

## РОЗВИТОК ПУХЛИННО-ІНДУКОВАНОГО ЕФЕКТУ СВІДКА ТА РАДІОЧУТЛИВОСТІ В ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ НА ГЛІОБЛАСТОМУ З РІЗНИМ СТАТУСОМ МЕТИЛУВАННЯ ГЕНА *MGMT* В КЛІТИНАХ ПУХЛИНИ

О.В. ЗЕМСКОВА<sup>1</sup>, Д.А. КУРІННИЙ<sup>2</sup>, С.Р. РУШКОВСЬКИЙ<sup>3</sup>, О.М. ДЕМЧЕНКО<sup>2</sup>,  
М.Г. РОМАНЕНКО<sup>3</sup>, О.Я. ГЛАВАЦЬКИЙ<sup>1</sup>, С.В. КЛИМЕНКО<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Державна установа «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України»,  
вул. Платона Майбороди, 32, Київ, 04050, Україна

<sup>2</sup> Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України»,  
вул. Ю. Ілленка, 53, Київ, 04050, Україна

<sup>3</sup> Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка,  
вул. Володимирська, 64/13, Київ, 01601, Україна

E-mail: kurinnyi.d@gmail.com

*Досліджено вплив метилування гена *MGMT* у клітинах гліобластоми на розвиток пухлино-індукованого ефекту свідка та зміну чутливості нетрансформованих клітин-свідків (лімфоцитів периферичної крові) до дії іонізуючого випромінювання. Отримані результати вказують на розвиток індукованого гліобластомою ефекту свідка. Встановлено відсутність зв'язку маніфестації пухлино-індукованого ефекту свідка в не-опромінених лімфоцитах периферичної крові зі статусом метилування промоторної ділянки гена *MGMT* в клітинах пухлини. Після радіаційного навантаження були зафіксовані статистично значущі ( $p < 0,01$ ) відмінності у апоптичній активності та радіочутливості лімфоцитів периферичної крові хворих на гліобластому, що мають різний статус метилування гена *MGMT* в клітинах пухлини.*

**Ключові слова:** гліобластома, метилування *MGMT*, пухлино-індукований ефект свідка, *Comet assay*.

**Вступ.** Гліобластома є найбільш поширеною первинною пухлиною головного мозку у дорослих відрізняється вкрай несприятливим прогнозом та характеризується найнижчими показниками виживаності серед гліом. Навіть при комплексному лікуванні 5-річна виживаність таких хворих коливається в межах від 0,05 до 4,7 % (Quinn T. Ostrom et al, 2014) Агресивність гліобластоми залежить від її біологічних властивостей. У хворих на гліобластому, підвищений рівень фізіологічної активності клітин, які знаходяться в стані онкологічної трансформації, супроводжується викидом у міжклітинний

простір цитокинів IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  та IL-10, IL-8, IL-2 та GM-CSF, мікроРНК і фрагментів ДНК, які шляхом прямої чи опосередкованої взаємодії можуть впливати на клітини, що не зазнали трансформації (Widel, 2016; Rong Wang et al, 2018). Наслідком такого впливу може бути розвиток в нетрансформованих клітинах пухлино-індукованого ефекту свідка (TIBE – tumor-induced bystander effect), який характеризується зростанням синтезу стрес-месенджерів (NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), що призводить до збільшення пошкоджень ДНК, та, як наслідок, до активізації процесів репарації та апоптозу (Redon et al, 2010; Verma et al, 2017; Mothersill et al, 2018). Але препущення, що при гліобластомі дійсно спостерігається TIBE, потребувало експериментального підтвердження.

*MGMT* є одним з ключових генів, від активності якого може залежати успіх терапії хворих на гліобластому (Brandes et al, 2016). Він розташований на десятій хромосомі (10q26), кодує фермент O<sup>6</sup>-метилгуанін-метилтрансферазу, який бере участь в прямій репарації ДНК: каталізує перенесення алкільної групи з O<sup>6</sup>-метилгуаніна на власний цистеїн, що дозволяє відновити ДНК після пошкодження алкільючими сполуками. Ген містить 98 сайтів CpG у промоторній області та першому з п'яти екзотів. Вважається, що метилування сайтів CpG, розташованих у першому некодуючому екзоні та енхансері, яке спостерігається виключно в клітинах новоутворень, є критичним для втрати експресії *MGMT*. В цьому випадку клітини пухлини не здатні відновити ДНК, пошкоджену антираковим хіміопрепаратом темозоломідом

