УДК 575.2:576.32 /.36:575.113:575.853:612.014

Д. А. Курінний[1]✉, О. В. Земскова[2], М. Г. Романенко[1], Л. В. Неумержицька[1], М. Ю. Макарчук[3], О. Е. Куцик[4], С. Р. Рушковський[3]

[1]Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини, гематології та онкології Національної академії медичних наук України», вул. Юрія Іллєнка, 53, м. Київ, 04050, Україна
[2]Державна установа «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», вул. Платона Майбороди, 32, м. Київ, 04050, Україна
[3]Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, 01601, Україна
[4]Національна дитяча спеціалізована лікарня «Охматдит» МОЗ України, вул. В'ячеслава Чорновола, 28/1, м. Київ, 01135, Україна

АНАЛІЗ ЗМІНИ МЕТИЛЮВАННЯ ДНК ПРИ МАНІФЕСТАЦІЇ ПРЯМОГО І ЗВОРОТНОГО ЕФЕКТІВ СВІДКА

Мета: дослідити зміни метилювання ДНК в клітинах-свідках та клітинах-індукторах при маніфестації прямого і зворотного ефектів свідка.

Методи. Окреме та сумісно-роздільне культивування лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) 10 умовно здорових осіб; опромінення γ-квантами (випромінювач IBL-237C); модифікований метод кометного електрофорезу (Comet assay) в нейтральних умовах з використанням чутливого до метилювання ферменту рестрикції HpaII; люмінесцентна мікроскопія з автоматизованою системою комп'ютерного програмного забезпечення аналізу результатів; статистичні методи.

Результати. Рівень метилювання ДНК у лімфоцитах периферичної крові (ЛПК) кількісно оцінювали за показниками міграції ДНК в агарозний гель: довжина хвоста «комети» (у мкм), відсотка ДНК у хвостовій частині «комети» та Tail Moment (TM), що одночасно враховує як кількість ДНК у хвостовій частині «комети», так і довжину хвоста. При окремому культивуванні ЛПК, опромінених γ-квантами (доза 1,0 Гр, потужність 2,34 Гр/хв), відмічено достовірне зниження середніх значень порівняно з неопроміненим контролем показників довжини хвоста «комет» ((57,03 ± 1,17) мкм проти (66,64 ± 2,03) мкм; $p < 0,001$) та Tail Moment (67,77 ± 1,22 проти 85,06 ± 2,30; $p < 0,001$), що може вказувати на зменшення кількості сайтів рестрикції метил-чутливої рестриктази HpaII та, як наслідок, збільшення рівня глобального метилювання ДНК. При реалізації прямого ефекту свідка в клітинах-свідках зростає рівень пошкоджень ДНК, що позначається достовірнем зниженням середніх значень показників: відсотка ДНК у хвостовій частині «комет» ($p < 0,001$), довжини хвостової частини ($p < 0,001$) та TailMoment ($p < 0,001$) порівняно як з неопроміненим контролем, так і опроміненими ЛПК при окремому культивуванні, і свідчить про зростання рівня глобального метилювання. Так само, як і в опромінених культурах лімфоцитів, які культивувались окремо, в клітинах-індукторах спостерігали достовірне зниження середніх значень показників довжини хвостової частини ($p < 0,01$) та TailMoment ($p < 0,001$) порівняно з контролем, що може вказувати на зменшення кількості сайтів рестрикції та збільшення рівня глобального метилювання ДНК внаслідок опромінення. Між клітинами-індукторами та опроміненими клітинами, які культивувались окремо, не визначено різниці за середніми значеннями всіх досліджуваних показників: відсотка ДНК у хвостовій частині комет ($p > 0,05$), довжини хвостової частини ($p > 0,05$) та TailMoment ($p > 0,05$), що може свідчити про відсутність змін рівня метилювання ДНК при впливі неопроміненої культури на опромінену при сумісно-роздільному культивуванні.

Висновок. Розвиток прямого ефекту свідка супроводжується епігенетичними змінами, що прявляються зростанням рівня метилювання ДНК в клітинах-свідках. Водночас в клітинах-індукторах змін рівня метилювання ДНК не визначено, що свідчить про відсутність проявів зворотного ефекту свідка на епігенетичному рівні.

Ключові слова: сумісно-роздільне культивування лімфоцитів людини; іонізуюче випромінювання; прямий та зворотний ефекти свідка; метил-чутливий Comet assay.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2024. Вип. 29. С. 199–212. doi: 10.33145/2304-8336-2024-29-199-212

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

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2024. Вип. 29.

D. A. Kurinnyi[1]✉, O. V. Zemskova[2], M. G. Romanenko[1], L. V. Neumerzhitska[1], M. Yu. Makarchuk[3], O. E. Kutsyk[4], S. R. Rushkovsky[3]

[1]State Institution «National Research Center for Radiation Medicine, Hematology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 53 Yuriia Illienka Str., Kyiv, 04050, Ukraine
[2]State Institution «Romodanov Institute of Neurosurgery of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 32 Platona Maiborody Str., Kyiv, 04050, Ukraine
[3]Educational and Scientific Center «Institute of Biology and Medicine» of the Taras Shevchenko Kyiv National University, 64/13 Volodymyrska Str., Kyiv, 01601, Ukraine
[4]National Specialized Pediatric Hospital «OKHMATDYT» of the Ministry of Health of Ukraine, 28/1 Vyacheslava Chornovola Str., Kyiv, 01135, Ukraine

ANALYSIS OF DNA METHYLATION CHANGES IN MANIFESTATION OF DIRECT AND RESCUE BYSTANDER EFFECTS

Objective: to investigate changes in DNA methylation in bystander and inducer cells during the manifestation of direct and rescue bystander effects.

Methods. Separate and co-cultivation of peripheral blood lymphocytes (PBL) of 10 conditionally healthy individuals; γ-quantum irradiation (IBL-237C emitter); modified comet electrophoresis method (Comet assay) under neutral conditions using the methylation-sensitive restriction enzyme HpaII; fluorescence microscopy with an automated computer software system for analyzing the results; statistical methods.

Results. The level of DNA methylation in PBL was quantitatively assessed using DNA migration parameters in agarose gel: the length of the comet tail (in μm), the percentage of DNA in the tail part of the comet, and Tail Moment (TM), which simultaneously takes into account both the amount of DNA in the tail part of the comet and the length of the tail. In separate cultivation of PBL irradiated with γ-quanta (dose 1.0 Gy, power 2.34 Gy/min), a reliable decrease in the average values compared to the non-irradiated control was noted for the length of the «comet» tail ((57.03 ± 1.17) μm versus (66.64 ± 2.03) μm; $p < 0.001$) and Tail Moment (67.77 ± 1.22 versus 85.06 ± 2.30; $p < 0.001$), which may indicate a decrease in the number of restriction sites of the methyl-sensitive restriction enzyme HpaII and, as a consequence, an increase in the level of global DNA methylation. When the bystander effect is realized, the level of DNA damage in bystander cells increases, while there is a significant decrease in the average values of the following parameters: the percentage of DNA in the tail part of the «comets» ($p<0.001$), the length of the tail part ($p<0.001$) and TailMoment ($p<0.001$) compared to both the non-irradiated control and irradiated PBLs in separate cultivation, and indicates an increase in the level of global DNA methylation. As in irradiated lymphocyte cultures cultured separately, in inducer cells a reliable decrease in the mean values of tail length ($p < 0.01$) and TailMoment ($p < 0.001$) was observed compared to the control, which may indicate a decrease in the number of restriction sites and an increase in the level of global DNA methylation as a result of irradiation. Between inducer cells and irradiated cells that were cultured separately, no difference was found in the mean values of all the studied parameters: the percentage of DNA in the tail part of comets ($p > 0.05$), tail length ($p > 0.05$) and TailMoment (p 0.05), which may indicate the absence of changes in the level of DNA methylation when a non-irradiated culture is exposed to an irradiated one during co-cultivation.

Conclusion. The development of the direct bystander effect is accompanied by epigenetic changes, which are characterized by an increase in the level of DNA methylation in bystander cells. At the same time, in inducer cells, changes in the level of DNA methylation were not determined, which indicates the absence of manifestations of the reverse bystander effect at the epigenetic level.

Key words: joint/separate cultivation of human lymphocytes; ionizing radiation; direct and reversed bystander effects; methyl-sensitive Comet assay.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2024;29:199-212. doi: 10.33145/2304-8336-2024-29-199-212

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

ВСТУП

Дія іонізуючої радіації на біологічні об'єкти характеризується проявом як мішеневих, так і немішеневих ефектів. У 1992 році в своїй спільній роботі H. Nagasawa та J. B. Little вперше описали радіаційно-індукований ефект свідка (radiation induced bystander effect – RIBE) [1], який в останні десятиріччя є одним з найбільш досліджуваних радіаційно індукованих немішеневих ефектів. Такий великий інтерес до маніфестації ефекту свідка обумовлено значенням, який він має для прогнозування віддалених наслідків опромінення людини.

