

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

С. Р. Рушковський¹, О. М. Демченко², М. Г. Романенко², М. Ю. Макаруч¹, Д. А. Курінний²✉¹Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, 01601, Україна²Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини, гематології та онкології Національної академії медичних наук України», вул. Юрія Ілленка, 53, м. Київ, 04050, Україна

ВПЛИВ АСТАКСАНТИНУ НА ПРОЯВ ПРЯМОГО І ЗВОРОТНОГО ПУХЛИННО-ІНДУКОВАНОГО ЕФЕКТУ СВІДКА

Мета: дослідити взаємний вплив на геном малігнізованих і нормальних лімфоцитів периферичної крові людини при їх сумісному культивуванні та можливість модифікації ефектів цієї взаємодії атаксантином.

Методи. Окреме та сумісно-роздільне культивування лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) 6 хворих на хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ) та 6 умовно здорових осіб; метод Comet assay; люмінесцентна мікроскопія з автоматизованою програмою аналізу результатів; статистичні.

Результати. При сумісно-роздільному культивуванні лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) умовно здорових осіб (клітини-свідки) та клітин крові хворих на ХЛЛ (клітини-індуктори) спостерігали прояви як прямого, так і зворотного пухлинно-індукованих ефектів свідка. Прямий ефект характеризувався високим рівнем комет, які відповідають клітинам, що знаходяться на S-фазі клітинного циклу, та зростанням апоптичної активності в культурах клітин-свідків. Зворотний ефект в культурі клітин-індукторів проявлявся збільшення частоти клітин, які затрималися на S-фазі, зменшення частки клітин з високим рівнем пошкодження ДНК, зниженням рівня клітин на стадії апоптозу. Під дією атаксантину в культурах клітин-свідків значуще зменшився рівень як клітин на S-фазі, так і апоптичних клітин ($p < 0,05$). Вплив атаксантину на клітини-індуктори був протилежним: спостерігалось збільшення частоти клітин на S-фазі та зростання апоптичної активності ($p < 0,05$).

Висновок. Встановлено можливість модифікації атаксантином проявів як прямого, так і зворотного пухлинно-індукованих ефектів свідка.

Ключові слова: атаксантин; сумісно-роздільне культивування лімфоцитів людини; прямий та зворотний пухлинно-індуковані ефекти свідка; Comet assay; апоптоз.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2024. Вип. 29. С. 213–227. doi: 10.33145/2304-8336-2024-29-213-227

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

S. R. Rushkovsky¹, O. M. Demchenko², M. H. Romanenko², M. Yu. Makarchuk¹, D. A. Kurinnyi²✉

¹*Educational and Scientific Center «Institute of Biology and Medicine» of the Taras Shevchenko Kyiv National University, 64/13 Volodymyrska Str., Kyiv, 01601, Ukraine*

²*State Institution «National Research Center for Radiation Medicine, Hematology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 53 Yurii Illienka Str., Kyiv, 04050, Ukraine*

IMPACT OF ASTAXANTHIN ON MANIFESTATIONS OF THE DIRECT AND RESCUE TUMOR-INDUCED BYSTANDER EFFECT

Objective: to investigate the reciprocal impact on the genome of malignant and normal human peripheral blood lymphocytes under their co-culture and the possibility to modify the effects by astaxanthin.

Methods. Separate and joint/separate culturing of peripheral blood lymphocytes (PBL) of the chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients (n = 6) and conditionally healthy individuals (n = 6), Comet assay method, fluorescence microscopy with automated software for the analysis of results, statistical methods.

Results. Both direct and rescue tumour-induced bystander effects were observed under the joint/separate culturing of blood lymphocytes of conditionally healthy individuals (the bystander cells) and blood cells from CLL patients (the inducer cells). The direct effect was characterized by the high level of comets corresponding to the S-phase cells and increased apoptotic activity in the bystander cell cultures. The rescue effect in the culture of inducer cells was expressed by the increased frequency of cells retained in S-phase, decreased proportion of cells with a high level of DNA damage and decreased amount of cells in apoptotic stage. Level of both S-phase cells and apoptotic cells in the cultures of bystander cells significantly decreased under the impact of astaxanthin (p < 0.05). Effect of astaxanthin on the inducer cells was the opposite, namely an increased frequency of S-phase cells and increased apoptotic activity in cultures (p < 0.05) was observed.

Conclusions. Possible modification of manifestations of both direct and rescue tumor-induced bystander effects by the astaxanthin was established.

Key words: astaxanthin; joint/separate culturing of human lymphocytes; direct and rescue tumor-induced bystander effects; Comet assay, apoptosis.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2024;29:213-227. doi: 10.33145/2304-8336-2024-29-213-227

ВСТУП

Пухлинно-індукований ефект свідка (tumor-induced bystander effect – TIBE) – це явище, яке спостерігається при взаємодії (навіть віддаленої) малігнізованих клітин з нормальними: злоякісні клітини можуть індукувати структурні та функціональні пошкодження ядра (геному) та інших внутрішньоклітинних компонентів нетрансформованих клітин [1–3]. Існування TIBE було підтверджено в різноманітних експериментах *in vitro* та *in vivo* [3–5], а саме явище вважається «одним із проявів універсального феномену – відповіді свідка (bystander response), викликаного реакцією клітин на індукований генотоксичний стрес», відомим прикладом якого є радіаційно індукований ефект свідка (radiation induced bystander effect – RIBE) [3, 4]. Подібно прояву RIBE, маніфестація TIBE характеризується збільшенням геномної нестабільності, активацією проліферації та підвищеним рівнем апоптозу в немалігнізованих клітинах-свідках. Вважають, що феномен TIBE сприяє роз-

INTRODUCTION

The tumor-induced bystander effect (TIBE) is a phenomenon observed under the interaction (even remote) of malignant cells with normal ones when malignant cells can induce structural and functional damage to the nuclei (genome) and other intracellular components of untransformed cells [1–3]. Existence of TIBE has been confirmed in various *in vitro* and *in vivo* experiments [3–5]. It is considered as «one of manifestations of universal phenomenon i.e. the bystander response caused by the cellular reaction to the induced genotoxic stress», and the radiation-induced bystander effect (RIBE) is a well-known example [3, 4]. Similar to RIBE, the manifestation of TIBE is characterized by an increase in genomic instability, activation of proliferation, and increased apoptosis in non-malignant bystander cells. It is believed that the TIBE contributes to development of the secondary malignancies in

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

витку вторинних злоякісних новоутворень у онкологічних хворих [6, 7], ризик виникнення яких може ще підвищуватися після генотоксичної хіміо- чи радіотерапії [8–10].

Взаємодія між клітинами, що індукують ефект свідка, та клітинами-свідками, є процесом двоспіввідножним: нормальні клітини впливають на клітини-індуктори, активуючи різноманітні системи репарації та збільшуючи виживаність цих клітин. Такий ефект має назву зворотній ефект свідка або «ефект порятунку» (rescue effect) [11, 12]. Незважаючи на свою другу назву, зворотній ефект свідка може мати негативні медичні наслідки, оскільки «підтримка» пухлинних клітин нормальними може значно знижувати ефективність терапії онкологічних хвороб.

Незважаючи на активне вивчення маніфестації прямого та зворотного TIBE [13–19], низка питань досі залишаються відкритими і потребують подальшого вирішення. Зокрема, це стосується розробки підходів для дослідження особливостей взаємодії нормальних клітин з малігнізованими з використанням різних параметрів пошкодження геному, а також можливості модифікації такої взаємодії.

У попередніх дослідженнях було показано, що застосування розробленої нами системи спільно-роздільного культивування клітин-індукторів та клітин-свідків з подальшим використанням методу електрофорезу окремих клітин в нейтральних умовах для оцінки пошкодженості ДНК дозволило чітко визначити прояви як прямого, так і зворотного TIBE при культивуванні клітин крові хворих на хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ) з лімфоцитами умовно здорових донорів [20]. Оскільки, механізми «відповіді свідка» пояснюються активним синтезом клітинами-індукторами та клітинами-свідками сигнальних стресових молекул, частина з яких є активними окисниками (NO , H_2O_2) [5, 13], природні речовини, що мають антиоксидантні властивості можуть розглядатися як перспективні модифікатори ефекту свідка. Астаксантин, каротиноїд з групи ксантофілів, є одним з потужних природних антиоксидантів [21]. Нами досліджені його радіопротекторні, генопротекторні та апоптогенні властивості [22–25].