© О.В. ЗЕМСКОВА, Д.А. КУРІННИЙ,  
С.Р. РУШКОВСЬКИЙ, О.М. ДЕМЧЕНКО,  
М.Г. РОМАНЕНКО, О.Я. ГЛАВАЦЬКИЙ,  
С.В. КЛИМЕНКО, 2021

(ДНК-алкілюючий агент). В клінічних дослідженнях AVAREG та EORTC 26101 було підтверджено факт залежності ефективності лікування гліом від статусу метилювання гена *MGMT* (Brandes et al, 2016; Wick et al, 2017). Згідно з останньою редакцією класифікації ВООЗ метилювання промотору гена *MGMT* є предиктивною ознакою ефективності хіміотерапії у хворих на гліобластому (Stupp et al, 2009; Wick et al, 2014). В той же час, в 2005 р. було продемонстровано переваги у виживаності хворих на гліобластому при проведенні комплексної терапії – поєднанні хіміотерапії темозоломідом із променевою терапією (Stupp et al, 2005).

Оскільки ген *MGMT* бере участь в прямій репарації ДНК, метилювання його промотору пов'язано зі зростанням рівня геномної нестабільності в клітинах пухлин. Однак, чи буде при цьому посилюватись вплив трансформованих клітин на здорові, і як наслідок, чи буде відбуватись посилення маніфестації пухлино-індукованого ефекту свідка, на сьогодні не відомо. Крім того, зважаючи на широке застосування променевої терапії при лікуванні хворих на гліобластому, важливим є визначення можливості зміни радіочутливості здорових клітин організму під комплексним впливом опромінення та клітин в стані злоякісної трансформації, які мають різний статус метилювання гена *MGMT*.

Метою роботи було визначення впливу гліобластоми з різним статусом метилювання промоторної ділянки гена *MGMT* в клітинах на маніфестацію пухлино-індукованого ефекту свідка та розвиток чутливості нетрансформованих клітин-свідків (лімфоцитів периферичної крові) до дії іонізуючого випромінювання.

**Матеріали та методи.** В дослідженні використовували культури лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) 25 осіб (двадцяти хворих на гліобластому та п'ятьох умовно здорових волонтерів). Серед досліджених хворих було сформовано дві рівні групи в залежності від статусу метилювання гена *MGMT* в пухлині: 10 осіб з метилюванням та 10 осіб з відсутністю метилювання промоторної ділянки гена *MGMT*. Середній вік хворих склав 54,5 років (27–68). В усіх випадках діагноз гліобластоми (IV grade WHO) було патоморфологічно верифіковано після хірургічного видалення пухлин. Хірургічне лікування хворих проводилось в ДУ «Ін-

ститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», ад'ювантне лікування (хіміо- та променева терапія) хворим не проводилось. Статус метилювання промоторної ділянки гена *MGMT* в визначався виключно в клітинах пухлин хворих на гліобластому. Аналіз проводився у медичній лабораторії CSD (м. Київ).

Культури ЛПК, одержані від 5-х умовно здорових волонтерів (2 жінки, 3 чоловіка), середній вік – 43 роки (31–48), які заперечували свідомий контакт зі знайомими чи потенційними мутагенами, вели здоровий спосіб життя, були використані в якості контролю. Дослідження проводились згідно етичних норм, прийнятих українським законодавством. Всі особи були залучені до дослідження за умови надання інформованої згоди. Культивування лімфоцитів проводили впродовж 48 год за модифікованим нами стандартним мікрометодом (Kurinnui et al, 2018). Частину культур опромінювали  $\gamma$ -квантами (випромінювач IBL-237C, потужність 2,34 Гр/хв) в дозі 1,0 Гр на 0 годині культивування.

Для оцінки відносного рівня пошкодження ДНК використовували метод електрофорезу окремих клітин (Comet assay) в нейтральних умовах (Langie et al, 2007; Olive et al, 2012). Приготування слайдів, лізис клітин та проведення нейтрального кометного електрофорезу проводили за загальноприйнятою методикою (Langie et al, 2007). Після електрофорезу препарати фарбували DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) в концентрації 2 мкг/мл та аналізували за допомогою люмінесцентного мікроскопу з приєднаною фотокамерою CanonD1000. Зображення обробляли з використанням програми ImageJ (imagej.nih.gov), плагіну OpenComet. В якості параметру для визначення відносного рівня пошкодження ДНК використовували показник «Tail Moment» (TM) (Langie et al, 2007). Для оцінки інтенсивності процесів апоптозу в культурах ЛПК визначали частоту «атипових» комет (утворюються з клітин з високим рівнем фрагментації ДНК (рис. 1) (Wilkins et al, 2002).