Ефект свідка характеризується здатністю клітин-мішеней, пошкоджених іонізуючим випромінюванням, індукувати вторинні біологічні зміни в неопромінених клітинах-реципієнтах [2–6]. Існування RIBE доведено при дії щільно- та рідкоіонізуючих випромінювань в діапазоні доз від 5,0 мГр до 10,0 Гр [6–8].

Основними чинниками RIBE вважаються цитокіни (зокрема, TGF-β, TNF-α, IL-8, IL-6); вторинні стрес-месенджери (NO, H_2O_2); безклітинні хроматинові частинки (cfCh) та позаклітинна ДНК, вивільнені внаслідок апоптозу радіочутливих клітин-мішеней або малігнізованих клітин [9–14].

У відповіді клітин на генотоксичний стрес важливу роль відіграє епігенетична складова. Метилювання ДНК є важливим запобіжником аберантної генної активності та одним з головних чинників регуляції генної експресії. Якщо цитозин, до якого у позиції 5 за допомогою метилтрансферази приєднана метилова група, знаходиться в промоторній частині гена, транскрипція цього гена повністю блокується. Наприклад, повне генне замовчання внаслідок метилювання ДНК відіграє ключову роль у блокуванні активності транспозонів LINE, які сумарно складають майже 20 відсотків геному людини [15]. Крім того, метилювання ДНК в ділянках з малою щільністю генів, зокрема, в ділянках прицентромерного гетерохроматину, є важливим елементом стабілізації структури, підтримання конформації і цілісності хромосом [16, 17].

В наших попередніх дослідженнях було визначено, що активація генів репарації, супресії, апоптозу, яка відбувається у пошкоджених іонізуючим випромінюванням лімфоцитах периферичної крові людини, супроводжується коливанням рівня метилювання ДНК [18].

При реалізації ефекту свідка в клітинах-свідках зростає рівень пошкоджень ДНК, що є наслідком підвищення концентрації стрес-месенджерів. Зростання рівня геномних пошкоджень у клітинах-свід-

INTRODUCTION

The manifestation of target and non-target effects characterize the impact of ionizing radiation on biological objects. In 1992, in the joint work of H. Nagasawa and J.B. Little first described the radiation-induced bystander effect (RIBE) [1], which has been actively studied for the last thirty years. Such a great interest in the bystander effect is due to its importance for predicting the long-term consequences of human exposure.

The bystander effect is characterized by the ability of target cells damaged by ionizing radiation to induce secondary biological changes in non-irradiated recipient cells [2–6]. The existence of RIBE has been proven under the action of densely and rarely ionizing radiation in the dose range from 5.0 mGy to 10.0 Gy [6–8].

Cytokines (particularly TGF-β, TNF-α, IL-8, IL-6); secondary stress messengers (NO, H_2O_2); cell-free chromatin particles (cfCh) and extracellular DNA released due to the death of radiosensitive target cells or malignised cells are considered to be the main factors of RIBE [9–14].

The epigenetic component plays a key role in the response of cells to genotoxic stress. DNA methylation is an important preventive measure against aberrant gene activity and one of the main factors in the regulation of gene expression. If a cytosine, to which a methyl group is attached in position 5 with the help of a methyltransferase, is located in the promoter part of the gene, the transcription of this gene is completely blocked. For example, complete gene silencing through DNA methylation plays a key role in blocking the activity of LINE transposons, which collectively make up nearly 20 percent of the human genome [15]. In addition, DNA methylation in areas with low gene density, in particular, in areas of near-centromeric heterochromatin, is an important element of stabilizing the structure, maintaining the conformation and integrity of chromosomes [16, 17].

Our previous studies have shown that activation of genes involved in repair, suppression, and apoptosis, occurring in human PBLs damaged by ionizing radiation, is accompanied by changes in DNA methylation levels [18].

When the bystander effect is realized, the level of DNA damage increases in bystander cells, which is a consequence of the increased concentration of stress messengers. The increase in the level of genomic damage in bystander cells, in turn, caus-

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2024. Вип. 29.

ках, в свою чергу, викликає посилення репаративної та апоптичної активності. Логічним уявляється проведення досліджень щодо з'ясування яким чином прояви прямого та зворотного ефекту свідка впливають на рівень метилювання ДНК, чи є відмінність в показниках метилювання ДНК окремо опромінених клітин, клітин-індукторів та клітин свідків.

МЕТА

Дослідити зміни метилювання ДНК в клітинах-свідках та клітинах-індукторах при маніфестації прямого і зворотного ефектів свідка.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У дослідженні використані зразки цільної крові, одержані від десятьох умовно здорових волонтерів (7 жінок, 3 чоловіки) віком 20–51 років, середній вік - 31 рік. Усі особи заперечували свідомий контакт з відомими чи потенційними мутагенами та вели здоровий спосіб життя. До участі в дослідженнях особи були залучені добровільно та за умов поінформованої згоди. Цільну кров додавали в культуральне середовище RPMIB1640 у співвідношенні 1 : 10. Частина зразків була опромінена γ-квантами (випромінювач IBLB 237C, доза 1,0 Гр, потужність 2,34 Гр/хв). Культивування опромінених і неопромінених культур лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) проводилось у ємностях, розділених мембраною з порами 1,0 мкм, що запобігало перемішуванню клітин, але дозволяло проходити біологічно-активним речовинам. Зразки крові культивувались 48 год при 37 °С.

Аналіз стану глобального метилювання ДНК в ЛПК проводили з використанням модифікованого методу гель-електрофорезу окремих клітин (Comet assay) в нейтральних умовах з використанням метил-чутливого ферменту рестрикції HpaII [19]. Виділення лімфоцитів у градієнті щільності Histopaque 1077 (Sigma, USA) здійснювали згідно з протоколом виробника. Отриману суспензію клітин змішували з 1 % легкоплавкою агарозою (Sigma, USA) при 37 °С. Приготування слайдів та лізис клітин здійснювали за загальноприйнятою методикою [20]. Після лізису клітин скельця відмивали у буферному розчині, що складався з $5 \cdot 10^{-3}$ М TrisHCl, $5 \cdot 10^{-3}$ М NaCl, $5 \cdot 10^{-4}$ М β-меркаптоетанолу та $1 \cdot 10^{-3}$ М Na_2EDTA. Надалі на слайди наносили розчин з ферментом рестрикції (1,5 Од. HpaII у 100 мкл буфера Tango (Fermentas, Литва) та інкубували у вологій камері при 37 °С упродовж 55 хв. Реакцію зупиняли за допомогою буфера ТВЕ (89 мМ Tris-borat, 2 мМ EDTA, pH 7,5), після

es an increase in reparative and apoptotic activity. It seems logical to conduct studies to find out how the manifestations of the direct and reverse bystander effect affect the level of DNA methylation, and whether there is a difference in the DNA methylation indices of separately irradiated cells, inducers and bystander cells.

OBJECTIVE

The study objective was to investigate the changes in DNA methylation in bystander cells and inducer cells under manifestation of the direct and rescue bystander effects.

MATERIALS AND METHODS

The study involved whole blood samples obtained from ten conditionally healthy volunteers (7 women, 3 men) aged 20–51 years, with an average age of 31 years. All individuals denied any conscious contact with known or potential mutagens and led a healthy lifestyle. Individuals were recruited for the study voluntarily and provided informed consent. Whole blood was added to the RPMIB1640 culture medium in a ratio of 1:10. Some of the samples were irradiated with γ-quanta (IBLB 237C emitter, dose 1.0 Gy, power 2.34 Gy/min). Irradiated and non-irradiated cultures of peripheral blood lymphocytes (PBL) were cultivated in containers separated by a membrane with 1.0 ?m pores, which prevented cell mixing but allowed biologically active substances to pass through. Blood samples were cultured for 48 hours at 37 °C.