МЕТА

Дослідити взаємний вплив на геном малігнізованих та нормальних лімфоцитів периферичної крові людини при їх сумісному культивуванні та можливість модифікації ефектів цієї взаємодії астаксантином.

cancer patients [6, 7], the risk of which may be further increased upon genotoxic chemotherapy or radiotherapy [8–10].

Interaction between the cells that induce a bystander effect and bystander cells is a bidirectional process, where normal cells have an effect on inducer cells, activating various repair systems and improving the survival of these cells. This event is called the rescue bystander effect [11, 12]. Despite this name, the rescue bystander effect can lead to the negative health consequences, as «maintaining» of tumor cells by normal ones and might significantly reduce the effectiveness of cancer therapy.

In spite of active research of manifestations of the direct and rescue TIBE [13–19], a range of issues still remain unsolved and required further solution. In particular, it concerns the development of approaches to study the peculiarities of interaction between normal and malignant cells using different parameters of genome damage, as well as a possibility of modifying such interactions.

In previous studies, we have shown that the application of the developed by us system for joint/separate cultivation of inducer and bystander cells with the subsequent use of the Comet assay in neutral conditions to assess DNA damage made it possible to clearly determine the manifestations of both direct and rescue TIBE during cultivation blood cells of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and lymphocytes from conditionally healthy donors [20]. Since mechanisms of the «bystander response» may be explained by active synthesis of the signal stress molecules by inducer and bystander cells, some of which are active oxidants (NO , H_2O_2) [5, 13], the natural substances with antioxidant properties can be considered as promising modifiers of the bystander effect. Astaxanthin (a carotenoid from the xanthophylls group) is one of the most powerful natural antioxidants [21]. In addition, we investigated its radio-protective, genoprotective and apoptogenic properties [22–25].

OBJECTIVE

To investigate the reciprocal impact of malignant and normal human peripheral blood lymphocytes on the genome under their cocultivation and possibility to modify the effects of this interaction with astaxanthin.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У якості моделі онкотрансформованих клітин (клітини-індуктори) обрано лімфоцити периферичної крові людини (ЛПК), одержані від хворих на хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), оскільки саме цю форму гемобластозів відносять до радіаційно-асоційованої патології, захворюваність на яку підвищилась в Україні внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС [20], а клітин-свідків – інтактні ЛПК умовно здорових осіб.

Зразки периферичної крові були отримані у 6 хворих на ХЛЛ та 6 умовно здорових донорів, які заперечували свідомий контакт зі знаними чи потенційними мутагенами, вели відносно здоровий спосіб життя. Всі особи були залучені до досліджень за умов поінформованої згоди.

Культивування лімфоцитів здійснювали впродовж 48 год за модифікованим нами стандартним мікрометодом [23, 25]. Для сумісно-роздільного культивування використовували розроблену нами систему, яка становить собою дві культуральні ємності, розділені між собою мембраною з порами 1 мкм. У частину культур додавали астаксантин в концентрації (20 мкг/мл), яка була визначена під час наших попередніх досліджень [22–25]. Для оцінки відносного рівня пошкодження ДНК використовували метод електрофорезу окремих клітин (Comet assay) в нейтральних умовах [26]. Культуральну суміш центрифугували 10 хв при 1000 об/хв. Знімали верхній шар клітин над еритроцитарним осадом та проводили виділення лімфоцитів у градієнті щільності Histopaque 1077 (Sigma, USA) згідно з протоколом виробника. Суспензію клітин змішували з 1 % легкоплавкою агарозою (Sigma, USA) при 37 °С. Приготування слайдів, лізис клітин та проведення нейтрального кометного електрофорезу проводили за загальноприйнятою методикою [27]. Після електрофорезу препарати фарбували DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) в концентрації 2 мкг/мл та аналізували під люмінесцентним мікроскопом з приєднаною фотокамерою Canon D1000. Для кожного варіанту робили не менше трьох повторів та фотографували не менше 100 випадково обраних «комет» для кожного повтору (рис. 1).

Зображення аналізували за допомогою програми Image J (imagej.nih.gov) з використанням плагіну OpenComet [26, 27]. Як параметр для визначення відносного рівня пошкодження ДНК використовували показник «Tail Moment» (ТМ) [27], який вираховується як добуток довжини «хвоста» комети (у мкм) і частки ДНК у хвості. Для оцінки довжини

MATERIALS AND METHODS

Human peripheral blood lymphocytes (PBL) obtained from CLL patients were chosen as a model of oncotransformed cells (inducer cells) since this form of hemoblastosis is considered as a radiation-associated disease, the morbidity of which increased in Ukraine as a result of the Chernobyl NPP accident [20]. The intact PBL from the conditionally healthy individuals were used as bystander cells.

Peripheral blood samples were obtained from CLL patients (n = 6) and conditionally healthy volunteers (n = 6) who denied any conscious exposure to the known or potential mutagens and had followed a relatively healthy lifestyle. All subjects were involved on the basis of informed consent.

Lymphocytes were cultured for 48 hours according to our modified standard micro method [23,25]. For the joint/separate cultivation, we used the system developed by us, which consists of two culture tubes separated by a 1 μm membrane. Astaxanthin was added into culture medium in final concentrations 20 μg/ml that was determined during our previous studies [22–25]. The method of the single cell electrophoresis (Comet assay) under neutral conditions was used to analyze the relative level of DNA damage [26]. The culture mixture was centrifuged for 10 minutes at 1000 rpm. The upper layer of cells above the erythrocyte sediment was removed and lymphocytes were isolated in a density gradient Histopaque 1077 (Sigma, USA) according to the manufacturer's protocol. The cell suspension was mixed with 1% low-meltpoint agarose (Sigma, USA) at 37 °C. Slide preparation, cell lysis, and neutral comet electrophoresis were performed according to the conventional method [27]. After electrophoresis, the preparations were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) at a 2 μg/ml concentration and analyzed under a fluorescence microscope with attached Canon D1000 camera. At least three replicates were made for each variant and at least 100 randomly selected 'comets' were photographed for each repeat (Figure 1).

Images were analyzed with the Image J (imagej.nih.gov) application using the OpenComet plugin [26, 27]. The «Tail Moment» (TM) parameter [27] was used to determine the relative level of DNA damage, calculated as the product of comet's tail length (in μm) and part of DNA in the tail. To estimate the length of tail and

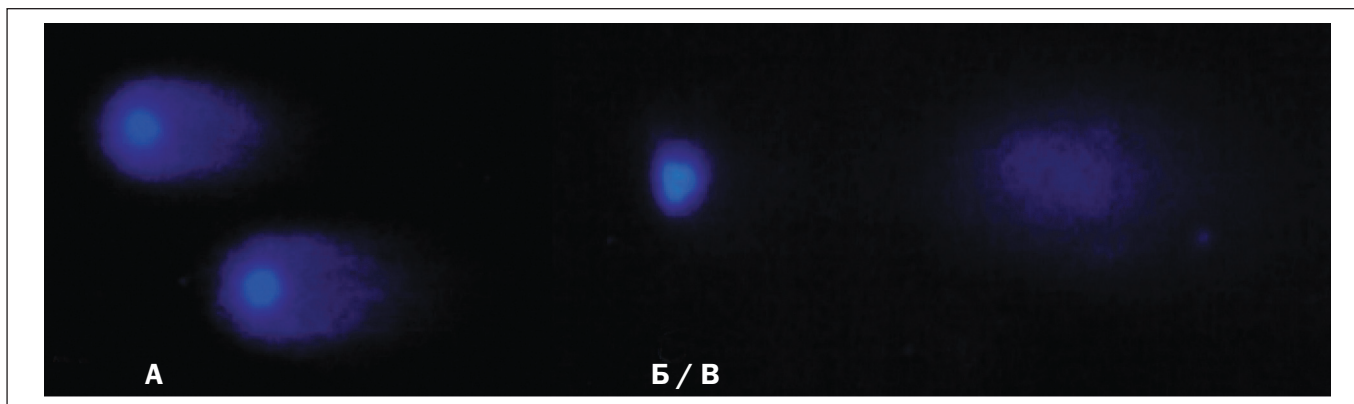


Рисунок 1. Приклади «стандартних» (А) та «атипових» комет (Б)

Figure 1. Examples of «standard» (A) and «aberrant» comets (B)

хвоста та ТМ у мікрометрах використовували фотографію препарата-мікрометра на тому ж збільшенні, що й при фотографуванні слайдів. Таким чином, було встановлено відповідність кількості пікселів на фотографії реальній довжині у мікрометрах. «Атипові комети», які утворюються з клітин з високим рівнем фрагментації ДНК, аналізували окремо.