Статистичну обробку даних проводили за загальноприйнятими методами. Достовірність відмін між рядами даних оцінювали за критерієм Мана-Уїтні (Rosner, 2016).

**Результати та обговорення.** Індивідуальні нові значення TM в культурах ЛПК волонтерів

з групи порівняння (умовно здорові особи) при окремому культивуванні ЛПК вірогідно не відрізнялись поміж собою і коливались в межах від  $3,35 \pm 1,12$  до  $6,00 \pm 1,52$  ( $p > 0,05$ ). Середнє значення склало  $4,17 \pm 0,52$  (таблиця). Ці значення ТМ відповідають результатам наших попередніх досліджень щодо фонових рівнів даного параметру пошкоджуваності ДНК (Kurinnnyi et al, 2017; Kurinnnyi et al, 2018; Kurinnnyi et al, 2020).

В неопромінених культурах ЛПК хворих на гліобластому, як з метильованим (група 1) так із неметильованим промотором гена *MGMT* (група 2), було зафіксовано статистично значуще ( $p < 0,05$  та  $p < 0,01$  відповідно) зростання середньогрупових рівнів ТМ в порівнянні з середнім значенням ТМ умовно здорових осіб (таблиця). Слід відзначити, що різниця показників ТМ між групами 1 та 2 не була статистично значущою ( $p > 0,05$ ). Міжіндивідуальні коливання ТМ в групі 1 складали від  $4,18 \pm 0,34$  до  $18,10 \pm 1,61$ , а в групі 2 – від  $5,56 \pm 0,53$  до  $19,77 \pm 2,52$ .

Оскільки обраним нами пацієнтам перед взяттям зразків крові не проводили променевого лікування або хіміотерапії, то зафіксоване під час експерименту зростання ТМ в неопромінених культурах ЛПК осіб з груп 1 та 2 в порівнянні з показниками контрольної групи вказує на розвиток ТІВЕ. Це можна пояснити тим, що маніфестація ТІВЕ пов'язана з активним синтезом в клітинах-свідках (лімфоцитах крові осіб, хворих на гліобластому) стрес-мессенджерів ( $\text{NO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) під впливом клітин гліобластоми. Наслідком цих процесів є зростан-

ня в клітинах-свідках рівня пошкоджень ДНК, зокрема одно- та дволанцюгових розривів (Widel, 2016; Rong Wang et al, 2018).

Дія іонізуючого випромінювання *in vitro* на лімфоцити крові онкологічно хворих пацієнтів, в яких була відмічена маніфестація ТІВЕ, спричиняє додаткове зростання рівня пошкоджень ДНК. Отже радіочутливість лімфоцитів пацієнтів з гліобластомою може знаходитися в залежності від інтенсивності ТІВЕ.

Реакція на опромінення в дозі 1,0 Гр в групах 1, 2 та в групі контролю була різноспрямованою (таблиця). В групі контролю було зафіксовано статистично значуще ( $p < 0,01$ ) зростання середнього значення ТМ з  $4,17 \pm 0,52$  в неопромінених культурах ЛПК до  $8,56 \pm 0,85$  в опромінених. Це зростання пов'язано як з виникненням пошкоджень ДНК під впливом іонізуючого опромінення, так і з активацією генів репарації (Kumaravel et al, 2009; Wang et al, 2013). В той же час, радіаційне навантаження не викликало статистично значущих ( $p > 0,05$ ) змін ТМ в культурах ЛПК обох груп хворих (група 1:  $9,26 \pm 1,95$  та  $8,87 \pm 1,45$  в неопромінених та культурах відповідно; група 2:  $10,80 \pm 1,55$  та  $7,95 \pm 0,90$  в неопромінених та культурах відповідно).

