

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

ПЕРСИСТЕНЦІЯ ГЕНОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ ВНАСЛІДОК РОЗВИТКУ ПУХЛИННО-ІНДУКОВАНОГО ЕФЕКТУ СВІДКА В СОМАТИЧНИХ КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ

Мета: встановити рівень аберацій хромосом у лімфоцитах периферичної крові людини при розвитку в них пухлинно-індукованого ефекту свідка впродовж кількох мітотичних поділів.

Матеріали і методи. Матеріал: лімфоцити периферичної крові людини; культура клітин недрібноклітинного раку легень людини лінії А-549. Метод: цитогенетичний аналіз рівномірно забарвлених хромосом лімфоцитів периферичної крові людини з визначенням частоти всіх типів аберацій.

Результати. У лімфоцитах периферичної крові людини за довгострокового 120-годинного культивування з додаванням кондиційного середовища клітин недрібноклітинного раку легень людини лінії А-549 зареєстровано підвищення рівня аберацій хромосом порівняно з контролем з 1,90 до 3,40 на 100 клітин у першому мітозі, з 2,00 до 3,60 на 100 клітин – у другому, з 1,70 до 3,10 на 100 клітин – у третьому, з 1,50 до 2,80 на 100 клітин у четвертому клітинному поділі ($p < 0,05$). Зростання хромосомної нестабільності відбулося за рахунок збільшення частоти одиночних фрагментів з 0,70 до 2,20 на 100 клітин у першому мітозі, з 1,00 до 2,10 на 100 клітин – у другому, з 0,90 до 2,00 на 100 клітин – у третьому, з 1,10 до 2,40 на 100 клітин у четвертому клітинному поділі ($p < 0,05$). Частоти аберацій хромосомного типу (ацентричних парних фрагментів, аномальних моноцентриків) впродовж періоду спостереження не мали значущої різниці з відповідними контрольними рівнями ($p > 0,05$). Дицентричних хромосом не зареєстровано.

Висновки. У лімфоцитах периферичної крові здорових осіб за культивування впродовж чотирьох клітинних поділів з додаванням кондиційного середовища клітин недрібноклітинного раку легень людини лінії А-549 встановлено персистенцію геномної нестабільності внаслідок розвитку пухлинно-індукованого ефекту свідка, цитогенетичним проявом якої було зростання загальної частоти аберацій хромосом за рахунок пошкоджень хроматидного типу. Частоти аберацій хроматидного типу (одиночних фрагментів) перевищували відповідні контролю і значуще не розрізнялись між окремими мітотичними поділами. Розвиток пухлинно-індукованого ефекту свідка не впливав на індукцію аберацій хромосомного типу (ацентричних фрагментів, аномальних моноцентриків, дицентричних хромосом), рівні яких не мали істотної різниці з контрольними.

Ключові слова: пухлинно-індукований ефект свідка; лімфоцити периферичної крові людини; персистенція, геномна нестабільність, аберації хромосом.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2025. Вип. 30. С. 284–298. doi: 10.33145/2304-8336-2025-30-284-298

✉ 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 St., Kyiv, 04050, Ukraine

PERSISTENCE OF GENOMICAL INSTABILITY DUE TO THE DEVELOPMENT OF THE TUMOR-INDUCED BYSTANDER EFFECT IN HUMAN SOMATIC CELLS

Objective: to establish the level of chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes during the development of a tumor-induced bystander effect over several mitotic divisions.

Materials and Methods. Material: human peripheral blood lymphocytes; human non-small cell lung cancer A-549 cell culture. Method: cytogenetic analysis of uniformly stained human peripheral blood lymphocyte chromosomes to determine the frequency of all types of aberrations.

Results. In human peripheral blood lymphocytes after long-term (120-hour) cultivation with the addition of conditioned medium from human non-small cell lung cancer A-549 cells, an increase in the level of chromosome aberrations was registered compared to the control: from 1.90 to 3.40 per 100 cells in the first mitosis; from 2.00 to 3.60 per 100 cells in the second; from 1.70 to 3.10 per 100 cells in the third; and from 1.50 to 2.80 per 100 cells in the fourth cell division ($p < 0.05$). The increase in chromosomal instability occurred due to an increase in the frequency of single fragments: from 0.70 to 2.20 per 100 cells in the first mitosis; from 1.00 to 2.10 per 100 cells in the second; from 0.90 to 2.00 per 100 cells in the third; and from 1.10 to 2.40 per 100 cells in the fourth cell division ($p < 0.05$). The frequencies of chromosomal-type aberrations (acentric paired fragments, abnormal monocentrics) showed no significant difference from the corresponding control levels ($p > 0.05$) during the observation period. Dicentric chromosomes were not registered.

Conclusions. Persistence of genomic instability due to the development of a tumor-induced bystander effect was established in peripheral blood lymphocytes of healthy individuals after four cell divisions of cultivation with a conditioned medium from human non-small-cell lung cancer A-549 cells. Its cytogenetic manifestation was an increase in the frequency of chromosome aberrations due to chromatid-type damage. The frequencies of chromatid-type aberrations (single fragments) exceeded the corresponding controls and did not differ significantly between mitotic divisions. The development of the tumor-induced bystander effect did not influence the induction of chromosomal-type aberrations (acentric fragments, abnormal monocentrics, dicentric chromosomes), whose levels did not differ significantly from the controls.

Key words: tumor-induced bystander effect; human peripheral blood lymphocytes; persistence; genomic instability; chromosome aberrations.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2025;30:284-298. doi: 10.33145/2304-8336-2025-30-284-298

ВСТУП

Пухлинно-індукований ефект свідка є одним з проявів універсального феномену ефекту свідка [1–3]. Його розвиток характеризується генотоксичним впливом онкологічно трансформованих клітин на інтактні за посередництва активних форм кисню і азоту, цитокінів, інтерлейкінів, безклітинних хроматинових частинок (cfCh), позаклітинної ДНК, екзосом [4–7]. Внаслідок такого впливу у клітинах-свідках змінюються показники окислювально-відновлювального гомеостазу, експресія генів і метилювання ДНК, індукуються мутації, хромосомні аберації, утворюються мікроядра, посилюється

INTRODUCTION

Tumor-induced bystander effect is one of the manifestations of the universal phenomenon of the bystander effect [1–3]. Its development is characterized by the genotoxic effect of oncologically transformed cells on intact cells mediated by reactive oxygen and nitrogen species, cytokines, interleukins, cell-free chromatin particles (cfCh), extracellular DNA, exosomes [4–7]. As a result of such influence, indicators of redox homeostasis, gene expression, and DNA methylation change in bystander cells, mutations, chromosomal aberrations are induced, micronuclei are formed, and apoptosis

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

апоптоз [7–10]. Характерною ознакою пухлинно-індукованого ефекту свідка є індукція геномної нестабільності [3, 7, 9]. Збереження цілісності геному забезпечується процесами репарації ДНК та елімінації нежиттєздатних клітин. При порушенні цих процесів на тлі мутагенного впливу генетичні пошкодження можуть зберігатись і передаватись протягом кількох клітинних генерацій, що може призводити до наростання геномної нестабільності [11–13]. Розвиток геномної нестабільності внаслідок ефекту свідка може сприяти реалізації вторинних злоякісних новоутворень у онкологічних хворих [14–16]. Більшість досліджень генетичної нестабільності і пошкодження ДНК внаслідок ефекту свідка пов'язані з радіаційним впливом на малігнізовані / нормальні клітини, що дозволяє говорити про індукцію і персистенцію геномної нестабільності внаслідок радіаційно-індукованого ефекту свідка [9, 17, 18]. Персистенція геномної нестабільності внаслідок розвитку пухлинно-індукованого ефекту свідка лишається недостатньо вивченою. Зважаючи на викладене, метою роботи було встановлення рівня аберацій хромосом при розвитку пухлинно-індукованого ефекту свідка у лімфоцитах периферичної крові людини впродовж кількох мітотичних поділів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження персистенції геномної нестабільності соматичних клітин людини внаслідок розвитку пухлинно-індукованого ефекту свідка виконано з використанням клітин недрібноклітинного раку легень людини лінії A-549 (індукторів сигналу ефекту свідка) і лімфоцитів периферичної крові людини (клітин-свідків), де реєстрували цитогенетичні показники впродовж чотирьох мітотичних поділів. Медіатором розповсюдження сигналу ефекту свідка було кондиційне середовище клітин A-549.

