

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

О. В. Шеметун✉, О. О. Талан, О. Б. Дибська

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

ДОСЛІДЖЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ ХРОМОСОМ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ ПРИ РОЗВИТКУ ВТОРИННОГО РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО ЕФЕКТУ СВІДКА

Мета: встановити рівень хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові людини при розвитку вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка.

Матеріали і методи. Лімфоцити периферичної крові людини; культура клітин недрібноклітинного раку легень людини лінії А-549 (опромінена *in vitro* ^{137}Cs в дозі 0,50 Гр/неопромінена). Цитогенетичний аналіз рівномірно забарвлених хромосом лімфоцитів периферичної крові людини з визначенням частоти всіх типів аберацій.

Результати. Середньогрупова частота аберацій хромосом (4,75 на 100 клітин) у лімфоцитах периферичної крові людини, що культивувались з додаванням кондиційного культурального середовища від клітин-свідків недрібноклітинного раку легень людини клітинної лінії А-549, перевищувала контрольну (1,60 на 100 клітин) ($p < 0,001$) за рахунок збільшення частоти одиночних фрагментів від 1,20 до 3,95 на 100 клітин ($p < 0,001$). Середньогрупові частоти аберацій хромосом і аберацій хроматидного типу в лімфоцитах периферичної крові людини за розвитку первинного (5,80 і 4,35 на 100 клітин відповідно) і вторинного (4,75 і 3,95 на 100 клітин відповідно) радіаційно-індукованого ефекту свідка значуще не відрізнялись одна від одної ($p > 0,05$).

Висновки. За культивування лімфоцитів периферичної крові людини з додаванням кондиційного середовища від клітин-свідків недрібноклітинного раку легень людини А-549 зареєстровано вторинний радіаційно-індукований ефект свідка, цитогенетичним проявом якого було підвищення рівня хромосомної нестабільності внаслідок збільшення частоти аберацій хроматидного типу (одиночних фрагментів). Рівні аберацій хромосом хроматидного типу при розвитку первинного і вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка значуще не відрізнялися. Розвиток вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка не вплинув на індукцію аберацій хромосомного типу.

Ключові слова: радіаційно-індукований ефект свідка; лімфоцити периферичної крові людини; аберації хромосом; клітини недрібноклітинного раку легень людини лінії А-549.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2024. Вип. 29. С. 228–242. doi: 10.33145/2304-8336-2024-29-228-242

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

O. V. Shemetun✉, O. A. Talan, O. B. Dibska

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

STUDY OF CHROMOSOME STABILITY OF HUMAN SOMATIC CELLS IN THE DEVELOPMENT OF THE SECONDARY RADIATION-INDUCED BYSTANDER EFFECT

Objective. To establish the level of chromosomal instability in human peripheral blood lymphocytes during the development of secondary radiation-induced bystander effect.

Materials and methods. Human peripheral blood lymphocytes; culture of human non-small-cell lung cancer cell line A549 (irradiated in vitro by ^{137}Cs in a dose of 0.50 Gy/unirradiated). Cytogenetic analysis of uniformly colored chromosomes of human peripheral blood lymphocytes with determination of the frequency of all types of aberrations.

Results. The mean group frequency of chromosome aberrations (4.75 per 100 cells) in human peripheral blood lymphocytes co-cultivated with conditioned culture medium from bystander cells of human non-small cell lung cancer cell lines A-549 exceeded the control (1.60 per 100 cells) ($p < 0.001$) due to an increase in the frequency of single fragments from 1.20 to 3.95 per 100 cells ($p < 0.001$). The mean group frequency of chromosome aberrations and chromatid-type aberrations in human peripheral blood lymphocytes during the development of primary (5.80 and 4.35 per 100 cells, respectively) and secondary (4.75 and 3.95 per 100 cells, respectively) radiation-induced bystander effect did not significantly differ from each other ($p > 0.05$).

Conclusions. Under the conditions of co-cultivation of human peripheral blood lymphocytes with conditioned culture medium from bystander cells of human non-small cell lung cancer A-549, a secondary radiation-induced bystander effect was registered, the cytogenetic manifestation of which was an increase in the level of chromosomal instability due to the rise in the frequency of chromatid-type aberrations (single fragments). The levels of chromatid-type chromosome aberrations during the development of the primary and secondary radiation-induced bystander effect did not differ significantly. The development of the secondary radiation-induced bystander effect did not affect the induction of chromosomal-type aberrations.

Key words: radiation-induced bystander effect; human peripheral blood lymphocytes; chromosome aberrations; human non-small cell lung cancer cell lines A-549.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2024;29:228-242. doi: 10.33145/2304-8336-2024-29-228-242

ВСТУП

Традиційна концепція радіобіології базується на теорії мішені, згідно з якою всі біологічні ефекти при опроміненні клітин є наслідком прямого пошкодження іонізуючим випромінюванням хроматину ядра, генетичного апарату мітохондрій, мембранної системи клітин [1]. Проте ця модель змінилась після відкриття немішеневих ефектів дії іонізуючого випромінювання, які стосуються біологічних змін у неопромінених клітинах, що зазнали пошкодження від безпосередньо опромінених клітин [2–5]. Відкриття пухлинно-індукованого ефекту свідка та рятувального ефекту дозволило говорити про універсальність феномену ефекту свідка як відповіді організму на генотоксичний стрес [6–8]. Описано явище вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка, коли первинні клітини-свідки виступають індукторами пошкоджень в

INTRODUCTION

The traditional concept of radiobiology is based on the theory of the target, according to which all biological effects of cell irradiation are the result of direct damage by ionizing radiation to the chromatin of the nucleus, the genetic apparatus of mitochondria, and the membrane system of cells [1]. This model changed after the discovery of non-target effects of ionizing radiation, which refer to biological changes in non-irradiated cells that were damaged by directly irradiated cells [2–5]. The discovery of the tumor-induced bystander effect and the rescue effect made it possible to talk about the universality of the phenomenon of the bystander effect as an organism's response to genotoxic stress [6–8]. The phenomenon of the secondary radiation-

✉ Olena V. Shemetun, e-mail: shemetun@ukr.net

оточуючих або віддалених клітинах [9, 10]. Її індукція може сприяти поширенню геномної нестабільності в організмі, який зазнав опромінення, що важливо враховувати при проведенні променевої терапії онкологічних захворювань для запобігання розвитку вторинних злоякісних новоутворень радіаційного генезу [11].

При моделюванні радіаційно-індукованого ефекту свідка часто використовують перещеплювані культури клітин. Культуру клітин недрібноклітинного раку легень людини А-549 застосовували, здебільшого, як свідка для дослідження проліферації, росту, апоптозу, метастазування, утворення мікроядер та розривів ДНК в онкотрансформованих клітинах при взаємодії з опроміненими нормальними/пухлинними клітинами [12–15]. Ми змоделювали розвиток вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка з застосуванням клітин А-549 як індукторів байстендер сигналу в інтактних лімфоцитах периферичної крові людини, які є стандартними клітинами у цитогенетичних дослідженнях з мутагенезу. Такий підхід дозволив коректно оцінити рівень хромосомної нестабільності при розвитку первинного та вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка в соматичних клітинах людини, визначити частоту та спектр аберацій хромосом, що утворюються при цьому.

МЕТА

Метою роботи було встановлення рівня хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові людини при розвитку вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження стабільності хромосом соматичних клітин людини при розвитку вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка виконано з використанням клітин недрібноклітинного раку легень людини лінії А-549 (як індукторів сигналу ефекту свідка) і лімфоцитів периферичної крові людини (як клітин-свідків), де реєстрували цитогенетичні показники. Медіатором розповсюдження сигналу ефекту свідка було кондиційне середовище клітин А-549.

При виконанні роботи виконували окреме культивування лімфоцитів периферичної крові людини для визначення в них фонового (контрольного) рівня аберацій хромосом; культивування лімфоцитів периферичної крові людини з додаванням кондиційного середовища культури клітин недріб-

induced bystander effect has been described when primary bystander cells act as inducers of damage in surrounding or distant cells [9, 10]. Its induction can contribute to the spread of genomic instability in an organism that has undergone irradiation, which is important to consider when conducting radiation therapy for oncological diseases to prevent the development of secondary malignant neoplasms of radiation origin [11].