Таким чином, гліобластома спричинює чіткі прояви ТІВЕ в ЛПК хворих. До того ж, можна зробити припущення, що ТІВЕ призводить до значних змін у прояву радіочутливості немалігнізованих клітин-свідків. Однак питання про вплив статусу метилування гена *MGMT* в пухлинних клітинах на прояв ТІВЕ в неопромінених клітинах та при про-

**Значення ТМ в неопромінених та опромінених культурах ЛПК умовно здорових осіб та хворих на гліобластому**

Група осіб	Без опромінення		Опромінення в дозі 1,0 Гр	
	Min-Max	Середнє	Min-Max	Середнє
Контрольна група (умовно здорові особи)	3,35–6,00	$4,17 \pm 0,52$	6,23–14,49	$8,56 \pm 0,85\ddagger$
Група 1	4,18–18,10	$9,26 \pm 1,89^*$	3,81–15,19	$8,87 \pm 1,45$
Група 2	5,56–19,77	$10,80 \pm 1,55^{**}$	4,79–11,32	$7,95 \pm 0,90$

*Примітки.* Min – мінімальне значення, Max – максимальне значення, \* – значущість відмін ( $p < 0,05$ ) по відношенню до контрольної групи, \*\* – значущість відмін ( $p < 0,01$ ) по відношенню до контрольної групи, ‡ – значущість відмін ( $p < 0,01$ ) по відношенню до неопромінених культур

вокаційному радіаційному навантаженні залишається відкритим.

Для більш детального аналізу нами був проведений аналіз частотного розподілу окремих клітин в залежності від рівня пошкоджень ДНК. Всі «комети» були розділені за значеннями ТМ на 17 груп (ТМ від 0 до 16 <). Якщо ТМ дорівнював граничному значенню, «комету» відносили до наступної групи (рис. 2). Перша група (ТМ 0 – <1) сформована клітинами, які знаходяться на S-стадії клітинного циклу та зупинились в поділі при проходженні чек-поінт контролю (Kurinyi et al, 2018). Остання група зі значенням ТМ від 16 відповідає клітинам з екстремально високим ступенем розривів ДНК.

Як видно з рис. 2, а, після культивування неопромінених ЛПК умовно здорових осіб, значення ТМ основної частини «комет» були в межах від 0 до 6, що відповідає низькому рівню пошкоженості геному. При аналізі розподілів неопромінених культур ЛПК хворих з групи 1 та групи 2, в порівнянні з даними контрольної групи, спостерігалось статистично значуще ( $p < 0,01$ ) зростання частоти клітин з ТМ > 16 на фоні зменшення пулу «комет» з ТМ 0 – <1 (клітини, що зупинились в поділі на S-стадії клітинного циклу) та з ТМ від 1 до 4 (клітини з невеликою відносною кількістю розривів ДНК). Таким чином, прояв ТІВЕ (зростання середніх значень ТМ в неопромінених культурах лімфоцитів у нейроонкологічних хворих порівняно з умовно здоровими особами) відбувається за рахунок збільшення клітин з великим рівнем пошкодження ДНК. Відсутність статистично значущої різниці між частотними розподілами ТМ «комет» хворих обох груп свідчить про незначний вплив статусу метилування гена *MGMT* в пухлинних клітинах на індукцію ефекту свідка.

Як і очікувалось, дія провокуючого опромінення *in vitro* (1,0 Гр) в культурах ЛПК контрольної групи осіб призвело до зростання пулу клітин з екстремально високою відносною кількістю розривів ДНК (рис. 2, а). У хворих на гліобластому  $\gamma$ -випромінювання спричинило два варіанти відповіді: в групі хворих № 1 не спостерігалось значущих відмін у розподілі «комет» в порівнянні з неопроміненими культурами (рис. 2, б); в групі № 2 було зафіксовано зростання майже до рівня контрольної групи