При виконанні роботи виконували окреме культивування лімфоцитів периферичної крові людини для визначення в них фонового (контрольного) рівня аберацій хромосом впродовж кількох клітинних поділів та культивування лімфоцитів периферичної крові людини з додаванням кондиційного середовища культури клітин недрібноклітинного раку легень A-549 для визначення рівня хромосомної нестабільності, індукованої в лімфоцитах периферичної крові людини внаслідок розвитку та можливої персистенції пухлинно-індукованого ефекту свідка.

До дослідження на основі поінформованої згоди були залучені десять здорових осіб (вісім жіночої і дві чоловічої статі) середнього віку, які заперечували

is enhanced [7–10]. A characteristic feature of the tumor-induced bystander effect is the induction of genomic instability [3, 7, 9]. The integrity of the genome is ensured by DNA repair processes and the elimination of non-viable cells. When these processes are disrupted by mutagenic effects, genetic damage can persist and be transmitted over multiple cell generations, potentially leading to increased genomic instability [11–13]. The development of genomic instability due to the bystander effect can contribute to the realization of secondary malignant neoplasms in cancer patients [14–16]. Most studies of genetic instability and DNA damage due to the bystander effect are related to radiation exposure to malignant/normal cells, suggesting the induction and persistence of genomic instability due to radiation-induced bystander effect [9, 17, 18]. The persistence of genomic instability due to tumor-induced bystander effect remains poorly understood. Considering the above, the aim of the work was to establish the level of chromosomal aberrations during the development of tumor-induced bystander effect in human peripheral blood lymphocytes during several mitotic divisions.

MATERIALS AND METHODS

The study of the persistence of genomic instability of human somatic cells due to the development of a tumor-induced bystander effect was performed using human non-small cell lung cancer A-549 cells (bystander effect signal inducers) and human peripheral blood lymphocytes (bystander cells), where cytogenetic parameters were recorded over four mitotic divisions. The mediator for the spread of the bystander effect signal was the conditioned medium of A-549 cells.

During the work, separate cultivation of human peripheral blood lymphocytes was performed to determine the background (control) level of chromosome aberrations in them over several cell divisions, and cultivation of human peripheral blood lymphocytes with the addition of conditioned medium of non-small cell lung cancer A-549 cells to determine the level of chromosomal instability induced in human peripheral blood lymphocytes due to the development and possible persistence of the tumor-induced bystander effect.

Ten healthy middle-aged individuals (eight women and two men) who denied conscious exposure to ionizing radiation during the year prior to

свідомий контакт з іонізуючим випромінюванням впродовж року перед цитогенетичним обстеженням.

Культивування цільної крові людини виконували з використанням загальноновживаного напівмікрометоду у нашій модифікації [19]. Гепаринізовану венозну кров об'ємом 0,50 мл культивували з додаванням 4,50 мл живильного середовища RPMI 1640 з L-глютаміном (Sigma, USA), 0,10 мл фітогемаглютиніну (PHA, Difco-P, Sigma, USA) впродовж 48 годин, що дозволяло аналізувати клітини переважно першого культурального мітозу; 72 годин – другого мітозу; 96 годин – третього; 120 годин – четвертого мітозу. За 2 години до закінчення культивування додавали 0,10 мл колцеміду (Colcemid, Sigma, USA). Після гіпотонічної обробки (0,075 М розчином KCl) і фіксації (96% етанолом та льодяною оцтовою кислотою у співвідношенні 3 : 1) одержували фіксовані клітинні осадки, які зберігали у морозильній камері при температурі – 20 °C до приготування препаратів метафазних хромосом.

Клітини недрібноклітинного раку легень людини A-549 культивували в поживному середовищі Advanced DMEM/F12 за стандартною методикою [20].

При дослідженні індукції і персистенції пухлинно-індукованого ефекту свідка кондиційне середовище клітин A-549 відбирали через 24 години після заміни і додавали до культури лімфоцитів крові в об'ємі 0,30 мл перед початком культивування. Фіксацію і обробку культур проводили на 48, 72, 96 і 120 годині, що відповідало проходженню лімфоцитами периферичної крові першого – четвертого мітотичних поділів.

Препарати метафазних хромосом фарбували рівномірно барвником Гімза (Merck, Німеччина). Цитогенетичний аналіз проводили під світловими мікроскопами «Aristoplan» (Leitz, Німеччина), «Axioscope» (Opton, Німеччина), «Axioplan» (Opton, Німеччина) зі збільшенням $\times 1000$. Під час цитогенетичного аналізу враховували аберації хроматидного (одиначні ацентричні фрагменти, хроматидні обміни) та хромосомного (парні фрагменти, ацентричні кільця, дицентричні та кільцеві хромосоми, аномальні моноцентрики) типів. Загалом при виконанні роботи проаналізовано 8000 клітин.

Для кожної точки дослідження, якою вважали культуру лімфоцитів крові однієї обстеженої особи, розраховували відсоток аберантних метафаз і частоту аберацій хромосом на 100 метафаз. Дані по окремих точках дослідження об'єднували у варіанти дослідження (1, 2, 3, 4 мітози) в контролі та при розвитку пухлинно-індукованого ефекту свідка з подальшим розрахун-

cytogenetic examination were involved in the study based on informed consent.

Cultivation of human whole blood was performed using the generally accepted semi-micro-method in our modification [19]. Heparinized venous blood with a volume of 0.50 ml was cultured with the addition of 4.50 ml of RPMI 1640 nutrient medium with L-glutamine (Sigma, USA), 0.10 ml of phytohemagglutinin (PHA, Difco-P, Sigma, USA) for 48 hours, which allowed analyzing cells mainly of the first cultural mitosis; 72 hours – second mitosis; 96 hours – third; 120 hours – fourth mitosis. Two hours before the end of cultivation, 0.10 ml of colcemid (Colcemid, USA) was added. After hypotonic treatment (0.075 M KCl solution) and fixation (96% ethanol and glacial acetic acid in a ratio of 3:1), fixed cell sediments were obtained, which were stored in a freezer at – 20 °C until the preparation of metaphase chromosome slides.

Human non-small cell lung cancer A-549 cells were cultured in Advanced DMEM/F12 nutrient medium according to standard methods [20].

When studying the induction and persistence of the tumor-induced bystander effect, the conditioned medium of A-549 cells 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. Fixation and processing of cultures were performed at 48, 72, 96, and 120 hours, which corresponded to the passage of peripheral blood lymphocytes through the first to fourth mitotic divisions.

Metaphase chromosome slides were uniformly stained with Giemsa dye (Merck, Germany). Cytogenetic analysis was performed under light microscopes «Aristoplan» (Leitz, Germany), «Axioscope» (Opton, Germany), «Axioplan» (Opton, Germany) with $\times 1000$ magnification. During cytogenetic analysis, chromatid (single acentric fragments, chromatid exchanges) and chromosomal (paired fragments, acentric rings, dicentric and ring chromosomes, abnormal monocentrics) types of aberrations were taken into account. In total, 8000 cells were analyzed during the work.