Analysis of the global DNA methylation pattern in PBLs was performed using a modified method of gel electrophoresis of individual cells (Comet assay) in neutral conditions using the methyl-sensitive restriction enzyme HpaII [19]. Isolation of lymphocytes in Histopaque 1077 density gradient (Sigma, USA) was carried out according to the manufacturer's protocol. The obtained cell suspension was mixed with 1% low-melting agarose (Sigma, USA) at 37 °C. Preparation of slides and lysis of cells were carried out according to the generally accepted method [20]. Upon cell lysis the slides were washed in a buffer solution of $5 \cdot 10^{-3}$ M TrisHCl, $5 \cdot 10^{-3}$ M NaCl, $5 \cdot 10^{-4}$ M β-mercaptoethanol and $1 \cdot 10^{-3}$ M Na_2EDTA. Then a solution with a restriction enzyme (1.5 HpaII Units in 100 ?l Tango buffer (Fermentas, Lithuania)) was applied to the slides and incubated in a humid chamber at 37 °C for 55 min. The reaction was

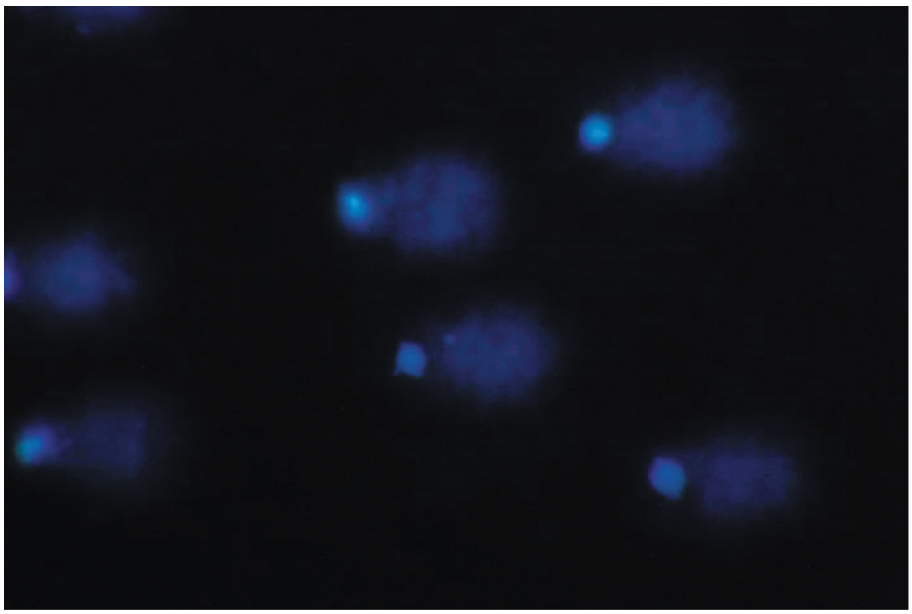

Рисунок 1. «Комети», що утворюються при проведенні модифікованого методу кометного електрофорезу з використанням ферменту рестрикції HpaII

Figure 1. «Comets» that are formed during a modified method of comet electrophoresis using the restriction enzyme HpaII

чого проводили електрофорез у TBE буфері впродовж 7 хв при температурі 4 °С, напрузі 1 В/см та силі струму 200 mA.

Для візуалізації результатів слайди фарбували DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) в концентрації 2,0 мкг/мл відразу після електрофорезу без фіксації слайдів. Перегляд слайдів здійснювали за допомогою люмінесцентного мікроскопа Opton Axioskop (Zeiss, Germany) з приєднаною фотокамерою Canon D1000. Для подальшої обробки результатів отримували фотографії 100 індивідуальних нуклеоїдів (т. з. «комет») (рис. 1).

Для кількісної оцінки міграції ДНК в агарозний гель використовували показники довжини хвоста «комети» (у мкм), % ДНК у хвостовій частині «комети» та Tail Moment (TM), який одночасно враховує як кількість ДНК у хвостовій частині «комети», так і довжину хвостової частини [22, 23].

Аналіз зображень клітин здійснювали за допомогою програми ImageJ (imagej.nih.gov) з використанням плагіну OpenComet.

Достовірність різниці між рядами даних та напрямом зсуву значень TM розраховували за критерієм Манна-Уітні [24].

stopped with TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 7.5) followed by electrophoresis in TBE buffer for 7 min at 4 °C, 1 V/cm voltage and of 200 mA current.

To visualize the results the slides were stained with 2.0 μg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) immediately upon electrophoresis without fixing. Slides were viewed at an Opton Axioskop fluorescence microscope (Zeiss, Germany) with an attached Canon D1000 camera. Photographs of the 100 individual nucleotides (so-called «comets») were made for data processing (Fig. 1).

The comet tail length (in μm), DNA % in the comet tail, and Tail Moment (TM), which accounts both the amount of DNA in comet tail and tail length were used evaluate the DNA migration into agarose gel [22, 23].

A review of the cell images was carried out using the ImageJ software (imagej.nih.gov) with OpenComet plugin application.

The reliability of the difference between data series and the direction of the TM value shift were calculated according to the Mann-Whitney test [24].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Рівень метилювання ДНК у лімфоцитах периферичної крові (ЛПК) кількісно оцінювали за показниками міграції ДНК в агарозний гель: відсотка

RESULTS AND DISCUSSION

The level of DNA methylation in PBLs was quantified by the value of DNA migration in agarose gel, namely the percentage of DNA in the tail part of

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2024. Вип. 29.

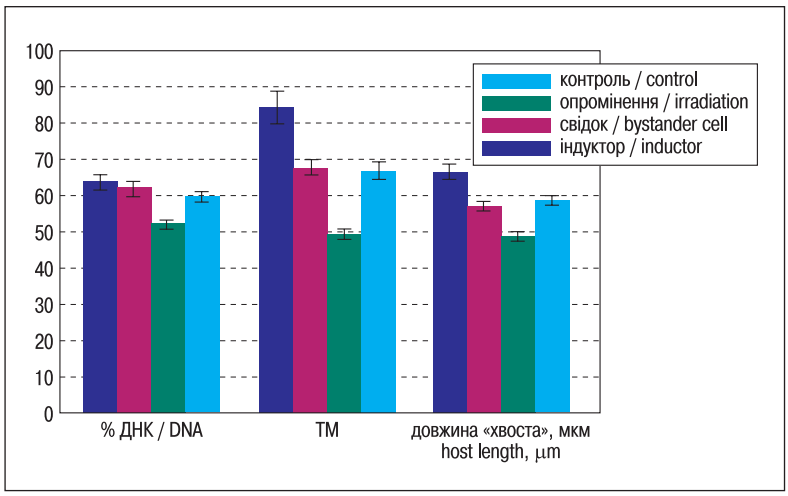

Рисунок 2. **Середні групові значення % ДНК, TailMoment та довжини «хвоста»**

Figure 2. **Mean group values of % DNA, TailMoment, and Tail length**

ДНК у хвостовій частині «комети», довжина хвоста «комети» (у мкм), та Tail Moment (TM), що одночасно враховує як кількість ДНК у хвостовій частині «комети», так і довжину хвоста. Результати за середніми значеннями показників рівня метилювання ДНК при окремому культивуванні неопромінених (контроль) та опромінених клітин, клітин-свідків та клітин-індукторів представлені на рис. 2.

На першому етапі дослідження були визначені показники рівня метилювання ДНК неопромінених ЛПК після окремого культивування. Середнє значення показників % ДНК у хвостовій частині комет склало (64,15 ± 1,56) %; TM (85,06 ± 2,30) мкм; довжини хвоста комети (66,64 ± 2,03) мкм.

При окремому культивуванні ЛПК, опромінених γ-квантами (доза 1,0 Гр, потужність 2,34 Гр/хв), відмічено достовірне зниження середніх значень порівняно з неопроміненим контролем показників довжини хвоста «комет» ((57,03 ± 1,17) мкм проти (66,64 ± 2,03) мкм; $p < 0,001$) та Tail Moment (67,77 ± 1,22 проти 85,06 ± 2,30; $p < 0,001$), що може вказувати на зменшення кількості сайтів рестрикції метилчутливої рестриктази HpaII та, як наслідок, збільшення рівня глобального метилювання ДНК.

При маніфестації радіаційно-індукованого ефекту свідка в клітинах-свідках встановлено достовірне зниження середніх показників відсотка ДНК у хвостовій частині комет ($p < 0,001$), довжини хвостової частини ($p < 0,001$) та TailMoment ($p < 0,001$) у порівнянні як з неопроміненими, так і опроміненими клітинами, які культивувалися окремо, що свідчить про зниження кількості сайтів рестрикції та зростання рівня глобального метилювання ДНК.

Так само, як і в опромінених культурах лімфоцитів, які культивувались окремо, в клітинах-індукторах спостерігали достовірне зниження середніх значень показників довжини хвостової частини ($p < 0,01$) та

«comet», the length of «comet» tail (?m), and Tail Moment (TM), which accounts both the amount of DNA in the tail part of «comet» and tail length. Data on the average values of DNA methylation under separate cultivation of non-irradiated (control) and irradiated cells, bystander cells and inducer cells are presented in Fig. 2.

At the first stage of the study the values of DNA methylation level in non-irradiated PBLs after separate cultivation were assayed. The mean value of DNA % in the tail part of comets was (64.15 ± 1.56) %, TM (85.06 ± 2.30) ?m, and comet tail length (66.64 ± 2.03) ?m.