Статистичний аналіз даних проводили за загальноприйнятими методами [28].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

При окремому культивуванні ЛПК умовно здорових донорів значення ТМ коливалися від 0 мкм до 49,13 мкм, з середнім ($3,95 \pm 0,15$) мкм та медіаною 2,71 мкм (табл. 1). Введення астаксантину не призвело до статистично значущих ($p > 0,05$) змін ТМ в цій групі, що відповідає результатам наших попередніх досліджень [24, 25].

Таблиця 1

Значення ТМ (мкм) після окремого та сумісно-роздільного культивування клітин крові здорових донорів і хворих на ХЛЛ при додаванні астаксантину

Table 1

TM values (μm) after separate and co-culture of blood cells from healthy donors and CLL patients with the addition of astaxanthin

Статистичні показники Statistical indices	K/C	K+A / C+A	ХЛЛ/CLL	ХЛЛ+A CLL+A	C/B	C+A/B+A	ХЛЛ-I CLL-I	ХЛЛ-+A CLL-I+A
Min-Max	0-49,13	0-36,19	0-66,45	0-24,12	0-65,42	0-76,67	0-50,18	0-66,45
Середнє / Mean	$3,95 \pm 0,15$	$4,01 \pm 0,16$	$7,05 \pm 0,53^*$	$4,51 \pm 0,25^{**}$	$3,11 \pm 0,44$	$5,43 \pm 0,29^*$	$4,44 \pm 0,33^{**}$	$4,13 \pm 0,30^{**}$
Медіана / Median	2,71	2,73	2,33	2,92	2,00	2,44	1,44**	0,76**

Примітки. К – контроль (окреме культивування); K+A – контроль + 20 мкг/мл астаксантину (окреме культивування); ХЛЛ – клітини хворих на ХЛЛ (окреме культивування); ХЛЛ+A – клітини хворих на ХЛЛ+20 мкг/мл астаксантину (окреме культивування); С – клітини-свідки (сумісно-роздільне культивування); C+A – клітини-свідки+20 мкг/мл астаксантину (сумісно-роздільне культивування); ХЛЛ-I – індуктор (клітини хворих на ХЛЛ, сумісно-роздільне культивування); ХЛЛ-I+A – індуктор+ 20 мкг/мл астаксантину (сумісно-роздільне культивування); * $p < 0,05$ відносно контролю, ** $p < 0,05$ відносно ХЛЛ

Notes. C – control (separate cultivation); C+A – control+20 $\mu\text{g/ml}$ astaxanthin (separate cultivation); CLL – cells of CLL patients (separate cultivation); CLL+A – cells of CLL patients + 20 $\mu\text{g/ml}$ astaxanthin (separate cultivation); B – bystander cells (co-culture); B+A – bystander cells + 20 $\mu\text{g/ml}$ astaxanthin (co-culture); CLL-I – inducer (CLL patients' cells, co-culture); CLL-I+A – inducer + 20 $\mu\text{g/ml}$ astaxanthin (co-culture); * $p < 0.05$ vs. control, ** $p < 0.05$ vs. CLL

Середнє значення ТМ при окремому культивуванні клітин хворих на ХЛЛ виявилось значно більшим, ніж у контролі ($(7,05 \pm 0,53)$ мкм та $(3,95 \pm 0,15)$ мкм відповідно, $p < 0,05$), що свідчить про високий рівень пошкодження ДНК в клітинах крові хворих на ХЛЛ. Додавання астаксантину призвело до значущого зниження рівня ТМ в культурах крові хворих на ХЛЛ ($p < 0,05$).

При сумісно-роздільному культивуванні в культурах клітин-свідків середнє значення ТМ в культурах клітин-свідків статистично значуще не відрізнялось від контрольного ($p > 0,05$). Додавання до системи астаксантину призвело до зростання середнього значення ТМ в культурах клітин-свідків ($p < 0,05$).

Для клітин-індукторів при сумісно-роздільному культивуванні середні рівні ТМ та його медіанні значення були статистично значуще менші порівняно зі значенням в окремих культурах крові ХЛЛ ($p < 0,05$), що, ймовірно, є проявом зворотного ефекту свідка. Варіанти досліду без астаксантину та з додаванням астаксантину, за середніми показниками ТМ статистично не відрізнялися, хоча медіанні значення суттєво відрізняються як при порівнянні з даними окремого культивування клітин хворих на ХЛЛ, так і між собою: 2,33 нм – окреме культивування клітин пацієнтів, хворих на ХЛЛ, 1,44 нм – індуктор без додавання астаксантину, 0,76 – індуктор з додаванням астаксантину.

Для більш детального аналізу було проведено дослідження частотного розподілу окремих клітин за відносним показником пошкодженості ДНК (ТМ). За рівнями ТМ вибірка «комет» у контролі була поділена на 10 груп (децилів) по 10 % клітин у кожній. Встановлені граничні значення децилів дорівнювали: 0,57 мкм; 0,95 мкм; 1,55 мкм; 2,15 мкм; 2,71 мкм (медіанне значення ТМ); 3,36 мкм; 4,15 мкм; 5,27 мкм та 7,98 мкм. Ці значення були обрані при формуванні десяти груп під час розрахунку частот ТМ за даними інших варіантів експерименту. Якщо рівень ТМ дорівнював граничному, «комету» відносили до наступної групи. Як було обговорено нами раніше [24], до групи 1 відносяться «комети» з мінімальним виходом ДНК, які утворюються з клітин, що зупинилися на S стадії клітинного циклу, у групу 10 входять клітинини з екстремально високим рівнем пошкодження ДНК, до груп 2–5 (домедіанні значення ТМ) відносяться клітини що мають низький або помірний рівень пошкодженості ДНК, до груп 6–9 – клітини, що мають відносно високий ступінь ДНК пошкодження.

При аналізі розподілу «комет» по групах при окремому культивуванні клітин крові хворих на ХЛЛ

The mean value of TM in individual cell cultures of CLL patients was significantly higher compared to the control group ($(7.05 \pm 0.53) \mu\text{m}$ and $(3.95 \pm 0.15) \mu\text{m}$, respectively, $p < 0.05$), indicating a high level of DNA damage in blood cells of CLL patients. The addition of astaxanthin led to a significant decrease in the level of TM in blood cultures of CLL patients ($p < 0.05$).

The average value of TM in bystander cell cultures (when cultured joint/separately) was not significantly different from the control ($p > 0.05$). Adding of astaxanthin to the system led to increase in the mean TM value in the cultures of bystander cells ($p < 0.05$).

The mean TM levels and its median values for the inducer cells in the joint/separate culturing were significantly lower than those in individual CLL blood cultures ($p < 0.05$), which was probably a manifestation of a rescue effect. Options with no astaxanthin and with astaxanthin adding were not statistically different in terms of the mean TM values, although median values were significantly different either when compared with data from separate culturing of the CLL patients' cells or with each other featuring 2.33 nm in separate cultivation of the CLL patients' cells, 1.44 nm in case of inducer cells without astaxanthin, and 0.76 nm for inducer cells with astaxanthin.

For a more detailed analysis, a study of the frequency distribution of individual cells according to the relative index of DNA damage (TM) was carried out. According to TM levels, the sample of «comets» in the control was divided into 10 groups (decels) of 10 % cells in each. The limit values of deciles were equal to: 0.57 μm ; 0.95 μm ; 1.55 μm ; 2.15 μm ; 2.71 μm (median TM value); 3.36 μm ; 4.15 μm ; 5.27 μm and 7.98 μm . These values were chosen when forming ten groups for the calculation of TM frequencies based on the data of other variants of the experiment. If the level of TM was equal to the limit, the «comet» was assigned to the next group. As we discussed earlier [24], group 1 includes «comets» with minimal DNA yield, which are formed from cells that have stopped at the S stage of the cell cycle, group 10 includes cells with an extremely high level of DNA damage, groups 2–5 (premedian values of TM) include cells with a low or moderate level of DNA damage, groups 6–9 – cells with a relatively high degree of DNA damage.