For each experimental point which was considered a culture of blood lymphocytes from one examined individual, the percentage of aberrant metaphases and the frequency of chromosome aberrations per 100 metaphases were calculated. Data for individual experimental points were combined into experiment variants (1, 2, 3, 4 mitoses) in the control and during the development of the tumor-

ком середньогрупових значень і статистичних похибок. Знаходили різницю між середніми значеннями в окремих варіантах дослідження. Перевірку нульових гіпотез проводили на рівні значущості $p < 0,05$ за допомогою критерію Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ

Цитогенетичний аналіз лімфоцитів крові здорових осіб встановив, що у першому мітотичному поділі (на 48 годині культивування) середня частота абераційних клітин та рівень аберацій хромосом становили 1,90 на 100 клітин (табл. 1). Аберації хроматидного типу (одиначні фрагменти) складали 37 % від загальної кількості пошкоджень хромосом. Вони зареєстровані з середньою частотою 0,70 на 100 метафаз (табл. 2). Середньогруповий рівень аберацій хромосомного типу становив 1,20 на 100 метафаз. Вони були представлені ацентричними парними фрагменти з частотою 1,10 на 100 клітин та аномальними моноцентриками з середньою частотою 0,10 на 100 клітин. У другому мітозі (72 години культивування) спостерігали тенденцію до підвищення середньогрупової частоти аберацій хромосом, а у третьому і четвертому – до зниження порівняно з показником першого клітинного поділу. У четвертому мітотичному поділі (120 годин культивування) цей показник складав 1,50 на 100 метафаз. Індивідуальні частоти аберацій хромосом у першому і другому мітотичних поділах лімфоцитів крові знаходилися в межах 1,00–3,00 на 100 метафаз, у третьому і четвертому мітозах – 1,00–2,00 на 100 метафаз.

induced bystander effect, with subsequent calculation of group mean values and statistical errors. The difference between the mean values in individual study variants was found. Null hypotheses were tested at a significance level of $p < 0.05$ using Student's t -test.

RESULTS

Cytogenetic analysis of blood lymphocytes from healthy individuals showed that in the first mitotic division (at 48 hours of cultivation) the mean frequency of aberrant cells and the level of chromosome aberrations were 1.90 per 100 cells (Table 1). Chromatid-type aberrations (single fragments) accounted for 37% of the total number of chromosome lesions. They were registered with a mean frequency of 0.70 per 100 metaphases (Table 2). The mean group level of chromosome-type aberrations was 1.20 per 100 metaphases. They were represented by acentric paired fragments with a frequency of 1.10 per 100 cells and abnormal monocentrics with an average frequency of 0.10 per 100 cells. In the second mitosis (72 hours of cultivation), a tendency was observed to increase the mean group frequency of chromosome aberrations, and in the third and fourth – to decrease compared to the indicator of the first cell division. In the fourth mitotic division (120 hours of cultivation) this indicator was 1.50 per 100 metaphases. Individual frequencies of chromosome aberrations in the first and second mitotic divisions of blood lymphocytes were within 1.00–3.00 per 100 metaphases, in the third and fourth mitoses – 1.00–2.00 per 100 metaphases.

Таблиця 1

Основні цитогенетичні показники при дослідженні персистенції пухлинно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах крові людини, $M \pm m$

Table 1

The main cytogenetic data in the study of the persistence of the tumor-induced bystander effect in human blood lymphocytes, $M \pm m$

Варіанти досліджу		Кількість проаналізованих клітин	Частота аберантних клітин, % Frequency of aberrant cells, %	Частота аберацій хромосом, на 100 клітин Frequency of chromosome aberration, per 100 cells	
Experimental variants				середня mean	мінімальна—максимальна minimum—maximum
Контроль / Control					
Мітоз Mitosis	1	1000	1,90 ± 0,43	1,90 ± 0,43	1,00—3,00
	2	1000	2,00 ± 0,44	2,00 ± 0,44	1,00—3,00
	3	1000	1,70 ± 0,41	1,70 ± 0,41	1,00—2,00
	4	1000	1,50 ± 0,38	1,50 ± 0,38	1,00—2,00
Пухлинно-індукований ефект свідка / Tumor-induced bystander effect					
Мітоз Mitosis	1	1000	3,40 ± 0,57	3,40 ± 0,57	2,00—5,00
	2	1000	3,60 ± 0,59	3,60 ± 0,59	3,00—4,00
	3	1000	3,10 ± 0,55	3,10 ± 0,55	3,00—4,00
	4	1000	2,80 ± 0,52	2,80 ± 0,52	2,00—4,00

Таблиця 2

Частота аберацій хроматидного і хромосомного типу при дослідженні персистенції пухлинно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах крові людини, $M \pm m$

Table 2

Frequency of chromatid and chromosome type aberrations in the study of the persistence of the tumor-induced bystander effect in human blood lymphocytes, $M \pm m$

Варіанти досліджу		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	
Experimental variants						
Контроль / Control						
Мітоз Mitosis	1	0,70 ±0,26	1,10 ± 0,33	0,10 ± 0,10	0,00 ± 0,00	1,20 ± 0,34
	2	1,00 ±0,31	1,00 ± 0,31	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,31
	3	0,90 ±0,30	0,80 ± 0,28	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,80 ± 0,28
	4	1,10 ±0,33	0,40 ± 0,20	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,20
Пухлинно-індукований ефект свідка / Tumor-induced bystander effect						
Мітоз Mitosis	1	2,20±0,46	1,10 ± 0,33	0,10 ± 0,10	0,00 ± 0,00	1,20 ± 0,34
	2	2,10±0,45	1,40 ± 0,37	0,10 ± 0,10	0,00 ± 0,00	1,50 ± 0,38
	3	2,00±0,44	1,10 ± 0,33	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,10 ± 0,33
	4	2,40±0,40	0,40 ± 0,20	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,20

Середньогрупова частота аберацій хромосом у першому мітотичному поділі лімфоцитів периферичної крові людини при культивуванні із додаванням кондиційного середовища від клітин недрібноклітинного раку легені людини А-549 перевищувала відповідний контрольний рівень ($p < 0,05$) і становила 3,40 на 100 клітин з індивідуальними коливаннями в межах 2,00–5,00 на 100 клітин. Аберації хроматидного типу складали 65 % від загальної кількості пошкоджень хромосом. Вони були представлені одиночними фрагментами з середньогруповою частотою 2,20 на 100 клітин, що перевищувала контрольну ($p < 0,05$). Індивідуальні показники частоти аберацій хроматидного типу знаходились у межах від 1,00 до 3,00 на 100 клітин (рис. 1). У восьми випадках дослідження спостерігали зростання цього показника порівняно з контрольним рівнем, що свідчить про індукцію пухлинно-індукованого ефекту свідка. У випадках 7 і 8 рівень аберацій хроматидного типу не змінився – пухлинно-індукованого ефекту свідка не було зареєстровано. Збільшення хромосомної нестабільності при індукції пухлинно-індукованого ефекту свідка не залежало від фонових рівнів аберацій хромосом. Частота аберацій хромосомного типу становила 1,20 на 100 клітин, що не мало статистично значущої різниці з контрольним рівнем в інтактних лімфоцитах крові ($p > 0,05$). Аберації хромосомного типу були представлені парними ацентричними фрагментами з частотами 1,10 на 100