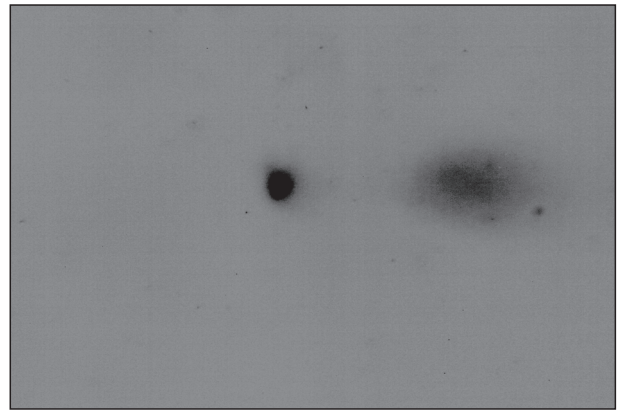


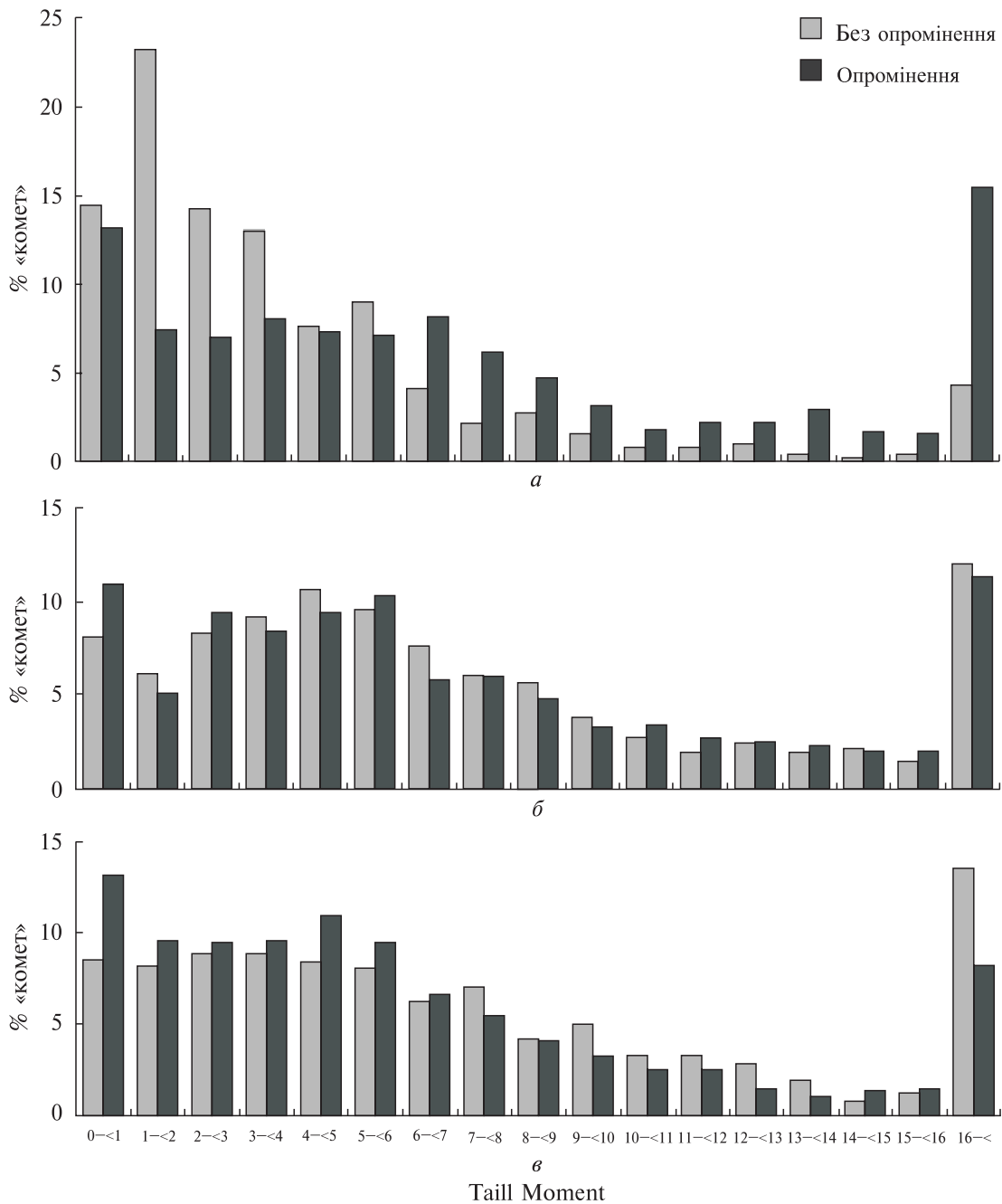
Рис. 1. «Атипова» комета. Збільшення 600×

частоти клітин, що зупинились в поділі на стадії S клітинного циклу, та відмічено зниження частоти клітин з високим рівнем пошкоджень ДНК (рис. 2, в). Відміни між розподілами частот «комет» в опромінених культурах лімфоцитів різних груп хворих була такою статистично значущою ( $p < 0,05$ ). Отже, не зважаючи на відсутність вірогідних відмін між групами за середніми значеннями ТМ після опромінення культур ЛПК, при аналізі частотних розподілів «комет» чітко виявляються особливості прояву радіочутливості ЛПК осіб з групи порівняння і хворих на гліобластому, а також відміни у радіочутливості ЛПК нейроонкологічних хворих в залежності від статусу метилування гена *MGMT* в клітинах пухлин.

