

УДК 576.316:616-008.63:612.112:616.15-053.6/.9:612.014.48

О. В. Шеметун✉, О. О. Талан, О. М. Демченко, М. А. Пілінська

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

РОЗВИТОК РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО ЕФЕКТУ СВІДКА В СОМАТИЧНИХ КЛІТИНАХ ОСІБ РІЗНОГО ВІКУ

Мета. Дослідити розвиток хромосомної нестабільності внаслідок радіаційно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах крові осіб різних вікових груп.

Матеріали і методи. Матеріалом дослідження були лімфоцити крові 42 осіб віком від 12 до 102 років, розподілених на чотири вікові групи – підлітки, особи середнього віку, особи літнього віку, довгожителі. Ефект свідка вивчали шляхом моделювання його індукції в лімфоцитах крові людини, при якому в інкубаційну суміш додавали по 0,3 мл неопроміненої крові (слугували клітинами-свідками) і 0,3 мл крові осіб іншої статі, опроміненої *in vitro* в дозі 0,25 Гр (рентгенівське опромінення), з наступним культивуванням за загальноприйнятим напівмікрометодом. Препарати метафазних хромосом фарбували з використанням GTG-забарвлення і аналізували під світловими мікроскопами зі збільшенням $\times 1000$.

Результати. Середньогрупові рівні аберацій хромосом у клітинах-свідках підлітків ($6,08 \pm 0,67$ на 100 метафаз), осіб середнього ($4,56 \pm 0,61$ на 100 метафаз) і літнього віку ($6,34 \pm 0,76$ на 100 метафаз) статистично достовірно перевищували показники відповідних вікових контролів ($p < 0,01$) за рахунок аберацій хроматидного типу. Рівень аберацій хромосом в клітинах-свідках довгожителів ($2,84 \pm 0,51$ на 100 метафаз) статистично достовірно не відрізнявся від контрольного ($p > 0,05$). Радіаційно-індукований ефект свідка зареєстровано у 83 % підлітків, 90 % осіб середнього та 50 % осіб літнього віку.

Висновки. У неопромінених лімфоцитах крові підлітків, осіб середнього та літнього віку при кокультивуванні з клітинами, опроміненими *in vitro* в дозі 0,25 Гр, індукується ефект свідка. У неопромінених лімфоцитах крові довгожителів ефекту свідка не виявлено. Зареєстрована міжіндивідуальна варіабельність в індукції ефекту свідка. Розвиток ефекту свідка не залежить від рівня хромосомної нестабільності в контрольних культурах.

Ключові слова: радіаційно-індукований ефект свідка, лімфоцити крові людини, вік, частота аберацій хромосом.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2018. Вип. 23. С. 499–509. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-499-509.

✉ Шеметун Олена Володимирівна, e-mail: shemetun@ukr.net

O. V. Shemetun✉, O. O. Talan, O. M. Demchenko, M. A. Pilinska

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

DEVELOPMENT OF RADIATION-INDUCED BYSTANDER EFFECT IN THE SOMATIC CELLS OF PERSONS FROM DIFFERENT AGE GROUPS

Objective. To investigate the development of chromosomal instability as a result of the radiation-induced bystander effect in blood lymphocytes of persons from different age groups.

Materials and methods. Materials of research were blood lymphocytes from 42 persons of different age (from 12 to 102 years), divided into four age groups – teenagers, middle-aged, elderly and centenarians. Bystander effect was studied by modeling its induction in human lymphocytes, at which 0.3 ml of non-irradiated blood (served as bystander cells) and 0.3 ml of blood from persons of another sex exposed in vitro to X-ray in a dose of 0.25 Gy were added to the incubation mixture, followed by cultivation according to generally accepted semi-micro-method. Slides of metaphase chromosomes were GTG-stained and analyzed under light microscopes with magnification $\times 1000$.

Results. The average level of chromosomal aberrations in bystander cells of teenagers (6.08 ± 0.67 per 100 metaphases), middle-aged people (4.56 ± 0.61 per 100 metaphases) and elderly persons (6.34 ± 0.76 per 100 metaphases) significantly exceeded those of the corresponding age-related controls ($p < 0.01$) due to the aberrations of chromatid type. The level of chromosome aberrations in centenarians' bystander cells (2.84 ± 0.51 per 100 metaphases) was not significantly different from the control ($p > 0.05$). The bystander effect was registered in 83% of teenagers, 90 % middle-aged persons and 50 % of the elderly persons.

Conclusions. In the non-irradiated blood lymphocytes of teenagers, middle-aged and elderly persons under condition of co-cultivation with cells X-irradiated in vitro in a dose of 0.25 Gy the bystander effect was induced. In the non-irradiated centenarians' blood lymphocytes the bystander effect was not revealed. Interindividual variability in the induction of bystander effect was registered. The development of bystander effect was independent on the level of chromosomal instability in control cultures.

Key words. Radiation-induced bystander effect, human blood lymphocytes, age, frequency of chromosome aberrations.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2018;23:499-509. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-499-509.