The mean group frequency of chromosome aberrations in the first mitotic division of human peripheral blood lymphocytes when cultured with the addition of conditioned medium from human non-small cell lung cancer A-549 cells exceeded the control level ($p < 0.05$) and was 3.40 per 100 cells, with individual variations ranging from 2.00 to 5.00 per 100 cells. Chromatid-type aberrations constituted 65% of the total number of chromosome damages. They were represented by single fragments with a mean group frequency of 2.20 per 100 cells, which exceeded the control ($p < 0.05$). Individual indicators of chromatid-type aberration frequency ranged from 1.00 to 3.00 per 100 cells (Fig. 1). In eight experimental cases, an increase in this indicator was observed compared to the control level, indicating the induction of a tumor-induced bystander effect. In cases 7 and 8, the level of chromatid-type aberrations did not change, and no tumor-induced bystander effect was registered. The increase in chromosomal instability during the induction of the tumor-induced bystander effect did not depend on the background level of chromosome aberrations. The frequency of chromosomal aberrations was 1.20 per 100 cells, which showed no statistically significant difference from the control level in intact blood lymphocytes ($p > 0.05$). Chromosomal-type aberrations were represented by paired acentric fragments with frequencies of 1.10 per 100 cells

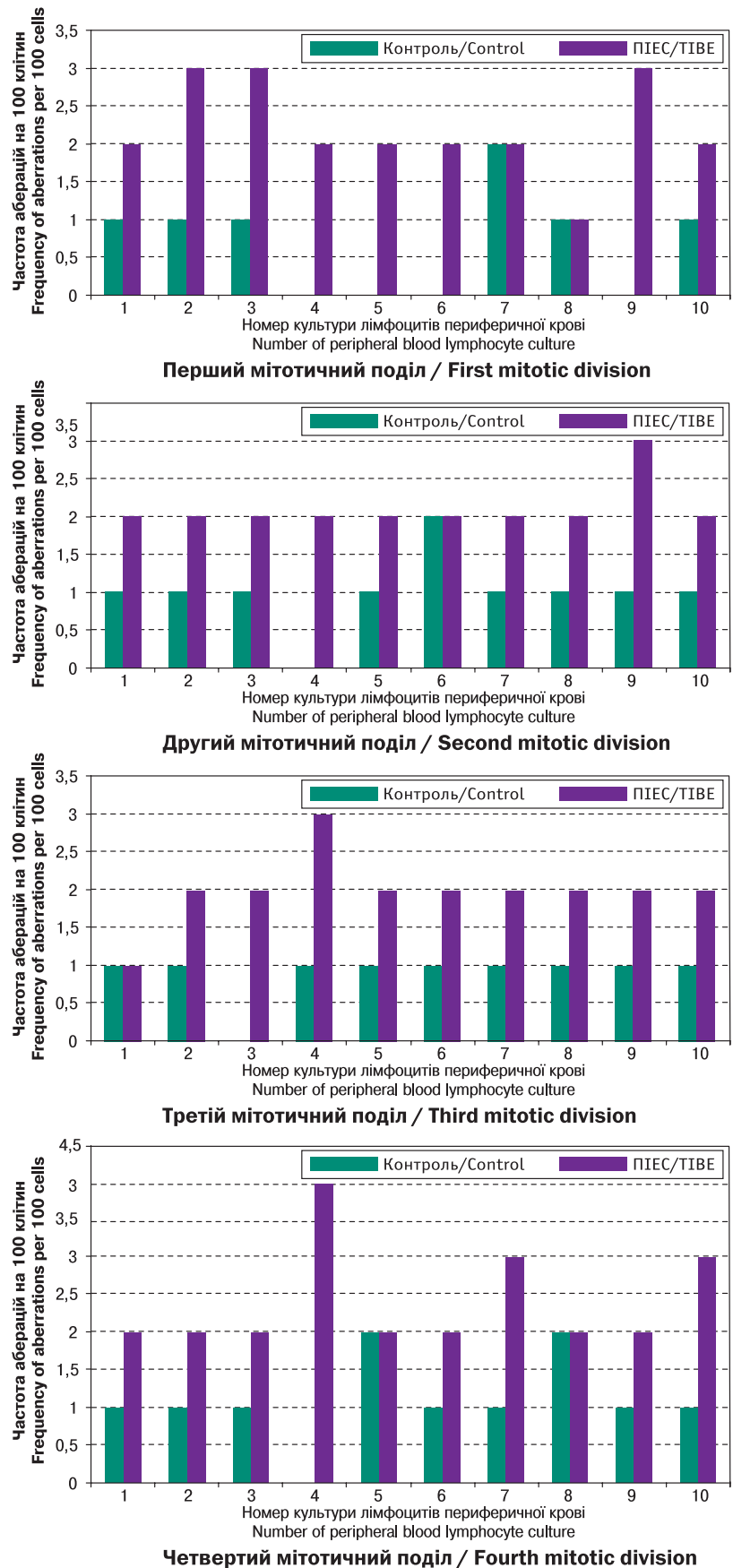


Рисунок 1. Індивідуальні частоти аберацій хроматидного типу в лімфоцитах периферичної крові людини при дослідженні персистенції пухлинно-індукованого ефекту свідка

Figure 1. Individual frequencies of chromatid-type aberrations in human peripheral blood lymphocytes in a study of the persistence of tumor-induced bystander effect

клітин та аномальними моноцентриками на рівні 0,10 на 100 клітин, що не мали істотної різниці з показниками групи порівняння ($p > 0,05$). Асиметричних хромосомних обмінів (дицентричних і кільцевих хромосом) не виявлено.

У другому мітотичному поділі лімфоцитів крові здорових осіб за ко-культивування з додаванням кондиційного середовища культури клітин недрібноклітинного раку легень людини А-549 середньогрупова частота аберантних клітин складала 3,60 % з індивідуальними коливаннями від 3,00 % до 4,00 %. Пошкоджені клітини мали по 1 аберації хромосом, внаслідок чого середня частота аберацій хромосом також становила 3,60 на 100 клітин і перевищувала таку у групі порівняння ($p < 0,05$). Аберації хроматидного типу (одиначні фрагменти), зареєстровані з середньогруповою частотою 2,10 на 100 клітин, що перевищувала контрольну ($p < 0,05$). Індивідуальні рівні цих пошкоджень у обстежених осіб знаходились в межах від 2,00 до 3,00 на 100 клітин. У дев'яти випадках досліджу спостерігали зростання частоти аберацій хроматидного типу порівняно з контролем, що свідчить про індукцію пухлинно-індукованого ефекту свідка ($p < 0,05$). У випадку 6 рівень аберацій хроматидного типу не змінився - пухлинно-індукованого ефекту свідка не було зареєстровано. Збільшення хромосомної нестабільності не залежало від фонового рівня аберацій хромосом. Частота аберацій хромосомного типу становила 1,50 на 100 клітин і не мала значущої різниці з контрольним рівнем в інтактних лімфоцитах крові ($p > 0,05$). Вони були представлені парними фрагментами з частотою 1,40 на 100 клітин та аномальними моноцентриками на рівні 0,10 на 100 клітин. Парні фрагменти виявлені у всіх обстежених осіб з межами коливань 1,00–2,00 на 100 клітин, тоді як аномальний моноцентри зареєстровано лише у випадку 6 з частотою 1,00 на 100 клітин. Асиметричних хромосомних обмінів (дицентричних і кільцевих хромосом) не виявлено.

У третьому мітотичному поділі лімфоцитів крові людини за ко-культивування з додаванням кондиційного середовища культури клітин недрібноклітинного раку легень людини А-549 середньогрупова частота аберантних клітин складала 3,10 %, середньогрупова частота аберацій хромосом – 3,60 на 100 клітин, індивідуальні коливання показників знаходились у межах від 3,00 до 4,00 на 100 клітин. Ці результати перевищували відповідні показники у групі порівняння ($p < 0,05$). Аберації хроматидного типу, зареєстровані з середньогруповою частотою

and abnormal monocentrics at a level of 0.10 per 100 cells, which did not differ significantly from the comparison group's indicators ($p > 0.05$). Asymmetric chromosomal exchanges (dicentric and ring chromosomes) were not detected.

