

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.09.082>

УДК 579.253.2:614.876:616-008.841.5:678.48

**С.Р. Рушковський¹, Д.А. Курінний²,
О.М. Демченко², М.А. Пілінська²**

¹ ННЦ “Інститут біології та медицини” Київського національного університету ім. Тараса Шевченка

² ДУ “Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України”, Київ

E-mail: rsr@ukr.net

Особливості прояву радіаційно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах периферичної крові людини за дією астаксантину

Представлено членом-кореспондентом НАН України В.А. Кунахом

*Методом електрофорезу окремих клітин (comet assay) в нейтральних умовах досліджено вплив астаксантину на прояв ефекту свідка при сумісному культивуванні інтактних та опромінених *in vitro* в дозі 0,5 Гр лімфоцитів периферичної крові людини. Показано значне зменшення виходу ДНК у культурах клітин-свідків порівняно з контролем. Це пояснюється наявністю в культурі лімфоцитів-свідків значної кількості пошкоджених клітин, у яких спрацював чекпоінт на S фазі клітинного циклу. Астаксантин впливає на реалізацію ефекту свідка, зменшуючи кількість клітин, які зупиняють поділ на S фазі клітинного циклу, а також збільшуючи частоту клітин з великим рівнем фрагментації ДНК.*

Ключові слова: *ефект свідка, астаксантин, γ -опромінення, культура лімфоцитів периферичної крові людини, електрофорез окремих клітин.*

Вплив іонізуючого випромінювання характеризується не тільки первинними, але й вторинними ефектами, одним з яких є ефект свідка (bystander effect). Радіаційно-індукований ефект свідка можна визначити як здатність опромінених клітин призводити до морфологічних, фізіологічних та геномних змін у клітинах, які не підпадають під дію іонізуючої радіації, але якимось чином контактують з опроміненими. Вважається, що в реалізації цього процесу важливу роль відіграють вільні радикали кисню [1, 2].

Починаючи з 2015 р. нами досліджуються радіопротекторні властивості астаксантину — каротиноїду з групи ксантофілів, найбільш потужного з відомих на сьогодні антиоксидантів природного походження [3], істотною перевагою якого є відсутність токсичності та мутагенної активності [4]. В експериментах *in vitro* нами було показано значне зменшення цитогенетичних ефектів іонізуючої радіації в лімфоцитах периферичної крові (ЛПК) людини під дією астаксантину [5]. Найбільш вірогідно радіопротекторний ефект астаксантину пояснюється активацією апоптозу в субпопуляції клітин, які мають сублетальний

рівень пошкоджень геному. Крім того, під впливом каротиноїду відмічено підсилення контролю на S стадії клітинного циклу [6].

Спираючись на вищезазначені результати, стало можливим зробити припущення щодо здатності астаксантину здійснювати модифікуючий вплив на розвиток радіаційно-індукованого ефекту свідка. Перевірка цього припущення була метою представленої роботи.

Матеріали та методи. Культури ЛПК були отримані від чотирьох умовно здорових волонтерів, які заперечували свідомий контакт зі знаними чи потенційними мутагенами, вели здоровий спосіб життя. Всі особи були залучені до обстеження за умов поінформованої згоди. ЛПК культивували протягом 48 год за модифікованим нами стандартним мікрометодом [5]. Частину зразків крові опромінювали γ -квантами (випромінювач IBL-237C, потужність 2,34 Гр/хв) у дозі 0,5 Гр до початку культивування. Астаксантин ("Sigma", США) у кінцевій концентрації 20,0 мкг/мл, визначеній під час власних попередніх досліджень [5, 6], вводили в культури лімфоцитів перед опроміненням. Сумісне культивування лімфоцитів з опромінених та інтактних зразків крові проводили у системах, що являють собою дві ємності, розділені мембраною з діаметром пор 1 мкм.

Для оцінки відносного рівня пошкоджуваності ДНК використовували метод електрофорезу окремих клітин (comet assay) в нейтральних умовах. Приготування слайдів, лізис клітин та нейтральний кометний електрофорез здійснювали за загальноприйнятою методикою [7]. Після електрофорезу препарати фарбували DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) та аналізували під люмінесцентним мікроскопом. Зображення обробляли за допомогою програми ImageJ (imagej.nih.gov) з використанням плагіну OpenComet [8]. Як параметр для оцінки міграції ДНК використовували показник tail moment (ТМ). Статистичну обробку даних виконували за загальноприйнятими методами [9].