Відомо, що одним із проявів ефекту свідка та результатів дії іонізуючого випромінювання є активація апоптозу в клітинах, що мають критично високий рівень пошкоджень ДНК (Najafi et al, 2014; Rong Wang et al, 2018). Тому, для більш повної характеристики ТІВЕ та радіочутливості лімфоцитів-свідків хворих на гліобластому, нами був проведений додатковий аналіз апоптичної активності культур клітин (рис. 3).

Спонтанна середня частота клітин у стані апоптозу в неопромінених культурах ЛПК умовно здорових осіб становила  $2,00 \pm 0,60$  %, що відповідає нашим попереднім даним (Kurinyi et al, 2018). В неопромінених культурах ЛПК хворих на гліобластому спостерігався вірогідно вищий ( $p < 0,05$ ) по відношенню до контрольної групи рівень апоптичної активності:  $8,21 \pm 2,45$  % в групі № 1,  $11,82 \pm 2,69$  % в





**Рис. 2.** Частотний розподіл комет за значеннями ТМ в неопромінених та опромінених *in vitro* в дозі 1,0 Гр культурах ЛПК умовно здорових осіб (контрольна група – а), ЛПК хворих на гліобластому з метильованим (група 1 – б) та неметильованим промотором гена *MGMT* (група 2 – в)

групі № 2 Ці дані також підтверджують наш попередній висновок про реалізацію TIBE в лімфоцитах хворих на гліобластому. Зважаючи на активну участь в розвитку класичного

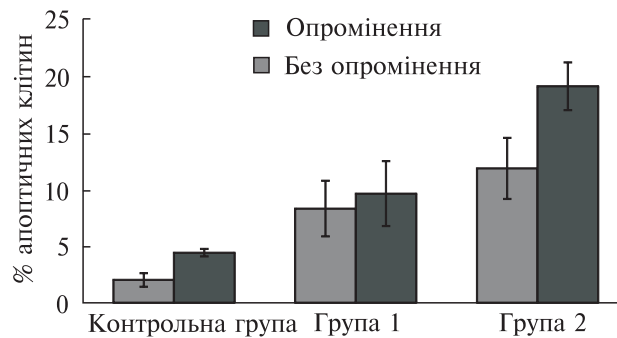
ефекту свідка фактора некрозу пухлин TNF- $\alpha$  та інших цитокінів (Rong Wang et al, 2018), а також враховуючи посилений синтез цих речовин онко-трансформованими клітинами (Lee et

al, 2011; Conlon et al, 2019), не виключено, що встановлена нами зміна апоптичної активності в ЛПК хворих на гліобластому пов'язана з відповіддю саме на цей вплив.

Опромінення призвело до зростання частоти клітин в стані апоптозу в групі контролю (з  $2,00 \pm 0,60$  % до  $4,3 \pm 0,33$  %,  $p < 0,05$ ) та групі № 2 (з  $11,82 \pm 2,69$  % до  $19,04 \pm 3,10$  %,  $p < 0,05$ ). В групі № 1 не було зареєстровано статистично значущих ( $p > 0,05$ ) змін частот клітин у стані апоптозу:  $8,22 \pm 2,45$  та  $9,60 \pm 2,85$  % в неопромінених та опромінених культурах відповідно. Таким чином, більш висока апоптична активність спостерігається саме в опромінених культурах ЛПК хворих у разі відсутності метилювання промоторної ділянки гена *MGMT* в клітинах пухлин. В свою чергу, активація процесів апоптозу безпосередньо пов'язана зі зниженням, після опромінення, частоти клітин, що мають високий рівень пошкоджень ДНК в групі 2 (рис. 2, в, група клітин з ТМ > 16).