In the second mitotic division of blood lymphocytes from healthy individuals, when co-cultured with the addition of conditioned medium from human non-small cell lung cancer A-549 cells, the mean group frequency of aberrant cells was 3.60 % with individual variations from 3.00 % to 4.00 %. Damaged cells had 1 chromosome aberration each, as a result of which the mean frequency of chromosome aberrations also constituted 3.60 per 100 cells which was higher than that in the comparison group. Chromatid-type aberrations (single fragments) were registered with the mean group frequency of 2.10 per 100 cells, which exceeded the control ($p < 0.05$). Individual levels of these damages in the examined individuals ranged from 2.00 to 3.00 per 100 cells. In nine experimental cases, an increase in the frequency of chromatid-type aberrations was observed compared to the control, indicating the induction of a tumor-induced bystander effect ($p < 0.05$). In case 6, the level of chromatid-type aberrations did not change, and no tumor-induced bystander effect was registered. The increase in chromosomal instability did not depend on the background level of chromosome aberrations. The frequency of chromosomal-type aberrations was 1.50 per 100 cells and showed no significant difference from the control level in intact blood lymphocytes ($p > 0.05$). They were represented by paired fragments with a frequency of 1.40 per 100 cells and abnormal monocentrics at a level of 0.10 per 100 cells. Paired fragments were found in all examined individuals with a range of 1.00–2.00 per 100 cells, while an abnormal monocentric was recorded only in case 6 with a frequency of 1.00 per 100 cells. Asymmetric chromosomal exchanges (dicentric and ring chromosomes) were not detected.

In the third mitotic division of human blood lymphocytes when co-cultured with the addition of conditioned medium from human non-small cell lung cancer A-549 cells, the mean group frequency of aberrant cells was 3.10%, and the the mean group frequency of chromosome aberrations was 3.60 per 100 cells; individual variations of indicators ranged from 3.00 to 4.00 per 100 cells. These results exceeded the corresponding indicators in the comparison group ($p < 0.05$). Chromatid-type aberrations were registered with the mean group frequency of 2.00 per 100 cells, which

тою 2,00 на 100 клітин, що перевищувала контрольну ($p < 0,05$). Одиночні фрагменти виявлені у всіх обстежених осіб на рівні, що знаходився в межах від 1,00 до 3,00 на 100 клітин. Аналіз частоти цих аберацій у окремих осіб показав, що у дев'яти випадках спостерігали її зростання, у одному - вона дорівнювала контрольній. Частота аберацій хромосомного типу у третьому мітотичному поділі лімфоцитів крові здорових осіб за культивування з додаванням кондиційного середовища від культури клітин недрібноклітинного раку легень людини А-549 становила 1,10 на 100 клітин, що не мало статистично значущої різниці з контрольним рівнем в інтактних лімфоцитах крові людини ($p > 0,05$). Аберації хромосомного типу були представлені парними фрагментами. Симетричних (аномальних моноцентриків) та асиметричних (дицентричних і кільцевих хромосом) хромосомних обмінів не виявлено.

У четвертому мітотичному поділі лімфоцитів крові здорових осіб за культивування з кондиційним середовищем культури клітин недрібноклітинного раку легень людини А-549 середньогруповою частота аберацій хромосом становила 2,80 %. Середньогруповий рівень аберацій хромосом становив 2,80 на 100 клітин і перевищував відповідний контроль ($p < 0,05$). У окремих варіантах дослідження показник знаходився у межах від 2,00 до 4,00 на 100 клітин. Переважну більшість (86 %) пошкоджень хромосом складали аберації хроматидного типу – одиночні фрагменти. Їх середньогруповою частота становила 2,40 на 100 клітин і перевищувала контрольну ($p < 0,05$). Аберації хроматидного типу виявлені у всіх обстежених осіб на рівні 2,00–3,00 на 100 клітин. У восьми випадках дослідження спостерігали зростання частоти цих аберацій порівняно з контролем, що свідчить про індукцію пухлинно-індукованого ефекту свідка. У випадку 4 спостерігали підвищення їх частоти до 4 на 100 клітин (найбільший показник у групі) при відсутності пошкоджень хроматидного типу у контролі. У випадках 5 і 8 рівень аберацій хроматидного типу не змінився порівняно з контролем – пухлинно-індукованого ефекту свідка не було зареєстровано. Частота аберацій хромосомного типу становила 0,40 на 100 клітин, що не мало значущої різниці з контрольним рівнем в інтактних лімфоцитах крові ($p > 0,05$). Аберації хромосомного типу були представлені лише парними фрагментами. Ці аберації виявлені у п'яти з десяти варіантів дослідження з частотою 1,00 на 100 клітин. Симетричних (аномальних моноцентриків) та асиметричних (дицентричних і кільцевих хромосом) хромосомних обмінів не виявлено.

exceeded the control ($p < 0.05$). Single fragments were found in all examined individuals at a level ranging from 1.00 to 3.00 per 100 cells. Analysis of the frequency of these aberrations in individual subjects showed that in nine cases its increase was observed, in one it was equal to the control value. The frequency of chromosomal-type aberrations in the third mitotic division of blood lymphocytes from healthy individuals when cultured with the addition of conditioned medium from human non-small cell lung cancer A-549 cells was 1.10 per 100 cells, which showed no statistically significant difference from the control level in intact human blood lymphocytes ($p > 0.05$). Chromosomal-type aberrations were represented by paired fragments. Symmetric (abnormal monocentrics) and asymmetric (dicentric and ring chromosomes) chromosomal exchanges were not detected.

In the fourth mitotic division of blood lymphocytes from healthy individuals when cultured with conditioned medium from human non-small cell lung cancer A-549 cells, the mean group frequency of aberrant cells was 2.80%. The mean group level of chromosome aberrations was 2.80 per 100 cells and exceeded the corresponding control ($p < 0.05$). In individual experimental variants, the indicator ranged from 2.00 to 4.00% per 100 cells. The vast majority (86%) of chromosome damages were chromatid-type aberrations – single fragments. Their mean group frequency was 2.40 per 100 cells and exceeded the control ($p < 0.05$). Chromatid-type aberrations were found in all examined individuals at a level of 2.00–3.00 per 100 cells. In eight experimental cases, an increase in the frequency of these aberrations was observed compared to the control, indicating the induction of a tumor-induced bystander effect. In case 4, their frequency increased to 4.00 per 100 cells (the highest indicator in the group) in the absence of chromatid-type damages in the control. In cases 5 and 8, the level of chromatid-type aberrations did not change compared to the control, and no tumor-induced bystander effect was registered. The frequency of chromosomal-type aberrations was 0.40 per 100 cells, which showed no significant difference from the control level in intact blood lymphocytes ($p > 0.05$). Chromosomal-type aberrations were represented only by paired fragments. These aberrations were found in five out of ten experimental variants with a frequency of 1.00 per 100 cells. Symmetric (abnormal monocentrics) and asymmetric (dicentric and ring chromosomes) chromosomal exchanges were not detected.

ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення персистенції геномної нестабільності у нормальних лімфоцитах крові людини внаслідок генотоксичного впливу кондиційного середовища малігнізованих клітин лінії А-549 потребувало визначення фонових (контрольних) рівнів аберацій хромосом впродовж всього періоду спостереження для виключення можливих випадків з затриманою хромосомною нестабільністю (коли зміни в хромосомах внаслідок дії мутагенних чинників проявляються не після впливу, а в наступних генераціях клітин [21]). Цитогенетичне дослідження показало, що частота аберацій хромосом у лімфоцитах крові здорових осіб відповідала спонтанному рівню аберацій хромосом у осіб середнього віку [22]. Не зареєстровано випадків перевищення верхньої популяційної межі спонтанної частоти аберацій хромосом, що складає 3 %. Осіб з затриманою хромосомною нестабільністю не виявлено. Отримані результати засвідчили стабільність геному лімфоцитів крові обстежених осіб. Це дозволило використати їхню кров при вивченні персистенції геномної нестабільності внаслідок індукції пухлинно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах крові людини за умов впливу кондиційного середовища клітин недрібноклітинного раку легень людини лінії А-549.

У всіх варіантах досліду за довготривалого культивування лімфоцитів крові здорових осіб з кондиційним середовищем клітин недрібноклітинного раку легень людини лінії А-549 середні частоти аберацій хромосом перевищували відповідні контрольні значення в інтактних лімфоцитах ($p < 0,05$) та значуще не розрізнялись між мітотичними поділами ($p > 0,05$). Це свідчить про розвиток пухлинно-індукованого ефекту свідка та його персистенцію впродовж періоду спостереження. Отримані результати підтверджують дані наших досліджень щодо розвитку пухлинно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах крові людини за 48-годинного культивування, отримані при вивченні вторинного радіаційно-індукованого ефекту свідка із застосуванням цієї ж модельної системи [23]. Проте персистенцію ефекту свідка в цих дослідженнях не вивчали.

Аберації хроматидного типу (одиначні фрагменти внаслідок хроматидних розривів) складали більшість пошкоджень хромосом при розвитку пухлинно-індукованого ефекту свідка за всіх термінів культивування лімфоцитів крові людини. Ці аберації є маркерами хромосомної нестабільності, індукція яких притаманна для розвитку

DISCUSSION

Studying the persistence of genomic instability in normal human blood lymphocytes due to the genotoxic effect of conditioned medium from malignant A-549 cells required determining background (control) levels of chromosome aberrations throughout the entire observation period. This was done to rule out possible cases of delayed chromosomal instability, where changes in chromosomes due to mutagenic factors manifest not immediately after exposure, but in subsequent cell generations [21]. Cytogenetic studies showed that the frequency of chromosome aberrations in blood lymphocytes of healthy individuals corresponded to the spontaneous level of chromosome aberrations in middle-aged individuals [22]. No cases of exceeding the upper population limit of spontaneous chromosome aberration frequency, which is 3%, were registered. No individuals with delayed chromosomal instability were identified. The obtained results confirmed the genomic stability of lymphocytes in the examined individuals. This allowed their blood to be used to study the persistence of genomic instability due to the induction of the tumor-induced bystander effect in human blood lymphocytes under the influence of conditioned medium from human non-small cell lung cancer A-549 cells.

In all experimental variants of long-term cultivation of blood lymphocytes from healthy individuals with conditioned medium from human non-small cell lung cancer A-549 cells, the mean frequencies of chromosome aberrations exceeded the corresponding control values in intact lymphocytes ($p < 0.05$) and did not differ significantly between mitotic divisions ($p > 0.05$). This indicates the development of the tumor-induced bystander effect and its persistence throughout the observation period. The obtained results confirm the data from our previous studies regarding the development of the tumor-induced bystander effect in human blood lymphocytes during 48-hour cultivation, obtained when studying the secondary radiation-induced bystander effect using the same model system [23]. However, the persistence of the bystander effect was not studied in those investigations.

Chromatid-type aberrations (single fragments due to chromatid breaks) constituted the majority of chromosome damages during the development of the tumor-induced bystander effect at all cultivation times of human blood lymphocytes. These aberrations are markers of chromosomal instability, and their induction is characteristic of the bystander

ефекту свідка [3]. Їх частка збільшилась від 65 % у першому мітотичному поділі за культивування протягом 48 годин до 86 % в четвертому мітозі, коли тривалість культивування становила 120 годин. Рівні аберацій хроматидного типу в усіх варіантах досліджу перевищували контрольні показники ($p < 0,01$), що вказує на персистенцію геномної нестабільності впродовж всього періоду спостереження.

Аналіз індивідуальних частот аберацій хроматидного типу впродовж чотирьох мітотичних поділів показав, що частота аберацій хромосом у лімфоцитах крові за культивування з кондиційним середовищем не корелювала з фоновими частотами пошкоджень хромосом. Зареєстровано міжіндивідуальну варіабельність у здатності до індукції пухлинно-індукованого ефекту свідка. У випадку 4 рівень аберацій хроматидного типу збільшувався з другого по четвертий мітотичний поділ лімфоцитів крові (2,00, 3,00 та 4, 00 на 100 клітин відповідно) при відсутності цих пошкоджень хромосом у контрольних культурах першого, другого та четвертого мітозів, що вказує на зростання геномної нестабільності. У випадку 10 зареєстровано індукцію пухлинно-індукованого ефекту свідка з частотою одиночних фрагментів на рівні 2,00 на 100 клітин протягом першого-третього мітотичних поділів лімфоцитів крові, тоді як у четвертому мітозі частота аберацій хроматидного типу зросла до 3,00 на 100 клітин. У решти обстежених осіб спостерігали стабілізацію підвищеного рівня аберацій хроматидного типу протягом 120 годин (чотирьох мітозів) спостереження.

Середньогрупові частоти аберацій хромосомного типу у лімфоцитах крові здорових осіб за культивування протягом чотирьох мітотичних поділів з додаванням кондиційного середовища клітин недрібноклітинного раку легень людини А-549 не мали статистично значущої різниці з відповідними контрольними рівнями. У другому мітотичному поділі спостерігали тенденцію до підвищення цього показника порівняно з першим мітозом, що могло стати наслідком віднесення при цитогенетичному аналізі подвійних хроматидних розривів (пошкоджень хроматидного типу) до ацентричних парних фрагментів (аберацій хроматидного типу), що важко розрізнити при рівномірному забарвленні хромосом. У третьому мітотичному поділі лімфоцитів крові спостерігали тенденцію до зниження частоти аберацій хромосомного типу, а в четвертому їх рівень став нижчим за показник, зареєстрований у першому мітозі ($p < 0,05$) і

effect's development [3]. Their proportion increased from 65% in the first mitotic division during 48-hour cultivation to 86% in the fourth mitosis, when the cultivation duration was 120 hours. The levels of chromatid-type aberrations in all experimental variants exceeded control indicators ($p < 0.01$), indicating the persistence of genomic instability throughout the entire observation period.

Analysis of individual frequencies of chromatid-type aberrations during four mitotic divisions showed that the frequency of chromosome aberrations in blood lymphocytes cultivated with conditioned medium did not correlate with background frequencies of chromosome damage. Interindividual variability in the ability to induce tumor-induced bystander effect was registered. In case 4, the level of chromatid-type aberrations increased from the second to the fourth mitotic division of blood lymphocytes (2.00, 3.00, and 4.00 per 100 cells, respectively) in the absence of these chromosome damages in control cultures of the first, second, and fourth mitoses, indicating an increase in genomic instability. In case 10, the induction of the tumor-induced bystander effect was registered with a frequency of single fragments at a level of 2.00 per 100 cells during the first to third mitotic divisions of blood lymphocytes, while in the fourth mitosis, the frequency of chromatid-type aberrations increased to 3.00 per 100 cells. In the remaining examined individuals, a stabilization of the elevated level of chromatid-type aberrations was observed throughout the 120-hour (four mitoses) observation period.