When analyzing the distribution of comets into groups upon separate cultivation of blood cells

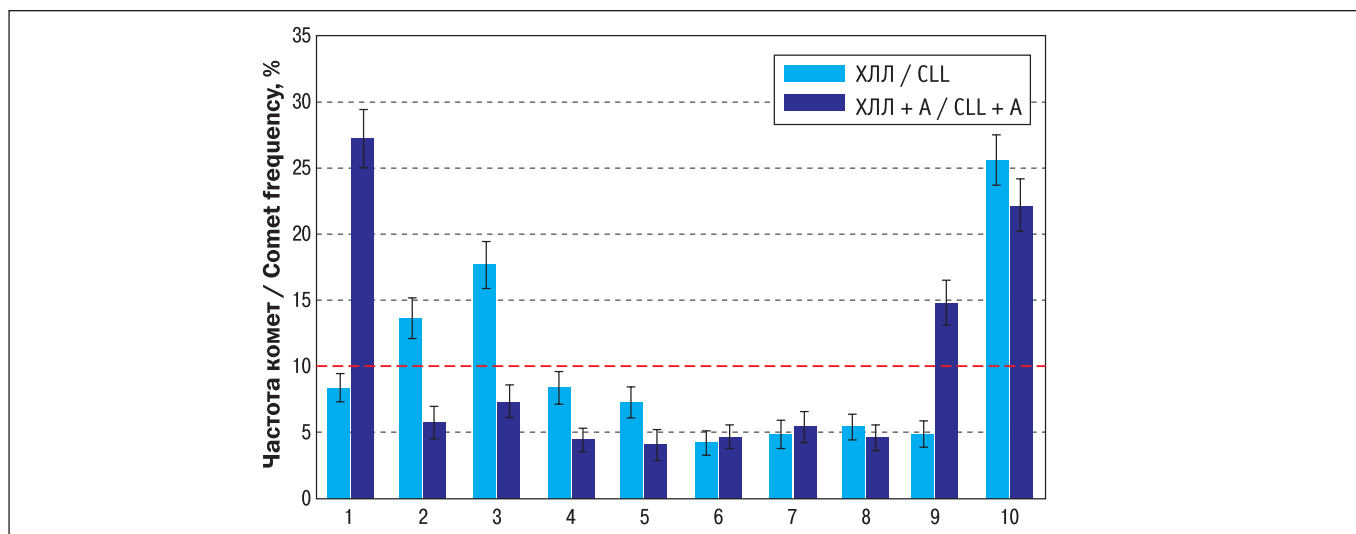


Рисунок 2. Частотний розподіл «комет» за значеннями ТМ при окремому культивуванні клітин крові хворих на ХЛЛ без додавання та з додаванням 20.0 мкг/мл астаксантину (ХЛЛ + А)

По осі абсцис – групи «комет»; 10 % (марковано пунктирною лінією) є контрольним значенням для всіх груп

Figure 2. Frequency distribution of «comets» by TM values in separate cultivation of blood cells of CLL patients without addition (CLL) and with addition of 20.0 µg/ml astaxanthin (CLL+A)

On the abscissa axis are groups of «comets»; 10 % (marked with a dotted line) is the control value for all groups

встановлено статистично значуще ($p < 0,05$) зростання відносної кількості комет з помірним рівнем пошкодження ДНК (групи 2, 3) та з найвищим рівнем пошкодження ДНК (група 10) (рис. 2).

Після сумісно-роздільного культивування ЛПК умовно здорових осіб (клітини-свідки) та хворих на ХЛЛ (клітини-індуктори) частотний аналіз даних дав змогу більш чітко визначити особливості прояву ефекту свідка (рис. 3). Так, в культурах клітин-свідків спостерігалось статистично значуще зростання частоти клітин, які зупинилися на S-фазі клітинного циклу (група 1; $29,48 \pm 1,97$ %), $p < 0,01$), а також збільшення відносної кількості клітин з високим рівнем пошкодження ДНК (група 10; $23,13 \pm 1,82$ %), $p < 0,05$).

Отримані дані вказують на високий рівень генетичної нестабільності в клітинах хворих на ХЛЛ. Після додавання астаксантину спостерігалось зростання кількості комет групи 1 ($p < 0,01$). Оскільки відомо, що при нейтральному варіанті «кометного» електрофорезу у клітин, які знаходяться у S фазі, значно знижується вихід ДНК, то така ситуація свідчить про наявність значної кількості пошкоджених клітин, у яких астаксантин активує чекпойнт на S фазі клітинного циклу, що було показано в наших попередніх дослідженнях [25]. Саме цим можна пояснити значне зниження середнього рівня ТМ у культурах клітин крові хворих на ХЛЛ при додаванні астаксантину в обраній концентрації.

from the CLL patients the relative number of comets in the groups with moderate level of DNA damage i.e. groups 2 and 3 and in the group with highest level of DNA damage i. e. group 10 was increased significantly ($p < 0.05$) (Fig. 2)

After the joint/separate culturing of blood cells from provisionally healthy individuals (the bystander cells) and CLL patients (the inducer cells), the frequency analysis of data allowed a more clear defining of the bystander effect pattern (Fig. 3). Specifically, a significant frequency increase of cells stopped at a S-phase of cell cycle was observed (group 1; 29.48 ± 1.97 %), $p < 0.01$), as well as increase in the relative number of cells with a high level of DNA damage (group 10; 23.13 ± 1.82 %), $p < 0.05$) in the cultures of bystander cells.

The data obtained indicate a high level of genomic instability in the cells from CLL patients. Increased number of comets of the first group was observed after adding the astaxanthin ($p < 0.01$). Since it is known that the neutral variant of 'comet' electrophoresis significantly reduces DNA yield in the cells in S-phase, this pattern indicates the presence of a significant number of damaged cells in which astaxanthin activated the checkpoint in S-phase of cell cycle, as it was shown in our previous studies [25]. Just this suggestion can explain a significant decrease in the mean level of TM in blood cell cultures of CLL patients when astaxanthin was added at the specific concentration.

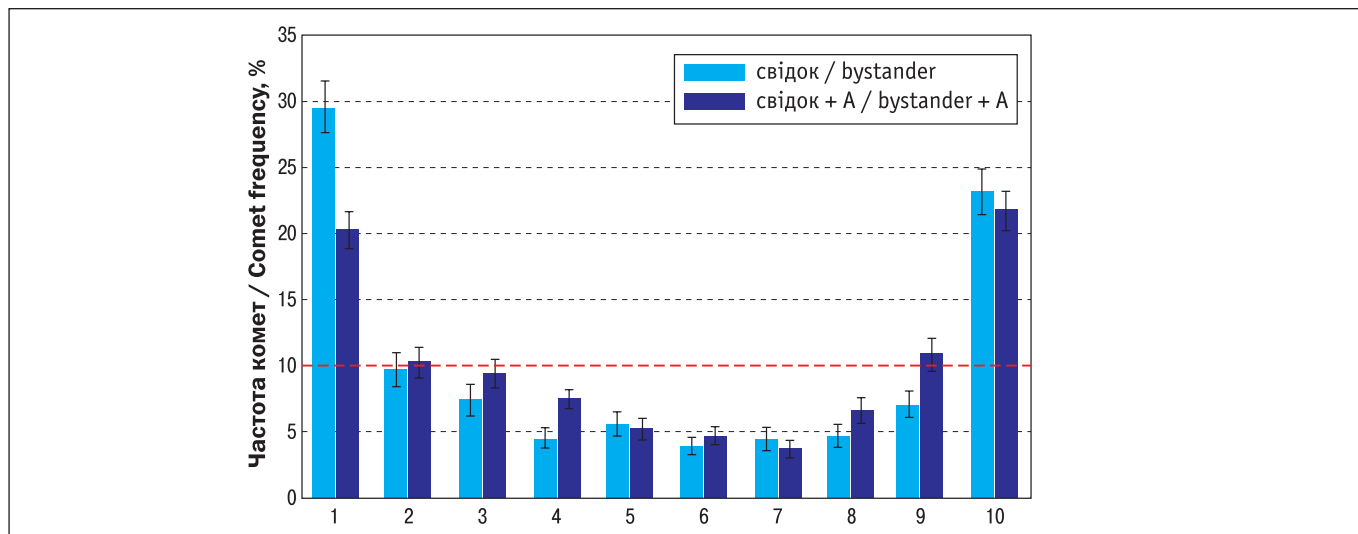


Рисунок 3. Частотний розподіл «комет» за значеннями ТМ в культурах клітин-свідків при сумісно-роздільному культивуванні без додавання (Свідок) та з додаванням 20,0 мкг/мл астаксантину (Свідок + А) По осі абсцис – групи «омет»; 10 % (марковано пунктирною лінією) є контрольним значенням для всіх груп

Figure 3. Frequency distribution of «comets» by TM values in bystander cell cultures during co-separated cultivation without addition (Bystander) and with addition of 20.0 µg/ml astaxanthin (Bystander + A) On the abscissa axis are groups of «comets»; 10 % (marked with a dotted line) is the control value for all groups

Вплив астаксантину при реалізації пухлинно-індукованого ефекту свідка проявився зменшенням рівня клітин-свідків групи 1 ($(20,19 \pm 1,49) \%$, $p < 0,05$) (рис. 3), що може свідчити про послаблення негативного впливу ефекту свідка.

