

УДК 616.5-001.27:615.8

Д. А. Курінний<sup>1</sup>✉, С. Р. Рушковський<sup>2</sup>, О. М. Демченко<sup>1</sup>, М. А. Пілінська<sup>1</sup><sup>1</sup>Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», 53, вул. Мельникова, м. Київ, 04050, Україна<sup>2</sup>Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ АСТАКСАНТИНУ НА РОЗВИТОК ГЕНОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ В ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ, ОПРОМІНЕНИХ *IN VITRO* НА G<sub>2</sub> СТАДІЇ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ

**Мета:** визначення можливості модифікації астаксантином рівня індукованих гамма-квантами пошкоджень геному в культурі лімфоцитів периферичної крові людини, опроміненої *in vitro* на постсинтетичній (G<sub>2</sub>) стадії першого мітотичного циклу.

**Матеріал і методи.** Лімфоцити периферичної крові чотирьох умовно здорових волонтерів віком 35–51 років культивували за модифікованим мікрометодом. Для визначення пошкоджень геному на G<sub>2</sub> стадії мітотичного циклу частину культур опромінювали гамма-квантами в дозі 1,0 Гр на 46-й годині культивування. Неопромінені культури слугували контролем. Астаксантин в кінцевій концентрації 20,0 мкг/мл вводили в культури лімфоцитів перед опроміненням. Проводили цитогенетичний аналіз рівномірно забарвлених препаратів метафазних хромосом, визначали частоту аберацій хроматидного та хромосомного типів. За допомогою методу електрофорезу окремих клітин (Comet assay) оцінювали відносний рівень пошкоджень ДНК (показник «Tail Moment») та частоту апоптичних клітин (клітини з високим рівнем фрагментації ДНК).

**Результати.** Середньогрупові частоти аберацій хромосом при гамма-опроміненні лімфоцитів *in vitro* перевищували такі без опромінення і становили  $72,35 \pm 1,17$  та  $2,46 \pm 0,30$  на 100 метафаз, відповідно ( $p < 0,001$ ), переважно, за рахунок аберацій хроматидного типу ( $58,32 \pm 1,29$  на 100 метафаз). Додавання астаксантину перед опроміненням лімфоцитів не призвело до зміни як частоти хромосомних порушень ( $71,54 \pm 1,34$  на 100 метафаз), так і спектру аберацій – превалювали також аберації хроматидного типу ( $58,47 \pm 1,47$  на 100 метафаз). Встановили зростання показника «Tail Moment» при опроміненні лімфоцитів (з  $3,84 \pm 0,36$  до  $12,06 \pm 1,88$ , відповідно,  $p < 0,001$ ) та відсутність статистично значущого впливу астаксантину на цей показник в опроміненних лімфоцитах ( $8,96 \pm 2,39$ ,  $p > 0,05$ ), тобто астаксантин не змінював відносний рівень радіаційно-індукованих пошкоджень ДНК. Не було виявлено також апоптогенної дії астаксантину: частоти апоптичних клітин становили ( $2,25 \pm 1,49$ ) % в культурах інтактних лімфоцитів, ( $2,08 \pm 1,54$ ) % в опроміненних культурах і ( $1,78 \pm 1,25$ ) % – при сумісній дії гамма-опромінення та астаксантину ( $p > 0,05$ ). На відміну від встановленої нами раніше генопротекторної дії астаксантину на лімфоцити периферичної крові людини, що були опромінені на стадії спокою (G<sub>0</sub>), отримані дані свідчать про відсутність подібного ефекту після опромінення лімфоцитів на G<sub>2</sub> стадії клітинного циклу.

**Висновки.** В рамках виконаного дослідження не встановлено модифікуючого (захисного) впливу астаксантину на радіаційно-індуковану геномну нестабільність при опроміненні культури лімфоцитів периферичної крові людини гамма-квантами в дозі 1,0 Гр на постсинтетичній (G<sub>2</sub>) стадії першого мітотичного циклу.

