

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.04.091>

УДК 579.253.2:614.876:616-008

Д.А. Курінний¹, С.Р. Рушковський², М.А. Пілінська¹

¹ ДУ “Національний науковий центр радіаційної медицини
НАМН України”, Київ

² ННЦ “Інститут біології та медицини”

Київського національного університету ім.Тараса Шевченка

E-mail: kourinni@gmail.com

**Відсутність модифікуючого впливу
астаксантину на цитогенетичний ефект
в лімфоцитах периферичної крові людини,
опромінених *in vitro* на G₂ стадії клітинного циклу**

Представлено членом-кореспондентом НАН України В.А. Кунахом

*Досліджено радіопротекторний потенціал атаксантину після гамма-опромінення культури лімфоцитів периферичної крові людини *in vitro* в дозі 1,0 Гр на постсинтетичній (G₂) стадії першого мітотичного циклу. Показано відсутність модифікуючого впливу атаксантину на стадії G₂, не зафіксовано істотних змін сумарної частоти хромосомних порушень та спектра хромосомних аберацій. Проведено порівняння дії атаксантину на стадіях G₂ та G₀ клітинного циклу.*

Ключові слова: атаксантин, культура лімфоцитів периферичної крові людини, аберації хромосом, радіопротекторний ефект.

Атаксантин, який належить до каротиноїдів ксантофільної групи, є потужним антиоксидантом і відзначається високим рівнем безпеки: в експериментах на тваринах LD₅₀ не виявлено [1]. Як було показано нами раніше, попереднє додавання атаксантину сприяло істотному зменшенню частоти дицентриків та кільцевих хромосом (цитогенетичних маркерів радіаційного впливу) за умов гамма-опромінення *in vitro* в дозі 1,0 Гр культури лімфоцитів периферичної крові людини на пресинтетичній (G₀) стадії першого клітинного циклу [2].

Крім визначення модифікаційних можливостей радіопротекторів при опроміненні на G₀ стадії, важливо проводити такі дослідження на G₂ стадії клітинного циклу, оскільки саме на цій стадії клітини найбільш чутливі до впливу іонізуючого випромінювання, на чому і засновано тест “G₂–radiation sensitivity assay” [3]. Тест базується на взаємозв’язку між чутливістю геному соматичних клітин людини до дії іонізуючого випромінювання на G₂ стадії клітинного циклу та частотою хромосомних порушень. Велика чисельність хроматидних розривів після опромінення на G₂ стадії клітинного циклу може бути результатом високої

© Д.А. Курінний, С.Р. Рушковський, М.А. Пілінська, 2017

ISSN 1025-6415. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2017. № 4

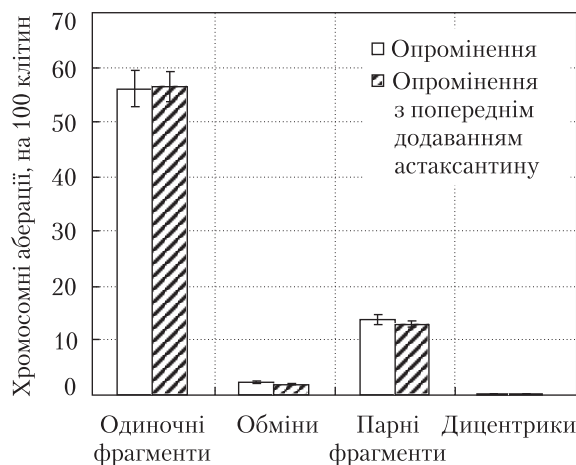


Рис. 1. Зміна радіаційно-індукованої частоти і типів аберацій хромосом під дією іонізуючого випромінювання в дозі 1,0 Гр на G_2 стадії клітинного циклу та впливом астаксантину