Cell cultures are often used to model the radiation-induced bystander effect. Human non-small cell lung cancer cell culture A-549 was used, mostly, as a bystander to study proliferation, growth, apoptosis, metastasis, formation of micronuclei, and DNA breaks in oncotransformed cells when interacting with irradiated normal/tumor cells [12–14]. We modeled the development of a secondary radiation-induced bystander effect using A-549 cells as bystander signal inducers in intact human peripheral blood lymphocytes, which are standard cells in cytogenetic mutagenesis studies. This approach made it possible to correctly assess the level of chromosomal instability during the development of the primary and secondary radiation-induced bystander effect in human somatic cells, and to determine the frequency and spectrum of induced chromosome aberrations.

OBJECTIVE

The work aimed to establish the level of chromosomal instability in human peripheral blood lymphocytes during the development of the secondary radiation-induced bystander effect.

MATERIALS AND METHODS

Chromosome stability of human somatic cells during the development of the secondary radiation-induced bystander effect was studied using human non-small cell lung cancer cell lines A-549 (as inducers of the bystander effect signal) and human peripheral blood lymphocytes (as bystander cells), where cytogenetic parameters were recorded. The mediator of the signal dissemination of the bystander effect was the conditioned medium of A-549 cells.

When performing the work, separate cultivation of human peripheral blood lymphocytes was carried out to determine the control level of chromosome aberrations in them; cultivation of human peripheral blood lymphocytes with the addition of conditioned medium from the culture of non-small cell lung cancer cell lines A-549 to study its possible

ноклітинного раку легень А-549 для дослідження його можливого впливу на інтактні лімфоцити; культивування лімфоцитів периферичної крові людини з додаванням кондиційного середовища від опроміненої *in vitro* культури клітин недрібноклітинного раку легень А-549 для моделювання розвитку в них первинного радіаційно-індукованого ефекту свідка; культивування лімфоцитів периферичної крові людини з додаванням кондиційного середовища від неопроміненої культури первинних клітин-свідків недрібноклітинного раку легень А-549 для моделювання розвитку в лімфоцитах периферичної крові вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка.

До дослідження на основі поінформованої згоди були залучені десять здорових осіб середнього віку, які заперечували свідомий контакт з іонізуючою радіацією та іншими мутагенними чинниками.

Культивування цільної крові людини виконували з використанням загальнозживаного напівмікрометоду у нашій модифікації [15]. Клітини недрібноклітинного раку легень людини А-549 культивували в поживному середовищі Advanced DMEM/F12 за стандартною методикою [16, 17].

При визначенні впливу кондиційного середовища клітин А-549 на лімфоцити крові людини його відбирали через 24 години після заміни і додавали до культури лімфоцитів крові в об'ємі 0,30 мл перед початком культивування.

При моделюванні розвитку первинного радіаційно-індукованого ефекту свідка лімфоцити крові людини були клітинами-свідками, до яких перед культивуванням додавали 0,30 мл кондиційного середовища від опроміненої *in vitro* культури клітин недрібноклітинного раку легень А-549, що були використані як клітини-індуктори. Культуру клітин А-549 опромінювали *in vitro* в дозі 0,50 Гр γ -квантами ^{137}Cs (випромінювач IBL-237С, потужність 2,34 Гр/хв).

Для моделювання вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах периферичної крові людини застосовано двох етапне моделювання первинного і вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка в культурі клітин недрібноклітинного раку легень людини А-549 та лімфоцитах периферичної крові людини на першому і другому етапах виконання роботи відповідно [18]. Моделювання первинного радіаційно-індукованого ефекту свідка виконували шляхом переносу кондиційного середовища від опроміненої *in vitro* в дозі 0,50 Гр культури клітин А-549 до неопроміненої культури клітин А-549. Моделювання вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка – шляхом перенесення кондиційного

effect on intact lymphocytes; cultivation of human peripheral blood lymphocytes with the addition of conditioned medium from the non-small cell lung cancer cells A-549 irradiated *in vitro* to simulate the development of primary radiation-induced bystander effect in them; cultivation of human peripheral blood lymphocytes with the addition of conditioned medium from the non-irradiated culture of primary bystander cells of non-small cell lung cancer cell lines A-549 for modeling the development of secondary radiation-induced bystander effect in peripheral blood lymphocytes.

Ten healthy middle-aged individuals who denied knowing exposure to ionizing radiation and other mutagenic factors were recruited into the study based on informed consent.

Cultivation of human whole blood was performed using the commonly used semi-micro method in our modification [15]. Human non-small cell lung cancer cell lines A-549 were cultured in Advanced DMEM/F12 nutrient medium according to the standard method [16, 17].

When determining the effect of the conditioned medium of A-549 cells on human blood lymphocytes, it was taken 24 hours after replacement and added to the blood lymphocyte culture in a volume of 0.30 ml before the start of cultivation.

When modeling the primary radiation-induced bystander effect, human blood lymphocytes were the bystander cells. Before cultivation, 0.30 ml of conditioned medium from non-small cell lung cancer cell lines A-549 irradiated *in vitro*, which were used as inducer cells, was added to them. A-549 cell culture was irradiated with γ -quanta of ^{137}Cs (emitter IBL-237C, power 2.34 Gy/min) in a dose of 0.50 Gy before culturing.

Two-stage modeling of the primary and secondary radiation-induced bystander effect in the culture of human non-small cell lung cancer cells A-549 and human peripheral blood lymphocytes was applied in the first and second stages of the work, respectively, to model the secondary radiation-induced bystander effect in human peripheral blood lymphocytes [18]. Modeling of the primary radiation-induced bystander effect was carried out by transferring the conditioned medium from the culture of A-549 cells irradiated *in vitro* to the non-irradiated culture of A-549 cells. Modeling of the secondary radiation-induced bystander effect was performed by transferring the conditioned medium from the primary bystander cells of the A-549 cell

середовища від первинних клітин-свідків неопроміненої культури клітин А-549 до культури лімфоцитів периферичної крові людини, яку культивували за загальноприйнятим методом та визначали цитогенетичні показники розвитку вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка.

Препарати метафазних хромосом фарбували рівномірно барвником Гімза (Merck, Німеччина). Цитогенетичний аналіз виконували з груповим каріотипуванням під мікроскопами зі збільшенням $\times 1000$. Під час цитогенетичного аналізу враховували аберації хроматидного (одиначні ацентричні фрагменти, хроматидні обміни) та хромосомного (вільні парні фрагменти, ацентричні кільця, дицентричні та кільцеві хромосоми, аномальні моноцентрики) типів. Загалом при виконанні роботи проаналізовано 6000 клітин.

Для кожної точки досліду розраховували відсоток аберантних метафаз і частоту аберацій хромосом на 100 метафаз. Дані по окремих точках досліду об'єднували в групи відповідно до дизайну дослідження з подальшим розрахунком середньогрупових значень і статистичних похибок. Знаходили різницю між середніми значеннями в окремих варіантах дослідження. Перевірку нульових гіпотез проводили на рівні значущості $p \leq 0,05$ за допомогою критерію Стюдента [19].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Цитогенетичний аналіз лімфоцитів крові здорових осіб показав, що середньогрупова частота аберантних клітин в них становила 1,60 %, рівень аберацій хромосом – 1,60 на 100 клітин (табл. 1). Аберації хроматидного типу (одиначні фрагменти) зареєстровані з середньогруповою частотою 1,20 на 100 клітин, що складало 88 % від загальної кількості пошкоджень

culture to the culture of human peripheral blood lymphocytes. It was cultured according to the generally accepted method and cytogenetic indicators of the development of the secondary radiation-induced bystander effect were determined.