**Ключові слова:** астаксантин, культура лімфоцитів периферичної крові людини, аберації хромосом, Comet assay, пошкодження ДНК, апоптоз, радіопротекторний ефект.

*Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2017. Вип. 22. С. 208–215.*

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

D. A. Kurinnyi<sup>1</sup>✉, S. R. Rushkovsky<sup>2</sup>, O. M. Demchenko<sup>1</sup>, M. A. Pilinska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Melnykova str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

<sup>2</sup>Educational and Research Center «Institute of Biology and Medicine» of Kyiv Taras Shevchenko National University, Volodymyrska str., 64/13, Kyiv, 01601, Ukraine

## Study the impact of astaxanthin on developing of genomic instability in human peripheral blood lymphocytes irradiated *in vitro* on G<sub>2</sub> phase of cell cycle

**Objective.** To identify the possibility of modification by astaxanthin the level of genome damages induced by gamma quanta in the culture of human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* on postsynthetic (G<sub>2</sub>) phase of the first mitotic cycle.

**Materials and methods.** Peripheral blood lymphocytes from four apparently healthy volunteers 35–51 years old were cultivated using modified micromethod. To obtain genomic damages in G<sub>2</sub> phase of the first mitotic cycle the part of cultures was irradiated by  $\gamma$ -quanta in dose 1.0 Gy through 46 hours of cultivation. Astaxanthin in final concentration 20  $\mu$ g/ml was exposed to lymphocytes' cultures before the irradiation. Cytogenetic analysis the uniformly stained slides of metaphase chromosomes was carried out to determine the frequencies of chromosome and chromatid types of aberrations. Using the method of individual cells electrophoresis (Comet assay) the relative level of DNA damages (Tail Moment index) and the frequency of apoptotic cells with high level of DNA fragmentation were evaluated.

**Results.** Mean-group frequencies of chromosome aberrations after gamma irradiation of lymphocytes *in vitro* exceeded those without radiation exposure and were  $72.35 \pm 1.17$  and  $2.46 \pm 0.30$  per 100 metaphases, respectively ( $p < 0.001$ ), mainly due to chromatid type of aberrations ( $58.32 \pm 1.29$  per 100 metaphases). Adding of astaxanthin into culture medium before the irradiation did not result in changes as in the frequency of chromosomal damages ( $71.54 \pm 1.34$  per 100 metaphases) as in the spectrum of aberrations – also prevailed chromatid type of aberrations ( $58.47 \pm 1.47$  per 100 metaphases). The increase of Tail Moment index after radiation exposure (from  $3.84 \pm 0.36$  to  $12.06 \pm 1.88$ , respectively,  $p < 0.001$ ) and lack of significant impact of astaxanthin on this index in the irradiated lymphocytes ( $8.96 \pm 2.39$ ,  $p > 0.05$ ) was established, ie astaxanthin didn't change the relative level of radiation-induced DNA damages. Also apoptogenic effect of astaxanthin was not found: frequency of apoptotic cells were ( $2.25 \pm 1.49$ ) % in cultures of intact lymphocytes, ( $2.08 \pm 1.54$ ) % in irradiated cultures and ( $1.78 \pm 1.25$ ) % under joint action of gamma radiation and astaxanthin ( $p > 0.05$ ).

**Conclusions.** No impact of astaxanthin on genomic instability induced by gamma irradiation *in vitro* in cultures of human peripheral blood lymphocytes on postsynthetic (G<sub>2</sub>) phase of first mitotic cycle had been established.

**Key words:** astaxanthin, culture of human peripheral blood lymphocytes, chromosome aberrations, Comet assay, DNA injuries, apoptosis, radioprotective effect.

*Problems of radiation medicine and radiobiology. 2017;22:208–215.*

### ВСТУП

Беручи до уваги реалії сьогодення, що пов'язані не тільки з розширенням сфери використання іонізуючих випромінювань в промисловості та медицині, але й з можливістю ядерних аварій і загрозою ядерного тероризму, актуальною проблемою залишається пошук засобів профілактики та лікування ранніх і віддалених променевих ушкоджень у людини за допомогою ефективних радіозахисних сполук, бажано природного походження.