ВСТУП

Розширення сфери використання іонізуючого випромінювання в промисловості та медицині призвело до зростання радіаційного навантаження на великі контингенти населення різного віку (від дітей до довгожителів), що, враховуючи можливість виникнення аварійних ситуацій, потребує прогнозування медичних наслідків такого впливу [1, 2]. Оскільки соматична патологія у постраждалих осіб може бути спричинена не лише прямим радіаційним ушкодженням геному клітин-мішеней, але й ефектом свідка (вторинними змінами в неопромінених клітинах) [3], врахування його індукції є безумовно важливим при обстеженні опромінених осіб різного віку. Нами розроблено оригінальну систему моделювання радіаційно-індукованого ефекту свідка в культурі лімфоцитів крові людини, що дає можливість вивчення проявів цього феномену на цитогенетичному рівні [4]. З її використанням встанов-

INTRODUCTION

The expansion of the use of ionizing radiation in industry and medicine led to increase of radiation exposure of large contingents in human population of all ages (from children to centenarians), which, taking into account the possibility of emergencies, requires prediction of the medical consequences of such exposure [1, 2]. Because the somatic pathology in exposed persons may be caused not only by direct radiation damage of the genome in target cells but also by the bystander effect (secondary changes in non-irradiated cells) [3], taking into account its induction is certainly important under the examination of irradiated individuals of all ages. So, we have developed an original system of modeling the radiation-induced bystander effect in the culture of human blood lymphocytes, which makes it possible to study the manifestations of this phenomenon at the cytogenetic level [4]. With the use of this model

лено особливості індукції та персистенції ефекту свідка в умовах *in vitro* та *in vivo* при опроміненні в малих та високих дозах; показано можливість його модифікації з використанням антиоксидантних препаратів, доведено участь оксидативного стресу в механізмі розвитку ефекту свідка [5–7]. Вказані дослідження виконані із залученням осіб середнього віку, що зумовлено контактом осіб цієї вікової групи з мутагенами в процесі трудової діяльності. Оскільки інформаційний пошук не виявив даних, отриманих іншими науковцями щодо цитогенетичних аспектів індукції ефекту свідка у осіб різного віку, проведене дослідження є актуальним. Воно має фундаментальне значення і дозволить отримати нові знання щодо радіаційно-індукованої нестабільності геному людини у різному віці. В практичному аспекті отримані дані можуть бути використані для встановлення цитогенетичних маркерів ризику розвитку радіаційно-індукованої онкологічної патології у осіб різного віку, що сприятиме прогнозуванню і попередженню медичних наслідків опромінення.

МЕТА

Враховуючи викладене, метою нашої роботи було дослідження розвитку хромосомної нестабільності внаслідок радіаційно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах крові осіб різних вікових груп.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

При виконанні роботи досліджено індукцію ефекту свідка в неопромінених лімфоцитах 42 осіб віком від 12 до 102 років, яких було залучено до цитогенетичного обстеження за умов поінформованої згоди та розподілено на чотири групи відповідно з віком (табл. 1).

При визначенні «спонтанної» частоти аберацій хромосом цільну кров обстежених осіб культивували за загальноприйнятим напівмікрометодом протягом 48 годин (перший мітоз) [8]. При дослідженні ефекту свідка в інкубаційну суміш додавали по 0,3 мл неопроміненої крові обстежених осіб і 0,3 мл крові осіб іншої статі тієї ж вікової групи, опроміненої в дозі 0,25 Гр. Опромінення крові проводили на установці РУМ-17 (напруга 200 кВ, сила струму 10 мА, фільтри Cu 0,5 мм + Al 1 мм, фокусна відстань 50 см, потужність дози 0,415 Гр/хв).

Цитогенетичний аналіз виконували на GTG-забарвлених препаратах метафазних хромосом. Препарати фарбували з використанням барвника Гімза і трипсину [8]. Для розрізнення неопромінених та оп-

the peculiarities of induction and persistence of the bystander effect both *in vitro* and *in vivo* under the irradiation in small and high doses was established; the possibility of its modification with the help of antioxidant drugs was shown; oxidative stress in the mechanism of development of the bystander effect was proved [5–7]. These studies have been performed with the involvement of middle-aged persons due to the contact people from this age group with mutagens in the course of labor activity. As an information search did not reveal the data obtained by other researchers regarding the cytogenetic aspects of radiation-induced bystander effect in people of different ages, our study is relevant. It is of fundamental importance and permit to receive new data about the radiation-induced human genomic instability at different ages. In practical aspect the data obtained can be used to establish cytogenetic risk markers for the development of radiation-induced oncological pathology in people of all ages to facilitate the prediction and prevention of health effects of radiation exposure.

OBJECTIVE

The objective of our work was to study the development of chromosomal instability due to the radiation-induced bystander effect in blood lymphocytes of people from different age groups.

MATERIALS AND METHODS

The induction of bystander effect in irradiated lymphocytes of 42 persons aged from 12 to 102 years, which were involved in the cytogenetic examination under conditions of informed consent and divided into four groups according to age, has been investigated (Table 1).

To assay the «spontaneous» incidence of chromosomal aberrations the whole blood was cultivated according to generally accepted semi-micro method during 48 hours (the first mitosis) [8]. In the study of bystander effect 0.3 ml of non-irradiated blood and 0.3 ml of blood irradiated *in vitro* at a dose of 0.25 Gy from persons of the other sex from the same age group was added into the incubation mixture. Blood irradiation was performed at the facility RUM-17 (voltage 200 kV, current 10 mA, Cu filter 0.5 mm + Al 1 mm, focal length 50 cm, the dose rate 0.415 Gy/min).