Важливою складовою індукції ефекту свідка є підвищення в клітинах-свідках генерації вільних радикалів кисню [29]. Оксидативний стрес призводить до накопичення пошкоджень ДНК, в результаті чого зупиняється реплікація і активується чекпойнт на S-фазі клітинного циклу [30]. Астаксантин є потужним природним антиоксидантом, і зняття ним наслідків оксидативного стресу може сприяти зменшенню кількості клітин, поділ яких був зупинений на S-фазі.

При дослідженні рівня пошкоджень ДНК в клітинах-індукторах встановлено, що в популяції малігнізованих гемопоетичних клітин, які були одержані від хворих на ХЛЛ, при сумісному культивуванні з клітинами здорових осіб також домінували клітини, які належали до групи 1 (рис. 4). Порівняно з результатами, отриманими при окремому культивуванні, їх частота зросла до $(30,54 \pm 6,33) \%$, ($p < 0,01$). Водночас спостерігається зменшення кількості «комет», що належать до групи 10: $(25,53 \pm 2,01) \%$ – при окремому культивуванні, $(14,84 \pm 4,88) \%$ – при спільно-роздільному, $p < 0,05$. Представлені результати свідчать про наявність «позитивного» зворотного ефекту свідка, при якому активуються системи репарації ДНК (активація чекпойнта на S-

The impact of astaxanthin on bystander cells in realization of the tumour-induced bystander effect appeared as a decreased level of cells in the first group – $(20.19 \pm 1.49) \%$, $p < 0.05$, (Fig. 3), which may indicate a weakened negative impact of the bystander effect.

Increased generation of the oxygen free radicals in bystander cells is an important component of induction of the bystander effect [29]. Oxidative stress leads to accumulation of DNA damages, resulting in replication arrest and checkpoint activation in the S-phase of cell cycle [30]. Astaxanthin is known to be a powerful natural antioxidant and removal of the effects of oxidative stress under its impact can help reduce the number of cells whose division has been stopped in S-phase.

Studying the level of DNA damage in the inducer cells it was found that in population of malignant haematopoietic cells obtained from CLL patients, when co-cultured with cell from healthy individuals, the cells from the first group also dominated (Fig. 4). Compared to results obtained in a separate cultivation, their frequency increased to $(30.54 \pm 6.33) \%$, $p < 0.01$. At the same time, there was a decrease in the number of 'comets' belonging to group 10, namely $(25.53 \pm 2.01) \%$ in separate cultivation and $(14.84 \pm 4.88) \%$ in joint/separate cultivation ($p < 0.05$). The presented results indicate to a «positive» rescue effect, in which the DNA repair systems are activated featuring a checkpoint activation in S-phase of the cell

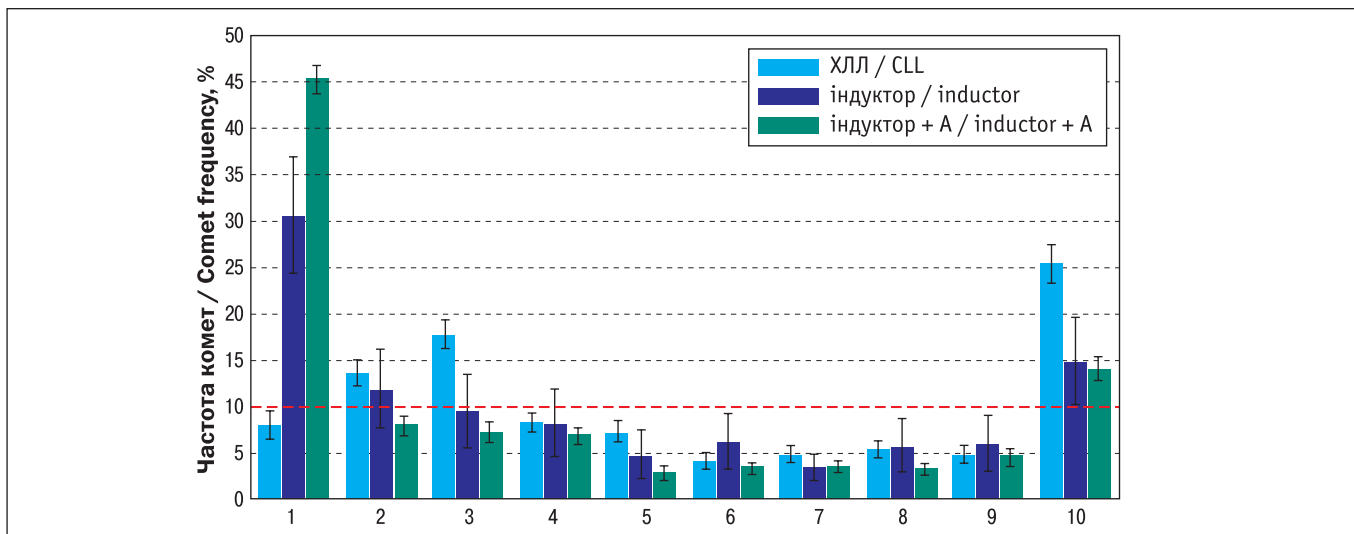


Рисунок 4. Розподіл «комет» по групах за значеннями ТМ після окремого культивування клітин крові хворих на ХЛЛ та після сумісно-роздільного культивування з лімфоцитами умовно здорових осіб без додавання (Індуктор) і з додаванням 20,0 мкг/мл астаξανтину (Індуктор + А)

По осі абсцис – групи «комет»; 10 % (марковано пунктирною лінією) є контрольним значенням для всіх груп

Figure 4. Division of «comets» into groups by TM values after separate cultivation of blood cells from CLL patients and after co-culture with lymphocytes from healthy individuals without addition (Inducer) and with addition of 20.0 µg/ml astaxanthin (Inducer + A)

On the abscissa axis are groups of «comets»; 10 % (marked with a dotted line) is the control value for all groups

фазі клітинного циклу), що може призводити до зменшення кількості клітин з високим рівнем рівнем пошкодження ДНК.

При спільно-роздільному культивуванні з попереднім введенням астаξανтину в культури клітин крові хворих на ХЛЛ відбувається статистично значуще збільшення частоти «комет» групи 1 ((45,33 ± 1,65) %, $p < 0,05$), яка відповідає клітинам, поділ яких зупинений на S-стадії клітинного циклу. Звертає на себе увагу, що при модифікації зворотного ефекту свідка астаξανтин діє протилежним чином, ніж в ситуації, яку спостерігали при маніфестації прямого ефекту. Імовірно, для реалізації зворотного ефекту свідка оксидативний стрес в клітинах-індукторах не є важливим, і посилення астаξανтином прояву зворотного ефекту свідка ймовірно відбувається шляхом посилення процесів репарації в клітинах-індукторах з високим рівнем пошкодження ДНК.

Відомо, що одним із проявів ефекту свідка (в тому числі пухлинно-індукованого), є зростання частоти апоптичних клітин [29]. За нашими попередніми результатами, радіопротекторні властивості астаξανтину частково пояснюються його здатністю активувати апоптоз в клітинах із сублетальною кількістю пошкоджень ДНК [25]. Тому додатково нами був проведений аналіз апоптичної активності в культурах клітин крові здорових осіб та хворих на ХЛЛ при окремому та сумісно-роздільному культивуванні.

cycle, which can lead to a decreased number of cells with a high level of DNA damage.

There was a significant increase in the frequency of group 1 «comets» ((45.33 ± 1.65) %, $p < 0.05$), which corresponded to the cells which division was stopped at the S-stage of the cell cycle when the blood cell cultures from CLL patients were jointly/separately cultured with preliminary administration of astaxanthin. It is notably that when modifying the rescue effect the astaxanthin acted in an opposite way than it was observed in manifestation of the direct effect. Oxidative stress in the inducer cells is probably not essential for realization of bystander effect, thus astaxanthin enhanced the manifestation of bystander effect likely by intensification of the repair processes in the inducer cells with a high level of DNA damage.