The mean group frequencies of chromosomal-type aberrations in blood lymphocytes of healthy individuals during four mitotic divisions of cultivation with the addition of conditioned medium from human non-small cell lung cancer A-549 cells did not show a statistically significant difference from the control levels. In the second mitotic division, a tendency to increase this indicator compared to the first mitosis was observed. It could be a consequence of classifying double chromatid breaks (chromatid-type damages) as acentric paired fragments (chromatid-type aberrations) during cytogenetic analysis, which are difficult to distinguish with uniform chromosome staining. In the third mitotic division of blood lymphocytes, a tendency to decrease the frequency of chromosomal-type aberrations was observed, and in the fourth, their level became lower than the indicator registered in the first mitosis ($p < 0.05$) and corresponded to the control ($p > 0.05$). This result is

відповідав контрольному ($p > 0,05$). Результат зумовлений елімінацією ацентричних пошкоджень хромосомного типу при поділі клітин внаслідок їхніх морфологічних особливостей та ймовірно меншою життєздатністю клітин з делеціями хромосом внаслідок нестачі генетичного матеріалу, тоді як розвиток пухлинно-індукованого ефекту свідка не впливав на індукцію аберацій цього типу.

Отримані нами результати щодо індукції і персистенції геномної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові людини при розвитку пухлинно-індукованого ефекту свідка дозволяють пояснити природу підвищеної частоти аберацій хромосом в лімфоцитах периферичної крові осіб з онкологічною патологією персистенцію пухлинно-індукованого ефекту свідка *in vivo* [3, 24]. В когортних дослідженнях, де показано, що частота аберацій хромосом у крові людини може бути прогностичним показником ризику розвитку раку, не можна виключити існування початкових стадій онкологічного процесу, що індукують підвищення хромосомної нестабільності ще до клінічної маніфестації хвороби [24–26].

ВИСНОВКИ

У лімфоцитах периферичної крові здорових осіб за культивування впродовж чотирьох клітинних поділів з кондиційним середовищем клітин недрібноклітинного раку легень людини лінії A-549 зареєстровано підвищений рівень аберацій хромосом, що вказує на персистенцію в них геномної нестабільності внаслідок розвитку пухлинно-індукованого ефекту свідка. Частоти аберацій хроматидного типу (одиначних фрагментів) перевищували відповідні контролю і значуще не розрізнялись між окремими мітотичними поділами. Розвиток пухлинно-індукованого ефекту свідка не впливав на індукцію аберацій хромосомного типу (ацентричних фрагментів, аномальних моноцентриків, дицентричних хромосом), рівні яких не мали істотної різниці з контрольними.

Джерела фінансування

Дослідження виконані за рахунок державного бюджету — фінансування НАМН України в межах НДР «Дослідження персистенції геномної нестабільності при розвитку пухлинно-індукованого ефекту свідка в соматичних клітинах людини».

Конфлікт інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

due to the elimination of acentric chromosomal-type damages during cell division due to their morphological features and probably lower viability of cells with chromosome deletions due to a lack of genetic material, whereas the development of the tumor-induced bystander effect did not affect the induction of aberrations of this type.

Our results on the induction and persistence of genomic instability in human peripheral blood lymphocytes during the development of tumor-induced bystander effect allow us to explain the nature of the increased frequency of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of individuals with oncological pathology due to the persistence of tumor-induced bystander effect *in vivo* [3, 24]. In cohort studies where it has been shown that the frequency of chromosome aberrations in human blood can be a prognostic indicator of cancer risk, the existence of initial stages of the oncological process that induce an increase in chromosomal instability even before the clinical manifestation of the disease cannot be excluded [24–26].

CONCLUSIONS

In human peripheral blood lymphocytes, after cultivating for four cell divisions with conditioned medium from human non-small cell lung cancer A-549 cells, an elevated level of chromosome aberrations was registered, indicating the persistence of genomic instability in them due to the development of the tumor-induced bystander effect. The frequencies of chromatid-type aberrations (single fragments) exceeded the controls and did not differ significantly between individual mitotic divisions. The development of the tumor-induced bystander effect did not influence the induction of chromosomal-type aberrations (acentric fragments, abnormal monocentrics, dicentric chromosomes), whose levels did not differ significantly from the controls.

Sources of funding

The research was carried out within the framework of the research project «Study of the persistence of genomic instability during the development of tumor-induced bystander effect in human somatic cells», funded by the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, State budget.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. 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.
2. Burdak-Rothkamm S., Rothkamm K. Radiation-induced bystander and systemic effects serve as a unifying model system for genotoxic stress responses. *Mutat. Res.* 2018. Vol. 778. P. 13-22. DOI: 10.1016/j.mrrev.2018.08.001.
3. 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
4. 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: 10.3109/09553002.2010.549533.
5. Exosome-mediated microRNA transfer plays a role in radiation-induced bystander effect / S. Xu, J. Wang, N. Ding et al. *RNA Biol.* 2015. Vol. 12, no. 12. P. 1355-363. DOI: 10.1080/15476286.2015.1100795.
6. Cell-free chromatin from dying cancer cells integrate into genomes of bystander healthy cells to induce DNA damage and inflammation / I. Mittra, U. Samant, S. Sharma et al. *Cell Death Discov.* 2017. Vol. 3. P. 17015. DOI: 10.1038/cddiscovery.2017.15.
7. 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
8. Krzywon A., Widel M. Bystander Me45 melanoma cells increase damaging effect in UVC irradiated cells. *Photochem. Photobiol.* 2019. Vol. 95, no. 4. P. 1019-1028. DOI: 10.1111/PHP.13080.
9. Role of epigenetic effectors in maintenance of the long-term persistent bystander effect in spleen *in vivo* / I. Koturbash, A. Boyko, R. Rodriguez-Juarez et al. *Carcinogenesis.* 2007. Vol. 28, Is. 8. P. 1831-1838. DOI: 10.1093/carcin/bgm053.
10. 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.
11. Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations / A. Janssen, M. Van der Burg, K. Suzhai et al. *Science.* 2011. Vol. 333. P. 1895-1898. DOI: 10.1126/science.1210214.
12. Djomina E. A. Early and late radiation effects in healthy tissues of oncologic patients under therapeutic irradiations. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2017. Vol. 22. P. 23-37. PMID: 29286495.
13. Siri S. O., Martino J., Gottifredi V. Structural chromosome instability: types, origins, consequences, and therapeutic opportunities. *Cancers.* 2021. Vol. 13, no. 12. P. 3056. DOI: 10.3390/cancers13123056.

REFERENCES

1. 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.
2. 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.
3. Shemetun OV., Talan OO., Dibska OB. et al. 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.
4. Lyng FM, Howe OL, McClean B. Reactive oxygen species-induced release of signalling factors in irradiated cells triggers membrane signalling and calcium influx in bystander cells. *Int J Radiat Biol.* 2011;87:683-695. doi: 10.3109/09553002.2010.549533.
5. Xu S, Wang J, Ding N, Hu W, Zhang X, Wang B, et al. Exosome-mediated microRNA transfer plays a role in radiation-induced bystander effect. *RNA Biol.* 2015;12(12):1355-1363. doi: 10.1080/15476286.2015.1100795.
6. Mittra I, Samant U, Sharma S, Raghuram GV, Saha T, Tidke P, et al. Cell-free chromatin from dying cancer cells integrate into genomes of bystander healthy cells to induce DNA damage and inflammation. *Cell Death Discov.* 2017;3:17015. doi: 10.1038/cddiscovery.2017.15.
7. 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.
8. Krzywon A, Widel M. Bystander Me45 melanoma cells increase damaging effect in UVC irradiated cells. *Photochem Photobiol.* 2019; 95(4):1019-1028. doi: 10.1111/php.13080.
9. Koturbash I, Boyko A, Rodriguez-Juarez R, McDonald RJ, Tryndyak VP, Kovalchuk I, et al. Role of epigenetic effectors in maintenance of the long-term persistent bystander effect in spleen *in vivo*. *Carcinogenesis.* 2007;28(8):1831-1838. doi: 10.1093/carcin/bgm053.
10. 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.
11. Janssen A, Van der Burg M, Suzhai K, Kops GJ, Medema RH. Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations. *Science.* 2011;333:1895-1898. doi: 10.1126/science.1210214.
12. Djomina EA. Early and late radiation effects in healthy tissues of oncologic patients under therapeutic irradiations. *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2017;22:23-37. PMID: 29286495.
13. Siri SO, Martino J, Gottifredi V. Structural chromosome instability: types, origins, consequences, and therapeutic opportunities. *Cancers.* 2021;13(12):3056. doi: 10.3390/cancers13123056.