Cytogenetic analysis was conducted on GTG-stained slides of metaphase chromosomes. Slides were stained using a Giemsa dye and trypsin [8]. To distinguish non-irradiated and irradiated

Таблиця 1
Обсяг цитогенетичних досліджень

Table 1
Volume of cytogenetic research

Обстежені групи Surveyed groups	Вік, роки / Age, years		Кількість осіб N of persons	Проаналізовано метафаз / metaphases analyzed	
	від – до / range	середній / mean		контроль / контроль	клітини-свідки / bystander cells
Підлітки / adolescents	12–16	13,7	12	1146	1266
Середній вік / middle age	33–52	39,5	10	1287	1163
Літній вік / elderly	60–70	64,6	10	1445	1025
Довгожителі / centenarians	90–102	94,3	10	1273	1058
Всього / total			42	5151	4512

роміненних лімфоцитів периферичної крові, що культивувались у змішаних культурах, використовували статеві хромосоми Y та XX. При аналізі реєстрували аберації хроматидного і хромосомного типів та визначали точки розривів згідно з міжнародною номенклатурою ISCN-2013 [9]. При виконанні роботи проаналізували 9663 GTG-зabarвлених метафаз.

Отримані дані опрацьовували з використанням методу порівняння середніх величин за Ст'юдентом-Фішером [10].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Цитогенетичний аналіз неопроміненних лімфоцитів периферичної крові осіб віком 12–16 років, що культивувались у змішаних культурах з лімфоцитами, опроміненними *in vitro* в дозі 0,25 Гр, показав, що частота абераційних клітин ($5,92 \pm 0,66 \%$) та рівень аберацій хромосом ($6,08 \pm 0,67$ на 100 метафаз) в клітинах-свідках статистично достовірно перевищували показники відповідного вікового контролю ($p < 0,001$) (табл. 2).

Аберації хроматидного типу (маркери хромосомної нестабільності, зростання частоти яких свідчить про індукцію ефекту свідка) були представлені хроматидними розривами. Їх рівень становив $3,63 \pm 0,53$ на 100 метафаз, і статистично достовірно перевищував показники контролю ($p < 0,01$).

Серед аберацій хромосомного типу в неопроміненних клітинах-свідках було зареєстровано термінальні та інтерстиціальні делеції, транслокації, дицентрики, кільцеві хромосоми. Їх сумарна середня частота ($2,45 \pm 0,43$ на 100 клітин) перевищувала контрольну ($p < 0,05$), проте окремо частота кожного з перерахованих пошкоджень не мала достовірної різниці з контролем ($p > 0,05$).

Аналіз індивідуальних цитогенетичних показників показав, що у 83 % осіб 12–16 років при культивуванні їх неопроміненних лімфоцитів з оп-

peripheral blood lymphocytes that were cultured in mixed cultures sex chromosomes Y and XX were used. In the analysis chromatid and chromosome types of aberrations were recorded and the break-points were determined according to the international nomenclature ISCN-2013 [9]. A total of 9663 GTG-stained metaphases were analyzed.

The statistical analysis of the obtained data (comparing of mean values) was carried out using the Student-Fisher method [10].

RESULTS AND DISCUSSION

Cytogenetic analysis of non-irradiated peripheral blood lymphocytes of persons aged 12–16 years that were cultured in mixed cultures with lymphocytes exposed *in vitro* in a dose of 0.25 Gy showed that the frequency of aberrant cells ($5.92 \pm 0.66 \%$) and level of chromosome aberrations (6.08 ± 0.67 per 100 metaphases) in bystander cells statistically significantly exceeded such indicators in the corresponding age control ($p < 0.001$) (Table 2).

Chromatid type aberrations (markers of chromosomal instability, the increase in frequency of which indicates an induction of bystander effect) were represented by chromatid breaks. Their level was 3.63 ± 0.53 per 100 metaphases and statistically significantly exceeded the control parameters ($p < 0.01$).

Among the chromosome type aberrations in non-irradiated cells terminal and interstitial deletions, translocations, dicentrics, and ring chromosomes were registered. Their total mean frequency (2.45 ± 0.43 per 100 cells) exceeded the control value ($p < 0.05$), however separately the frequency of each of these injuries did not have significant difference with the control ($p > 0.05$).

Analysis of individual cytogenetic parameters showed that in 83 % persons 12–16 years under cultivation their non-irradiated lymphocytes with irra-

Таблиця 2

Частота аберацій хромосом (на 100 метафаз) у неопромінених клітинах-свідках осіб віком 12–16 років при культивуванні з лімфоцитами, опроміненими *in vitro* в дозі 0,25 Гр

Table 2

Frequency of chromosome aberrations (per 100 metaphases) in non-irradiated bystander cells of individuals aged 12–16 years co-cultivated with lymphocytes irradiated *in vitro* in a dose of 0.25 Gy

№ п/п #	Хроматидного типу / chromatid type		Хромосомного типу / chromosome type		Всього / total	
	контроль control	клітини-свідки bystander cells	контроль control	клітини-свідки bystander cells	контроль control	клітини-свідки bystander cells
1	0,88	3,33	2,65	1,67	3,54	5,00
2	2,00	4,00	2,00	2,00	4,00	6,00
3	1,00	4,14	1,00	3,45	2,00	7,59
4	0,00	2,50	1,00	0,83	1,00	3,33
5	0,00	3,08	2,41	6,15	2,41	9,23
6	2,00	4,35	0,00	1,45	2,00	5,80
7	1,00	4,92	1,00	3,28	2,00	8,20
8	2,00	3,00	2,00	3,00	4,00	6,00
9	1,00	4,00	1,00	1,00	2,00	5,00
10	1,00	4,00	0,00	3,00	1,00	7,00
11	1,00	2,02	1,00	2,02	2,00	4,04
12	2,00	3,95	0,00	2,63	2,00	6,58
M ± m	1,14 ± 0,31	3,63 ± 0,53	1,22 ± 0,32	2,45 ± 0,43	2,36 ± 0,45	6,08 ± 0,67