Under separate cultivation of the γ-irradiated PBLs (1.0 Gy dose, 2.34 Gy/min dose rate) a significant decrease compared to the non-irradiated control was registered in the mean values of length of «comet» tail ((57.03 ± 1.17) μm vs. (66.64 ± 2.03) μm; $p < 0.001$) and Tail Moment (67.77 ± 1.22 vs. 85.06 ± 2.30; $p < 0.001$), indicating a decrease in the number of restriction sites of the HpaII methyl-sensitive restricts and resulting increase in global DNA methylation.

A significant decrease in the mean percentage of DNA in the comet tail part ($p < 0.001$), length of the tail parts ($p < 0.001$) and Tail Moment ($p < 0.001$) was established during the manifestation of the radiation-induced bystander effect in bystander cells in comparison with both non-irradiated and irradiated cells cultured separately, indicating a decrease in the number of restriction sites and an increase in global DNA methylation level.

Just as in irradiated cultivated separately cultures of lymphocytes a significant decrease in the mean values of the tail length ($p < 0.01$) and Tail Moment ($p < 0.001$) was observed in the inducer cells compared with non-irradiated ones. At the

TailMoment ($p < 0,001$) у порівнянні з неопроміненим клітинами. Водночас, між клітинами-індукторами та опроміненими клітинами, які культивувались окремо, не визначено різниці між середніми значеннями всіх досліджуваних показників: % ДНК у хвостовій частині комет ($p > 0,05$), довжини хвостової частини ($p > 0,05$) та ТМ ($p > 0,05$). Це може свідчити про відсутність змін рівня метилювання ДНК при впливі неопроміненої культури на опромінену при сумісно-роздільному культивуванні. Таким чином, впливу зворотного ефекту свідка на рівень глобального метилювання ДНК в нашому дослідженні не виявлено.

Для більш детального аналізу змін рівня метилювання ДНК при розвитку ефекту свідка було проведено частотний розподіл отриманих комет за індивідуальними показниками ТМ. При аналізі було обрано крок ТМ, який дорівнює 20.

Згідно з даними, представленими на рис. 3, можна відмітити зростання частоти комет в перших трьох групах (ТМ = 0 – < 20; 20 – < 40; 40 – < 60), що свідчить про зміну ландшафту метилювання ДНК в клітинах-свідках. Оскільки фермент рестрикції HpaII проявляє активність в неметильованих сайтах CpG, зниження розміру хвостової ділянки, що зафіксовано у клітинах-свідках, вказує на зменшення частоти сайтів впізнавання, та, відповідно, на гіперметилювання ДНК *de novo*.

same time no difference was determined between the average values of all the studied parameters in the inducer cells and irradiated cells cultured separately i.e. of the DNA % in comet tail ($p > 0.05$), tail length ($p > 0.05$) and TM ($p > 0.05$). This may indicate the absence of changes in DNA methylation level when a non-irradiated culture is exposed to an irradiated one during the joint/separate cultivation. Thus, no impact of the rescue bystander effect on global DNA methylation level was detected in our study.

The frequency distribution of the obtained comets was plotted according to individual TM values for a more detailed analysis of changes in the level of DNA methylation during the development of bystander effect. The TM step of 20 was chosen in the analysis.

According to the data presented in Fig. 3 an increase in the frequency of comets in the first three groups (TM = 0 – < 20; 20 – < 40; 40 – < 60) is notable, indicating a change in landscape of DNA methylation in bystander cells. Since the HpaII restriction enzyme is active in unmethylated sites of CrG, the reduction in the tail region size registered in bystander cells indicates a reduction in frequency of recognition sites and, accordingly, *de novo* DNA hypermethylation.

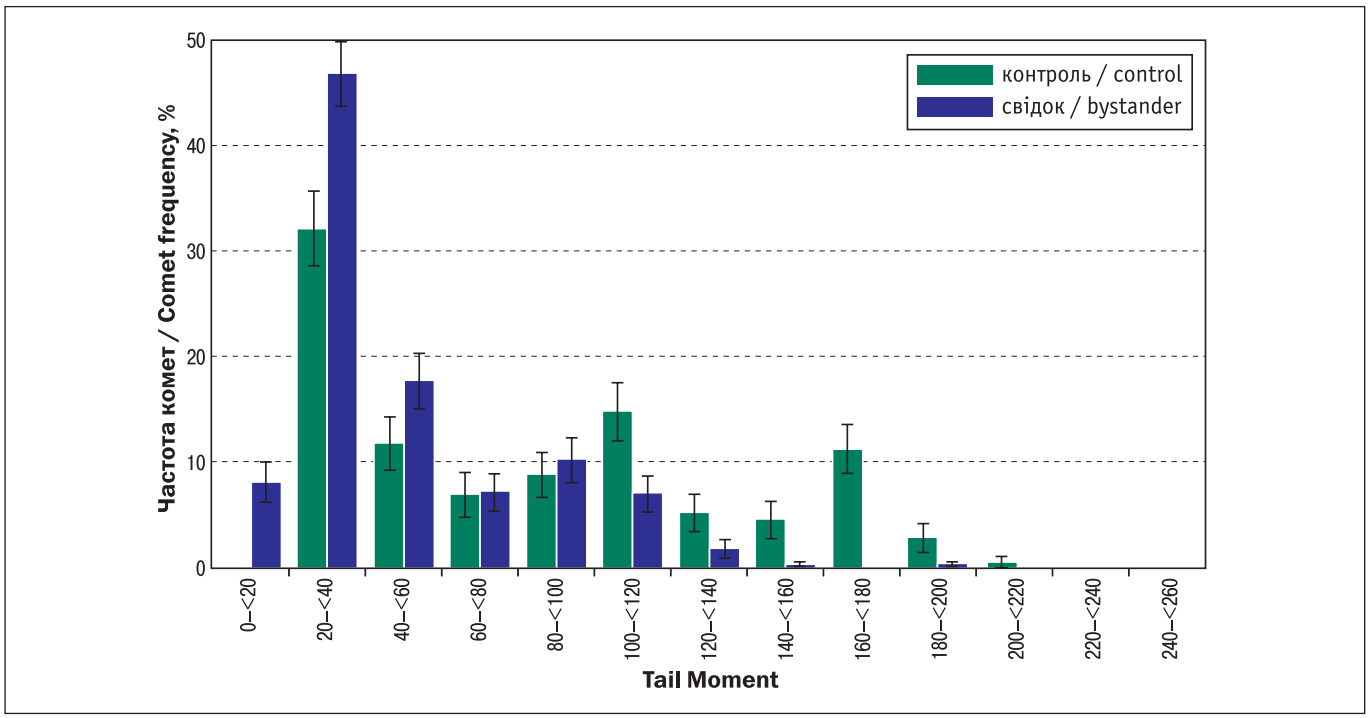

Рисунок 3. **Частотний розподіл «комет» за показником TailMoment у хвостовій частині (клітини-свідки при спільно-роздільному культивуванні, неопромінені клітини)**

Figure 3. **Frequency distribution of «comets» by TailMoment in the tail section (co-culture, bystander cells, non-irradiated cells of the control group)**

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2024. Вип. 29.