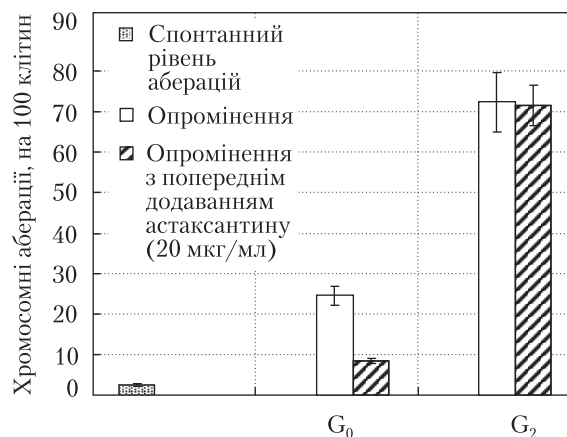


Рис. 2. Порівняння дії астаксантину на частоту аберацій хромосом, індукованих іонізуючим випромінюванням *in vitro* в дозі 1,0 Гр на G_0 і G_2 стадіях клітинного циклу

частоти конверсії розривів дволанцюгової ДНК в аберації хроматидного типу, на тлі зменшення або відсутності репараційної активності. Цей тест застосовується для оцінки індивідуальної радіочутливості хромосом людини *in vitro*, використовується в цитогенетичних обстеженнях онкологічних пацієнтів до і після променевої терапії [4, 5]. Хромосомна гіперчутливість до дії іонізуючого випромінювання на G_2 стадії клітинного циклу розцінюється як один із можливих маркерів схильності до онкопатології [6].

Мета дослідження полягала у визначенні радіопротекторного потенціалу астаксантину після опромінення культури лімфоцитів периферичної крові людини *in vitro* в дозі 1,0 Гр на постсинтетичній (G_2) стадії першого мітотичного циклу.

Для цитогенетичних досліджень використовували загальноприйняту класичну тест-систему — культуру лімфоцитів периферичної крові, одержану від чотирьох умовно здорових волонтерів (дві жінки, двоє чоловіків) віком 35–51 років, середній вік — 41 рік, які заперечували свідомий контакт зі зніаними чи потенційними мутагенами, вели здоровий спосіб життя. Всі особи були залучені до цитогенетичного обстеження за умов поінформованої згоди.

Лімфоцити периферичної крові людини культивували протягом 48 год за модифікованим нами стандартним мікрометодом [7]. У постановці експериментів використовували астаксантин (“Sigma”, США), який додавали до культур лімфоцитів у оптимальній кінцевій концентрації 20,0 мкг/мл, визначеній під час власних попередніх досліджень [2]. Астаксантин вводили в культуральне середовище на 46 год культивування лімфоцитів перед опроміненням культур гамма-квантами випромінювачем IBL-237C (потужність 2,34 Гр/хв) у дозі 1,0 Гр.

Під час цитогенетичного аналізу враховували всі аберації хроматидного (одиночні фрагменти, хроматидні обміни) та хромосомного (вільні парні фрагменти, ацентричні кільця, дицентричні та кільцеві хромосоми, аномальні моноцентрики) типів, які вірогідно можна розпізнати при груповому каріотипуванні на рівномірно пофарбованих препаратах метафазних хромосом [8].

Гамма-опромінення культури лімфоцитів у дозі 1,0 Гр на G_2 стадії мітотичного циклу зумовлювало істотне зростання ($p < 0,001$) сумарної частоти хромосомних порушень (з міжіндивідуальними коливаннями від $54,22 \pm 2,96$ до $97,22 \pm 0,96$ аберацій на 100 метафаз при $72,35 \pm 1,17$ на 100 метафаз по групі в середньому) переважно за рахунок аберацій хроматидного типу — одиночних фрагментів та хроматидних обмінів (з міжіндивідуальними коливаннями від $42,95 \pm 2,93$ до $72,22 \pm 2,63$ при $58,32 \pm 1,29$ на 100 метафаз по групі в середньому). Аберації хромосомного типу представлені в основному парними фрагментами, середньогрупова частота яких ($13,76 \pm 0,90$ на 100 метафаз) також значно перевищувала не тільки їх фоновий рівень ($0,96 \pm 0,21$ на 100 метафаз), але й такий за умов дії радіації в тій самій дозі на G_0 стадії клітинного циклу ($6,47 \pm 0,70$ на 100 метафаз) [2]. У двох осіб зафіксовано появу дицентриків (0,26 та 0,97 на 100 метафаз відповідно), наявність яких можна пояснити відсутністю синхронізації культури, завдяки чому клітини з дицентриками могли отримати радіаційне навантаження, знаходячись на синтетичній (S) стадії клітинного циклу.