роміненими клітинами було зареєстровано статистично достовірне зростання частоти аберацій хроматидного типу порівняно з контролем ($p < 0,05$), що свідчить про індукцію ефекту свідка. Індивідуальні частоти аберацій хромосом знаходились в межах від 3,33 до 9,23 на 100 клітин і не корелювали з фоновим рівнем аберацій хромосом, зареєстрованим в контролі. Звертає на себе увагу випадок 5, у якому в клітинах-свідках виявлено збільшення частоти аберацій не лише хроматидного (з 0,00 до 3,08 на 100 метафаз), а й хромосомного типу (з 2,41 до 6,15 на 100 метафаз, відповідно), що не притаманно для індукції ефекту свідка. Вказане відбулось за рахунок зростання частоти термінальних делецій хромосом до 4,62 на 100 метафаз, які, на нашу думку, в дійсності могли бути хроматидними розривами в однакових локусах обох хроматид хромосоми і візуально сприймалися як делеції.

У випадках 8 і 11 частота аберацій хроматидного типу і середня частота аберацій хромосом не мали статистично достовірної різниці з контролем ($p > 0,05$), тобто радіаційно-індукованого ефекту свідка не зареєстровано.

Проведений інформаційний пошук не виявив досліджень радіаційно-індукованого ефекту свідка, виконаних з використанням лімфоцитів периферичної крові підлітків, що не дозволяє порівняти отримані дані з літературними.

diated cells a statistically significant increase in the frequency of chromatid type aberrations compared to the control ($p < 0.05$) was recorded, indicating the induction of the bystander effect. The individual frequencies of chromosome aberrations ranged from 3.33 to 9.23 per 100 cells and did not correlate with the background level of chromosome aberrations recorded in the control. Note the case 5, in which in the bystander cells was revealed increased frequency of aberrations not only chromatid (from 0.00 to 3.08 per 100 metaphases), but also chromosome type (from 2.41 to 6.15 per 100 metaphases respectively), which is not typical for the induction of bystander effect. This was due to the growth of the frequency of terminal chromosome deletions to 4.62 per 100 metaphases, which in our opinion, in reality, could have been chromatid lesions in the same loci of both chromatids in the chromosome and visually perceived as deletions.

In cases 8 and 11 the frequency of chromatid type aberrations and the mean frequency of all chromosome aberrations did not have statistically significant difference with the control ($p > 0.05$), the radiation-induced bystander effect was not registered.

The conducted information search did not reveal studies of the radiation-induced bystander effect performed using peripheral blood lymphocytes of teenagers, which does not allow comparing our data with the literature.

Цитогенетичний аналіз неопромінених лімфоцитів периферичної крові осіб середнього віку, що культивувались у змішаних культурах з лімфоцитами, опроміненими *in vitro* в дозі 0,25 Гр, показав, що частота аберантних клітин в клітинах-свідках ($4,47 \pm 0,61$ %) та рівень аберацій хромосом ($4,56 \pm 0,61$ на 100 метафаз) статистично достовірно перевищували показники вікового контролю ($p < 0,001$), та не мали істотної різниці з відповідними показниками у групі підлітків ($p > 0,05$). (табл. 3).

Аберації хроматидного типу були представлені хроматидними розривами з частотою $2,49 \pm 0,46$ на 100 метафаз, що статистично достовірно перевищувала показники контролю ($p < 0,01$) але не відрізнялась від даних, зареєстрованих при дослідженні індукції ефекту свідка у осіб віком 12–16 років ($p > 0,05$). Рівень аберацій хроматидного типу, зареєстрований у осіб 33–52 років, узгоджується з даними наших досліджень з вивчення радіаційно-індукованого ефекту свідка із залученням осіб середнього віку і використанням рентгенівського опромінення *in vitro* в дозі 0,25 Гр, де він складав $2,11 \pm 0,43$ на 100 клітин, та *in vivo* з залученням осіб, які брали участь в ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС – $3,42 \pm 0,48$ на 100 метафаз [5].

Рівень аберацій хромосомного типу, що були представлені термінальними та інтерстиціальними делеціями, транслокаціями і дицентричними хромосомами, складав $2,07 \pm 0,42$ на 100 метафаз. Він не мав статистично достовірної різниці як з показником відповідного контролю, так і з частотою

Cytogenetic analysis of non-irradiated peripheral blood lymphocytes of middle aged individuals cultivated in mixed cultures with lymphocytes irradiated *in vitro* in a dose of 0.25 Gy showed that the frequency of aberrant cells in bystander cells (4.47 ± 0.61 %) and the level of chromosome aberrations (4.56 ± 0.61 per 100 metaphases) were statistically significantly higher than those of age control ($p < 0.001$), but did not have significant difference with the corresponding parameters in the adolescent's group ($p > 0.05$) (Table 3).

Chromatid type aberrations were represented by chromatid breaks with a frequency of 2.49 ± 0.46 per 100 metaphases, which significantly exceeded the control parameters ($p < 0.01$) but did not differ from data recorded in the study of induction of bystander effect in individuals aged 12–16 years old ($p > 0.05$). The level of chromatid type aberration, registered in individuals aged 33–52 years, is consistent with our research data on the radiation-induced bystander effect with the involvement of middle-aged people and the use of x-ray irradiation *in vitro* in a dose of 0.25 Gy where it was 2.11 ± 0.43 per 100 cells, and *in vivo* with the involvement of persons who participated in the liquidation of the Chernobyl accident – 3.42 ± 0.48 per 100 metaphases [5].