Нами з 2015 р. розпочаті дослідження генопротекторної дії астахантину (каротиноїда з групи ксантофілів), критеріями якої є цитогене-

### INTRODUCTION

Taking into account today's realities, not only related with the expansion of the use the ionizing radiation in industry and medicine, but also with the possibility of nuclear accidents and the threat of nuclear terrorism, the actual problem is the search for means of prevention and treatment of early and remote radiation damages in human using effective radioprotective compounds preferably of natural origin.

Since 2015 we started research concerning possible genoprotectiv action of astaxanthin (carotenoid from group of xanthophylls), criteria of which

тичні та молекулярно-генетичні показники ослаблення радіаційно-індукованих пошкоджень геному [1–3].

В попередніх дослідженнях нами було встановлено, що астаксантин в кінцевій концентрації 20,0 мкг/мл при дії на лімфоцити периферичної крові людини, опромінені на стадії спокою ( $G_0$ ) гамма-квантами в дозі 1,0 Гр, призводить до суттєвого зниження радіоіндукованого цитогенетичного ефекту та значного зростання частоти апоптичних клітин, що свідчить про його потужний радіозахисний потенціал [1, 2].

Разом з тим, можливість астаксантину впливати на реалізацію радіоіндукованої геномної нестабільності на  $G_2$  стадії клітинного циклу залишається невизначеною, хоча саме на цій стадії геном соматичних клітин людини є найбільш чутливим до руйнівного впливу іонізуючого випромінювання в зв'язку зі зменшенням репараційної активності [4–6].

## МЕТА

Мета роботи – визначення можливості модифікації астаксантином рівня індукованих гамма-квантами пошкоджень геному в культурі лімфоцитів периферичної крові людини, опроміненої *in vitro* на постсинтетичній ( $G_2$ ) стадії першого мітотичного циклу.

Для досягнення мети використано комбінацію методів класичного цитогенетичного та молекулярно-генетичного (Comet assay) аналізів, що дає можливість оцінити процеси, які відбуваються в клітині як на хромосомному, так і на молекулярному рівнях, а також визначити апоптогенну активність астаксантину, яка є однією з основних зафіксованих нами особливостей його дії [1–3].

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для досліджень використали загальноприйняту тест-систему – культуру лімфоцитів периферичної крові, одержану від чотирьох умовно здорових волонтерів (2 жінок, 2 чоловіків) віком 35–51 років, середній вік – 43 роки, які заперечували свідомий контакт зі знаними чи потенційними мутагенами, вели здоровий спосіб життя. Всі особи були залучені до обстеження за умов поінформованої згоди.

Культивування лімфоцитів проводили протягом 48 год за модифікованим нами стандартним мікрометодом [7]. Для отримання пошкоджень геному на  $G_2$  стадії мітотичного циклу частину культур опромінювали гамма-квантами випромінювачем IBL-237C (потужність 2,34 Гр/хв) в дозі 1,0 Гр на 46-й годині

considered cytogenetic and molecular-genetic indicators of weakening radiation-induced genome damages [1–3].

In previous studies we found that astaxanthin in final concentration 20.0 mg/ml under the action on culture of human peripheral blood lymphocytes irradiated by gamma quanta in dose 1.0 Gy on early presynthetic ( $G_0$ ) phase of mitotic cycle led to substantial reduction of cytogenetic effect and to considerable growth the frequency of apoptotic cells, which testified its powerful radioprotective potential [1, 2].

However, the ability of astaxanthin to affect the realization of radiation induced genomic instability in the  $G_2$  phase of the cell cycle remains uncertain, although precisely in this phase the genome of human somatic cells is most sensitive to the damaging effects of ionizing radiation due to a decrease in reparation activity [4–6].

## OBJECTIVE

The aim of our study is the investigation the possibility of modification by astaxanthin the level of genome damages induced by gamma quanta in the culture of human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* on postsynthetic ( $G_2$ ) phase of the first mitotic cycle.