Результати та їх обговорення. Середні показники рівня ТМ у контрольних (інтактна культура) та експериментальних (інтактна культура з додаванням астаксантину) зразках наведені на рис. 1. Після 48-годинного культивування ЛПК середній спонтанний рівень ТМ становив $6,30 \pm 0,40$. Додавання астаксантину в обраній концентрації (20,0 мкг/мл) до культури неопромінених ЛПК не спричинило вірогідної зміни цього показника ($6,21 \pm 0,22$, $p > 0,05$), що узгоджується з нашими попередніми даними щодо відсутності у каротиноїду мутагенних властивостей [5, 6].

При сумісному культивуванні опромінених та неопромінених ЛПК у клітинах-свідках спостерігали значне зменшення виходу ДНК порівняно з контрольним рівнем ($ТМ = 1,86 \pm 0,24$, $p < 0,05$). Додавання астаксантину зумовило збільшення ТМ у культурах неопромінених ЛПК ($5,49 \pm 0,65$, $p < 0,001$ відносно рівня ТМ клітин свідків без додавання астаксантину). Дані, отримані нами, є досить несподіваними. Відомо, що наслідком реалізації

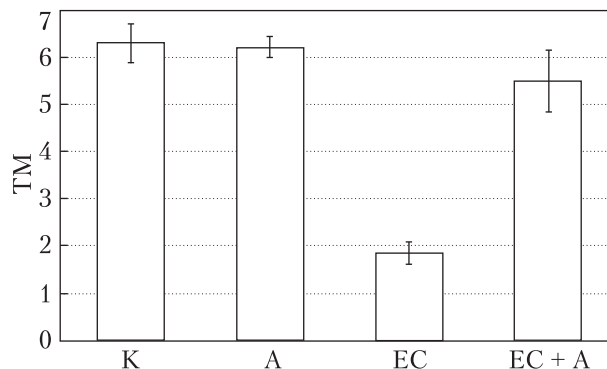


Рис. 1. Середні значення показника Tail Moment (ТМ). К — контроль (інтактна культура); А — додавання 20,0 мкг/мл астаксантину; ЕС — культура клітин-свідків; ЕС+А — культура клітин-свідків з додаванням 20,0 мкг/мл астаксантину

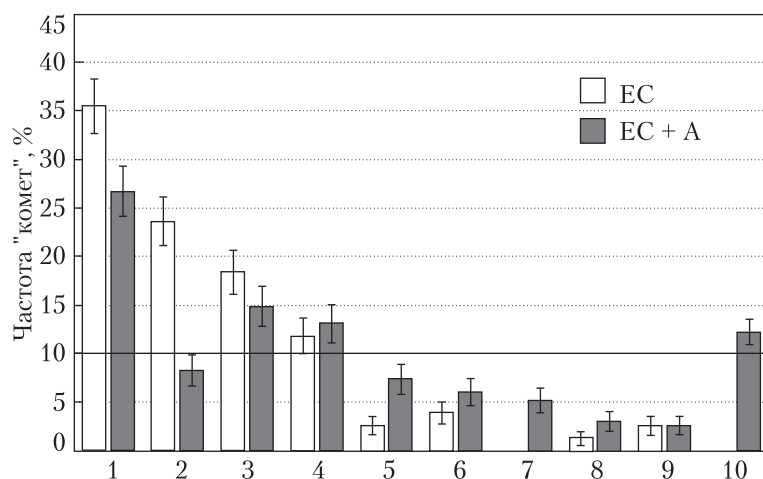


Рис. 2. Частотний розподіл “комет” за значеннями ТМ (див. пояснення у тексті) з культури клітин-свідків (ЕС) та культури клітин-свідків з додаванням 20,0 мкг/мл астаксантину (ЕС+А). 10 % (марковано жирною лінією) є контрольним значенням для всіх груп

ефекту свідка в неопромінених клітинах є збільшення рівня пошкоджуваності ДНК, генних мутацій та аберацій хромосом [1, 2], і ми повинні були очікувати збільшення ТМ в клітинах-свідках. Додавання астаксантину, виходячи з наших попередніх даних [5], навпаки, повинно було спричинити зниження загального рівня виходу ДНК при кометному електрофорезі.