Metaphase chromosome preparations were stained uniformly with Giemsa dye (Merck, Germany). Cytogenetic analysis was performed with group karyotyping under microscopes with a magnification of $\times 1000$. During the cytogenetic analysis, aberrations of chromatid (single fragments, chromatid exchanges) and chromosomal (free double fragments, acentric rings, dicentric and ring chromosomes, abnormal monocentric) types were considered. In total, 8000 cells were analyzed during the work.

For each experiment point, the percentage of aberrant metaphases and the frequency of chromosome aberrations per 100 metaphases were calculated. Data for individual points of the experiment were combined into groups according to the study design, followed by the calculation of mean group values and statistical errors. The difference between the mean group values in the different study variants was determined. The null hypothesis was tested at a significance level of $p \leq 0.05$ using the Student's *t*-test [19].

RESULTS

Cytogenetic analysis of blood lymphocytes of healthy individuals showed that the mean group frequency of aberrant cells in them was 1.60%, the level of chromosome aberrations – 1.60 per 100 cells (Table 1). The chromatid-type aberrations (single fragments) were registered with a mean group frequency of 1.20 per 100 cells, which ac-

Таблиця 1

Основні цитогенетичні показники при дослідженні вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка

Table 1

The main cytogenetic data in the study of secondary radiation-induced bystander effect

Варіанти досліду Experimental variants	Кількість проаналізованих клітин Number of cells	Частота аберантних клітин, % Frequency of aberrant cells, %	Частота аберацій хромосом, на 100 клітин Frequency of chromosome aberration, per 100 cells	
			середня mean	мінімальна – максимальна minimum – maximum
Контроль / Control	2000	1,60 ± 0,28	1,60 ± 0,28	1,00 – 2,00
ПІЕС / TIBE	2000	3,00 ± 0,38	3,00 ± 0,38	2,00 – 3,50
РІЕС / RIBE	2000	5,80 ± 0,52	5,80 ± 0,52	4,50 – 7,50
ВРІЕС / RISBE	2000	4,75 ± 0,48	4,75 ± 0,48	3,50 – 6,00

Примітки. ПІЕС – пухлинно індукований ефект свідка, РІЕС – радіаційно-індукований ефект свідка, ВРІЕС – вторинний радіаційно-індукований ефект свідка.
Notes. TIBE – tumor-induced bystander effect, RIBE – radiation-induced bystander effect, RISBE – secondary radiation-induced bystander effect.

Таблиця 2

Частота аберацій хроматидного і хромосомного типу при дослідженні вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка

Table 2

Frequency of chromatid and chromosome type aberrations in the study of secondary bystander effect and rescue effect

Варіанти досліджу Experimental variants	Частота аберацій хромосом, на 100 клітин / Frequency of chromosome aberration, per 100 cells				
	Хроматидного типу Chromatid type	Хромосомного типу / Chromosome type			всього total
		ацентричні фрагменти acentric double fragments	аномальні моноцентрики abnormal monocentrics	дицентричні і кільцеві хромосоми dicentric and ring chromosomes	
Контроль	1,20 ± 0,24	0,40 ± 0,14	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,14
ПІЕС	2,40 ± 0,34	0,55 ± 0,17	0,05 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,60 ± 0,17
РІЕС	4,35 ± 0,46	1,25 ± 0,25	0,15 ± 0,09	0,05 ± 0,05	1,45 ± 0,47
ВРІЕС	3,95 ± 0,44	0,70 ± 0,19	0,10 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,80 ± 0,20

Примітки. ПІЕС – пухлинно індукований ефект свідка, РІЕС – радіаційно-індукований ефект свідка, ВРІЕС – вторинний радіаційно-індукований ефект свідка.
Notes. TIBE – tumor-induced bystander effect, RIBE – radiation-induced bystander effect, RISBE – secondary radiation-induced bystander effect.

хромосом (табл. 2). Аберацій хромосомного типу були представлені ацентричними парними фрагментами з середньою частотою 0,40 на 100 клітин. Обмінних аберацій хромосомного типу (дицентричних хромосом, аномальних моноцентриків) у лімфоцитах периферичної крові здорових осіб не виявлено. Отриманий результат відповідав популяційному рівню цитогенетичних показників при спонтанному хромосомному мутагенезі [20], що дозволило використати їх як контроль при виконанні досліджень з вивчення вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка.

Середньогрупова частота аберацій хромосом у лімфоцитах периферичної крові людини, які культивували з додаванням кондиційного середовища від клітин недрібноклітинного раку легені людини А-549, становила 3,00 на 100 клітин і перевищувала показник у групі порівняння ($p < 0,05$). Пошкодження хроматидного типу виявлені у всіх осіб. Вони були представлені одиночними фрагментами з середньогруповою частотою 2,40 на 100 клітин (перевищувала контрольну ($p < 0,05$) та індивідуальними коливаннями в межах від 2,00 до 3,5 на 100 клітин (рис. 1). Частота аберацій хромосомного типу не мала значущої різниці з контрольним рівнем в інтактних лімфоцитах периферичної крові ($p > 0,05$). Серед них зареєстровані парні фрагменти з частотою 0,55 на 100 клітин та аномальні моноцентрики на рівні 0,05 на 100 клітин. Асиметричних хромосомних обмінів (дицентричних і кільцевих хромосом) не виявлено. Таким чином цитогенетичне дослідження встановило підвищення частоти аберацій хромосом в лімфоцитах

counted for 88% of the total number of chromosome damages (Table 2). The chromosomal-type aberrations were represented by acentric paired fragments with a mean frequency of 0.40 per 100 cells. Exchange chromosomal-type aberrations (dicentric chromosomes, abnormal monocentrics) were not detected in the peripheral blood lymphocytes of healthy individuals. The obtained result corresponded to the population level of cytogenetic indicators in spontaneous chromosomal mutagenesis [20]. This made it possible to use them as controls in studies of the secondary radiation-induced bystander effect.

The mean group frequency of chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes cultivated with adding the conditioned medium of human non-small cell lung cancer cell lines A-549 was 3.00 per 100 cells and exceeded the indicator in the comparison group ($p < 0.05$). Chromatid lesions were detected in all individuals. They were represented by single fragments with a group mean frequency of 2.40 per 100 cells (exceeded control, $p < 0.05$) and individual variations ranging from 2.00 to 3.5 per 100 cells. The frequency of chromosomal-type aberrations did not have a significant difference with the control level in intact peripheral blood lymphocytes ($p > 0.05$). Among them, paired fragments with a frequency of 0.55 per 100 cells and abnormal monocentrics at the level of 0.05 per 100 cells were registered. Asymmetric chromosomal exchanges (dicentric and circular chromosomes) were not detected. Thus, a cytogenetic study established an increase in the frequency of chromosome aberrations in human blood lymphocytes during cultivation with the addi-

