптичної активності, в клітинах свідках відмічене падіння рівня «комет» з високим ступенем пошкодження ДНК (група 10) при реалізації RIBE (з $(10,0 \pm 1,22)$ % на 100 клітин в групі контролю до $0,00$ % в культурах клітин-свідків) та зростання при TIBE (до $(26,87 \pm 1,91)$ % на 100 клітин по групі в середньому). В той же час реалізація RIBE+TIBE призвела до падіння рівня клітин групи 10 до показників контролю ($(9,23 \pm 1,20)$ % на 100 клітин), що відбулось за рахунок зростання частоти клітин, які затримались в поділі на S-стадії клітинного циклу (рис. 4).

Таким чином, порівнюючи результати, отримані в експериментах: індуктор (ЛПК умовно здорових осіб) – свідок (ЛПК умовно здорових осіб) та індуктор (клітини крові осіб, хворих на ХЛЛ) – свідок (ЛПК умовно здорових осіб), слід відзначити, що

ієд from $(1,96 \pm 0,49)$ % per 100 cells (control group) to $(15,87 \pm 2,64)$ % (RIBE) $(20,42 \pm 1,92)$ % (TIBE) $(17,59 \pm 1,69)$ % (RIBE + TIBE) per 100 cells, respectively. At the same time, it should be noted that the difference in the frequencies of apoptotic cells in the cultures of bystander cells (at the manifestation of RIBE, TIBE, RIBE + TIBE) was not statistically significant ($p > 0,05$).

In contrast to the unidirectional growth of apoptotic activity indices, it was observed a decrease in the level of «comets» with a high degree of DNA damage (group 10) in bystander cells under RIBE manifestation (from $(10,0 \pm 1,22)$ % per 100 cells in the control group to $0,00$ % in bystander cell cultures) and increase under TIBE (up to $(26,87 \pm 1,91)$ % per 100 cells in average). At the same time, the overlap of RIBE and TIBE led to a drop in the level of cells from group 10 to control value ($(9,23 \pm 1,20)$ % per 100 cells) as well as increase in the frequency of cells that were delayed in division at the S stage of the cell cycle (Fig. 4).

Thus, comparing the results obtained through the cocultivation of inductor cells (PBL of conditionally healthy individuals or CLL patients) with bystander cells (PBL of conditionally healthy individuals) it was observed that irradiated blood cells

вплив опромінених клітин крові хворих на ХЛЛ призводить до посилення маніфестації ефекту свідка в ЛПК умовно здорових осіб.

ВИСНОВОК

Збіг пухлинно-індукованого та радіаційно-індукованого ефектів свідка, викликаних опроміненими клітинами крові хворих на ХЛЛ в ЛПК умовно здорових осіб при їх спільному культивуванні, призводить в останніх до посилення маніфестації ефекту свідка.

Конфлікт інтересів

Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування

Дослідження виконані в рамках науково-дослідної роботи «Дослідження ефекту свідка, індукованого опроміненими *in vitro* лейкоцидними клітинами хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію, та можливості його модифікації астаксантином», № держреєстрації 0118U003770.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Eftekhari Z., Fardid R. the bystander effect of ultraviolet radiation and mediators. *J. Biomed. Phys. Eng.* 2020. Vol. 10, no. 1. P. 111–118. doi: 10.31661/jbpe.v0i0.956.
2. Widel M. Bystander effect induced by UV radiation; why should we be interested? *Postepy Hig. Med. Dosw (Online)*. 2012. Vol. 66. P. 828–837. doi: 10.5604/17322693.1019532.
3. The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect / S. Havaki, A. Kotsinas, E. Chronopoulos et al. *Cancer Lett.* 2015. Vol. 356, no. 1. P. 43–51. doi: 10.1016/j.canlet.2014.01.023.
4. Heeran A. B., Berrigan H. P., O'Sullivan J. The radiation-induced bystander effect (RIBE) and its connections with the hallmarks of cancer. *Radiat. Res.* 2019. Vol. 192, no. 6. P. 668–679. doi: 10.1667/RR15489.1.
5. Du Y, Du S, Liu L, Gan F, Jiang X, Wangrao K, Lyu P, Gong P, Yao Y. Radiation-induced bystander effect can be transmitted through exosomes using mirnas as effector molecules. *Radiat. Res.* 2020. Vol. 194, no. 1. P. 89–100. doi: 10.1667/RADE-20-00019.1.
6. Radiation-induced bystander effect: early process and rapid assessment / H. Wang, K. N. Yu, J. Hou et al. *Cancer Lett.* 2015. Vol. 356, no. 1. P. 137–144. doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.031.
7. Rong Wang, Tingy and Zhou, Wei Liu, Li Zuo. Molecular mechanism of bystander effects and related abscopal/cohort effects in cancer therapy. *Oncotarget.* 2018. Vol. 9, no. 26. P. 18637–18647. doi: 10.18632/oncotarget.24746.
8. Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo / C. E. Redon, J. S. Dickey, A. J. Nakamura et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2010. Vol. 107, no. 42. P. 17992–17997. doi:

of patients with CLL enhanced the manifestation of bystander effect in the PBL of conditionally healthy individuals.