To achieve this aim we used combination of two techniques – classical cytogenetic and molecular genetic (Comet assay) which allowed to evaluate processes occurring in the cell both on chromosomal and molecular levels and also to determine apoptogenic activity of astaxanthin, which is one of the major peculiarities of its action established by us [1–3].

## MATERIALS AND METHODS

For cytogenetic investigations was used conventional classical test system – the culture of peripheral blood lymphocytes obtained from 4 conditionally healthy volunteers (2 female, 2 male) aged 20–51 years old, average age – 43 years, who denied conscious contact with well-known or potential mutagens, lead a healthy lifestyle. All persons were involved in examination under conditions of informed consent.

Cultivation of lymphocytes was performed within 48 hours using modified by us standard micromethod [7]. To obtain genomic damages in  $G_2$  phase of the first mitotic cycle the part of cultures was irradiated with gamma quanta by emitter IBL-237C (dose-rate 2.34 Gy/min) in dose 1.0 Gy

культивування. Астаксантин (Sigma, USA) в кінцевій концентрації 20,0 мкг/мл, визначеній під час власних попередніх досліджень [1], вводили в культури лімфоцитів перед опроміненням. Неопромінені культури слугували контролем.

При цитогенетичному аналізі враховували всі аберації хроматидного (одиначні фрагменти, хроматидні обміни) і 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].

Для визначення відносного рівня пошкодження ДНК і частоти апоптозу використовували метод електрофорезу окремих клітин (Comet assay) [9–11]. Культуральну суміш центрифугували протягом 10 хвилин при 1000 об/хв. Знімали верхній шар клітин над осадом (100 мкл) та проводили виділення лейкоцитів у градієнті щільності Histopaque 1077 (Sigma, USA) згідно з протоколом виробника. Суспензію клітин змішували з 1 % легкоплавкою агарозою (SIGMA USA) при 37 °C. Приготування слайдів і проведення нейтрального кометного електрофорезу проводили за загальноприйнятою методикою [10, 11]. Після електрофорезу препарати фарбували DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) в концентрації 2 мкг/мл та аналізували під флюоресцентним мікроскопом Axioscop (Opton, Germany), з'єднаним з фотоапаратом Canon EOS D1000. Зображення аналізували за допомогою програми Image J (imagej.nih.gov) з використанням плагіну OpenComet [12]. В якості параметру для визначення відносного рівня пошкодження ДНК використовували показник «Tail Moment». Атипові комети, які утворюються з клітин з високим рівнем фрагментації ДНК і відображують апоптичний стан, аналізували окремо.

Статистичну обробку даних проводили за загальноприйнятими методами [13].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведених досліджень встановили, що фонові середньогрупові частоти аберантних метафаз і аберацій хромосом в лімфоцитах периферичної крові складала  $2,46 \pm 0,30$  на 100 клітин з міжіндивідуальними коливаннями від 1,33 до 3,02 на 100 метафаз та відповідала середньопопуляційному рівню показника [8]. Пошкодження хромосом були представлені переважно одиначними і парними ацентричними фрагментами ( $1,60 \pm 0,28$  та  $0,97 \pm 0,22$  на 100 метафаз, відповідно).

after 46 hours of cultivation. Astaxanthin (Sigma, USA) in final concentration 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  selected during own previous study [1], was added to culture medium before the irradiation. Non-irradiated cultures served as the controls.

During cytogenetic analysis all aberrations of chromatid (single fragments, chromatid exchanges) and chromosome (free double fragments, acentric rings, dicentric and ring chromosomes, abnormal monocentrics, inversions, insertions) types were registered. These chromosomal abnormalities were clearly recognized by group karyotyping of uniformly stained slides of metaphase chromosomes [8].