It is known that increased frequency of apoptotic cells is one of the manifestations of bystander effect, including the tumor-induced one [29]. According to our previous data, the radioprotective properties of astaxanthin are in a part explained by its ability to activate apoptosis in the cells with sublethal amounts of DNA damage [25]. Therefore, there was conducted an additional analysis of apoptotic activity in the blood cell cultures of healthy individuals and CLL patients in a separate and a joint/separate culturing.

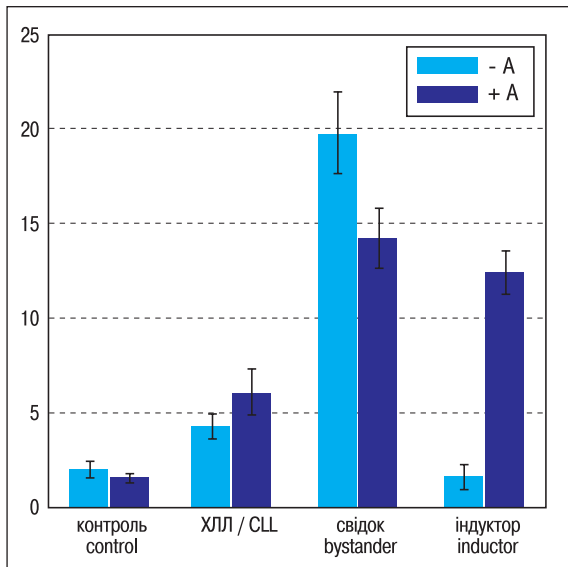


Рисунок 5. Вплив астаксантину на частоту клітин у стані апоптозу при окремому (контроль та ХЛЛ) та спільному культивуванні (Свідок та Індуктор) клітин хворих на ХЛЛ та умовно здорових осіб

-A – культури без додавання астаксантину, +A – культури з додаванням 20.0 мкг/мл астаксантину

Figure 5. The impact of astaxanthin on the frequency of cells in apoptosis in separate (control and CLL) and co-cultured (Bystander and Inductor) cells of CLL patients and healthy subjects

-A – culture without addition of astaxanthin, +A – culture with addition of 20.0 µg/ml astaxanthin

Оскільки в клітині під час реалізації процесів апоптозу відбувається тотальна фрагментація геномної ДНК, то після проведення кометного електрофорезу спостерігається масовий вихід фрагментів ДНК в агарозний гель. Тому для оцінки інтенсивності апоптичних процесів проводився аналіз частоти «атипових» комет.

Дані щодо апоптогенної активності в культурах клітин крові для різних варіантів експерименту представлені на рис. 5.

При визначенні апоптичної активності в окремих культурах ЛПК умовно здорових осіб було встановлено, що частота клітин в стані апоптозу дорівнює $(2,12 \pm 0,39) \%$. Додавання астаксантину не призвело до суттєвої зміни апоптичної активності в культурі клітин здорових осіб $(1,67 \pm 0,17) \%$, $(p > 0,05)$, що відповідає нашим попереднім даним [25].

Частота клітин в стані апоптозу в культурі ЛПК крові хворих на ХЛЛ при окремому культивуванні була статистично значуще вищою, порівняно з показником у культурах ЛПК умовно здорових осіб, і дорівнювала $(4,36 \pm 0,74) \%$, $(p < 0,05)$. Вірогідної зміни апоптичної активності культур під дією астаксантину не спостерігалось.

Після спільно-роздільного культивування клітин крові, одержаних від хворих на ХЛЛ та ЛПК умовно здорових осіб відмічено статистично значуще $(p < 0,01)$ зростання частоти клітин в стані апоптозу в культурах клітин-свідків з $(2,12 \pm 0,39) \%$ до $(19,72 \pm 2,23) \%$, що характерно для маніфестації прямого ефекту свідка. Особливу увагу привертає той факт, що в культурах клітин-індукторів, навпаки, спостерігалось суттєве зниження апоптичної активності, порівняно з окремою культурою лімфоцитів хворих на ХЛЛ з $(4,36 \pm 0,74) \%$ до $(1,69 \pm 0,68) \%$, $(p < 0,05)$. Це можна пояснити або активацією сис-

Since total fragmentation of genomic DNA occurs in the cell during apoptosis, a massive release of DNA fragments into the agarose gel was observed upon comet electrophoresis. Therefore, to assess the intensity of apoptotic processes, the frequency of «atypical» comets was analyzed.

Data on apoptogenic activity in the blood cell cultures for a range of experimental variants are shown in Fig. 5.

While assaying the apoptotic activity in individual PBL cultures of healthy subjects, it was found that the frequency of cells in the state of apoptosis was $(2,12 \pm 0,39) \%$. Adding of astaxanthin led to no significant change in apoptotic activity in the cell culture of healthy individuals $(1,67 \pm 0,17) \%$, $(p > 0,05)$, which correlated with our previous data [25].

Frequency of cells in the state of apoptosis in the PBL culture of CLL patients in separate culturing was significantly higher $(4,36 \pm 0,74) \%$, $(p < 0,05)$ compared to the PBL cultures of provisionally healthy individuals. No significant changes in apoptotic activity of cultures under the impact of astaxanthin were observed.

Upon joint/separate cultivation of blood cells obtained from CLL patients and provisionally healthy volunteers, there was a statistically significant $(p < 0,01)$ increase in the frequency of apoptotic cells in bystander cell cultures, namely from $(2,12 \pm 0,39) \%$ to $(19,72 \pm 2,23) \%$, which was typical for the presentation of a direct bystander effect. Particular attention was drawn to the fact that in cultures of inducer cells, conversely, a significant decrease in apoptotic activity was observed compared to a separate culture of lymphocytes from CLL patients i. e. from $(4,36 \pm 0,74) \%$ to

тем репарації, і, відповідно, зниження пулу клітин, які повинні стати на шлях апоптозу, або блокуванням проапоптотичних сигналів факторами, які виділяють клітини-свідки. Проте це припущення потребує подальших досліджень.

Вплив астаксантину на рівень апоптотичної активності в культурах клітин-свідків та клітин-індукторів характеризувався різною спрямованістю. Додавання астаксантину в обраній концентрації до культури клітин-свідків призводило до статистично значущого зниження частоти клітин в стані апоптозу до $(14,27 \pm 1,62) \%$, ($p < 0,05$). Це також підтверджує наше припущення, що астаксантин здатен «полегшувати» негативні наслідки прямого ефекту свідка за рахунок зниження оксидативного стресу в клітинах-свідках та активації репараційних систем. У культурах клітин-індукторів астаксантин збільшував апоптотичну активність з $(1,69 \pm 0,68) \%$ до $(12,53 \pm 1,11) \%$, ($p < 0,05$). Пояснюючи зміни розподілу комет по групах при дії астаксантину на клітини-індуктори, ми припустили, що каротиноїд модифікує прояв зворотного ефекту свідка за рахунок додаткової стимуляції репараційних систем, які вже є активними під впливом ЛПК нормальних клітин. Логічно припустити, що додаткова активація генної експресії може стосуватися не тільки безпосередньо репараційних систем, але й може призвести до запуску раніше заблокованих в трансформованих клітинах шляхів апоптозу.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що астаксантин впливає на розвиток як прямого, так і зворотного пухлинно-індукованого ефектів свідка.
2. При сумісно-роздільному культивуванні лімфоцитів периферичної крові умовно здорових осіб (клітини-свідки) і клітин крові хворих на ХЛЛ (клітини-індуктори) спостерігаються прояви як прямого, так і зворотного пухлинно-індукованих ефектів свідка.
3. Прямий ефект характеризується високим рівнем комет, які відповідають клітинам, що знаходяться на S-фазі, та зростанням апоптотичної активності в культурах клітин-свідків.
4. Зворотний ефект в культурі клітин-індукторів проявлявся як збільшення частоти клітин, які затрималися на S-фазі, зменшення частки клітин з високим рівнем пошкодження ДНК і зниження рівня клітин на стадії апоптозу.
5. Під дією астаксантину в культурах клітин-свідків значуще зменшився рівень як клітин на S-фазі, так

$(1,69 \pm 0,68) \%$, ($p < 0,05$). It can be explained either by activation of the repair systems, and, accordingly, a decrease in the pool of cells that should enter the pathway of apoptosis, or by the blocking of proapoptotic signals by factors secreted by the bystander cells. However, this suggestion requires further research.