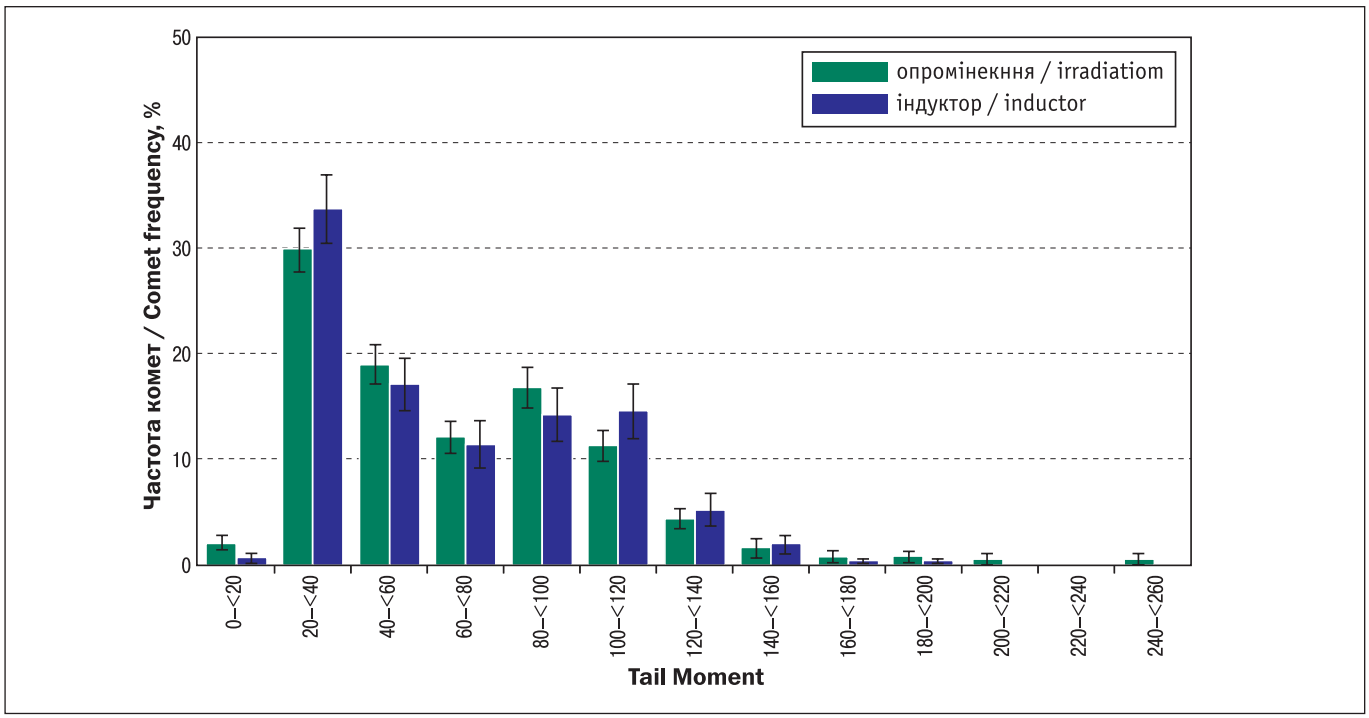

Рисунок 4. **Частотний розподіл «комет» за показником TailMoment у хвостовій частині (опромінені клітини при окремому культивуванні); клітини-індуктори при спільно-роздільному культивуванні)**

Figure 4. **Frequency distribution of «comets» by TM in the tail part (irradiated cells (separate cultivation); jointly-separated cultivation, inducer cells)**

Водночас, показники метилювання опромінених клітин при спільно-роздільному та окремому культивуванні статистично значуще не змінились (рис. 4). Таким чином, в умовах даного дослідження нами не було виявлено прояву зворотного ефекту свідка на рівні зміни метилювання ДНК.

Оскільки результат щодо зміни метилювання ДНК в клітинах-свідках був неочікуваний, виникла необхідність у проведенні більш диференційованого аналізу з використанням показника довжини хвостових ділянок комет в мікрометрах. Даний підхід було обрано з метою уникнення можливої проблеми, пов'язаної з використанням показника ТМ. ТМ є досить інформативним, оскільки враховує відсоток ДНК у хвостовій частині комети і довжину хвостової частини, не виявляє відмінностей між кометами з малим вмістом ДНК у хвостовій частині та великою довжиною хвоста, а також між кометами з високим вмістом ДНК і коротким хвостом. Показник ТМ для таких типів комет однаковий, що унеможливлює виявлення різниці в рівнях глобального метилювання.

Граничним показником для розподілу на групи було обрано значення медіан % ДНК у хвостовій частині комет (66,27 %) та довжини хвостової частини (62,5 мкм) контрольної групи. Медіана, як граничний показник, була використана, оскільки вона нечутлива до статистичних викидів та зміщень у бік

At the same time, the methylation values of irradiated cells under joint and separate cultivation did not change significantly (Fig. 4). Thus, no manifestation of the reversed bystander effect on the level of DNA methylation changes was detected under study conditions.

Since the result of DNA methylation changes in bystander cells was unexpected, a more differentiated analysis was needed using the comet tail length in micrometers. This approach was chosen to avoid a possible problem associated with the use of the TM metric. TM is quite informative since it takes into account the percentage of DNA in the comet tail and the length of the tail, but unfortunately it does not distinguish between comets with a low DNA content in the tail and a long tail, or between comets with a high DNA content and a short tail. The TM metric is the same for these types of comets, making it impossible to the detect differences in global methylation levels.

The median values of DNA percentage in the comet tail (66.27 %) and tail length (62.5 μm) of the control group were chosen as the threshold for grouping. The median value was used as a threshold parameter as being not sensitive to statistical outliers and shifts compared to the sample mean.

граничних значень порівняно з середнім значенням вибірки.

До групи 1 було віднесено комети, що мали домедіанний рівень % ДНК у хвостовій частині та домедіанний рівень довжини хвоста. Такі комети, ймовірно, містять незначну кількість сайтів рестрикції HpaII, що відповідає стану глобально гіперметильованого геному. За таких умов при дії рестриктази під час електрофорезу ДНК виходить в агарозний гель у формі великих фрагментів. Такі комети мають короткий хвіст та відносно великий розмір голови.

До групи 2 було віднесено комети зі значенням % ДНК у хвостовій частині, що більше або дорівнює медіанному, та домедіанний рівень довжини хвоста. Такі показники, ймовірно, вказують на збільшення сайтів рестрикції в геномі, проте фрагменти ДНК, що виходять в агарозний гель, все одно великі. Хвіст цих комет короткий, але більший, ніж у комет 1-ї групи. Такий стан може відповідати рівномірному, помірному повногеномному деметилюванню у неспецифічних ділянках.

До групи 3 було віднесено комети, в яких показники % ДНК у хвостовій частині та довжини хвоста перевищували або дорівнювали медіанному значенню. Ймовірно, це могло свідчити про багато сайтів рестрикції в геномі клітин, тому в агарозний гель виходила сильно фрагментована ДНК. Такі комети мають довгий хвіст та невелику за розміром голову. Цей стан відповідав глобально гіпометильованому геному клітини.

До групи 4 було віднесено комети, що мали домедіанне значення % ДНК у хвостовій частині та показник довжини хвоста більший або рівний медіанному. У комет цієї групи спостерігається подовжений хвіст, але вміст ДНК в хвості незначний. Імовірно, в даному випадку рестриктаза була активна лише в деяких ділянках геному, тому одна частина ДНК була розрізана на короткі фрагменти, а інша - на довгі. Такі комети мають довгий хвіст і відносно великий розмір голови, що може свідчити про деметилювання геному лише в певних ділянках. У свою чергу, це може вказувати на активацію окремих генів чи груп генів, які специфічно реагують на ефект свідка.

У контролі найбільше представлені комети груп 1 та 3, що свідчить про наявність приблизно однакового співвідношення клітин з глобально гіперметильованим та гіпометильованим геномом (рис. 5).

У клітин-свідків комети групи 1 складають найбільшу частку серед комет інших груп (рис. 6). Відносна кількість клітин групи 1 даної вибірки достовірно більша, ніж у контрольній групі ($p < 0,001$). Це свідчить про те, що відбувається збільшення

Group 1 included comets that had a pre-dominant level of DNA percentage in the tail and a pre-median tail length. Such comets probably contain a small number of HpaII restriction sites, which corresponds to the state of a globally hypermethylated genome. Under such conditions, when restriction enzyme acts during electrophoresis, the DNA is released into agarose gel in a form of large fragments. Such comets feature the short tails and relatively large head sizes.

Group 2 included comets that had a DNA percentage in the tails higher or equal to the median and pre-median tail lengths. Such values probably indicate an increased number of restriction sites in genome, but the DNA fragments that come out in agarose gel are still large. Tails of these comets are short, but larger than in the Group 1 comets. This condition may correspond to the uniform and moderate whole-genome demethylation in nonspecific regions.

Group 3 included comets with DNA percentage in the tails and the tail length higher or equal to the median value. This probably could indicate the large number of restriction sites in cell genome, hence highly fragmented DNA was released into agarose gel. These comets have had a long tail and a small head. This condition corresponded to a globally hypomethylated cell genome.

Group 4 included comets with a pre-median % DNA value in the tail part and a tail length index greater than or equal to the median. Comets of this group have an elongated tail, but the DNA content in the tail is insignificant. Probably, in this case, the restriction enzyme was active only in some parts of the genome, so one part of the DNA was cut into short fragments, and the other into long ones. Such comets have a long tail and a relatively large head size, which may indicate demethylation of the genome only in certain areas. In turn, this may indicate the activation of individual genes or groups of genes that specifically respond to the bystander effect.

Comets of groups 1 and 3 were most represented in the control group, indicating the approximately same ratio of cells with globally hypermethylated and hypomethylated genomes (Fig. 5).

Comets of the group 1 in bystander cells have made up the largest proportion among comets of other groups (Fig. 5). The relative number of cells of group 1 in this sample was significantly higher than in the control group ($p < 0.001$). This indi-

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2024. Вип. 29.