Міжіндивідуальні коливання рівня абераційних метафаз становили від $40,0 \pm 3,03$ до $61,11 \pm 2,87$ на 100 клітин. В усіх обстежених осіб частота хромосомних аберацій перевищувала частоту абераційних клітин, відповідно, середньогрупова частота аберацій на одну абераційну клітину дорівнювала 1,54.

У разі додавання астаксантину перед опроміненням істотних змін як сумарної частоти хромосомних порушень ($71,54 \pm 1,34$ на 100 метафаз по групі в середньому), так і спектра аберацій не виявлено (рис. 1): як і раніше, переважали аберації хроматидного типу (одиночні фрагменти та хроматидні обміни) із сумарною середньогруповою частотою $58,47 \pm 1,47$ на 100 метафаз. Аберації хромосомного типу були представлені парними фрагментами, середньогрупова частота яких ($12,94 \pm 0,99$ на 100 метафаз) мала тенденцію до зниження.

Порівняльну характеристику кількісних показників впливу астаксантину на хромосомні порушення, індуковані гамма-квантами *in vitro* на G_0 [2] та G_2 стадіях клітинного циклу, наведено на рис. 2. Якщо дія астаксантину на культуру лімфоцитів крові людини, опромінену на G_0 стадії клітинного циклу, сприяла істотному ослабленню радіоіндукованого цитогенетичного ефекту, у разі опромінення культури лімфоцитів на G_2 стадії мітотичного циклу він не спричиняв радіозахисного ефекту. Механізм модифікуючого впливу астаксантину потребує подальшого вивчення.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Stewart J.S., Lignell A., Pettersson A., Elfving E., Soni M. G. Safety assessment of astaxanthin-rich microalgae biomass: Acute and subchronic toxicity studies in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2008. **46**. P. 3030–3036.
2. Пілінська М.А., Курінний Д.А., Рушковський С.Р., Дибська О.Б. Дія астаксантину на рівень радіаційно-індукованих аберацій хромосом в лімфоцитах периферичної крові людини *in vitro*. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2016. **14**, № 1. P. 52–57.
3. Sanford K.K., Parshad R., Price F.M., Jones G.M., Tarone R.E., Eierman L., Hale P., Waldmann T.A. Enhanced chromatid damage in blood lymphocytes after G_2 phase x-irradiation, a marker of the ataxia-telangiectasia gene. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990. **82**. P. 1050–1055.
4. Dyomina E.A., Ryabchenko N. M. Increased individual chromosomal radiosensitivity of human lymphocytes as a parameter of cancer risk. *Exp. Oncol.* 2007. **29**. P. 217–220.
5. Ryabchenko N.M., Glavin O.A., Shtefura V.V., Anikushko M.F. Chromosomal radiosensitivity in Ukrainian breast cancer patients and healthy individuals. *Exp. Oncol.* 2013. **34**, № 2. P. 121–124.

6. Baert A., Depuydt J., Van Maerken T., Poppe B., Malfait F., Storm K., van den Ende J., Van Damme T., De Nobe S., Perletti G., De Leeneer K., Claes K.B.M., Vral A. Increased chromosomal radiosensitivity in asymptomatic carriers of a heterozygous *BRCA1* mutation. *Breast Cancer Res.* 2016. **18**, 52. 12 p. doi: <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0709-1>.
7. Педан Л.Р., Пілінська М.А. Оцінка стабільності хромосом лімфоцитів периферичної крові осіб, постраждалих від дії факторів Чорнобильської аварії, за допомогою тестуючого мутагенного навантаження *in vitro*. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2004. № 5. С. 175–179.
8. Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. Хромосомы человека: Атлас. Москва: Медицина, 1982. С. 264.