The level of aberrations of chromosome type which represented by terminal and interstitial deletions, translocations and dicentrics was 2.07 ± 0.42 per 100 metaphases. It had no statistically significant difference both with the value of the corresponding age control and with the fre-

Таблиця 3

Частота аберацій хромосом (на 100 метафаз) у неопромінених клітинах-свідках осіб віком 33–52 роки при культивуванні з лімфоцитами, опроміненими *in vitro* в дозі 0,25 Гр

Table 3

Frequency of chromosome aberrations (per 100 metaphases) in non-irradiated bystander cells of individuals aged 33–52 years co-cultivated with lymphocytes irradiated *in vitro* in a dose of 0.25 Gy

№ п/п #	Хроматидного типу / chromatid type		Хромосомного типу / chromosome type		Всього / total	
	контроль control	клітини-свідки bystander cells	контроль control	клітини-свідки bystander cells	контроль control	клітини-свідки bystander cells
1	0,67	3,31	1,33	2,48	2,00	5,79
2	0,00	0,64	0,80	2,55	0,80	3,18
3	0,00	3,00	1,79	3,00	1,79	6,00
4	0,00	3,00	2,00	0,00	2,00	3,00
5	3,00	5,88	1,00	1,96	4,00	7,84
6	0,67	3,36	2,00	3,36	2,67	6,72
7	0,00	2,50	2,67	2,50	2,67	5,00
8	0,67	2,00	2,00	1,00	2,67	3,00
9	0,00	1,58	1,33	1,58	1,33	3,16
10	0,00	2,76	3,33	2,07	3,33	4,83
M ± m	0,47 ± 0,19	2,49 ± 0,46	1,86 ± 0,37	2,07 ± 0,42	2,33 ± 0,42	4,56 ± 0,61

пошкоджень хромосомного типу у групі підлітків ($p > 0,05$).

Аналіз індивідуальних цитогенетичних показників у осіб середнього віку показав, що радіаційно-індукований ефект свідка було зареєстровано у 90 % обстежених осіб з середніми частотами, що знаходились в межах від 3,00 до 7,84 на 100 метафаз.

Зростання частоти аберацій хромосом у клітинах-свідках відбулось за рахунок збільшення частоти аберацій хроматидного типу. Як і при обстеженні підлітків, рівні аберацій хромосом у клітинах-свідках окремих осіб не корелювали з частотою пошкоджень хромосом у контрольних культурах. У випадку 2 частота індукованих аберацій хроматидного типу не мала статистично достовірної різниці з контролем і радіаційно-індукованого ефекту свідка не зареєстровано ($p > 0,05$). Разом з тим, у випадках 5 і 6 спостерігали значне збільшення хромосомної нестабільності в клітинах-свідках, внаслідок чого рівні аберацій хромосом перевищували контрольні показники і склали 5,88 і 3,36 на 100 метафаз, відповідно.

Цитогенетичний аналіз неопромінених лімфоцитів периферичної крові осіб літнього віку, що культивувались у змішаних культурах з лімфоцитами, опроміненими *in vitro* в дозі 0,25 Гр, показав, що частота аберацій клітин ($6,15 \pm 0,75$ %) та рівень аберацій хромосом ($6,34 \pm 0,76$ на 100 метафаз) в клітинах-свідках статистично достовірно перевищували показники відповідного вікового контролю ($p < 0,001$) (табл. 4) та не мали істотної різниці з по-

quency of chromosomal damages in the group of teenagers ($p > 0.05$).

Analysis of individual cytogenetic parameters in middle-aged persons showed that radiation-induced bystander effect was recorded in 90 % of the surveyed people with mean frequencies in the range from 3.00 to 7.84 per 100 metaphases.

Increase in frequency of chromosome aberrations in bystander cells was due to the increase in frequency of chromatid type aberrations. As under examination of adolescents, the levels of chromosome aberrations in individual bystander cells in middle-aged persons did not correlate with the frequency of chromosome damages in control cultures. In case 2, the frequency of induced aberrations of chromatid type had no significant difference with the control values and the radiation-induced bystander effect was not registered ($p > 0.05$). However, in cases 5 and 6 significant increase in chromosomal instability in bystander cells was observed as a result of which the levels of chromosomal aberrations exceeded the control values and were 5.88 and 3.36 to 100 metaphases, respectively.

Cytogenetic analysis of non-irradiated peripheral blood lymphocytes from elderly people cultivated in mixed cultures with lymphocytes exposed *in vitro* in a dose of 0.25 Gy showed that the frequency of aberrant cells (6.15 ± 0.75 %) and the level of chromosome aberrations (6.34 ± 0.76 per 100 metaphases) in bystander cells statistically significantly exceeded the parameters of the corresponding age control ($p < 0.001$) (Table 4) and did not have a significant

Таблиця 4

Частота аберацій хромосом (на 100 метафаз) у неопромінених клітинах-свідках осіб віком 60–70 років при культивуванні з лімфоцитами, опроміненими *in vitro* в дозі 0,25 Гр

Table 4

Frequency of chromosome aberrations (per 100 metaphases) in non-irradiated bystander cells of individuals aged 60–70 years co-cultivated with lymphocytes irradiated *in vitro* in a dose of 0.25 Gy

№ п/п #	Хроматидного типу / chromatid type		Хромосомного типу / chromosome type		Всього / total	
	контроль control	клітини-свідки bystander cells	контроль control	клітини-свідки bystander cells	контроль control	клітини-свідки bystander cells
1	1,67	5,74	0,56	1,64	2,22	7,38
2	2,00	4,00	1,60	2,00	3,60	6,00
3	4,00	5,00	2,00	2,00	6,00	7,00
4	3,91	4,00	1,30	2,00	5,22	6,00
5	5,63	6,00	0,63	3,00	6,25	9,00
6	2,00	1,67	0,00	0,83	2,00	3,33
7	1,60	2,31	0,80	2,31	2,40	4,62
8	2,00	5,00	2,00	1,00	4,00	6,00
9	2,00	4,00	0,00	2,00	2,00	6,00
10	0,00	7,55	2,00	3,77	2,00	11,32
M±m	2,49 ± 0,41	4,29 ± 0,63	1,32 ± 0,30	2,05 ± 0,44	3,81 ± 0,50	6,34 ± 0,76

казниками, отриманими при обстеженні осіб середнього віку ($p > 0,05$).