Impact of astaxanthin on the level of apoptotic activity in the cultures of bystander cells and inducer cells was multidirectional. Adding of astaxanthin in specific concentration to the culture of bystander cells led to a significant decrease in frequency of apoptotic cells, namely down to $(14.27 \pm 1.62) \%$, ($p < 0.05$). This also confirmed our assumption that astaxanthin can «alleviate» the negative consequences of the direct bystander effect by reducing the oxidative stress in bystander cells and activating the repair systems. In cultures of inducer cells astaxanthin increased the apoptotic activity from $(1.69 \pm 0.68) \%$ to $(12.53 \pm 1.11) \%$ ($p < 0.05$). To explain the changes in distribution of comets by groups under the impact of astaxanthin on the inducer cells, we assumed that the carotenoid modifies the manifestation of rescue effect by additional stimulation of repair systems being already active under the influence of normal PBLs [30]. It is logical to assume that the additional activation of gene expression may not only directly affect the repair systems, but may also lead to the launch of apoptosis pathways previously blocked in the transformed cells.

CONCLUSIONS

1. Astaxanthin has been found to influence the development of both direct and rescue tumor-induced bystander effects.
2. Under joint/separate culturing of peripheral blood lymphocytes of provisionally healthy individuals (the bystander cells) and blood cells of CLL patients (the inducer cells) the manifestations of both direct and rescue tumor-induced bystander effects were observed.
3. The direct effect was characterized by a high level of comets, corresponding to the cells in S-phase, and increased apoptotic activity in the control cell cultures.
4. The rescue effect in the culture of inducer cells was manifested as the increased frequency of cells stopped in S-phase, decreased proportion of cells with a high level of DNA damage, and decreased level of cells in apoptosis.
5. Under the impact of astaxanthin the level of both S-phase cells and apoptotic cells in the cultures of

і апоптичних клітин ($p < 0,05$). Вплив астаξανтину на клітини-індуктори був протилежним: спостерігалось збільшення частоти клітин на S-фазі та зростання апоптичної активності в культурах ($p < 0,05$).

6. З'ясування молекулярних механізмів модифікації астаξανтином прямого та зворотного пухлино-індукованого ефектів свідка, а також встановлення можливих позитивних чи негативних наслідків цієї модифікації з точки зору прогнозування та лікування онкологічних захворювань потребують подальших досліджень.

Інформація про фінансування

Фінансування видатками Державного бюджету України.

Робота виконана в рамках планової НДР «Дослідження модифікації радіаційно-індукованих та пухлинно-індукованих пошкоджень генома в лімфоцитах периферичної крові осіб з гліобластомою», № держреєстрації: 0123U101591, шифр роботи № 642

Конфлікт інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. 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.
2. Widell 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. P. 1-17. doi: 10.4236/ijmpcero.2016.51001.
3. 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.
4. 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: 10.1667/0033-7587(2003)159[0567:nadeoe]2.0.co;2.
5. Up-regulation of ROS by mitochondria-dependent bystander signaling contributes to geno-toxicity of bystander effects / S. Chen, Y. Zhao, G. Zhao et al. *Mutat. Res.* 2009. Vol. 666. P. 68-73. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.04.006.
6. 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.
7. Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo / C. E. Redon, J. S. Dickey, A. J. Nakamura et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. Vol. 107, no. 42. P. 17992-17997. doi: 10.1073/pnas.1008260107.

control cells significantly decreased ($p < 0.05$). Effect of astaxanthin on inducer cells was the opposite, featuring an increase in frequency of cells in S-phase and an increase in apoptotic activity in cultures ($p < 0.05$).

6. Elucidation of molecular mechanisms of the direct and rescue tumor-induced bystander effects modification by astaxanthin, as well as establishing of possible positive or negative consequences of this modification in a view of prognosis and treatment of cancer require further research.

Funding information

Funding by expenditures of the State Budget of Ukraine.

The work was carried out within the framework of the planned RDP «Study of modification of radiation-induced and tumor-induced genome damage in peripheral blood lymphocytes of individuals with glioblastoma» State registration # 0123U101591, code № 642.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. 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.
2. Widell 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.
3. 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.
4. Morgan WF. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiat Res.* 2003;159(5):567-580. doi: 10.1667/0033-7587(2003)159[0567:nadeoe]2.0.co;2.
5. 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.* 2009;666(1-2):68-73. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.04.006.
6. Wang R, Zhou T, Liu W, Zuo L. Molecular mechanism of bystander effects and related abscopal/cohort effects in cancer therapy. *Oncotarget.* 2018;9(26):18637-18647. doi: 10.18632/oncotarget.24746.
7. Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Kareva IG, Naf D, Nowsheen S et al. Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(42): 17992-17997. doi: 10.1073/pnas.1008260107.

8. Choi D. K., Helenowski I., Hijiya N. Secondary malignancies in pediatric cancer survivors: perspectives and review of the literature. *Int J Cancer*. 2014. Vol. 135. P. 1764-1773. doi: 10.1002/ijc.28991.
9. Increased risk of second malignant neoplasms in adolescents and young adults with cancer / J. S. Lee, S. G. DuBois, P. F. Coccia et al. *Cancer*. 2016. Vol. 122. P. 116-123. doi: 10.1002/cncr.29685.
10. Excessive risk of second primary cancers in young-onset colorectal cancer survivors / X. He, W. Wu, Y. Ding et al. *Cancer Medicine*. 2018. Vol. 7. P. 1201-1210. doi: 10.1002/cam4.1437.
11. Rescue effects in radiobiology: Unirradiated bystander cells assist irradiated cells through intercellular signal feedback / S. Chen, Y. Zhao, W. Han et al. *Mutat. Res*. 2011. Vol. 706. P. 59-64. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2010.10.011.
12. Bystander WI-38 cells modulate DNA double-strand break repair in microbeam-targeted A549 cells through gap junction intercellular communication / A. Kobayashi, N. Autsavapromporn, T. Ahmad et al. *Radiat. Protect. Dosimetry*. 2018. P. 1-5. doi: 10.1093/rpd/ncy249.
13. Bystander normal human fibroblasts reduce damage response in irradiated targeted cancer cells through intercellular ROS level modulation / M. Widel, W. M. Przybyszewski, A. Cieslar-Pobuda et al. *Mutat. Res*. 2012. Vol. 731, no. 1-2. P. 117-124. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.12.007.
14. Verma V., Lin S. H. Implications of the bystander and abscopal effects of radiation therapy. *Clin. Cancer Res*. 2016. Vol. 22, no. 19. P. 4763-4765. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1512.
15. The abscopal effect associated with a systemic anti-melanoma immune response / E. F. Stamell, J. D. Wolchok, S. Gnjatic et al. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 2013. Vol. 85. P.293-295. doi: 10.1016/j.ijrobp.2012.03.017.
16. Abscopal effects of radiotherapy on advanced melanoma patients who progressed after ipilimumab immunotherapy / A. M. Grimaldi, E. Simeone, D. Giannarelli et al. *Oncoimmunology*. 2014. no. 3. P. 28780. doi: 10.4161/onci.28780.
17. Rationale for harnessing the abscopal effect as potential treatment for metastatic uveal melanoma / S. A. Batson, M. P. Breazzano, R. W. Milam et al. *Int. Ophthalmol. Clin*. 2017. Vol. 57. P. 41-48. doi: 10.1097/IIO.000000000000152.
18. Damaging and protective bystander cross-talk between human lung cancer and normal cells after proton microbeam irradiation / S. Desai, A. Kobayashi, T. Konishi et al. *Mutat. Res*. 2014. Vol. 763-764. P. 39-44. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.03.004.
19. Ghosh S., Ghosh A., Krishna M. Role of ATM in bystander signaling between human monocytes and lung adenocarcinoma cells. *Mutat. Res*. 2015. Vol. 794. P. 39-45. doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.10.003.
20. Leukemia in clean-up workers: radiation, professional and lifestyle risks / D. Bazyka, I. Dyagil, N. Gudzenko et al. Health effects of the Chernobyl accident – thirty years aftermath. Kyiv: DIA, 2016. P. 68-76. doi: 10.1097/HP.0000000000000440.
21. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications – a review / R. R. Ambati, S. M. Choi DK, Helenowski I, Hijiya N. Secondary malignancies in pediatric cancer survivors: perspectives and review of the literature. *Int J Cancer*. 2014;135(8):1764-1773. doi: 10.1002/ijc.28991.
9. Lee JS, DuBois SG, Coccia PF, Bleyer A, Olin RL, Goldsby RE. Increased risk of second malignant neoplasms in adolescents and young adults with cancer. *Cancer*. 2016;122(1):116-123. doi: 10.1002/cncr.29685.
10. He X, Wu W, Ding Y, Li Y, Si J, Sun L. Excessive risk of second primary cancers in young-onset colorectal cancer survivors. *Cancer Med*. 2018;7(4):1201-1210. doi: 10.1002/cam4.1437.
11. Chen S, Zhao Y, Han W, Chiu SK, Zhu L, Wu L et al. Rescue effects in radiobiology: unirradiated bystander cells assist irradiated cells through intercellular signal feedback. *Mutat Res*. 2011;706(1-2):59-64. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2010.10.011.
12. Kobayashi A, Autsavapromporn N, Ahmad TAFT, Oikawa M, Homma-Takeda S, Furusawa Y et al. Bystander WI-38 cells modulate DNA double-strand break repair in microbeam-targeted A549 cells through gap junction intercellular communication. *Radiat Prot Dosimetry*. 2019;183(1-2):142-146. doi: 10.1093/rpd/ncy249.
13. Widel M, Przybyszewski WM, Cieslar-Pobuda A, Saenko YV, Rzeszowska-Wolny J. Bystander normal human fibroblasts reduce damage response in radiation targeted cancer cells through intercellular ROS level modulation. *Mutat Res*. 2012;731(1-2):117-124. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.12.007.
14. Verma V, Lin SH. Implications of the bystander and abscopal effects of radiation therapy. *Clin Cancer Res*. 2016;22(19):4763-4765. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1512.
15. Stamell EF, Wolchok JD, Gnjatic S, Lee NY, Brownell I. The abscopal effect associated with a systemic anti-melanoma immune response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013;85(2):293-295. doi: 10.1016/j.ijrobp.2012.03.017.
16. Grimaldi AM, Simeone E, Giannarelli D, Muto P, Falivene S, Borzillo V et al. Abscopal effects of radiotherapy on advanced melanoma patients who progressed after ipilimumab immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2014;3:e28780. doi: 10.4161/onci.28780.
17. Batson SA, Breazzano MP, Milam RW Jr, Shinohara E, Johnson DB, Daniels AB. Rationale for harnessing the abscopal effect as potential treatment for metastatic uveal melanoma. *Int Ophthalmol Clin*. 2017;57(1):4148. doi: 10.1097/IIO.000000000000152.
18. Desai S, Kobayashi A, Konishi T, Oikawa M, Pandey BN. Damaging and protective bystander cross-talk between human lung cancer and normal cells after proton microbeam irradiation. *Mutat Res*. 2014;763-764:39-44. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.03.004.
19. Ghosh S, Ghosh A, Krishna M. Role of ATM in bystander signaling between human monocytes and lung adenocarcinoma cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;794:39-45. doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.10.003.
20. Bazyka D, Gudzenko N, Dyagil I, Goroh E, Polyschuk O, Trotsuk N et al. Chronic lymphocytic leukemia in Chernobyl cleanup workers. *Health Phys*. 2016;111(2):186-191. doi: 10.1097/HP.0000000000000440.