Для більш детального аналізу було досліджено частотний розподіл окремих клітин залежно від рівня міграції ДНК в агарозний гель. За показниками ТМ “комет” контрольних варіантів були встановлені граничні значення децилів (значення ТМ дорівнювали 0,76; 1,47; 2,63; 4,09; 5,32; 6,30; 7,52; 8,81; 11,06), які були обрані для формування груп під час розрахунку частот ТМ у клітинах-свідках за наявності чи відсутності астаксантину. Якщо значення ТМ дорівнювало граничному, “комету” відносили до наступної групи. Результати наведені на рис. 2.

Аналізуючи одержані дані, відзначимо як статистично значуще ($p < 0,01$) збільшення в культурах клітин-свідків частоти “комет” з низьким рівнем ТМ (групи 1 та 2), так і відсутність “комет” групи 10 (містить клітини з найвищим рівнем пошкоджуваності ДНК). Оскільки відомо, що в нейтральному варіанті “кометного” електрофорезу у клітин, які знаходяться в S фазі, значно знижується вихід ДНК [10], то, вірогідно, така ситуація свідчить про наявність у культурі лімфоцитів-свідків значної кількості пошкоджених клітин, у яких спрацював чекпоінт на S фазі клітинного циклу. Саме цим можна пояснити значне зниження середнього рівня ТМ у культурах клітин-свідків.

Додавання астаксантину в обраній концентрації зумовило зниження частоти “комет” як групи 1 (з $35,53 \pm 2,76\%$ до $26,75 \pm 2,56\%$, $p < 0,05$), так і групи 2 (з $23,68 \pm 2,45\%$ до $8,33 \pm 1,60\%$, $p < 0,01$). Відомо, що обов’язковою складовою індукції ефекту свідка є підвищення в неопромінених клітинах генерації активних сполук кисню [1, 2], які, у свою чергу, спричиняють так званий реплікаційний стрес: у результаті великої кількості оксидативних пошкоджень ДНК реплікація припиняється і активується чекпоінт на S фазі клітинного циклу [11]. Астаксантин є найпотужнішим з відомих антиоксидантів природного походження, який, на відміну від β -каротину, може проникати всередину клітини [3]. Зняття каротиноїдом наслідків оксидативного стресу повинно сприяти зменшенню кількості клітин, поділ яких був зупинений на S фазі клітинного циклу.

Раніше нами було показано, що під впливом астаксантину в опромінених клітинах відбувається деметилування ДНК [12], результатом чого є активація експресії генів. Ці процеси пов'язані з релаксацією петельних доменів ДНК, що, у свою чергу, призводить до збільшення виходу ДНК в агарозний гель у разі кометного електрофорезу [13]. Ми можемо припустити, що зниження частоти “комет” перших двох груп під впливом астаксантину відбувається за рахунок активації в пошкоджених клітинах генів систем репарації ДНК та/або апоптозу [5, 6].

Про можливу активацію апоптичних процесів також свідчить поява в культурах клітин-свідків у присутності астаксантину “комет” 10-ї групи, частота яких досягала $12,28 \pm 1,28\%$. Ця група відображає наявність клітин, у яких у результаті запуску програмованої клітинної смерті почалася фрагментація ДНК.