Аберації хроматидного типу були представлені хроматидними розривами і обмінами з середньою частотою $4,29 \pm 0,63$ на 100 метафаз, яка перевищувала дані контролю ($p < 0,01$) та відповідний показник у осіб віком 33–52 роки ($p < 0,05$), що, на нашу думку, є відображенням індукції ефекту свідка на тлі збільшеної хромосомної нестабільності, притаманної особам літнього віку [11].

Рівень аберацій хромосомного типу, що були представлені термінальними делеціями, транслокаціями, дицентричними і кільцевими хромосомами, складав $2,05 \pm 0,44$ на 100 метафаз. Він не мав статистично достовірної різниці як з показником контролю, так і з частотою пошкоджень хромосомного типу у осіб середнього віку ($p > 0,05$).

Аналіз індивідуальних цитогенетичних показників у осіб літнього віку показав, що розмах коливань частоти аберацій хромосом знаходився в межах від 3,33 % до 11,32 %. Радіаційно-індукований ефект свідка зареєстровано у 50 % обстежених осіб, в яких частота аберацій хроматидного типу і загальний рівень пошкоджень хромосом у клітинах-свідках перевищували контроль ($p < 0,05$). При цьому у випадку 10 в клітинах-свідках спостерігали значне збільшення хромосомної нестабільності за рахунок пошкоджень хроматидного типу, внаслідок чого рівень аберацій хромосом перевищив середньогруповий і склав 11,32 на 100 клітин ($p < 0,001$).

Розвиток ефекту свідка не залежав від рівня хромосомної нестабільності в контрольних культурах. У випадках 3, 4, 5 контрольні рівні аберацій хроматидного типу перевищували середньогрупові ($p < 0,05$), проте в клітинах-свідках не спостерігали зростання частоти цих пошкоджень порівняно з контролем ($p > 0,05$), що розцінено нами як відсутність індукції ефекту свідка.

Цитогенетичний аналіз неопромінених лімфоцитів периферичної крові довгожителів, що культивувались в змішаних культурах з лімфоцитами, опроміненими *in vitro* в дозі 0,25 Гр, показав, що сумарний рівень аберацій хромосом в них ($2,84 \pm 0,51$ на 100 метафаз) і частота аберацій хроматидного типу ($1,61 \pm 0,39$ на 100 метафаз) відповідали показникам контролю ($p > 0,05$), що свідчить про відсутність індукції ефекту свідка (табл. 4).

На нашу думку, це може бути спричинено індивідуальними особливостями у роботі про- і антиоксидантних систем у довгожителів, адже в усіх обстежених нами вікових групах виявлені особи, в яких не було

difference with such parameters obtained under the examination of middle-aged people ($p > 0.05$).

Chromatid type aberrations were represented by chromatid breaks and exchanges with an average frequency of 4.29 ± 0.63 per 100 metaphases, exceeding the control data ($p < 0.01$) and corresponding parameters in individuals aged from 33–52 years ($p < 0.05$), which, in our opinion, is a reflection of induction of bystander effect against the background of increased chromosomal instability inherent in the elderly [11].

The level of chromosome type aberrations represented by terminal deletions, translocations, dicentrics and ring chromosomes amounted to 2.05 ± 0.44 per 100 metaphases. It had no statistically significant difference both with the control data and with the frequency of chromosomal damages in middle-aged persons ($p > 0.05$).

Analysis of individual cytogenetic parameters in elderly showed the fluctuation frequency of chromosome aberrations from 3.33 to 11.32 %. The radiation-induced bystander effect was recorded in 50% of the individuals surveyed, in which the frequency of chromatid type aberrations and the overall level of chromosome damages in bystander cells exceeded the control ($p < 0.05$). At that in the case 10 a significant increase of chromosome instability was observed in bystander cells due to the damages of chromatid type, resulting in a level of chromosome aberrations exceeding the mean-group value and amounted to 11.32 per 100 cells ($p < 0.001$).

The development of bystander effect did not depend on the level of chromosomal instability in the control cultures. In cases 3, 4, 5 the control levels of chromatid type aberrations exceeded the mean-group values ($p < 0.05$), however in the bystander cells there was no increase in the frequency of these lesions as compared with the control ($p > 0.05$), which was considered by us as lack of induction the bystander effect.

Cytogenetic analysis of non-irradiated peripheral blood lymphocytes from centenarians cultured in mixed cultures together with lymphocytes exposed *in vitro* in a dose of 0.25 Gy showed that the total level of chromosome aberrations (2.84 ± 0.51 per 100 metaphases) and frequency of chromatid type aberrations (1.61 ± 0.39 per 100 metaphases) corresponded to the control parameters ($p > 0.05$) that indicates no induction of bystander effect (Table 4).