CONCLUSION

The overlap of the tumor-induced and radiation-induced bystander effects in PBL of conditionally healthy individuals caused by irradiated blood cells of patients with CLL during their cocultivation leads to an increase in the manifestation of the bystander effect.

Conflict of interests

The authors declare having no conflict of interests.

Funding

The research was performed as part of the research work «Study of the effect of a witness induced by irradiated *in vitro* leukemic cells of patients with chronic lymphocytic leukemia, and the possibility of its modification with astaxanthin», № State registration 0118U003770.

REFERENCES

1. Eftekhari Z, Fardid R. the bystander effect of ultraviolet radiation and mediators. *J Biomed Phys Eng.* 2020;10(1):111-118. doi: 10.31661/jbpe.v0i0.956.
2. Widel M. Bystander effect induced by UV radiation; why should we be interested? *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2012;66:828-837. doi: 10.5604/17322693.1019532.
3. Havaki S, Kotsinas A, Chronopoulos E, Kletsas D, Georgakilas A, Gorgoulis VG. The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect. *Cancer Lett.* 2015;356(1):43-51. doi: 10.1016/j.canlet.2014.01.023.
4. Heeran AB, Berrigan HP, O'Sullivan J. The radiation-induced bystander effect (RIBE) and its connections with the hallmarks of cancer. *Radiat Res.* 2019;192(6):668-679. doi: 10.1667/RR15489.1.
5. Du Y, Du S, Liu L, Gan F, Jiang X, Wangrao K, Lyu P, Gong P, Yao Y. Radiation-induced bystander effect can be transmitted through exosomes using mirnas as effector molecules. *Radiat Res.* 2020; 194(1):89-100. doi: 10.1667/RADE-20-00019.1.
6. Wang H, Yu KN, Hou J, Liu Q, Han W. Radiation-induced bystander effect: early process and rapid assessment. *Cancer Lett.* 2015; 356(1):137-144. doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.031.
7. Rong Wang, Tingy and Zhou, Wei Liu and Li Zuo. Molecular mechanism of bystander effects and related abscopal/cohort effects in cancer therapy. *Oncotarget.* 2018;9(26):18637-18647. doi: 10.18632/oncotarget.24746.
8. Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, et al. Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo. *Proc Natl Acad Sci*