- Phang, S. Ravi, R. G. Aswathanarayana. *Mar. Drugs*. 2014. Vol. 12. P. 128-152. doi: 10.3390/md12010128.
22. Astaxanthin as a modifier of genome instability after γ -radiation / D. Kurinnyi, S. Rushkovsky, O. Demchenko, M. Pilinska. In: *Progress in carotenoid research* / ed. by L. Zepka, E. Jacob-Lopes, V. Vera De Rosso. London : In Tech Open, 2018. P. 121-138. doi: 10.5772/intechopen.73775.
23. Kurinnyi D. A., Rushkovsky S. R., Demchenko O. M., Pilinska M. A. Study the impact of astaxanthin on developing of genomic instability in human peripheral blood lymphocytes irradiated in vitro on G2 phase of cell cycle. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2017. Iss. 22. P. 208-215. doi:10.33145/2304-8336-2017-22-208-215.
24. Peculiarities of modification by astaxanthin of radiation-induced damages in the genome of human blood lymphocytes exposed in vitro on different stages of the mitotic cycle / D. A. Kurinnyi, S. R. Rushkovsky, O. M. Demchenko, M. A. Pilinska. *Cytology and Genetics*. 2018. Vol. 52, no. 1. P. 40-45. doi: 10.3103/s0095452718010073.
25. Comparison of the modifying action of astaxanthin on the development of radiation-induced chromosome instability in human blood lymphocytes irradiated in vitro at different cell cycle stages / D. A. Kurinnyi, S. R. Rushkovskiy, O. M. Demchenko et al. *Cytology and Genetics*. 2018. Vol. 52, no. 5. P. 368-373. doi: 10.3103/S0095452718050055.
26. 30 years of the comet assay: an overview with some new insights / ed. by A. Azqueta, S. Langie, A. Collins. *Frontiers Media SA*, 2015. doi: 10.3389/978-2-88919-649-4.
27. 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. Vol. 178, no. 2. P. AV35-AV42. doi: 10.1667/rrav04.1.
28. Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 8th ed. Cengage Learning, 2015. 962 p.
29. The mechanisms of radiation-induced bystander effect / M. Najafi, R. Fardid, Gh. Hadadi et al. *Biomed. Phys. Eng.* 2014. Vol. 4, no. 4. P.163-172.
30. Mechanism of radiation-induced bystander effects: a unifying model / T. K. Hei, H. Zhou, V. N. Ivanov et al. *Geard. Pharm. Pharmacol.* 2008. Vol. 60, no. 8. P. 943-950. doi: 10.1211/jpp.60.8.0001.
21. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications – a review / R. R. Ambati, S. M. Phang, S. Ravi, R. G. Aswathanarayana. *Mar. Drugs*. 2014. Vol. 12. P. 128-152. doi: 10.3390/md12010128.
22. Astaxanthin as a modifier of genome instability after γ -radiation / D. Kurinnyi, S. Rushkovsky, O. Demchenko, M. Pilinska. In: *Progress in carotenoid research* / ed. by L. Zepka, E. Jacob-Lopes, V. Vera De Rosso. London: In Tech Open; 2018. P. 121-138. doi: 10.5772/intechopen.73775
23. Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Demchenko OM, Pilinska MA. Study the impact of astaxanthin on developing of genomic instability in human peripheral blood lymphocytes irradiated in vitro on G2 phase of cell cycle. *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2017;22:208-215. doi: 10.33145/2304-8336-2017-22-208-215.
24. Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Demchenko OM, Pilinska MA. Peculiarities of modification by astaxanthin of radiation-induced damages in the genome of human blood lymphocytes exposed in vitro on different stages of the mitotic cycle. *Cytol Genet.* 2018;52(1): 40-45. doi: 10.3103/s0095452718010073.
25. Kurinnyi DA, Rushkovskiy SR, Demchenko OM et al. Comparison of the modifying action of astaxanthin on the development of radiation-induced chromosome instability in human blood lymphocytes irradiated in vitro at different cell cycle stages. *Cytol. Genet.* 2018; 52(1):368-373. doi: 10.3103/S0095452718050055.
26. 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.
27. Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the «comet» assay. 1990. *Radiat Res.* 2012;178(2):AV35-42. doi: 10.1667/rrav04.1.
28. Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 8th ed. Cengage Learning, 2015. 962 p.
29. Najafi M, Fardid R, Hadadi G, Fardid M. The mechanisms of radiation-induced bystander effect. *J Biomed Phys Eng.* 2014;4(4):163-172.
30. Hei TK, Zhou H, Ivanov VN, Hong M, Lieberman HB, Brenner DJ et al., Mechanism of radiation-induced bystander effects: a unifying model. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60(8):943-950. doi: 10.1211/jpp.60.8.0001.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

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>

Демченко Олена Миколаївна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії генетичних та епігенетичних досліджень, відділ медичної гене-

INFORMATION ABOUT AUTHORS

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 Kyiv National University, Kyiv, Ukraine

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4497-3782>

Olena M. Demchenko, Candidate of Biological Sciences, Senior Research Assicuate, Laboratory of Genetic and Epigenetic Research, Department of Medical Genetics, Insti-

тики, Інститут експериментальної радіології, ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини, гематології та онкології НАМН України», Київ, Україна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6414-7795>

Романенко Марина Геннадіївна, 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>

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>

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>

tute 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/0000-0002-6414-7795>

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>

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, Ukraine

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0982-3463>

Denys A. Kurinnyi, Candidate of Biological Sciences, Head of the 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 of Ukraine», Kyiv, Ukraine

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9976-6898>

Стаття надійшла до редакції 17.09.2024

Received: 17.09.2024