In our opinion, this may be caused by individual peculiarities in the functioning of pro- and anti-oxidant systems in the centenarians since in all the age groups we surveyed individuals who did not have an

Таблиця 5

Частота аберацій хромосом (на 100 метафаз) у неопромінених клітинах-свідках осіб віком 90–102 роки при культивуванні з лімфоцитами, опроміненими *in vitro* в дозі 0,25 Гр

Table 5

Frequency of chromosome aberrations (per 100 metaphases) in non-irradiated bystander cells of individuals aged 90–102 years co-cultivated with lymphocytes irradiated *in vitro* in a dose of 0.25 Gy

№ п/п #	Хроматидного типу / chromatid type		Хромосомного типу / chromosome type		Всього / total	
	контроль control	клітини-свідки bystander cells	контроль control	клітини-свідки bystander cells	контроль control	клітини-свідки bystander cells
1	0,69	0,00	1,38	0,97	2,07	0,97
2	0,00	1,00	2,00	0,00	2,00	1,00
3	1,33	0,00	2,00	1,92	3,33	1,92
4	2,67	2,00	2,67	0,00	5,33	2,00
5	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00	3,00
6	0,50	1,00	0,50	1,00	1,00	2,00
7	2,00	1,52	2,00	1,52	4,00	3,04
8	1,00	2,07	2,00	1,38	3,00	3,45
9	4,00	3,00	3,00	2,00	7,00	5,00
10	5,13	3,17	2,56	1,59	7,69	4,76
M ± m	1,57 ± 0,35	1,61 ± 0,39	1,81 ± 0,37	1,23 ± 0,34	3,38 ± 0,51	2,84 ± 0,51

зареєстровано індукції ефекту свідка. Їх частка серед підлітків складала 17 %, серед осіб середнього віку – 10 %, серед осіб літнього віку – 50 %. Також, отриманий результат може бути наслідком часткової мітохондріальної дисфункції при старінні людини, що зменшує індукцію в клітинах сполук активного кисню і цим запобігає розвитку вторинного оксидативного стресу, який відіграє провідну роль у механізмі розвитку ефекту свідка [12].

Рівень аберацій хромосомного типу складав $1,23 \pm 0,34$ на 100 метафаз, що відповідає контрольному показнику ($p > 0,05$). Серед цих пошкоджень зареєстровано термінальні делеції, транслокації та інверсії, частоти яких також не перевищували контрольні ($p > 0,05$).

Аналіз індивідуальних цитогенетичних показників у лімфоцитах крові довгожителів при їх кокультивуванні з опроміненими клітинами показав, що коливання частоти аберацій хромосом в окремих осіб знаходились у межах від 0,97 до 5,00 на 100 клітин. Індивідуальні частоти аберацій хроматидного типу у всіх обстежених статистично достовірно не відрізнялись від показників, зареєстрованих у них в контролі, що свідчить про відсутність індукції ефекту свідка у всіх обстежених довгожителів.

ВИСНОВКИ

Встановлено розвиток радіаційно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах периферичної крові підлітків, осіб середнього і літнього віку, що на цитогенетичному рівні результувалось у підвищення

induction of the bystander effect were detected. Their part among adolescents was 17 %, among middle-aged people – 10 %, among the elderly – 50 %. Also, this result may be a consequence of partial mitochondrial dysfunction at aging, which reduces the induction in the cells of the active oxygen compounds and thus prevents the development of secondary oxidative stress which plays a leading role in the mechanism of development of the bystander effect [12].

The level of chromosome type aberrations was 1.23 ± 0.34 per 100 metaphases, which corresponds to the control value ($p > 0.05$). These damages were represented by terminal deletions, translocations and inversions, the frequencies of which did not exceed the control values ($p > 0.05$).

Analysis of individual cytogenetic parameters in blood lymphocytes of centenarians under their cocultivation with irradiated cells showed that the variations in the frequency of chromosome aberrations in individuals were in the range of 0.97 to 5.00 per 100 cells. The individual frequencies of chromatid type aberrations in all surveyed did not significantly differ from those recorded in them in the control cultures, indicating the absence of induction of the bystander effect in all surveyed centenarians.

CONCLUSIONS

The development of the radiation-induced bystander effect in peripheral blood lymphocytes of adolescents, middle-aged and elderly which at the cytogenetic level resulted in an increase in total level of chromo-