Суттєва різниця, яка спостерігалась при порівнянні частотних розподілів лімфоцитів в опромінених культурах за ступенем радіаційно-індукованих пошкоджень ДНК і апоптичної активності між групами хворих, відмінних за статусом метилювання *MGMT*, свідчать, що статус метилювання гена *MGMT* в клітинах пухлини може бути пов'язаним зі зміною радіочутливості нормальних клітин. Однак сам фермент O<sup>6</sup>-метилгуанін-метилтрансфераза не приймає участь в процесах репарації пошкоджень ДНК, які індуковані дією іонізуючої радіації. Вірогідно, факт його метилювання чи деметилювання може відображати наявність глобальних епігенетичних змін як в пухлинних, так і нормальних тканинах хворих. Так, порушення глобального метилювання ДНК в лімфоцитах периферичної крові раніше були описані у пацієнтів з раком щитоподібної та молочної залози (Tang et al, 2016; Ceolin et al, 2018). Епігенетичні модифікації свою чергу, можуть призводити до змін експресії генів, що безпосередньо задіяні в клітинній відповіді на дію іонізуючого випромінювання. Наразі дані щодо наявності чи відсутності зв'язку між статусами метилювання в клітинах гліобластоми і нормальних клітинах відсутні, і це потребує додаткових досліджень.

Таким чином, нами вперше було зареєстровано розвиток ефекту свідка індукованого гліо-



**Рис. 3.** Порівняння частот клітин у стані апоптозу до та після опромінення в культурах лімфоцитів периферичної крові умовно здорових осіб (контрольна група), хворих на гліобластому з метильованим (група 1) та неметильованим промотором гена *MGMT* (група 2)

бластомой та показано можливий зв'язок між статусом метилювання гена *MGMT* в клітинах пухлини зі зміною радіочутливості нормальних клітин-свідків. Подальше вивчення клінічного значення описаних нами явищ призведе до зменшення похибок при прогнозуванні успішності радіотерапії або комбінованої терапії гліобластом.

**Висновки.** Отримані нами результати вказують на розвиток індукованого гліобластомой ефекту свідка, який проявляється як у вигляді збільшення відносної кількості пошкоджень ДНК клітин-свідків, так і у активації в них процесів апоптозу. Вплив метилювання промоторної ділянки гена *MGMT* в пухлинних клітинах на маніфестацією ТІВЕ в неопромінених ЛПК хворих не спостерігався. Були зафіксовані відмінності у радіочутливості лімфоцитів периферичної крові хворих на гліобластому, що мають різний статус метилювання гена *MGMT* в клітинах пухлини.

**Дотримання етичних стандартів.** 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 етичними принципами, ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики (2001р.)

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Робота виконувалась авторами

без фінансування зі сторони державних та/або не державних фондів та фінансових інституцій.

DEVELOPMENT OF TUMOR-INDUCED BYSTANDER EFFECT AND RADIOSENSITIVITY IN THE PATIENTS' PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES ON GLIOBLASTOMA WITH DIFFERENT STATUS OF THE *MGMT* GENE METHYLATION IN TUMOR CELLS

O.V. Zemskova, D.A. Kurinnyi, S.R. Rushkovsky, O.M. Demchenko, M.G. Romanenko, O.Ya Glavatsky, S.V. Klymenko

State Institution «Institute of Neurosurgery. acad. A.P. Romodanova National Academy of Medical Sciences of Ukraine», street Platona Maiboroda, 32, Kyiv, 04050, Ukraine

State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», st. Yu. Ilyenko, 53, Kyiv, 04050, Ukraine

Educational and Research Center «Institute of Biology and Medicine» of Taras Shevchenko National University of Kyiv, st. Volodymyrska, 64/13, Kyiv, 01601, Ukraine

E-mail: kurinnyi.d@gmail.com

The effect of the *MGMT* gene methylation in glioblastoma cells on the development of the tumor-induced bystander effect and the modification of the sensitivity of untransformed bystander cells (peripheral blood lymphocytes) to the impact of ionizing radiation was studied. The results obtained demonstrate the development of the bystander effect, induced by the glioblastoma. There was no association found between the manifestation of the tumor-induced bystander effect in non-irradiated peripheral blood lymphocytes and the methylation status of the promoter region *MGMT* gene in the tumor cells. After the exposure to the radiation, statistically significant ( $p < 0,01$ ) differences in apoptotic activity and radiosensitivity in peripheral blood lymphocytes of glioblastoma patients with different status of the *MGMT* gene methylation in tumor cells were observed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Brandes AA, Finocchiaro G, Zaganel V et al (2016) AVAREG: a phase II, randomized, noncomparative study of fotemustine or bevacizumab for patients with recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol* 18:1304–1312. doi: 10.1093/neuonc/nou035

Ceolin L, Goularte AP et al (2018) Global DNA methylation profile in medullary thyroid cancer patients. *Exp Mol Pathol* 105(1):110–114. doi: 10.1016/j.yexmp.2018.06.003