To determine the relative level of DNA damages and frequency of apoptosis the method of individual cells electrophoresis (Comet assay) was used [9–11]. The cultural mixture was centrifuged during 10 min at 1000 rev/min. Top layer above the sediment cells (0.75  $\mu\text{l}$ ) was collected and isolation of leukocytes was performed with Histopaque 1077 density gradient (Sigma, USA) according to the manufacturer protocol. The suspension of cells was mixed with 1% low-melting agarose (Sigma, USA) at 37 °C. Preparation of slides and neutral comet electrophoresis was performed by standard method [10, 11]. After electrophoresis the slides were stained by DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) in concentration 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and analyzed under fluorescent microscope Axioscop (Opton, Germany) connected with Canon EOS D1000 camera. Images were examined using image processing program Image J (imagej.nih.gov) with Open Comet plugin [12]. «Tail Moment» index was used as a parameter for evaluation of relative level of DNA damages. «Atypical comets» which formed from cells with high DNA fragmentation and reflected the apoptotic state were analyzed separately.

Statistical data processing was carried out by generally accepted methods [13].

## RESULTS AND DISCUSSION

As a result of the research was determined that background mean-group frequency of aberrant metaphases and chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes was  $2.46 \pm 0.30$  per 100 cells with varying from 1.33 to 3.02 per 100 metaphases, which corresponded to the average value in population [8]. Chromosome damages were represented mainly by single and double acentric fragments ( $1.60 \pm 0.28$  and  $0.97 \pm 0.22$  per 100 metaphases, respectively).

Гамма-опромінення культури лімфоцитів в дозі 1,0 Гр на G<sub>2</sub> стадії мітотичного циклу призвело до 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 (одиначних 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 були представлені, в основному, парними фрагментами, середньогрупова частота яких ( $13,76 \pm 0,90$  на 100 метафаз) також перевищувала ( $p < 0,01$ ) не тільки їх фоновий рівень ( $0,96 \pm 0,21$  на 100 метафаз), але й такий при дії радіації в тій же дозі на G<sub>0</sub> 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 поступовою десинхронізацією культури лімфоцитів, завдяки чому деякі клітини з дицентричними хромосомами могли отримати радіаційне навантаження, знаходячись на синтетичній (S) стадії клітинного циклу.

Міжіндивідуальні коливання частот абераційних метафаз становили від  $40,0 \pm 3,03$  до ( $61,11 \pm 2,87$ ) % і в середньому склали ( $46,72 \pm 1,48$ ) %. В усіх обстежених осіб частота хромосомних аберацій перевищувала частоту абераційних клітин, завдяки чому середньогрупова частота аберацій на одну абераційну клітину дорівнювала 1,54.

Додавання астаксантину перед опроміненням культур не призвело до суттєвих змін як сумарної частоти хромосомних порушень ( $71,54 \pm 1,34$  на 100 метафаз по групі в середньому), так і спектру аберацій (рис. 1) — превалювали також аберації хроматидного типу (одиначні 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) майже не змінилась ( $p > 0,05$ ). Таким чином, астаксантин не впливав на цитогенетичний ефект, індукований в культурі лімфоцитів людини, опроміненій на G<sub>2</sub> стадії мітотичного циклу.