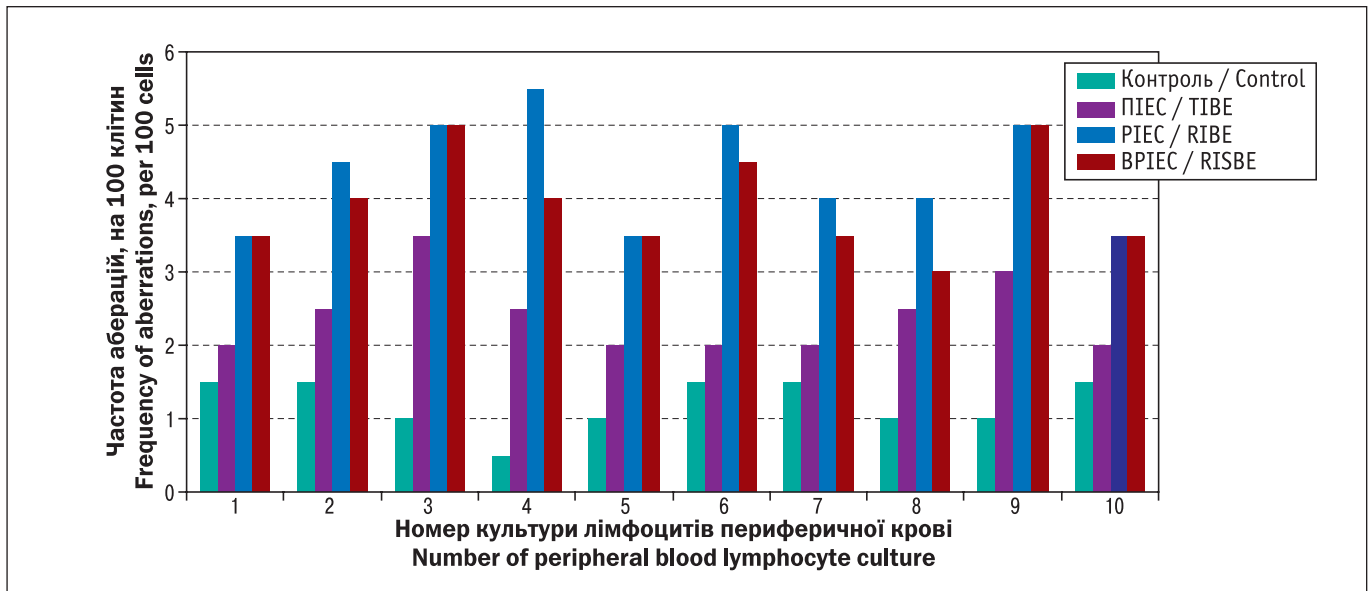


Рисунок 1. Індивідуальні частоти аберацій хроматидного типу в лімфоцитах периферичної крові людини за розвитку первинного і вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка

ПІЕС – пухлинно-індукований ефект свідка; РІЕС – радіаційно-індукований ефект свідка; ВРІЕС – вторинний радіаційно-індукований ефект свідка.

Figure 1. Individual frequencies of chromatin-type aberrations in the study of secondary radiation-induced bystander effect

TIBE – tumor-induced bystander effect; RIBE – radiation-induced bystander effect; RISBE – secondary radiation-induced bystander effect.

крові людини за культивування з додаванням кондиційного середовища від перещеплюваної культури клітин недрібноклітинного раку легень людини А-549. Зростання хромосомної нестабільності відбулось за рахунок підвищення частоти аберацій хроматидного типу, що вказує на розвиток пухлинно-індукованого ефекту свідка. Зареєстровано міжіндивідуальну варіабельність обстежених осіб у здатності до його індукції.

У дослідженні, що моделювало розвиток первинного радіаційно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах периферичної крові людини середньогрупова частота аберацій хромосом становила 5,80 на 100 клітин з індивідуальними коливаннями від 4,50 до 7,50 на 100 клітин. Серед пошкоджень хромосом переважали аберації хроматидного типу (одиначні фрагменти). Вони були виявлені в усіх обстежених осіб на рівні 3,50-5,50 на 100 клітин. Їх середньогрупова частота (4,35 на 100 клітин) перевищувала контрольну ($p < 0,05$). Не було кореляції між фоновим та індукованим радіаційно-індукованим ефектом свідка рівнем хромосомної нестабільності. У випадках 7 і 8, що мали різний рівень частоти аберацій хроматидного типу в контролі (1,50 і 1,00 на 100 клітин відповідно), рівень пошкоджень хроматидного типу при розвитку первинного радіаційно-індукованого ефекту свідка складав 4,00 на 100 клітин. У ви-

tion of a conditioned medium from the culture of human non-small cell lung cancer cells A-549. The increase in chromosomal instability occurred due to the rise in the frequency of chromatin-type aberrations, which indicates the development of a tumor-induced bystander effect. Interindividual variability of the examined persons in the ability to induce it was registered.

In a study on modeling the development of a primary radiation-induced bystander effect in human peripheral blood lymphocytes, the group mean frequency of chromosomal aberrations was 5.80 per 100 cells, with an individual variation from 4.50 to 7.50 per 100 cells. Chromatin-type aberrations (single fragments) predominated among chromosome damages. They were detected in all examined persons at the level of 3.50-5.5 per 100 cells. Their mean group frequency (4.35 per 100 cells) exceeded the control ($p < 0.05$) (Fig. 1). There was no correlation between background and radiation-induced bystander effect levels of chromosomal instability. In cases 7 and 8, which had a different frequency level of chromatin-type aberrations in the control (1.50 and 1.00 per 100 cells, respectively), the level of chromatin-type damage during the development of the radiation-induced bystander effect was 4 per 100 cells. In cases with

падках з однаковою фоновою частотою пошкоджень хромосом (5, 8, 9) при індукції радіаційно-індукованого ефекту свідка зареєстровано різні рівні хромосомної нестабільності. У випадку 4 при найнижчій частоті пошкоджень хромосом в інтактних лімфоцитах розвиток ефекту свідка індукував найвищий серед обстежених осіб рівень аберацій хроматидного типу, що становив 5,50 на 100 клітин.

Частота аберацій хромосомного типу складала 1,45 на 100 клітин і перевищувала контрольний рівень ($p < 0,05$). Вони були представлені парними фрагментами, аномальними моноцентриками та дицентричними хромосомами. Парні фрагменти зареєстровано у всіх обстежених осіб з частотою 1,25 на 100 клітин, яка перевищувала фоновий рівень цих пошкоджень та показник при розвитку пухлинно-індукованого ефекту свідка ($p < 0,05$). Частоти хромосомних аберацій обмінного типу (аномальних моноцентриків і дицентричних хромосом) значимо не відрізнялись від контрольних.

При моделюванні розвитку вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка середньогрупова частота аберацій хромосом у лімфоцитах периферичної крові людини перевищувала контрольний показник і складала 4,75 на 100 клітин з індивідуальними коливаннями від 3,50 до 6,00 на 100 клітин. Аберації хроматидного типу зареєстровані з середньогруповою частотою 3,95 на 100 клітин, що перевищувала контрольну ($p < 0,001$). Вони були представлені одиночними фрагментами. Індивідуальні значення частоти аберацій хроматидного типу знаходились в межах від 3,00 до 5,00 на 100 клітин. У всіх випадках дослідження спостерігали зростання цього показника порівняно з контролем ($p < 0,05$). Не зареєстровано кореляції між фоновим і індукованим вторинним радіаційно-індукованим ефектом свідка рівнем хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові людини. У випадках 3, 5, 8, 9 з фоновою частотою пошкоджень хромосом 1,00 на 100 клітин рівні хромосомної нестабільності за розвитку вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка складала 5,00, 3,50, 3,00 і 5,00 на 100 клітин відповідно. відповідно. У випадку з найнижчим фоновим рівнем аберацій хроматидного типу (0,50 на 100 клітин) частота аберацій хроматидного типу становила 4,00 на 100 клітин.

Середньогруповий рівень аберацій хромосомного типу, які були представлені ацентричними парними фрагментами та аномальними моноцентриками, становив 0,80 на 100 метафаз. Ацентричні

the same background frequency of chromosome damage (5, 8, 9) upon induction of the radiation-induced bystander effect, different levels of chromosomal instability were registered. In case 4, with the lowest frequency of chromosome damage in intact lymphocytes, the development of the bystander effect induced the highest level of chromatid-type aberrations among the examined individuals, which was 5.50 per 100 cells.

The frequency of chromosomal-type aberrations was 1.45 per 100 cells and exceeded the control level ($p < 0.05$). They were represented by paired fragments, and abnormal monocentric and dicentric chromosomes. Paired fragments were registered in all examined persons with a frequency of 1.25 per 100 cells, which exceeded the background level of these damages and the indicator for the development of a tumor-induced bystander effect ($p < 0.05$). The frequencies of exchange chromosomal-type aberrations (abnormal monocentric and dicentric chromosomes) were not significantly different from the control ones.