Таким чином, нами встановлено, що астаксантин впливає на реалізацію ефекту свідка, по-перше, зменшуючи частоту клітин, які, зупинили свій поділ на S фазі клітинного циклу, по-друге, збільшуючи рівень клітин з активованою програмою апоптозу. Детальні механізми подібного впливу астаксантину потребують подальшого вивчення.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Buonanno M., de Toledo S.M., Pain D., Azzama E.I. Long-term consequences of radiation-induced bystander effects depend on radiation quality and dose and correlate with oxidative stress. *Radiat Res.* 2011. **175**, № 4. P. 405–415. <https://doi.org/10.1667/RR2461.1>
2. Shemetun O.V., Pilinska M.A. Radiation-induced bystander effect. *Cytol. Genet.* 2007. **41**, № 4. P. 66–71.
3. Ambati R.R., Phang S.M., Ravi S., Aswathanarayana R.G. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications. *Mar. Drugs.* 2014. **12**, № 1. P. 128–152. <https://doi.org/10.3390/md12010128>
4. Tago Y., Fujii T., Wada J., Kato M., Wei M., Wanibuchi H., Kitano M. Genotoxicity and subacute toxicity studies of a new astaxanthin-containing *Phaffia rhodozyma* extract. *J. Toxicol. Sci.* 2014. **9**, № 3. P. 373–382.
5. Rushkovsky S.R., Kurinnyi D.A., Demchenko O.M., Pilinska M.A. Radioprotective properties of astaxanthin: The Impact on radiation induced chromosomal aberrations and DNA breaks in human lymphocytes in vitro. *Ionizing radiation. Advances in research and applications*: Reeve T. (Ed.). New York: Nova science publishers, 2018. P. 221–240.
6. Kurinnyi D.A., Rushkovsky S.R., Demchenko O.M., Dibska O.B., Pilinska M.A. Comparison of the modifying effect of astaxanthin on the development of radiation-induced chromosomal instability in human lymphocytes exposed *in vitro* at different stages of the cell cycle. *Cytol. Genet.* 2018. **52**, № 5. P. 368–373. <https://doi.org/10.3103/S0095452718050055>
7. Afanasieva K., Zazhytska M., Sivolob A. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: loops and fragments. *Electrophoresis.* 2010. **31**. P. 512–519. <https://doi.org/10.1002/elps.200900421>
8. Gyori B.M., Venkatachalam G., Thiagarajan P.S., Hsu D., Clement M. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol.* 2014. **2**. P. 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.020>
9. Rosner B. Fundamentals of biostatistics. 8th ed. Cengage Learning, 2015. 962 p.
10. Olive P.L., Durand R.E. Heterogeneity in DNA damage using the comet assay. *Cytometry.* 2005. **66**. P. 1–8. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20154>
11. Burhans W.C., Weinberger M. DNA replication stress, genome instability and aging. *Nucleic Acids Res.* 2007. **35**, № 22. P. 7545–7556. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1059>
12. Kurinnyi D.A., Demchenko O.M., Romanenko M.G., Rushkovsky S.R. The impact of astaxanthin on the level of DNA methylation in irradiated in vitro human lymphocytes. *Probl. Radiat. Med. Radiobiol.* 2018. **23**. P. 235–245. <https://doi.org/10.33145/2304-8336-2018-23-235-245>
13. Afanasieva K.S., Chopei M.I., Lozovik A.V., Rushkovsky S.R., Sivolob A.V. Redistribution of DNA loop domains in human lymphocytes under blast transformation with interleukin 2. *Ukr. Biochem. J.* 2016. **88**, № 6. P. 45–51. <https://doi.org/10.15407/ubj88.06.045>

Надійшло до редакції 04.06.2019

REFERENCES

1. Buonanno, M., de Toledo, S. M., Pain, D. & Azzama, E. I. (2011). Long-term consequences of radiation-induced bystander effects depend on radiation quality and dose and correlate with oxidative stress. *Radiat Res.*, 175, No. 4, pp. 405-415. <https://doi.org/10.1667/RR2461.1>
2. Shemetun, O. V. & Pilinska, M. A. (2007). Radiation-induced bystander effect. *Cytol. Genet.*, 41, No. 4, pp. 66-71.
3. Ambati, R. R., Phang, S. M., Ravi, S. & Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications. *Mar. Drugs.*, 12, No. 1, pp. 128-152. <https://doi.org/10.3390/md12010128>
4. Tago, Y., Fujii, T., Wada, J., Kato, M., Wei, M., Wanibuchi, H. & Kitano, M. (2014). Genotoxicity and subacute toxicity studies of a new astaxanthin-containing *Phaffia rhodozyma* extract. *J. Toxicol. Sci.*, 9, No. 3, pp. 373-382.
5. Rushkovsky, S. R., Kurinnyi, D. A., Demchenko, O. M. & Pilinska, M. A. (2018). Radioprotective properties of astaxanthin: The impact on radiation induced chromosomal aberrations and DNA breaks in human lymphocytes *in vitro*. In Reeve, T. (Ed.). *Ionizing radiation. Advances in research and applications* (pp. 221-240). New York: Nova science publishers.
6. Kurinnyi, D. A., Rushkovsky, S. R., Demchenko, O. M., Dibska, O. B. & Pilinska, M. A. (2018). Comparison of the modifying effect of astaxanthin on the development of radiation-induced chromosomal instability in human lymphocytes exposed *in vitro* at different stages of the cell cycle. *Cytol. Genet.*, 52, No. 5, pp. 368-373. <https://doi.org/10.3103/S0095452718050055>
7. Afanasieva, K., Zazhytska, M. & Sivolob, A. (2010). Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: loops and fragments. *Electrophoresis*, 31, pp. 512-519. <https://doi.org/10.1002/elps.200900421>
8. Gyori, B. M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P. S., Hsu, D. & Clement, M. (2014). OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol.*, 2, pp. 457-465. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.020>
9. Rosner, B. (2015). *Fundamentals of Biostatistics*. 8th ed. Cengage Learning. 962 pp.
10. Olive, P. L. & Durand, R. E. (2005). Heterogeneity in DNA damage using the comet assay. *Cytometry*, 66, pp. 1-8. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20154>
11. Burhans, W. C. & Weinberger, M. (2007). DNA replication stress, genome instability and aging. *Nucleic Acids Res.*, 35 No. 22, pp. 7545-7556. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1059>
12. Kurinnyi, D. A., Demchenko, O. M., Romanenko, M. G. & Rushkovsky, S. R. (2018). The impact of astaxanthin on the level of DNA methylation in irradiated *in vitro* human lymphocytes. *Probl. Radiat. Med. Radiobiol.*, 23, pp. 235-245. <https://doi.org/10.33145/2304-8336-2018-23-235-245>
13. Afanasieva, K. S., Chopei, M. I., Lozovik, A. V., Rushkovsky, S. R. & Sivolob, A. V. (2016). Redistribution of DNA loop domains in human lymphocytes under blast transformation with interleukin 2. *Ukr. Biochem. J.*, 88, No. 6, pp. 45-51. <https://doi.org/10.15407/ubj88.06.045>