- 10.1073/pnas.1008260107.
9. Evaluation of the interaction between malignant and normal human peripheral blood lymphocytes under cocultivation and separate cultivation / D. A. Kurinnyi, S. R. Rushkovsky, O. M. Demchenko et al. *Cytology and Genetics*. 2020. Vol. 54, no. 2. P. 124–129. <https://doi.org/10.3103/S0095452720020103>.
 10. Olive P. L., Banth J. P. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the «comet» assay. *Radiat. Res.* 2012. Vol. 178. P. 35–42. doi: 10.1667/rrav04.1.
 11. Kurinnyi D. A., Rushkovsky S. R., Demchenko O. M., Pilinska M. A. Study the impact of astaxanthin on developing of genomic instability in human peripheral blood lymphocytes irradiated in vitro on G₂ phase of cell cycle. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2017. Vol. 22. P. 208–216.
 12. 30 years of the Comet Assay: an overview with some new insights / ed. by A. Azqueta, S. Langie, A. Collins. *Frontiers*. 2007. 560 p. doi: 10.3389/978-2-88919-649-4.
 13. Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 8th ed. Cengage Learning, 2015. 962 p.
 14. Kurinnyi D. A., Rushkovsky S. R., Demchenko O. M., Pilinska M. A. Peculiarities of modification by astaxanthin of radiation-induced damages in the genome of human blood lymphocytes exposed in vitro on different stages of the mitotic cycle. *Cytology and Genetics*. 2018. Vol. 52, no. 1. P. 40–45. doi: 10.3103/S0095452718010073.
 15. Suzuki K., Yamashita S. Radiation-induced bystander response: mechanism and clinical implications. *Advances in Wound Care*. 2013. Vol. 3, no. 1. P. 16–24. doi: 10.1089/wound.2013.0468.
 16. DNA damage and the bystander response in tumor and normal cells exposed to X-rays / M. Subhashree, R. Venkateswarlu, K. Karthik et al. *Mutat. Res.* 2017. Vol. 821. P. 20–27. doi: 10.1016/j.mrgentox.2017.06.007.
 17. Detection of chromosomal instability in bystander cells after Si490-ion irradiation / B. Ponnaiya, M. Suzuki, C. Tsuruoka et al. *Radiat. Res.* 2011. Vol. 176, no. 3. P. 280–290. doi: 10.1667/rr2428.1.
 18. Nagasawa H., Little J. B. Bystander effect for chromosomal aberrations induced in wild-type and repair deficient CHO cells by low fluences of alpha particles. *Mutat. Res.* 2002. Vol. 508, no. 1–2. P. 121–129. doi: 10.1016/s0027-5107(02)00193-8.
 19. Rozovski U., Keating M. J., Estrov Z. Targeting inflammatory pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2013. Vol. 88, no. 3. P. 655–666. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.07.011.
 20. Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia / X. J. Yan, I. Dozmorov, W. Li et al. *Blood*. 2011. Vol. 118, no. 19. P. 5201–5210. doi: 10.1182/blood-2011-03-342436.
 21. Cytokine-driven loss of plasmacytoid dendritic cell function in chronic lymphocytic leukemia / D. Saulep-Easton, F. B. Vincent, M. Le Page et al. *Leukemia*. 2014. Vol. 28. P. 2005–2015. doi: 10.1038/leu.2014.105
 - U.S.A. 2010;107(42):17992-17997. doi: 10.1073/pnas.1008260107.
 9. Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Demchenko OM, Sholoiko W, Pilinska MA. Evaluation of the interaction between malignant and normal human peripheral blood lymphocytes under cocultivation and separate cultivation. *Cytology and Genetics*. 2020;54(2):124-129. <https://doi.org/10.3103/S0095452720020103>.
 10. Olive PL, Banth JP. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the «comet» assay. *Radiat Res*. 2012;178:35-42. doi: 10.1667/rrav04.1.
 11. Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Demchenko OM, Pilinska MA. Study the impact of astaxanthin on developing of genomic instability in human peripheral blood lymphocytes irradiated in vitro on G₂ phase of cell cycle. *Probl Radiac Med Radiobiol*. 2017;22:208-216.
 12. Azqueta A, Langie S, Collins A, editors. 30 years of the Comet Assay: an overview with some new insights. *Frontiers*; 2007. 560 p. doi: 10.3389/978-2-88919-649-4.
 13. Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 8th ed. Cengage Learning; 2015. 962 p.
 14. Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Demchenko OM, Pilinska MA. Peculiarities of modification by astaxanthin of radiation-induced damages in the genome of human blood lymphocytes exposed in vitro on different stages of the mitotic cycle. *Cytology and Genetics*. 2018;52(1):40-45. doi: 10.3103/S0095452718010073.
 15. Suzuki K, Yamashita S. Radiation-induced bystander response: mechanism and clinical implications. *Advances in Wound Care*. 2013;3(1):16-24. doi: 10.1089/wound.2013.0468.
 16. Subhashree M, Venkateswarlu R, Karthik K, Shangamithra V, Venkatachalam P. DNA damage and the bystander response in tumor and normal cells exposed to X-rays. *Mutat Res*. 2017;821:20-27. doi: 10.1016/j.mrgentox.2017.06.007.
 17. Ponnaiya B, Suzuki M, Tsuruoka C, Uchihori Y, Wei Y, Hei TK. Detection of chromosomal instability in bystander cells after Si490-ion irradiation. *Radiat Res*. 2011;176(3):280-290. doi: 10.1667/rr2428.1.
 18. Nagasawa H, Little JB. Bystander effect for chromosomal aberrations induced in wild-type and repair deficient CHO cells by low fluences of alpha particles. *Mutat Res*. 2002;508(1-2):121-129. doi: 10.1016/s0027-5107(02)00193-8.
 19. Rozovski U, Keating MJ, Estrov Z. Targeting inflammatory pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88(3):655-666. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.07.011.
 20. Yan XJ, Dozmorov I, Li W, et al. Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(19):5201–5210. doi: 10.1182/blood-2011-03-342436.
 21. Saulep-Easton D, Vincent FB, Le Page M, et al. Cytokine-driven loss of plasmacytoid dendritic cell function in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2014;28:2005-2015. doi: 10.1038/leu.2014.105
 22. Najafi M, Fardid R, Hadadi Gh, Fardid MJ. The mechanisms of radiation-induced bystander effect. *Biomed Phys Eng*.