In a study on modeling the development of the secondary radiation-induced bystander, the mean-group frequency of chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes exceeded the control indicator and was 4.75 per 100 cells with individual fluctuations from 3.50 to 6.00 per 100 cells. The chromatid-type aberrations were registered with a mean-group frequency of 3.95 per 100 cells, which exceeded the control ($p < 0.001$). They were represented by single fragments. Individual values of the chromatid-type aberrations frequency ranged from 3.00 to 5.00 per 100 cells. In all cases of the experiment, an increase in this indicator was observed compared to the control ($p < 0.05$). There was no correlation between background and induced secondary radiation-induced bystander effect levels of chromosomal instability in human peripheral blood lymphocytes. In cases 3, 5, 8, and 9, with a background frequency of chromosomal damage of 1.00 per 100 cells, the levels of chromosomal instability were 5.00, 3.50, 3.00, and 5.00 per 100 cells, respectively. In the case with the lowest background level of chromatid-type aberrations (0.50 per 100 cells), the frequency of chromatid-type aberrations was 4.00 per 100 cells.

The mean-group level of chromosomal-type aberrations, which were represented by double acentric fragments and abnormal monocentrics, was 0.80 per 100 metaphases. Acentric fragments were detected with the mean-group frequency of 0.70 per 100

фрагменти виявлені з частотою 0,70 на 100 метафаз у 9 з 10 обстежених. Аномальні моноцентрики зареєстровані у двох обстежених з частотою 0,50 на 100 клітин. Середньогруповий рівень аномальних моноцентриків становив 0,10 на 100 метафаз. Він не мав істотної різниці зі спонтанним популяційним рівнем. Асиметричних хромосомних обмінів (дицентричні та кільцеві хромосоми) не зареєстровано.

Порівняння стабільності хромосом лімфоцитів периферичної крові людини при розвитку первинного й вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка показало, що за індукції вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка показники загальної частоти аберацій хромосом та аберацій хроматидного типу статистично значимо не відрізнялись від рівня цих пошкоджень за розвитку первинного радіаційно-індукованого ефекту свідка ($p > 0,05$). Рівні обмінних аберацій хромосомного типу (аномальних моноцентриків та дицентричних хромосом) відповідали популяційним.

ОБГОВОРЕННЯ

Вторинний радіаційно-індукований ефект свідка є одним з проявів універсального феномену ефекту свідка і характеризується індукцією первинними клітинами-свідками пошкоджень в оточуючих і віддалених інтактних клітинах. Його вивчення є важливим для запобігання медичним наслідкам опромінення людини і розкриття механізмів радіаційно-індукованого канцерогенезу та вторинного онкогенезу внаслідок радіотерапії онкологічної патології. Вторинний радіаційно-індукований ефект свідка досліджували із його моделюванням в нормальних лімфоцитах периферичної крові людини з використанням культури клітин недрібноклітинного раку легень людини лінії A-549 [18]. Це дозволило коректно оцінити рівень хромосомної нестабільності при розвитку вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка в соматичних клітинах людини та дослідити внесок в неї пухлинно-індукованого ефекту, чого не можна було б зробити із застосуванням при його моделюванні лише нетрансформованих клітин. Вивчення впливу кондиційного середовища від культури клітин недрібноклітинного раку легень людини A-549 на цитогенетичні показники в лімфоцитах крові здорових осіб встановило в них підвищення частоти аберацій хромосом за рахунок збільшення частоти аберацій хроматидного типу, які є маркерами хромосомної нестабільності, що стало наслідком розвитку пухлинно-індукованого ефекту свідка. Зареєстровано

metaphases in 9 out of 10 examined persons. Abnormal monocentrics were found in two examinees with a frequency of 0.50 per 100 cells. The mean-group level of abnormal monocentrics was 0.10 per 100 metaphases. It had no significant difference with the spontaneous population level. Asymmetric chromosomal exchanges (dicentric and circular chromosomes) were not registered.

Comparison of chromosome stability of human peripheral blood lymphocytes during simulation of primary and secondary radiation-induced bystander effect showed that due to the induction of the secondary radiation-induced bystander effect, the frequency of chromosome aberrations and chromatid-type aberrations did not significantly differ from the level of these damages during the development of primary radiation-induced bystander effect ($p > 0.05$). The frequency of exchange chromosomal-type aberrations (abnormal monocentric and dicentric chromosomes) corresponded to the population level.

DISCUSSION

The secondary radiation-induced bystander effect is one of the manifestations of the universal phenomenon of the bystander effect and is characterized by the induction by primary bystander cells of damage in surrounding and distant intact cells. Its study is important for preventing the medical consequences of human exposure and revealing the mechanisms of radiation-induced carcinogenesis and secondary oncogenesis as a result of radiotherapy of oncological pathology. The secondary radiation-induced bystander effect was studied with its simulation in normal human peripheral blood lymphocytes using human non-small cell lung cancer cell lines A-549 culture [18]. This allowed us to correctly assess the level of chromosomal instability during the development of the secondary radiation-induced bystander effect in human somatic cells and to investigate the contribution of the tumor-induced effect to it, which could not be done using only non-transformed cells in its modeling. The study of the effect of conditioned medium from the culture of A-549 human non-small cell lung cancer cells on cytogenetic parameters in the blood lymphocytes of healthy individuals established an increase in the frequency of chromosome aberrations due to the rise in the frequency of chromatid-type aberrations, which are markers of chromosomal instability, which was a consequence of the development of tumor-induced the bystander effect. Interindividual vari-

міжіндивідуальну варіабельність обстежених осіб у здатності до його індукції, що узгоджується з результатами досліджень з моделювання цього ефекту в лімфоцитах людини з використанням крові хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію [15]. Дослідження радіаційно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах периферичної крові здорових осіб за культивування з кондиційним середовищем від опроміненої *in vitro* в дозі 0,50 Гр культури клітин недрібноклітинного раку легень людини А-549 зареєструвало зростання хромосомної нестабільності порівняно з контролем та дослідом з моделюванням пухлинно-індукованого ефекту свідка, що може вказувати на синергізм мутагенного впливу пухлинно-радіаційно-індукованого ефектів свідка на інтактні лімфоцити здорових осіб. Визначальним при цьому було збільшення частоти аберацій хроматидного типу при індукції радіаційно-індукованого ефекту свідка порівняно з пухлинно-індукованим. Підвищений рівень парних фрагментів, зареєстрованих в клітинах-свідках при індукції радіаційно-індукованого ефекту свідка, на нашу думку, є наслідком подвійних хроматидних розривів, оскільки частоти інших аберацій хромосомного типу (аномальних моноцентриків і дицентричних хромосом) у всіх варіантах дослідження значуще не відрізнялись від контрольних показників. Отримані результати відрізняються від даних К. Kanagaraj зі співавт. [8], коли вплив кондиційного середовища від опромінених рентгенівськими променями *in vitro* в дозі 0,50 Гр дермальних фіброblastів дорослої людини не спричинив розвитку первинного та вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах периферичної крові людини, тоді як зворотній дослід дав позитивний результат. Це могло бути наслідком використання обмінних аберацій хромосомного типу (дицентричних хромосом) для реєстрації радіаційно-індукованого ефекту свідка. Ці аберації є маркерами прямої радіаційної дії і використовуються при проведенні біологічної індикації та дозиметрії опромінення людини [21–24]. Дослідження кластогенних властивостей периферичної крові опромінених осіб [25, 26] і моделювання радіаційно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах периферичної крові людини [7, 27] показує, що цитогенетичними маркерами розвитку радіаційно-індукованого ефекту свідка в них є аберації хроматидного типу (хроматидні розриви і обміни). Медіаторами передачі байстендер сигналу в таких моделях, як і за використанням кондиційного середовища від опромінених клітин, можуть бути розчинні