Надійшло до редакції 23.12.2016

REFERENCES

1. Stewart, J. S., Lignell, A., Pettersson, A., Elfving, E. & Soni, M. G. (2008). Safety assessment of astaxanthin-rich microalgae biomass: Acute and subchronic toxicity studies in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 46, Iss. 9, pp. 3030-3036. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.05.038>
2. Pilinska, M. A., Kurinnyi, D. A., Rushkovsky, S. R. & Dybska, O. B. (2016). The impact of astaxanthin on radiation-induced chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. *Visn. Ukr. tov-va genetykiv i seleksioneriv*, 14, No. 1, pp. 52-57 (in Ukrainian).
3. Sanford, K. K., Parshad, R., Price, F. M., Jones, G. M., Tarone, R. E., Eierman, L., Hale, P. & Waldmann, T. A. (1990). Enhanced Chromatid Damage in Blood Lymphocytes After G 2 Phase X Irradiation, a Marker of the Ataxia-Telangiectasia Gene. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, pp. 1050-1055.
4. Dyomina, E. A. & Ryabchenko, N. M. (2007). Increased individual chromosomal radiosensitivity of human lymphocytes as a parameter of cancer risk. *Exp. Oncol.*, 29, pp. 217-220.
5. Ryabchenko, N. M., Glavin, O. A., Shtefura, V. V. & Anikushko, M. F. (2013). Chromosomal radiosensitivity in Ukrainian breast cancer patients and healthy individuals. *Exp. Oncol.*, 34, No. 2, pp. 121-124.
6. Baert, A., Depuydt, J., Van Maerken T., Poppe, B., Malfait, F., Storm, K., Van den Ende, J., Van Damme, T., De Nobe S., Perletti, G., De Leeneer, K., Claes, K. B. M. & Vral, A. (2016). Increased chromosomal radiosensitivity in asymptomatic carriers of a heterozygous *BRCA1* mutation. *Breast Cancer Res.*, 18:52, 12 p. doi: <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0709-1>.
7. Pedan, L. R. & Pilinska, M. A. (2004). Assessment of the stability of chromosomes of peripheral blood lymphocytes of victims of the Chernobyl accident factors using testing mutagenic burden *in vitro*. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, No. 5, pp. 175-179 (in Ukrainian).
8. Zakharov, A.F., Benyush, V.A., Kuleshov, N.P. & Baranowska, L.I. (1982). *Human Chromosomes: Atlas*. Moscow: Meditsina (in Russian).

Received 23.12.2016

Д. А. Куринный¹, С. Р. Рушковский², М. А. Пилинская¹

¹ ГУ “Национальный научный центр радиационной медицины НАМН Украины”, Киев

² УНЦ “Институт биологии и медицины”

Киевского национального университета им. Тараса Шевченко

E-mail: kourinniy@gmail.com

ОТСУТСТВИЕ МОДИФИЦИРУЮЩЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ АСТАКСАНТИНА НА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, ОБЛУЧЕННЫХ *IN VITRO* НА G₂ СТАДИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Исследован радиопротекторный потенциал астаксантина после гамма-облучения культуры лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* в дозе 1,0 Гр на постсинтетической (G₂) стадии первого митотического цикла. Показано отсутствие модифицирующего влияния астаксантина на стадии G₂, не зафиксировано существенных изменений суммарной частоты хромосомных нарушений и спектра хромосомных aberrаций. Проведено сравнение действия астаксантина на стадиях G₂ и G₀ клеточного цикла.

Ключевые слова: астаксантин, культура лимфоцитов периферической крови человека, aberrации хромосом, радиопротекторный эффект.

D.A. Kurinnyi¹, S.R. Rushkovsky², M.A. Pilinska¹

¹ National Research Center for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine, Kiev

² Institute of Biology and Medicine, Taras Shevchenko National University of Kiev

E-mail: kourinniy@gmail.com

THE LACK OF MODIFYING EFFECT OF ASTAXANTHIN
ON CYTOGENETIC EFFECTS IN IRRADIATED *IN VITRO*
HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES ON STAGE G₂ OF THE CELL CYCLE

Radioprotective potential of astaxanthin after gamma-irradiation of human peripheral blood lymphocytes' cultures in vitro in dose 1.0 Gy on the post synthetic (G₂) stage of the first mitotic cycle has been studied. The lack of astaxanthin modifying effect on stage G₂ has been demonstrated. No significant changes in the total frequency of chromosomal disorders and in the spectrum of chromosomal aberrations are detected. The comparison of astaxanthin effects between stage G₂ and G₀ of the cell cycle is conducted.

Keywords: *astaxanthin, culture of human peripheral blood lymphocytes, chromosome aberrations, radioprotective effect.*