Conlon KC, Miljkovic MD, Waldmann TA (2019) Cytokines in the Treatment of Cancer. *J Inter. Cyt Res* 39(1):6–21. <http://doi.org/10.1089/jir.2018.0019>

Kumaravel, TS, Vilhar B, Faux SP (2009) Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol* 25: 53–64. <https://doi.org/10.1007/s10565-007-9043-9>

Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Demchenko OM, Sholoiko VV, Pilinska MA (2020) Evaluation of the interaction between malignant and normal human peripheral blood lymphocytes under cocultivation and separate cultivation. *Cytol. Genet.* 54(2):124–129. <https://doi.org/10.3103/S0095452720020103>

Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Demchenko OM, Pilinska MA (2017) Study the impact of astaxanthin on developing of genomic instability in human peripheral blood lymphocytes irradiated in vitro on G<sub>2</sub> phase of cell cycle. *Problems of radiation medicine and radiobiology* 22:208–216. doi: 10.33145/2304-8336-2017-22-208-215

Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Demchenko OM, Pilinska MA (2018) Peculiarities of modification by astaxanthin the radiation-induced damages in the genome of human blood lymphocytes exposed invitro on different stages of the mitotic cycle. *Cytol Genet* 52(1):40–45. doi: 10.3103/S0095452718010073.

Langie S, Collins A (2007) 30 years of the Comet Assay: an overview with some new insights. *Frontiers Media SA*, 560 p. doi: 10.3389/978-2-88919-649-4

Lee S, Margolin K (2011) Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)* 3(4):3856–3893. doi: 10.3390/cancers3043856

Mothersill C, Rusin A, Fernandez-Palomo C, Seymour C (2018) History of bystander effects research 1905 – present; what is in a name? *Int J Radiat Biol* 94 (8):696–707. doi: 10.1080/09553002.2017.1398436

Najafi M, Fardid R, Hadadi G, Fardid M (2014) The mechanisms of radiation-induced bystander effect. *J Biomed Phys Eng* 4(4):163–172. PMID: 25599062; PMID: PMC4289523

Olive PL, Banáth JP (2012) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the «comet» assay. *Radiat Res* 17835–17842

Quinn T Ostrom, LucBauchet et al (2014) The epidemiology of glioma in adults: a «state of the science» review, *Neuro-Oncology*. 16(7):896–913. doi: 10.1093/neuonc/nou087

Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, et al (2010) Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues *in vivo*. *Proc Nat Acad Sci USA* 107(42):17992–17997. doi: 10.1073/pnas.1008260107

Rong Wang, Tingyang Zhou, Wei Liu and Li Zuo (2018) Molecular mechanism of bystander effects and related abscopal/cohort effects in cancer therapy.

- Oncotarget 9(26):18637–18647. doi: 10.18632/oncotarget.24746
- Rosner B. (2015) Fundamentals of Biostatistics. 8th ed. Cengage Learning, 962 p. ISBN-13: 9781305268920
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP et al (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10:459–466
- Tang Q, Cheng J, Cao X, Surowy H, Burwinkel B (2016) Blood-based DNA methylation as biomarker for breast cancer: a systematic review. *Clin Epigen* 8:115–133. doi: 10.1186/s13148-016-0282-6
- Verma N, Tiku AB (2017) Significance and nature of bystander responses induced by various agents. *Mutat Res* 773:104–121. doi: 10.1016/j.mrrev.2017.05.003
- Wang Yan, Xu Chang Du et al (2013) Evaluation of the Comet Assay for Assessing the Dose-Response Relationship of DNA Damage Induced by Ionizing Radiation. *Inter. J Mol Sci* 14:22449–22461. doi: 10.3390/ijms141122449
- Wick W, Gorlia T, Bendszus M et al (2017) Lomustine and Bevacizumab in progressive glioblastoma. *N Engl J Med* 377:1954–1963. doi: 10.1056/NEJMoa1707358.
- Widel M (2016) Radiation induced bystander effect: From *in vitro* studies to clinical application. *Int. J. Medical Physics. Clin Engin Rad Oncol* 5:1–17. doi: 10.4236/ijmpcero.2016.51001
- Wilkins RC, Kutzner BC, Truong M, Sanchez-Dardon J, McLean JR (2002) Analysis of radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: flow cytometry using Annexin V and propidium iodide versus the neutral comet assay. *Cytometry* 48:14–19

Надійшла в редакцію 20.07.20  
Після доопрацювання 07.10.20  
Прийнята до друку 18.03.21