ability of the examined persons in the ability to induce it was recorded, which is consistent with the results of studies on modeling this effect in human lymphocytes using the blood of patients with chronic lymphocytic leukemia [15]. A study of the radiation-induced bystander effect in peripheral blood lymphocytes of healthy individuals under co-cultivation with conditioned medium from human non-small cell lung cancer cell A-549 irradiated *in vitro* in a dose of 0.50 Gy registered an increase in chromosomal instability compared to control and an experiment with modeling of tumor-induced bystander effect, which may indicate the synergism of the mutagenic effect of tumor- and radiation-induced bystander effects on intact lymphocytes of healthy individuals. The decisive factor was the increase in the frequency of chromatid-type aberrations during the induction of the radiation-induced bystander effect compared to the tumor-induced effect. In our opinion, the increased level of paired fragments registered in the bystander cells during the induction of the radiation-induced bystander effect is a consequence of double chromatid breaks, since the frequencies of other chromosomal aberrations (abnormal monocentric and dicentric chromosomes) in all variants of the experiment did not differ significantly from the control indicators. The obtained results differ from the data of K. Kanagaraj et al. [8] when the conditioned media from adult dermal fibroblasts X-ray irradiated *in vitro* in a dose of 0.50 Gy did not cause primary/secondary radiation-induced bystander effect in human peripheral blood lymphocytes, while the reverse experiment gave a positive result. This could be a consequence of the use of exchange chromosomal-type aberrations (dicentric chromosomes) to register the radiation-induced bystander effect. These aberrations are markers of direct radiation action and are used in biological indication and dosimetry of human exposure [21–24]. Studies of the clastogenic quality of the peripheral blood of irradiated persons [25, 26] and modeling of the radiation-induced bystander effect in human peripheral blood lymphocytes [7, 27] show that cytogenetic markers of the development of the radiation-induced bystander effect in them are chromatid-type aberrations (chromatid breaks and exchanges). Soluble factors (cytokines, reactive forms of oxygen, and nitrogen) that induce DNA damage in bystander cells due to oxidative stress

чинники (цитокіни, активні форми кисню і азоту), що індукують пошкодження ДНК клітин-свідків внаслідок оксидативного стресу [28-30]. Разом з тим, зростання частоти аберацій хромосомного типу (дицентричних хромосом, робертсонівських транслокацій, центромерних розривів) при розвитку радіаційно-індукованого ефекту свідка показано S. Kirolikar зі співавт. [31] при вивченні участі вільного позаклітинного хроматину з опромінених клітин раку грудної залози людини (MDA-MB231) як індуктора ефекту свідка в неопромінених фібробластах мишей NIH3T3. Результат зумовлювався включенням опроміненого позаклітинного хроматину в ДНК неопромінених клітин-свідків (підтверджено авторами із застосуванням флюоресцентної гібридизації). Внаслідок цього у неопромінених клітинах індукувались пошкодження, притаманні для прямої дії радіації.

Культивування лімфоцитів периферичної крові здорових осіб з додаванням кондиційного середовища від неопромінених клітин-свідків недрібно-клітинного раку легень людини A-549 встановило підвищення загального рівня аберацій хромосом за рахунок підвищення частоти аберацій хроматидного типу, представлених одиночними фрагментами, що вказує на розвиток вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка. Порівняння стабільності хромосом лімфоцитів периферичної крові людини при розвитку первинного й вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка показало, що за індукції вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка показники загальної частоти аберацій хромосом та аберацій хроматидного типу значимо не відрізнялись від рівня цих пошкоджень за розвитку первинного ефекту свідка. Рівні обмінних аберацій хромосомного типу (аномальних моноцентриків та дицентричних хромосом) відповідали популяційним, що свідчить про відсутність впливу вторинного ефекту свідка на їх індукцію. Отриманий результат вказує на стабілізацію підвищеного рівня хромосомної нестабільності, індукованої первинним і вторинним радіаційно-індукованим ефектом свідка в лімфоцитах периферичної крові людини в умовах *in vitro*. Аналіз індивідуальних значень частоти аберацій хроматидного типу за розвитку проявів ефекту свідка засвідчив підвищення цього показника внаслідок індукції пухлинного, радіаційно-індукованого та вторинного радіаційно-індукованого ефекту в усіх випадках дослідження. Зареєстровано міжіндивідуальну варіабельність обстежених осіб у здатності до роз-

can be mediators of bystander signal transmission in such models and when using a conditioned medium from irradiated cells [28-30]. At the same time, an increase in the frequency of chromosomal aberrations (dicentric chromosomes, Robertsonian translocations, centromeric breaks) during the development of the radiation-induced bystander effect was shown by S. Kirolikar et al. [31] in studying the involvement of free extracellular chromatin from irradiated human breast cancer cells (MDA-MB231) as an inducer of the bystander effect in non-irradiated NIH3T3 mouse fibroblasts. The result was due to the inclusion of irradiated extracellular chromatin in the DNA of non-irradiated control cells (confirmed by the authors using fluorescent hybridization). As a result, damage inherent to the direct action of radiation was induced in non-irradiated cells.

Cultivation of peripheral blood lymphocytes of healthy individuals with the addition of conditioned medium from non-irradiated bystander cells of human non-small cell lung cancer A-549 established an increase in the level of chromosome aberrations due to the rise in the frequency of chromatid-type aberrations represented by single fragments, which indicates the development of a secondary radiation-induced bystander effect. Comparison of chromosome stability of human peripheral blood lymphocytes during the development of primary and secondary radiation-induced bystander effect showed that during the induction of secondary radiation-induced bystander effect, the frequency of chromosome aberrations and chromatid-type aberrations did not significantly differ from the level of these damages during the development of the primary radiation-induced bystander effect. This indicates stabilization of the increased level of chromosomal instability induced by the primary and secondary radiation-induced bystander effect in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. The levels of exchange chromosomal-type aberrations (abnormal monocentric and dicentric chromosomes) corresponded to the population level, which indicates the absence of the influence of the secondary bystander effect on their induction. Analysis of individual values of the frequency of chromatid-type aberrations during the development of manifestations of the bystander effect showed an increase in this indicator due to the induction of tumor-, radiation-induced, and secondary radiation-induced effects in all cases of the experiment. Interindividual variability of the examined persons in the ability to develop these

витку цих ефектів, що не корелювала з фоновим рівнем хромосомної нестабільності в лімфоцитах їх периферичної крові.

ВИСНОВКИ

Загальна частота аберацій хромосом в лімфоцитах периферичної людини за культивування з кондиційним середовищем від неопромінених клітин-свідків недрібноклітинного раку легенів A-549 перевищувала таку в контролі за рахунок зростання частоти одиночних фрагментів, що вказує на підвищення рівня хромосомної нестабільності при розвитку вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка. Розвиток вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка не впливав на індукцію аберацій хромосомного типу. Рівні аберацій хромосом хроматидного типу при розвитку первинного і вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка значимо не розрізнялись.

Джерела фінансування

Дослідження виконані у межах НДР 614 «Дослідження стабільності хромосом соматичних клітин людини при розвитку вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка», фінансування НАМН України, державний бюджет.

Вираз вдячності

Висловлюємо вдячність доктору біологічних наук, завідувачу лабораторії клітинної радіобіології ІЕР ННЦРМГО Галіні Йосипівні Лавренчук за методичну допомогу в роботі з культурою клітин недрібноклітинного раку легень людини лінії A-549.

Конфлікт інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гродзинський Д. М. Парадигми сучасної радіобіології. *Problems of nuclear power plants safety and of Chernobyl*. 2005. Вип. 3. Ч. 2. С. 9-16.
2. 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
3. Mechanisms of radiation bystander and non-targeted effects: Implications to radiation carcinogenesis and radiotherapy / R. Yahyapour, E. Motevaseli, A. Rezaeyan et al. *Curr. Radiopharm.* 2018. Vol. 11, no 1. P. 34-35. doi: 10.2174/1874471011666171229123130.
4. Radiation-induced bystander and abscopal effects: Important lessons from preclinical models / E. Daguene, S. Louati, A. S. Wozny

effects was recorded, which did not correlate with the background level of chromosomal instability in the lymphocytes of their peripheral blood.

CONCLUSIONS

Under the conditions of co-cultivation of human peripheral blood lymphocytes with conditioned culture medium from bystander cells of human non-small cell lung cancer A-549, a secondary radiation-induced bystander effect was registered, the cytogenetic manifestation of which was an increase in the level of chromosomal instability due to an increase in the frequency of chromatid-type aberrations (single fragments). The levels of chromatid-type chromosome aberrations during the development of the primary and secondary radiation-induced bystander effect did not differ significantly.

Funding

The research was carried out within framework of the research project «Study of chromosomes stability of human somatic cells in the development of the secondary radiation-induced bystander effect», funded by the NAMS of Ukraine, the state budget.