22. Najafi M., Fardid R., Hadadi Gh., Fardid M. J. The mechanisms of radiation-induced bystander effect. *Biomed. Phys. Eng.* 2014. Vol. 4, no. 4. P. 163–172.
23. Mechanism of radiation-induced bystander effects: a unifying model / T. K. Hei, H. Zhou, V. N. Ivanov et al. *Pharm. Pharmacol.* 2008. Vol. 60, no. 8. P. 943–950. doi: 10.1211/jpp.60.8.0001.
24. Bredt D. S., Snyder S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* 1994. Vol. 63. P. 175–195. doi: 10.1146/annurev.bi.63.070194.001135.
25. Reactive oxygen species and nitric oxide signaling in bystander cells / K. K. Jella, R. Moriarty, B. McClean et al. *PLoS ONE*. 2018. Vol. 13, no. 4. doi: 10.1371/journal.pone.0195371.
26. Sawal H. A., Asghar K., Bureik M., Jalal N. Bystander signaling via oxidative metabolism. *Oncotargets and Therapy*. 2017. Vol. 10. P. 3925–3940. doi: 10.2147/OTT.S136076.
27. Nitric oxide-mediated signaling in the bystander response of individually targeted glioma cells / C. Shao, V. Stewart, M. Folkard et al. *Cancer Res.* 2003. Vol. 63. P. 8437–8442. Published December 2003.
28. Furlong H., Mothersill C., Lyng F. M., Howe O. Apoptosis is signalled early by low doses of ionising radiation in a radiation-induced bystander effect. *Mutat. Res.* 2013. Vol. 741–742. P. 35–43. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.02.001.
- 2014;4(4):163-172.
23. Hei TK, Zhou H, Ivanov VN, Hong M, Lieberman HB, Brenner DJ, et al. Mechanism of radiation-induced bystander effects: a unifying model. *Pharm Pharmacol.* 2008;60(8):943-950. doi: 10.1211/jpp.60.8.0001.
24. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:175-195. doi: 10.1146/annurev.bi.63.070194.001135.
25. Jella KK, Moriarty R, McClean B, Byrne HJ, Lyng FM. Reactive oxygen species and nitric oxide signaling in bystander cells. *PLoS ONE*. 2018;13(4). doi: 10.1371/journal.pone.0195371.
26. Sawal HA, Asghar K, Bureik M, Jalal N. Bystander signaling via oxidative metabolism. *Oncotargets and Therapy*. 2017;10:3925-3940. doi: 10.2147/OTT.S136076.
27. Shao C, Stewart V, Folkard M, et al. Nitric oxide-mediated signaling in the bystander response of individually targeted glioma cells. *Cancer Res.* 2003;63:8437-8442. Published December 2003.
28. Furlong H, Mothersill C, Lyng FM, Howe O. Apoptosis is signalled early by low doses of ionising radiation in a radiation-induced bystander effect. *Mutat Res.* 2013;741-742:35-43. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.02.001.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

Курінний Денис Аркадійович, кандидат біологічних наук, виконуючий обов'язки завідувача відділу медичної генетики Інституту експериментальної радіології, Державної установи «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», м. Київ, Україна

Рушковський Станіслав Ричардович, кандидат біологічних наук, доцент кафедри загальної та медичної генетики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, м. Київ, Україна

Демченко Олена Миколаївна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії генетичних і епігенетичних досліджень відділу медичної генетики Інституту експериментальної радіології, Державної установи «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», м. Київ, Україна

Романенко Марина Геннадіївна, молодший науковий співробітник лабораторії мутагенезу і антимутагенезу відділу медичної генетики Інституту експериментальної радіології, Державної установи «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», м. Київ, Україна

Лященко Тарас Петрович, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фізіології людини і тварин Навчально-

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Denis A. Kurinnyi, Candidate of Biological Sciences, Acting Head of the Department of Medical Genetics of the Institute of Experimental Radiology, State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine

Stanislav R. Rushkovsky, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of General and Medical Genetics of the Educational and Scientific Center «Institute of Biology and Medicine» of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Olena M. Demchenko, Candidate of Biological Sciences, Senior Research Fellow, Laboratory of Genetic and Epigenetic Research, Department of Medical Genetics, Institute of Experimental Radiology, National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Maryna H. Romanenko, Junior Research Fellow, Laboratory of Mutagenesis and Antimutagenesis, Department of Medical Genetics, Institute of Experimental Radiology, National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Taras P. Lyashchenko, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Human and Animal Physiology of the Training and Research

наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, м. Київ, Україна

Пілінська Марія Андріївна, доктор медичних наук, професор, головний науковий співробітник лабораторії цитогенетики відділу медичної генетики Інституту експериментальної радіології, Державної установи «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», м. Київ, Україна

Center «Institute of Biology and Medicine» of the Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Mariia A. Pilinska, Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief Researcher of the Laboratory of Cytogenetics, Department of Medical Genetics, Institute of Experimental Radiology, State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine

Стаття надійшла до редакції 16.08.2021

Received: 16.08.2021