Received 04.06.2019

С.Р. Рушковський¹, Д.А. Куринний²,
Е.Н. Демченко², М.А. Пілінська²

¹ УНЦ “Інститут біології і медицини” Київського національного університету ім. Тараса Шевченка

² ГУ “Національний научний центр радіаційної медицини НАМН України”, Київ

E-mail: rsr@ukr.net

ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОГО
ЭФЕКТА СВИДЕТЕЛЯ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ
КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ АСТАКСАНТИНА

Методом электрофореза отдельных клеток (comet assay) в нейтральных условиях исследовано влияние астаксантина на проявление эффекта свидетеля при совместном культивировании интактных и облученных *in vitro* в дозе 0,5 Гр лимфоцитов периферической крови человека. Показано значительное уменьшение выхода ДНК в культурах клеток-свидетелей по сравнению с контролем. Это можно объяснить появлением в культуре лимфоцитов-свидетелей значительного количества поврежденных клеток, в которых сработал чекпойнт на S фазе клеточного цикла. Астаксантин влияет на реализацию эффекта свидетеля

ля, уменьшая количество клеток, которые, по всей вероятности, останавливают свое деление на S фазе клеточного цикла, а также увеличивая частоту клеток с высоким уровнем фрагментации ДНК.

Ключевые слова: эффект свидетеля, астаксантин, γ -облучение, культура лимфоцитов периферической крови человека, электрофорез отдельных клеток.

S.R. Rushkovsky¹, D.A. Kurinnyi²,
O.M. Demchenko², M.A. Pilinska²

¹ Institute of Biology and Medicine, Taras Shevchenko National University of Kyiv

² National Research Center for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine, Kyiv

E-mail: rsr@ukr.net

PECULIARITIES OF THE RADIATION-INDUCED BYSTANDER EFFECT MANIFESTATION IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES DUE TO ACTION OF ASTAXANTINE

Using the method of Comet assay under neutral conditions, the effect of astaxanthin on the manifestation of the bystander effect is studied. Intact human lymphocytes were cocultivated with lymphocytes γ -irradiated *in vitro* in a dose 0.5 Gy. A considerable decrease in the DNA exit in cultures of bystander cells compared with the control cultures is shown. This phenomenon can be explained by the existence, in the culture of bystander lymphocyte, a significant number of damaged cells, in which the checkpoint on the S phase of the cell cycle is activated. Astaxanthin had an influence on the realization of the bystander effect by reducing the number of cells, which obviously stopped their division in the S phase of the cell cycle, and increasing the frequency of cells with high level of DNA fragmentation as well.

Keywords: bystander effect, astaxanthine, γ -irradiation, human peripheral blood lymphocytes, Comet assay.