Acknowledgements

We express our gratitude to Halyna Y. Lavrenchuk, Doctor of Biological Sciences, Head Laboratory of Cellular Radiobiology of the NRCRMO IER, for methodological assistance in working with the culture of human non-small cell lung cancer cell line A-549.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Grodzinsky DM. [Paradigms of modern radiobiology]. *Problems of nuclear power plants safety and Chernobyl*. 2005;3(2):9-16. Ukrainian.
2. 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.* 2018;94(8):696-707. doi: 10.1080/09553002.2017.1398436.
3. Yahyapour R, Motevaseli E, Rezaeyan A, Abdollahi H, Farhood B, Cheki M, et al. Mechanisms of radiation bystander and non-targeted effects: Implications to radiation carcinogenesis and radiotherapy. *Curr Radiopharm.* 2018;11(1):34-35. doi: 10.2174/1874471011666171229123130.
4. Daguene E, Louati S, Wozny AS, Vial N, Gras M, Guy JB, et al. Radiation-induced bystander and abscopal effects: Important les-

- et al. *Br. J. Cancer*. 2020. Vol. 123. P. 339-348. doi: 10.1038/s41416-020-0942-3
5. 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.
 6. Burdak-Rothkamm S., K. Rothkamm. 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.
 7. Cytogenetic study of manifestations of the universal phenomenon of the bystander response / O. V. Shemetun, O. O. Talan, O. B. Dibska et al. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2022. Vol. 27. P. 249-263. doi: 10.33145/2304-8336-2022-27-249-263
 8. Emerging role of secondary bystander effects induced by fractionated proton microbeam radiation / N. Autsavapromporn, C. Liu, A. Kobayashi et al. *Radiat. Res.* 2018. Vol. 191, no. 2. P. 211-216. doi: 10.1667/RR15155.1
 9. Primary and secondary bystander effect and genomic instability in cells exposed to high and low linear energy transfer radiations / K. Kanagaraj, V. Rajan, B. N. Pandey et al. *Int. J. Radiat. Biol.* 2019. Vol. 95, no. 12. P. 1648-1658. doi: 10.1080/09553002.2019.1665208.
 10. Perspectives on the role of bystander effect and genomic instability on therapy-induced secondary malignancy / V. Perumal, M. Chinnadurai, V. Raavi et al. *Radiat. Cancer Res.* 2017. Vol. 8. P. 53-60. doi: 10.4103/jrcr.jrcr_22_16.
 11. Induction of bystander response in lung cancer cells under photon beam irradiation using bismuth sulfide nanoparticle irradiated human endothelial progenitor cells induce bystander killing in human non-small cell lung and pancreatic cancer cells / W. T. Turchan, R. H. Shapiro, G. V. Seigny et al. *Int. J. Radiat. Biol.* 2016. Vol. 92, no. 8. P. 427-433. doi:10.1080/09553002.2016.1186299.
 12. Effect of carbon ion radiation induces bystander effect on metastasis of A549 cells and metabonomic correlation analysis / Z. Yang, Q. Zhang, H. Luo et al. *Front. Oncol.* 2021. Vol. 10. P. 601620. doi: 10.3389/fonc.2020.601620.
 13. Hypoxia and proton microbeam: Role of gap junction intercellular communication in inducing bystander responses on human lung cancer cells and normal Cells / N. Autsavapromporn, A. Kobayashi, C. Liu et al. *Radiat. Res.* 2022. Vol. 197. P. 122-130. doi: 10.1667/RADE-21-00112.1
 14. Verma N., Tiku A. B. Polydatin-induced direct and bystander effects in A549 lung cancer cell line. *Nutrition and Cancer*. 2022. Vol. 74, iss. 1. P. 237-249. doi: <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1870705>
 15. Study the effects of ionizing radiation on the level of chromosome instability in human somatic cells during the development of tumor-induced bystander effect / Pilinska M. A., Shemetun O. V., Talan O. A. et al. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2020. Вип. 25. P. 353-361. doi: 10.33145/2304-8336-2020-25-353-361.
 - sons from preclinical models. *Br J Cancer*. 2020;123:339-348. doi: 10.1038/s41416-020-0942-3.
 5. Verma N, Tiku AB. Significance and nature of bystander responses induced by various agents. *Mutat Res*. 2017;773:104-121. doi: 10.1016/j.mrrev.2017.05.003.
 6. Burdak-Rothkamm S, Rothkamm K. Radiation-induced bystander and systemic effects serve as a unifying model system for genotoxic stress responses. *Mutat Res*. 2018;778:13-22. doi: 10.1016/j.mrrev.2018.08.001.
 7. Shemetun OV, Talan OO, Dibska OB, Yeremeeyva MM, Pilinska MA. Cytogenetic study of manifestations of the universal phenomenon of the bystander response. *Probl Radiac Med Radiobiol*. 2022;27:249-263. doi: 10.33145/2304-8336-2022-27-249-263.
 8. Autsavapromporn N, Liu C, Kobayashi A, Ahmad TAFT, Oikawa M, Dukaew N, et al. Emerging role of secondary bystander effects induced by fractionated proton microbeam radiation. *Radiat Res*. 2018;191(2):211-216. doi: 10.1667/RR15155.1
 9. Kanagaraj K, Rajan V, Pandey BN, Thayalan K, Venkatachalam P. Primary and secondary bystander effect and genomic instability in cells exposed to high and low linear energy transfer radiations. *Int J Radiat Biol*. 2019;95(12):1648-1658. doi: 10.1080/09553002.2019.1665208.
 10. Perumal V, Chinnadurai M, Raavi V, Kanagaraj K, Shangamithra V, Paul SF. Perspectives on the role of bystander effect and genomic instability on therapy-induced secondary malignancy. *Radiat Cancer Res*. 2017;8:53-60. doi: 10.4103/JRCR.JRCR_22_16.
 11. Turchan WT, Shapiro RH, Seigny GV, Chin-Sinex H, Pruden B, Mendonca MS. Induction of bystander response in lung cancer cells under photon beam irradiation using bismuth sulfide nanoparticle irradiated human endothelial progenitor cells induce bystander killing in human non-small cell lung and pancreatic cancer cells. *Int J Radiat Biol*. 2016;92(8):427-433. doi: 10.1080/09553002.2016.1186299.
 12. Yang Z, Zhang Q, Luo H, Shao L, Liu R, Kong Y, et al. Effect of carbon ion radiation induces bystander effect on metastasis of A549 cells and metabonomic correlation analysis. *Front Oncol*. 2021;10:601620. doi: 10.3389/fonc.2020.601620.
 13. Autsavapromporn N, Kobayashi A, Liu C, Jaikang C, Tengku Ahmad TA, Oikawa M, Konishi T. Hypoxia and proton microbeam: Role of gap junction intercellular communication in inducing bystander responses on human lung cancer cells and normal Cells. *Radiat Res*. 2022;197:122-130. doi: 10.1667/RADE-21-00112.1.
 14. Verma N, Tiku AB. Polydatin-induced direct and bystander effects in A549 lung cancer cell line. *Nutrition and Cancer*. 2022;74(1):237-249. doi: <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1870705>.
 15. Pilinska MA, Shemetun OV, Talan OA, Dibska OB, Kravchenko SM, Sholoiko WV. Study the effects of ionizing radiation on the level of chromosome instability in human somatic cells during the development of tumor-induced bystander effect. *Probl Radiac Med Radiobiol*. 2020; 25:353-361. doi: 10.33145/2304-8336-2020-25-353-361.