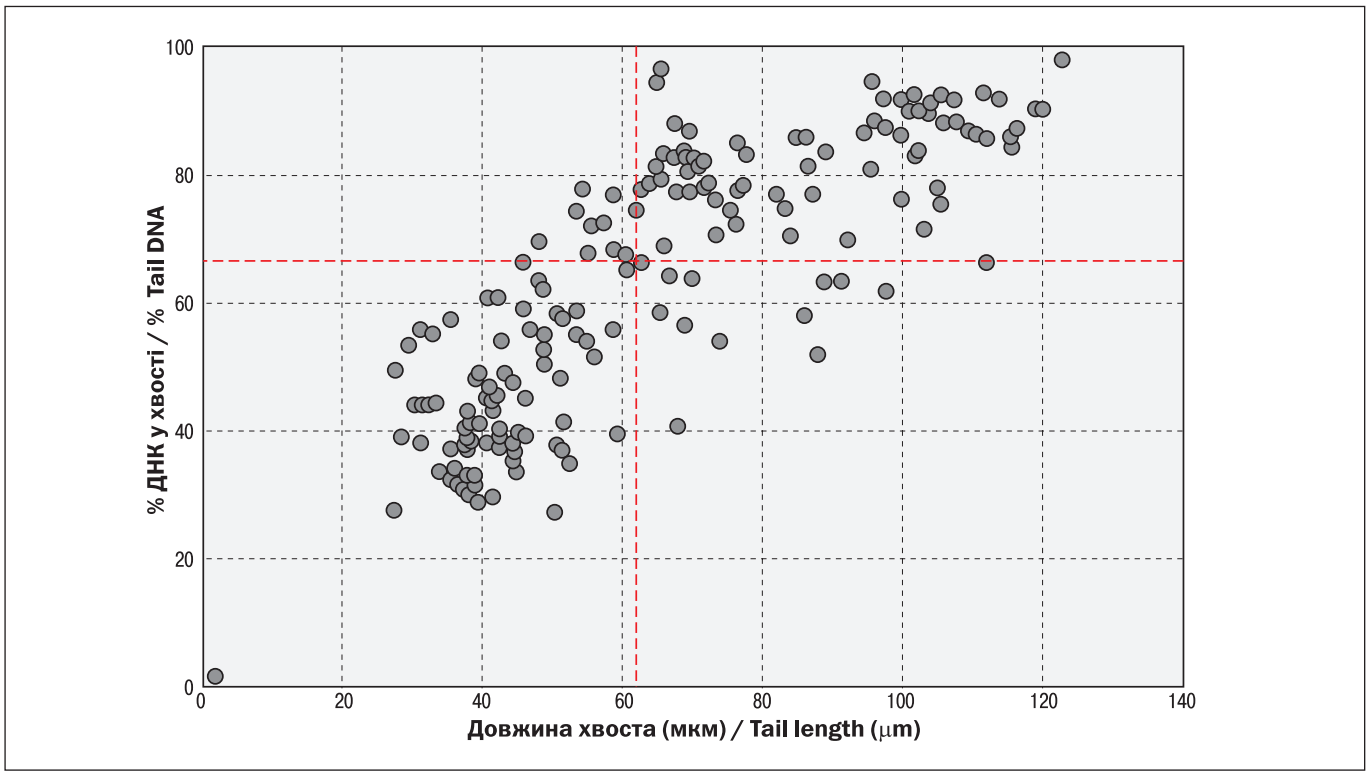

Рисунок 5. Розподіл комет контрольної групи за значеннями відсотка ДНК у хвостовій частині комет та довжиною хвостової частини

Figure 5. Distribution of comets in the control group by the percentage of DNA in the comet's tail and tail length

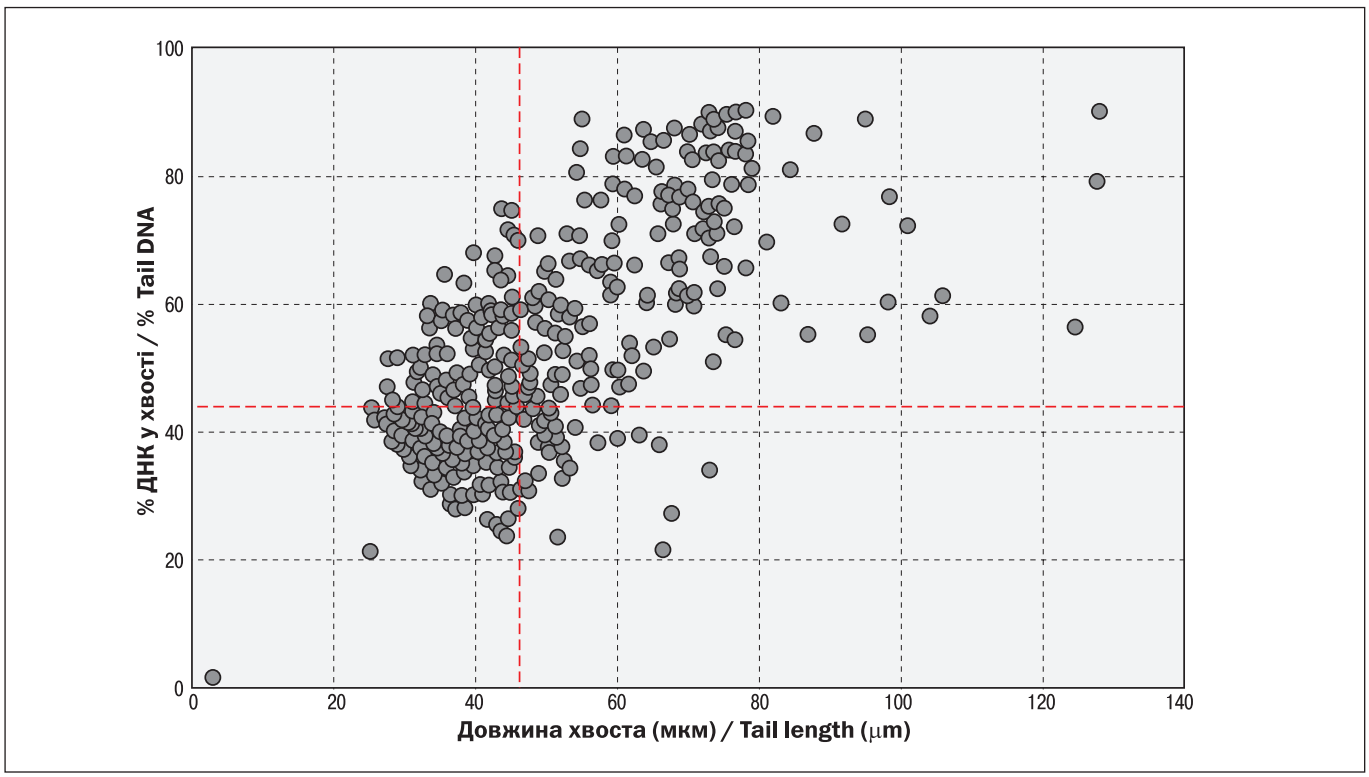

Рисунок 6. Розподіл комет групи клітин-свідків за значеннями відсотку ДНК в хвостовій частині комет та довжиною хвостової частини

Figure 6. Distribution of comets of the bystander cell group by the percentage of DNA in the comet tail and tail length

відносної кількості клітин зі зростанням рівня глобального метилювання ДНК внаслідок маніфестації радіаційно- індукованого ефекту свідка. Це також було показано при аналізі середніх показників відсотка ДНК у хвостовій частині комет, довжини хвостової частини та TailMoment у досліджуваній групі клітин-свідків. Крім цього достовірно знижується відсоток клітин групи 3 порівняно з контрольною групою ($p < 0,001$), що свідчить про зниження відносної кількості клітин з глобально гіпометильованим геномом. Відсоток клітин групи 2 не має достовірних відмінностей порівняно з даним показником у контролі ($p > 0,05$). Відносна кількість клітин групи 4 також не має значущих відмінностей відносно контрольної групи ($p > 0,05$).

У наших попередніх дослідження показано, що при реалізації пухлинно-індукованого ефекту свідка та у відповідь на мутагенний вплив у клітинах відбувається активація генних ланцюгів, відповідальних за процес репарації пошкоджень ДНК, активація процесів апоптозу в клітинах із сублетальним рівнем пошкоджень геному, активація контролю в чутливих точках клітинного циклу [25–27]. Водночас зростаюче метилювання ДНК блокує генну активність. Можливим поясненням цього парадоксу є висока вибірковість паттернів метилювання. Зважаючи на те, що метилювання ДНК окрім регуляторної має захисну функцію, гіперметилювання ДНК клітин-свідків має стабілізаційний ефект, зменшуючи рівень геномної нестабільності в цих клітинах.

ВИСНОВОК

Розвиток прямого ефекту свідка супроводжується епігенетичними змінами, що прявляються зростанням рівня метилювання ДНК у клітинах-свідках. Водночас в клітинах-індукторах змін рівня метилювання ДНК не визначено, що свідчить про відсутність проявів зворотного ефекту свідка на епігенетичному рівні.

Інформація про фінансування

Фінансування видатками Державного бюджету України.

Робота виконана в рамках планової НДР «Розробка нових підходів до оцінки радіаційно-індукованих та радіаційно-індуцибельних пошкоджень генома соматичних клітин людини», № держреєстрації: 0123U101597, шифр роботи № 643.