загального рівня аберацій хромосом та аберацій хроматидного типу в їх лімфоцитах ($p < 0,01$), тоді як у неопромінених лімфоцитах крові довгожителів ефекту свідка не виявлено. Середньогрупові рівні аберацій хромосом у клітинах-свідках підлітків ($6,08 \pm 0,67$ на 100 метафаз), осіб середнього ($4,56 \pm 0,61$ на 100 метафаз) і літнього віку ($6,34 \pm 0,76$ на 100 метафаз) статистично достовірно не розрізнялись між собою ($p > 0,05$). Встановлено міжіндивідуальну варіабельність в індукції ефекту свідка. Частота аберацій хроматидного типу в клітинах-свідках не залежала від рівня хромосомної нестабільності в контрольних культурах. Частка осіб, у яких ефекту свідка не зареєстровано, складала: серед підлітків – 17 %, серед осіб середнього віку – 10 %, серед осіб літнього віку – 50 %, 100 % – у довгожителів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Chromosomal mutagenesis in human somatic cells: 30-year cytogenetic monitoring after Chernobyl accident / M. A. Pilinskaya, G. M. Shemetun, O. V. Shemetun et al. *Exp. Oncology*. 2016. Vol. 38, no. 4. P. 276–279.
2. Cytogenetic effects / M. Pilinska, S. Dybskii, O. Shemetun, O. Dybska. *Health effects of the Chernobyl accident - a quarter of century aftermath*. Kyiv : DIA, 2011. P. 235–250.
3. The mechanisms of radiation-induced bystander effect / M. Najafi, R Fardid, Gh. Hadadi, M. Fardid. *J. Biomed. Phys. Eng.* 2014. Vol. 4, no. 4. P. 163–172.
4. Шеметун О. В., Талан О. О., Пілінська М. А. Модель для дослідження радіаційно-індукованого «ефекту свідка» з використанням лімфоцитів периферичної крові людини. *Журнал АМН України*. 2006. Т. 12, № 3. С. 556–565.
5. Shemetun O. V., Talan O. O., Pilinska M. A. Cytogenetic characteristics of the radiation-induced bystander effect and its persistence in human blood lymphocytes. *Cytol. Genet.* 2014. Vol. 48, no. 4. P. 244–249. DOI: 10.3103/S0095452714040069.
6. Шеметун О. В., Талан О. О. Дослідження модифікації ефекту свідка, індукованого рентгенівським випромінюванням в умовах in vitro. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології*. 2014. Вип. 19. С. 371–376.
7. Shemetun O. V., Talan O. O. Research of oxidative stress participation in the development of radiation-induced bystander effect in human peripheral blood lymphocytes. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.* 2014. No. 8. P. 144–148. doi: 10.15407/dopovidi2014.08.144.
8. Cytogenetic methods for studying human chromosomes : guidelines. Kyiv, 2003. - 23 p.
9. Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. An International system for human cytogenetic nomenclature: high-resolution banding (2013). Basel : Karger, 2013. 130 p.
10. Rosner B. Fundamentals of biostatistics. 8th ed. Cengage Learning, 2015. 962 p.

some aberrations and aberrations of chromatid type in their lymphocytes ($p < 0.01$), whereas in non-irradiated blood lymphocytes of centenarians the bystander effect was not revealed. The mean-group levels of chromosome aberrations in bystander cells of adolescents (6.08 ± 0.67 per 100 metaphases), middle-aged individuals (4.56 ± 0.61 per 100 metaphases) and elderly persons (6.34 ± 0.76 per 100 metaphases) did not differ significantly among themselves ($p > 0.05$). The existence of interindividual variability in the induction of bystander effect was established. The frequency of chromatid type aberrations in bystander cells did not depend on the level of chromosomal instability in control cultures. The proportion of persons with the lack of bystander effect was 17 % among adolescents, 10 % among middle-aged people, 50 % among the elderly, 100 % among centenarians.

REFERENCES

1. Pilinskaya MA, Shemetun GM, Shemetun OV, Dybsky SS, Dybska OB, Talan OO, Pedan LR, Kurinnyi DA. Chromosomal mutagenesis in human somatic cells: 30-year cytogenetic monitoring after Chernobyl accident. *Exp Oncology*. 2016;38(4):276-9.
2. Pilinska M, Dybskii S, Shemetun O, Dybska O. Cytogenetic effects. In: *Health effects of the Chernobyl accident - a quarter of century aftermath*. Kyiv: DIA; 2011. p. 235-50.
3. Najafi M, Fardid R, Hadadi Gh, Fardid M. The mechanisms of radiation-induced bystander effect. *J Biomed Phys Eng*. 2014;4(4):163-72.
4. Shemetun O, Talan O, Pilinska M. [Model for detection of radioinduced "bystander effect" with the help of human peripheral blood lymphocytes]. *Zhurnal Akademii Medychnykh Nauk Ukrainy*. 2006;12(3):556-65. Ukrainian.
5. Shemetun OV, Talan OO, Pilinska MA. Cytogenetic characteristics of the radiation-induced bystander effect and its persistence in human blood lymphocytes. *Cytol Genet*. 2014;48(4):244-9. DOI: 10.3103/S0095452714040069.
6. Shemetun OV, Talan OO. Investigation of modification X-ray induced bystander effect in vitro. *Probl Radiac Med Radiobiol*. 2014;19:371-6.
7. Shemetun OV, Talan OO. Research of oxidative stress participation in the development of radiation-induced bystander effect in human peripheral blood lymphocytes. *Dopov Nac akad nauk Ukr*. 2014;(8):144-8. doi: 10.15407/dopovidi2014.08.144.
8. Kyiv Medical Academy of Postgraduated Education of the Ministry of Health of Ukraine. [Cytogenetic methods of investigation of human chromosomes: methodic recommendations]. Kyiv; 2003. 23 p. Ukrainian.
9. Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. An International system for human cytogenetic nomenclature : high-resolution banding (2013). Basel: Karger; 2013. 130 p.

11. Цитогенетическое обследование лиц разного возраста, выполненное с использованием дифференциального G-окрашивания метафазных хромосом / О. О.Талан, Е. В. Шеметун, М. А. Пилинская, Д. А. Куринный. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2014. Т. 14. С. 229–231.
12. Payne B. A., Chinnery P. F. Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. Vol. 1847. P. 1347–1353. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.05.022.
10. Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 8th ed. Cengage Learning; 2015. 962 p.
11. Talan OA, Shemetun OV, Kurinnyi DA, Pilinskaya MA. [Cytogenetic examination of people of different ages performed using the G-bending of metaphase chromosomes]. In: [Factors in experimental evolution of organisms]. 2014. Vol. 14. p. 229-31. Russian.
12. Payne BA, Chinnery PF. Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *Biochim. Biophys. Acta*. 2015;1847:1347-53. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.05.022.

Стаття надійшла до редакції 29.08.2018

Received: 29.08.2018