14. Vargas-Rondon N., Villegas V. E., Rondon-Lagos M. The role of chromosomal instability in cancer and therapeutic responses. *Cancers*. 2017. Vol. 10. P. 4. DOI: 10.3390/cancers10010004.
15. Perspectives on the role of bystander effect and genomic instability on therapy-induced secondary malignancy / P. Venkatachalam, M. Chinnadurai, R. Venkateswarlu et al. *Radiat. Cancer Res.* 2017. Vol. 8. P. 53-60. DOI: 10.4103/jrcr.jrcr_22_16.
16. Shemetun O. V., Pilinska M. A. Radiation-induced bystander effect – modeling, manifestation, mechanisms, persistence, cancer risks (literature review). *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2019. Vol. 24. P. 65-92. DOI: 10.33145/2304-8336-2019-24-65-92.
17. Features of cytogenetic effects in oncological patients when using radiotherapy on the background of prior radiation exposure / N. O. Maznyk, T. S. Sypko, V. P. Starenkyi et al. *Ukrainian journal of radiology and oncology*. 2021. Vol. 29, no. 4. P. 48-64. DOI: 10.46879/ukroj.4.2021.48-64.
18. Radiation-induced bystander effect and its clinical implications / H. Tang, L. Cai, X. He et al. *Front. Oncol.* 2023. Vol. 13. P. 1124412. DOI: 10.3389/fonc.2023.1124412.
19. Pilinska M. A., Shemetun O. V., Talan O. A. et al. 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. Вип. 25. P. 353-361. DOI: 10.33145/2304-8336-2020-25-353-361.
20. 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. Vol. 27. P. 234-248. DOI: 10.33145/2304-8336-2022-27-234-248.
21. Дьоміна Е. А., Бариліак І. Р., Пілінська М. А. Глосарій з радіаційної цитогенетики. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2009, Т. 7. № 1. С. 125-163.
22. 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.
23. Shemetun O. V., Talan O. A., Dibska O. B. Study of chromosome stability of human somatic cells in the development of the secondary radiation-induced bystander effect. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2024. Vol. 29. P. 196-210. DOI: 10.33145/2304-8336-2024-29-196-210.
24. Domina E., Hrinchenko O. Biological features of blood lymphocytes of the primary patients with endometrial cancer. *Scientific Journal ScienceRise: Biological Science*. 2021. no. 1 (26). P. 20214. DOI: 10.15587/2519-8025.2021.227335.
25. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22358 subjects in 11 countries / S. Bonassi, H. Norppa, M. Ceppi et al. *Carcinogenesis*. 2008. Vol. 29, Iss. 6. P. 1178-1183. DOI: 10.1093/carcin/bgn075.
14. Vargas-Rondon N., Villegas VE, Rondon-Lagos M. The role of chromosomal instability in cancer and therapeutic responses. *Cancers*. 2017;10:4. doi: 10.3390/cancers10010004.
15. Venkatachalam P, Chinnadurai M, Venkateswarlu R, Venky R, Karthik K, Shangamithra V. 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.
16. Shemetun OV, Pilinska MA. Radiation-induced bystander effect - modeling, manifestation, mechanisms, persistence, cancer risks (literature review). *Probl Radiac Med Radiobiol*. 2019;24:65-92. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-65-92.
17. Maznyk NO, Sypko TS, Starenkyi VP, Hukova I, Artiukh S, Cherkasko L. Features of cytogenetic effects in oncological patients when using radiotherapy on the background of prior radiation exposure. *Ukrainian Journal of Radiology and Oncology*. 2021; 29(4):48-64. doi: 10.46879/ukroj.4.2021.48-64.
18. Tang H, Cai L, He X, Niu Z, Huang H, Hu W, et al. Radiation-induced bystander effect and its clinical implications. *Front Oncol*. 2023;13:1124412. doi: 10.3389/fonc.2023.1124412.
19. Pilinska MA, Shemetun OV, Talan OA et al. Study the effects of ionizing radiation on the level of chromosome instability in human somatic cells during the development of tumor-induced bystander effect. *Problems of radiation medicine and radiobiology*. 2020;25; 353-361. doi: 10.33145/2304-8336-2020-25-353-361.
20. Talko WV, Lavrenchuk GY, Pochapinskiy OD et al. 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.
21. Djomina EA, Barilyak IR, Pilinska MA. Glossary of radiation cytogenetics. *Visnyk Ukrainskogo tovarystva genetykiv i selekcioneriv*. 2009;7(1):125-163.
22. Shemetun OV, Talan OA, Demchenko OM, Kurinniy DA, Papuga MS, Pilinska MA. Frequency of spontaneous and radiation-induced chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of individuals of different ages. *Cytology and Genetics*. 2018;52(6):461-466. doi: 10.3103/S0095452718060117.
23. Shemetun OV, Talan OA, Dibska OB. Study of chromosome stability of human somatic cells in the development of the secondary radiation-induced bystander effect. *Probl Radiac Med Radiobiol*. 2024;29:196-210. doi: 10.33145/2304-8336-2024-29-196-210.
24. Domina E, Hrinchenko O. Biological features of blood lymphocytes of the primary patients with endometrial cancer. *Scientific Journal ScienceRise: Biological Science*. 2021;1(26):20214. doi: 10.15587/2519-8025.2021.227335.
25. Bonassi S, Norppa H, Ceppi M, Stromberg U, Vermeulen R, Znaor A, et al. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis*. 2008;29(6): 1178-1183. doi: 10.1093/carcin/bgn075.
26. Wang H, Wang Y, Kota KK, Sun B, Kallakury B, Mikhail NN, et al. Strong associations between chromosomal aberrations in blood

26. Strong associations between chromosomal aberrations in blood lymphocytes and the risk of urothelial and squamous cell carcinoma of the bladder / H. Wang, Y. Wang, K. K. Kota et al. *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. P. 13493. DOI: 10.1038/s41598-017-13976-y.

lymphocytes and the risk of urothelial and squamous cell carcinoma of the bladder. *Sci Rep.* 2017;7:13493. doi: 10.1038/s41598-017-13976-y.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

Шеметун Олена Володимирівна, доктор медичних наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії цитогенетики відділу медичної генетики Інституту експериментальної радіології ННЦРМГО

ORCID ID: 0000-0001-9038-7082

Талан Оксана Олексіївна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії цитогенетики відділу медичної генетики, Інститут експериментальної радіології ННЦРМГО

Дибська Олена Борисівна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії цитогенетики відділу медичної генетики, Інститут експериментальної радіології ННЦРМГО

INFORMATION ABOUT AUTHORS

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

ORCID ID: 0000-0001-9038-7082

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

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

Стаття надійшла до редакції 29.08.2025

Received: 29.08.2025