Конфлікт інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

cates an increase in the relative number of cells with elevating levels of global DNA methylation due to manifestation of the radiation-induced bystander effect. This was also shown when analyzing the mean DNA percentage in comet tail, tail length, and Tail Moment in the study group of bystander cells. Moreover, the percentage of cells in group 3 was significantly decreasing compared to the control group ($p < 0.001$), indicating a decrease in the relative number of cells with globally hypomethylated genome. Percentage of the group 2 cells was of no significant difference vs. the control group ($p > 0.05$). The relative number of cells in group 4 was also of no significant difference compared to the control group ($p > 0.05$).

Our previous studies have demonstrated that during the realization of the tumor-induced bystander effect and in response to mutagenic impact, the cells activate gene circuits responsible for DNA damage repair, activate apoptosis in cells with sublethal levels of genome damage, and activate control at sensitive points in the cell cycle [25–27]. At the same time, the increasing DNA methylation blocks gene activity. High selectivity of methylation patterns is a possible explanation for this paradox. Given that DNA methylation has a protective function in addition to regulatory one, the DNA hypermethylation in bystander cells is of a stabilizing effect, reducing the level of genomic instability in these cells.

CONCLUSION

The development of the direct bystander effect is accompanied by epigenetic changes, which are manifested by an increase in the level of DNA methylation in bystander cells. At that, no change in DNA methylation was detected in inducer cells, indicating the absence of manifestations of the reversed bystander effect at epigenetic level.

Funding information

Funding by expenditures of the State Budget of Ukraine.

Study was performed within framework of the planned RDP «Development of new approaches to the assessment of radiation-induced and radiation-inducible damage to the genome of human somatic cells». State registration # 0123U101597, code № 643.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2024. Вип. 29.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Nagasawa H., Little J. B. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res*. 1992. Vol. 52, iss. 22. P. 6394-63966.
2. Mothersill C., Seymour C. Radiation-induced bystander effects: past history and future directions. *Radiat. Res*. 2001. Vol. 155, no. 6. P. 757-765. doi: 10.1667/0033-7587(2001)155[0759:ribeph]2.0.co;2.
3. Widel M. Radiation induced bystander effect: from in vitro studies to clinical application. *International Journal of Medical Physics, Clinical Engineering and Radiation Oncology*. 2016. Vol. 5, no. 1. P. 1-17. doi: 10.4236/ijmpcero.2016.51001.
4. Verma N., Tiku A. B. Significance and nature of bystander responses induced by various agents. *Mutat. Res.* 2017. Vol. 773. P. 104-121. doi: 10.1016/j.mrrev.2017.05.003.
5. Pouget J.-P., Georgakilas A. G., Ravanat J.-L. Targeted and off-target (bystander and abscopal) effects of radiation therapy: redox mechanisms and risk/benefit analysis. *Antioxid. Redox Signal.* 2018. Vol. 29, no. 15. P. 1447-1487. doi: 10.1089/ars.2017.7267.
6. History of bystander effects research 1905-present; what is in a name? / C. Mothersill, A. Rusin, C. Fernandez-Palomo, C. Seymour. *Int. J. Radiat. Biol.* 2018. Vol. 94, no. 8. P. 696-707. doi: 10.1080/09553002.2017.1398436.
7. Burdak-Rothkamm S., Rothkamm K. Radiation-induced bystander and systemic effects serve as a unifying model system for genotoxic stress responses. *Mutat. Res.* 2018. Vol. 778. P. 13-22. doi: 10.1016/j.mrrev.2018.08.001.
8. Gamma ray-induced bystander effect in tumour glioblastoma cells: a specific study on cell survival, cytokine release and cytokine receptors / A. Facoetti, F. Ballarini, R. Cherubini et al. *Radiat. Prot. Dosim.* 2006. Vol. 122, no. 1-4. P. 271-274. doi: 10.1093/rpd/ncl431.
9. Morgan W. F. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiat. Res*. 2012. Vol. 178. P. 223-236. doi: 10.1667/rrav19.1.
10. Up-regulation of ROS by mitochondria-dependent bystander signaling contributes to genotoxicity of bystander effects / S. Chen, Y. Zhao, G. Zhao et al. *Mutat. Res*. 2009. Vol. 666, no. 1-2. P. 68-73. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.04.006.
11. Lyng F. M., Howe O. L., McClean B. Reactive oxygen species-induced release of signalling factors in irradiated cells triggers membrane signalling and calcium influx in bystander cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 2011. Vol. 87, no 7. P. 683-695. doi: 10.3109/09553002. 2010.549533.
12. Cell-free chromatin from dying cancer cells integrate into genomes of bystander healthy cells to induce DNA damage and inflammation / I. Mittra, U. Samant, S. Sharma et al. *Cell Death Discov.* 2017. Vol. 3. P. 17015. doi: 10.1038/cddiscovery.2017.15.
13. Prevention of radiation-induced bystander effects by agents that inactivate cell-free chromatin released from irradiated dying cells / S. Kirolikar, P. Prasannan, G. V. Raghuram et al. *Cell Death Dis.* 2018. Vol. 9, no. 15. P. 1142. doi: 10.1038/s41419-018-1181-x.

REFERENCES

1. Nagasawa H, Little JB. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res*. 1992;52(22): 6394-6396.
2. Mothersill C, Seymour C. Radiation-induced bystander effects: past history and future directions. *Radiat Res*. 2001;155(6):759-767. doi: 10.1667/0033-7587(2001)155[0759:ribeph]2.0.co;2.
3. Widel M. Radiation induced bystander effect: from in vitro studies to clinical application. *Int J Med Phys Clin Eng Radiat Oncol.* 2016; 05(01):1-17. doi: 10.4236/ijmpcero.2016.51001.
4. Verma N, Tiku AB. Significance and nature of bystander responses *induced by various agents.* Mutat Res Rev Mutat Res. 2017;773: 104-121. doi: 10.1016/j.mrrev.2017.05.003.
5. Pouget JP, Georgakilas AG, Ravanat JL. Targeted and off-target (bystander and abscopal) effects of radiation therapy: redox mechanisms and risk/benefit analysis. *Antioxid Amp Redox Signal*. 2018; 29(15):1447-1487. doi: 10.1089/ars.2017.7267.
6. Mothersill C, Rusin A, Fernandez-Palomo C, Seymour C. History of bystander effects research 1905-present; what is in a name? *Int J Radiat Biol.* 2017;94(8):696-707. doi: 10.1080/09553002.2017.1398436.
7. Burdak-Rothkamm S, Rothkamm K. Radiation-induced bystander and systemic effects serve as a unifying model system for genotoxic stress responses. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2018;778:13-22. doi: 10.1016/j.mrrev.2018.08.001.
8. Facoetti A, Ballarini F, Cherubini R, Gerardi S, Nano R, Ottolenghi A, Prise KM, Trott KR, Zilio C. Gamma ray-induced bystander effect in tumour glioblastoma cells: a specific study on cell survival, cytokine release and cytokine receptors. *Radiat Prot Dosim.* 2006;122(1-4): 271-274. doi: 10.1093/rpd/ncl431.
9. Morgan WF. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiat Res*. 2012;178(2):AV223-AV236. doi: 10.1667/rrav19.1.
10. Chen S, Zhao Y, Zhao G, Han W, Bao L, Yu KN, Wu L. Up-regulation of ROS by mitochondria-dependent bystander signaling contributes to genotoxicity of bystander effects. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen.* 2009;666(1-2):68-73. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.04.006.
11. Lyng FM, Howe OL, McClean B. Reactive oxygen species-induced release of signalling factors in irradiated cells triggers membrane signalling and calcium influx in bystander cells. *Int J Radiat Biol.* 2011;87(7):683-695. doi: 10.3109/09553002.2010.549533.
12. Mittra I, Samant U, Sharma S, Raghuram GV, Saha T, Tidke P, et. al. Cell-free chromatin from dying cancer cells integrate into genomes of bystander healthy cells to induce DNA damage and inflammation. *Cell Death Discov.* 2017;3(1). doi: 10.1038/cddiscovery.2017.15.
13. Kirolikar S, Prasannan P, Raghuram GV, Pancholi N, Saha T, Tidke P et al. Prevention of radiation-induced bystander effects by agents that inactivate cell-free chromatin released from irradiated dying