16. Selection and testing of experimental models of normal and malignant human cells in vitro and evaluation of their sensitivity range to the neutron/capture and photon-capture agents and photosensitizers / O. D. Pochapinskiy, G. Y. Lavrenchuk, N. P. Atamaniuk, A. V. Chernyshov. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2022. Вип. 26. P. 260-272. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-260-272.
17. Efficiency of photon capture beam technology and photodynamic impact on malignant and normal human cells in vitro / V. V. Talko, G. Y. Lavrenchuk, O. D. Pochapinskiy, et al. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2022. Вип. 27. P. 234-248. doi: 10.33145/2304-8336-2022-27-234-248.
18. Патент на корисну модель UA157209. Спосіб оцінки хромосомної нестабільності внаслідок розвитку вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах периферичної крові людини. 18.09.2024. Б. 38.
19. Атраментова Л. А. Дизайн и статистика биологического исследования. Харьков : НТМТ, 2014. 255 с.
20. Frequency of spontaneous and radiation-induced chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of individuals of different ages / O. V. Shemetun, O. A. Talan, O. M. Demchenko et al. *Cytology and Genetics.* 2018. Vol. 52, no 6. P. 461-466. doi:10.3103/S0095452718060117
21. Chromosomal alterations. Methods, results and importance in human health / ed. by G. Obe, Vijayalaxmi. Springer, 2007. 515 p. URL: https://books.google.com.ua/books/about/Chromosomal_Alterations.html?id=PfPgG8zxAhYC&redir_esc=y
22. Cytogenetic dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergencies. Vienna : IAEA, 2011. 229 p. URL: <https://www.iaea.org/publications/8735/cytogenetic-dosimetry-applications-in-preparedness-for-and-response-to-radiation-emergencies>
23. «Dose – effect» calibration dependence by frequency of unstable chromosomal exchanges in human lymphocytes in acute gamma irradiation by ^{137}Cs in low doses for biological dosimetry / V. A. Kurochkina, L. K. Bezdrobna, T. V. Tsyganok et al. *Nucl. Phys. At. Energy.* 2021. Vol. 22, iss. 2. P. 167-173. doi: 10.15407/jnpae2021.02.167
24. Radiation protection. Performance criteria for service laboratories performing biological dosimetry by cytogenetics. ISO 19238 : 2023(en). 36 p.
25. Transferable clastogenic activity in plasma from persons exposed as salvage personnel of the Chernobyl reactor / I Emerit, A Levy, L Cernjavski, R Arutyunyan et al. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1994. Vol. 120, no. 9. P. 558-561. doi: 10.1007/BF01221035.
26. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of patients treated with radium-224 for ankylosing spondylitis / G. Stephan, W. U. Kampen, D. Nosske, H. Roos. *Radiat. Environ. Biophys.* 2005. Vol. 44. P. 23-28.
27. Shemetun O. V., Talan O. O., Pilinska M. A. Cytogenetic characteristics of the radiation-induced bystander effect and its persistence in human blood lymphocytes. *Cytol. Genet.* 2014. Vol. 48, no. 4. P. 244-249. doi: <https://doi.org/10.3103/S0095452714040069>.
16. Pochapinskiy OD, Lavrenchuk GY, Atamaniuk NP, Chernyshov AV. Selection and testing of experimental models of normal and malignant human cells in vitro and evaluation of their sensitivity range to the neutron/capture and photon-capture agents and photosensitizers. *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2022;26:260-272. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-260-272.
17. Talko W, Lavrenchuk GY, Pochapinskiy OD, Atamanuk NP, Chernyshov AV. Efficiency of photon capture beam technology and photodynamic impact on malignant and normal human cells in vitro. *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2022;27:234-248. doi: 10.33145/2304-8336-2022-27-234-248.
18. [A method of assessing chromosomal instability due to the development of secondary radiation-induced bystander effect in human peripheral blood lymphocytes]. Utility model patent UA157209. 18.09.2024. Bul. 38. Ukrainian.
19. Atramentova LA. [Design and statistics in biological research]. Kharkiv: NTMT; 2014. 255p. Russian.
20. Shemetun OV, Talan OA, Demchenko OM, Kurinnyi DA, Papuga MS, Pilinska MA. Frequency of spontaneous and radiation-induced chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of individuals of different ages. *Cytol Genet.* 2018;52(6): 461-466. doi: 10.3103/S0095452718060117.
21. Obe G, Vijayalaxmi (Eds.). Chromosomal Alterations. Methods, Results and Importance in Human Health. Springer; 2007. 515 p. URL: https://books.google.com.ua/books/about/Chromosomal_Alterations.html?id=PfPgG8zxAhYC&redir_esc=y.
22. Cytogenetic dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergencies. Vienna: IAEA; 2011. 229 p. URL: <https://www.iaea.org/publications/8735/cytogenetic-dosimetry-applications-in-preparedness-for-and-response-to-radiation-emergencies>.
23. Kurochkina VA, Bezdrobna LK, Tsyganok TV, Khomych IA. [«Dose – effect» calibration dependence by frequency of unstable chromosomal exchanges in human lymphocytes in acute gamma irradiation by ^{137}Cs in low doses for biological dosimetry]. *Nucl Phys At Energy.* 2021;22(2):167-173. doi: 10.15407/jnpae2021.02.167. Ukrainian.
24. Radiation protection. Performance criteria for service laboratories performing biological dosimetry by cytogenetics. ISO 19238: 2023(en). 36 p.
25. Emerit I, Levy A, Cernjavski L, Arutyunyan R, Oganessian N, Pogosian A et al. Transferable clastogenic activity in plasma from persons exposed as salvage personnel of the Chernobyl reactor. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1994;120(9):558-561. doi: 10.1007/BF01221035.
26. Stephan G, Kampen WU, Nosske D, Roos H. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of patients treated with radium-224 for ankylosing spondylitis. *Radiat Environ Biophys.* 2005;44:23-28.
27. Shemetun OV, Talan OO, Pilinska MA. Cytogenetic characteristics of the radiation-induced bystander effect and its persistence in human blood lymphocytes. *Cytol. Genet.* 2014;48(4):244-249. doi: <https://doi.org/10.3103/S0095452714040069>

28. 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. P. 68-73. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.04.006>.
29. Belloni P, Latini P, Palitti F. Radiation-induced bystander effect in healthy G 0 human lymphocytes: biological and clinical significance. *Mutat. Res.* 2011. Vol. 713(1). P. 32-38.
30. 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. P. 683-695. doi: <https://doi.org/10.3109/09553002.2010.549533>
31. Prevention of radiation-induced bystander effects by agents that inactivate cell-free chromatin released from irradiated dying cells / S. Kirolikar, P. Prasannan, V. Gorantla et al. *Cell Death and Disease.* 2018. Vol. 9. P. 1142-1158.
28. 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: 68-73. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.04.006>.
29. Belloni P, Latini P, Palitti F. Radiation-induced bystander effect in healthy G0 human lymphocytes: biological and clinical significance. *Mutat Res.* 2011;713(1):32-38. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.05.010.
30. Lyng FM, Howe OL, McClean B. Reactive oxygen species-induced release of signaling factors in irradiated cells triggers membrane signaling and calcium influx in bystander cells. *Int J Radiat Biol.* 2011;87:683-695. <https://doi.org/10.3109/09553002.2010.549533>
31. 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 cells. *Cell Death and Disease.* 2018;9:1142-1158. doi: 10.1038/s41419-018-1181-x.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

Шеметун Олена Володимирівна, доктор медичних наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії цитогенетики відділу медичної генетики Інституту експериментальної радіології, ДУ «ННЦРМГО НАМН України», Київ, Україна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9038-7082>

Талан Оксана Олексіївна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії цитогенетики відділу медичної генетики, Інститут експериментальної радіології, ДУ «ННЦРМГО НАМН України», Київ, Україна

Дибська Олена Борисівна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії цитогенетики відділу медичної генетики, Інститут експериментальної радіології, ДУ «ННЦРМГО НАМН України», Київ, Україна

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Olena V. Shemetun, Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher, Head of the Cytogenetic Laboratory, Department of Medical Genetics, Experimental Radiology Institute, SI NRCRMHO of the AMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9038-7082>

Oksana O. Talan, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of the Cytogenetic Laboratory, Department of Medical Genetics, Experimental Radiology Institute, SI NRCRMHO of the AMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Olena B. Dibska, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of the Cytogenetic Laboratory, Department of Medical Genetics, Experimental Radiology Institute, SI NRCRMHO of the AMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Стаття надійшла до редакції 19.08.2024

Received: 19.08.2024