14. Molecular mechanism of bystander effects and related abscopal/cohort effects in cancer therapy / R. Wang, T. Zhou, W. Liu, L. Zuo. *Oncotarget*. 2018. Vol. 9, no. 26. P. 18637-18647. doi: 10.18632/oncotarget.24746.
15. Pappalardo X. G., Barra V. Losing DNA methylation at repetitive elements and breaking bad. E*pigenetics & Chromatin.* 2021. Vol. 14, no. 25. doi: 10.1186/s13072-021-00400-z.
16. Li E., Zhang Y. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2014. Vol. 6, no. 5. P. a019133. doi: 10.1186/s13072-021-00400-z.
17. Schubeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature*. 2015. Vol. 517, no. 7534. P. 321-326. doi: 10.1038/nature14192.
18. Kurinnyi D. A., Demchenko O. M., Romanenko M. G., Rushkovsky S. R. The impact of astaxanthin on the level of DNA methylation in irradiated in vitro human lymphocytes. *Probl. Rad. Med. Radiobiol.* 2018. Iss. 23. P. 235-245. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-235-245.
19. Lewies A., Van Dyk E., Wentzel J. F., Pretorius P. J. Using a medium-throughput comet assay to evaluate the global DNA methylation status of single cells. *Front. Genet.* 2014. Vol. 5. P. 215. doi:10.3389/fgene.2014.00215.
20. Olive P. L., Banath J. P., Durand R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the «Comet» assay. *Radiat. Res.* 2012;178(2):35-42. doi: 10.1667/rrav04.1.
21. OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis / B. M. Gyori, G. Venkatachalam, P. S. Thiagarajan et al. *Redox Biology.* 2014. Vol. 2, no. 1. P. 457-465. doi: 10.1016/j.redox.2013.12.020.
22. Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies / E. Lee, E. Oh, J. Lee et al. *Toxicol. Sci.* 2004. Vol. 81. P. 121-132. doi: 10.1093/toxsci/kfh184.
23. 30 years of the comet assay: an overview with some new insights / ed. by A. Azqueta, S. Langie, A. Collins. *Frontiers Media SA.* 2015. 176 p. doi: 10.3389/978-2-88919-649-4.
24. Rosner B. Fundamentals of biostatistics. 8th ed. Cengage Learning, 2015. 962 p.
25. 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. *Cytol. Genet.* 2020. Vol. 54. P. 124-129. doi: 10.3103/S0095452720020103.
26. 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. Rad. Med. Radiobiol.* 2017. Iss. 22. P. 208-215. doi:10.33145/2304-8336-2017-22-208-215.
27. Modification of the tumor-induced bystander effect by irradiation under cocultivation of lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia and lymphocytes from healthy donors / D. Kurin-

cells. Cell Death Amp Dis. 2018;9(12). doi: 10.1038/s41419-018-1181-x.
14. Wang R, Zhou T, Liu W, Zuo L. Molecular mechanism of bystander effects and related abscopal/cohort effects in cancer therapy. *Oncotarget*. 2018;9(26):18637-18647. doi: 10.18632/oncotarget.24746.
15. Pappalardo XG, Barra V. Losing DNA methylation at repetitive elements and breaking bad. *Epigenetics & Chromatin*. 2021;14(1)25. doi: 10.1186/s13072-021-00400-z.
16. Li E, Zhang Y. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(5):a019133. doi: 10.1101/cshperspect.a019133.
17. Schubeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature*. 2015;517(7534):321-326. doi: 10.1038/nature14192.
18. Kurinnyi DA, Demchenko OM, Romanenko MG, Rushkovsky SR. The impact of astaxanthin on the level of dna methylation in irradiated in vitro human lymphocytes. *Probl Rad Med Radiobiol.* 2018;23:235-245. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-235-245.
19. Lewies A, Van Dyk E, Wentzel JF, Pretorius PJ. Using a medium-throughput comet assay to evaluate the global DNA methylation status of single cells. *Front Genet.* 2014;5:215. doi: 10.3389/fgene.2014.00215.
20. Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced dna damage and repair in tumor and normal cells measured using the «Comet» Assay. *Radiat Res.* 2012;178(2):AV35-AV42. doi: 10.1667/rrav04.1.
21. Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS, Hsu D, Clement MV. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol.* 2014;2:457-465. doi: 10.1016/j.redox.2013.12.020.
22. Lee E. Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate dna damage in human biomonitoring studies. *Toxicol Sci.* 2004;81(1):121-132. doi: 10.1093/toxsci/kfh184.
23. Azqueta A, Langie S, Collins A, editors. 30 years of the comet assay: An overview with some new insights. *Frontiers Media SA*; 2015. doi: 10.3389/978-2-88919-649-4.
24. Rosner B. Fundamentals of biostatistics. 8th ed. Cengage Learning; 2015. 962 p.
25. Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Demchenko OM, Sholoiko VV, Pilinska MA. Evaluation of the interaction between malignant and normal human peripheral blood lymphocytes under cocultivation and separate cultivation. *Cytol Genet.* 2020;54(2):124-129. doi: 10.3103/s0095452720020103.
26. Kurinnyi D, Rushkovsky S, Demchenko O, Pilinska M. 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 Radiat Med Radiobiol*. 2017;22:208-215. doi: 10.33145/2304-8336-2017-22-208-215.
27. Kurinnyi D, Rushkovsky S, Demchenko O, Romanenko M, Liashchenko T, Pilinska M. Modification of the tumor/induced bystander effect by irradiation under cocultivation of lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia and lymphocytes

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2024. Вип. 29.

nyi, S. Rushkovsky, O. Demchenko et al. *Probl. Rad. Med. Radiobiol.* 2021. Iss. 22. P. 248-259. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-248-259.

from healthy donors. *Probl Radiat Med Radiobiol.* 2021;26: 248-259. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-248-259.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

Курінний Денис Аркадійович, кандидат біологічних наук, завідувач лабораторії генетичних та епігенетичних досліджень, відділ медичної генетики, Інститут експериментальної радіології, ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини, гематології та онкології НАМН України», Київ, Україна
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-9976-6898

Земскова Оксана Володимирівна, кандидат медичних наук, науковий співробітник відділу ад'ювантних методів лікування при пухлинах центральної нервової системи, лікар з променевої терапії відділення нейрохірургії, Державна установа «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», Київ, Україна
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-9462-8330

Романенко Марина Генадіївна, молодший науковий співробітник лабораторії мутагенезу і антимутагенезу, відділ медичної генетики, Інститут експериментальної радіології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини, гематології та онкології НАМН України», Київ, Україна
ORCID ID: https://orcid.org/0009-0008-4389-4389

Неумержицька Любов Володимирівна, кандидат біологічних наук, провідний науковий співробітник лабораторії мутагенезу і антимутагенезу, відділ медичної генетики, Інститут експериментальної радіології, ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини, гематології та онкології НАМН України», Київ, Україна
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-8284-4260

Макарчук Микола Юхимович, доктор біологічних наук, професор, професор кафедри фізіології та анатомії, Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-0982-3463

Куцик Олена Едуардівна, генетик, лабораторія медичної генетики, Національна дитяча спеціалізована лікарня «Охматдит», Київ, Україна
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7289-8409

Рушковський Станіслав Ричардович, кандидат біологічних наук, доцент кафедри загальної та медичної генетики, Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-4497-3782

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Denys A. Kurinnyi, Candidate of Biological Sciences, Head Laboratory of Genetic and Epigenetic Research, Department of Medical Genetics, Institute of Experimental Radiology, State Institution «National Research Center for Radiation Medicine, Hematology and Oncology of the NAMS Ukraine», Kyiv, Ukraine
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-9976-6898

Oksana V. Zemskova, Candidate of Medical Sciences, Research Associate, Department of Adjuvant Methods of Treatment for Tumors of the Central Nervous System, Radiation Therapist, Department of Neurosurgery, State Institution «Romodanov Institute of Neurosurgery of the NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-9462-8330

Maryna G. Romanenko, Junior Research Associate, Laboratory of Mutagenesis and Antimutagenesis, Department of Medical Genetics, Institute of Experimental Radiology, State Institution «National Research Center for Radiation Medicine, Hematology and Oncology of the NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine
ORCID ID: https://orcid.org/0009-0008-4389-4389

Liubov V. Neumerzhitska, Candidate of Biological Sciences, Leading Research Associate, Laboratory of Mutagenesis and Antimutagenesis, Department of Medical Genetics, Institute of Experimental Radiology, State Institution «National Research Center for Radiation Medicine, Hematology and Oncology of the NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-8284-4260

Mykola Yu. Makarchuk, Doctor of Biological Sciences, Professor, Professor of the Physiology and Anatomy Department, Educational and Scientific Center «Institute of Biology and Medicine», Taras Shevchenko Kyiv National University of Kyiv, Ukraine
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-0982-3463

Olena E. Kutsyk, Geneticist, Laboratory of Medical Genetics, National Children Specialized Hospital «OKHMATDYT» of the Ministry of Health of Ukraine, Kyiv, Ukraine
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7289-8409

Stanislav R. Rushkovsky, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Department of General and Medical Genetics, Educational and Scientific Center «Institute of Biology and Medicine», Taras Shevchenko National University, Kyiv, Ukraine
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-4497-3782

Стаття надійшла до редакції 17.09.2024 *Received: 17.09.2024*