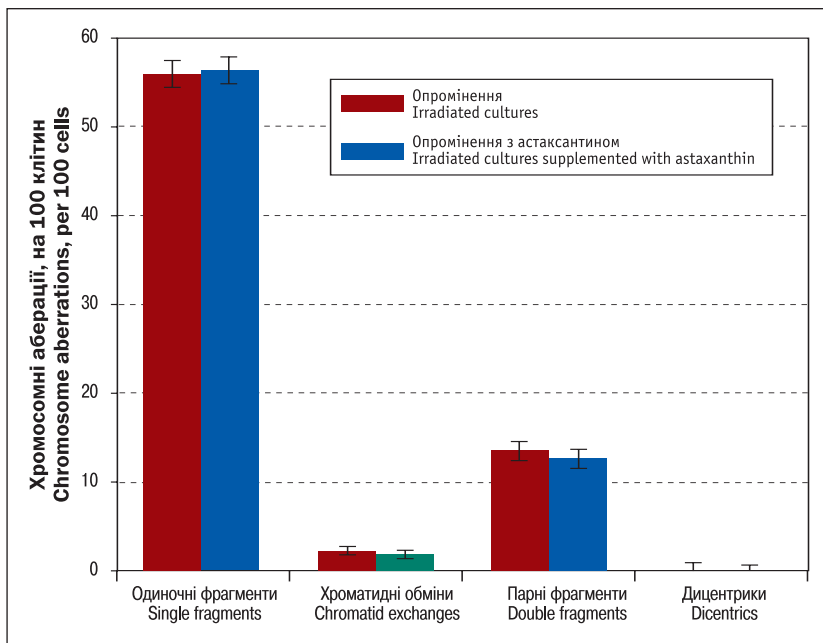
Порівняльна характеристика кількісних показників дії астаксантину на хромосомні порушення, індуковані гамма-квантами *in vitro* на G<sub>0</sub> та G<sub>2</sub> стадіях клітинного циклу, наведена на рис. 2.

Gamma irradiation of lymphocytes' cultures in dose 1.0 Gy on G<sub>2</sub> phase of mitotic cycle increased ( $p < 0.001$ ) the total frequency of chromosomal damages (with interindividual variations from  $54.22 \pm 2.96$  till  $97.22 \pm 0.96$  per 100 metaphases at  $72.35 \pm 1.17$  per 100 metaphases in average), mainly due to aberrations of chromatid type (single fragments and chromatid exchanges) with interindividual fluctuation from  $42.95 \pm 2.93$  to  $72.22 \pm 2.63$  at  $58.32 \pm 1.29$  per 100 metaphases in average. Chromosome type of aberrations were represented mostly by free double fragments whose mean-group frequency ( $13.76 \pm 0.90$  per 100 metaphases) also exceeded ( $p < 0.01$ ) not only their background level ( $0.96 \pm 0.21$  per 100 metaphases), but it's frequency under radiation exposure in the same dose in G<sub>0</sub> phase of the cell cycle ( $6.47 \pm 0.70$  per 100 metaphases) [2]. In two persons dicentrics ( $0.26$  and  $0.97$  per 100 metaphases, respectively) were found, that can be explained by gradual desynchronization of lymphocyte culture, thanks to which some cells with dicentrics could receive radiation exposure in synthetic (S) phase of the mitotic cycle.

Interindividual fluctuations in the frequency of aberrant metaphases were from ( $40.0 \pm 3.03$ ) to ( $61.11 \pm 2.87$ ) % and on average ( $46.72 \pm 1.48$ ) %. In all cases the frequency of chromosomal aberrations exceeded the frequency of aberrant cells, thus mean-group frequency of aberrations per one aberrant cell was equal to 1.54.

Addition of astaxanthin to the cultures before their irradiation did not lead to significant changes both in the total frequency of chromosomal disorders ( $71.54 \pm 1.34$  per 100 metaphases in group on average) and spectra of aberrations (Fig. 1) — also prevailed aberration of chromatid type (single fragments and chromatid exchanges) with a total mean-group frequency  $58.47 \pm 1.47$  per 100 metaphases. Aberrations of chromosome type were presented by free double fragments the frequency of which ( $12.94 \pm 0.99$  per 100 metaphases) almost did not change ( $p > 0.05$ ). Thus, astaxanthin had not impact on the cytogenetic effect induced in culture of human peripheral blood lymphocytes irradiated in the G<sub>2</sub> phase of mitotic cycle.

Comparative characteristic of quantitative indicators of astaxanthin action on chromosomal abnormalities induced by  $\gamma$ -quanta *in vitro* in dose 1.0 Gy on G<sub>0</sub> and G<sub>2</sub> phases of the cell cycle, shown in Fig. 2.



**Рисунок 1.** Спектри аберацій хромосом в опроміненіх на G<sub>2</sub> стадії клітинного циклу культурах лімфоцитів периферичної крові людини та в опроміненіх культурах при додаванні астаξανтину.

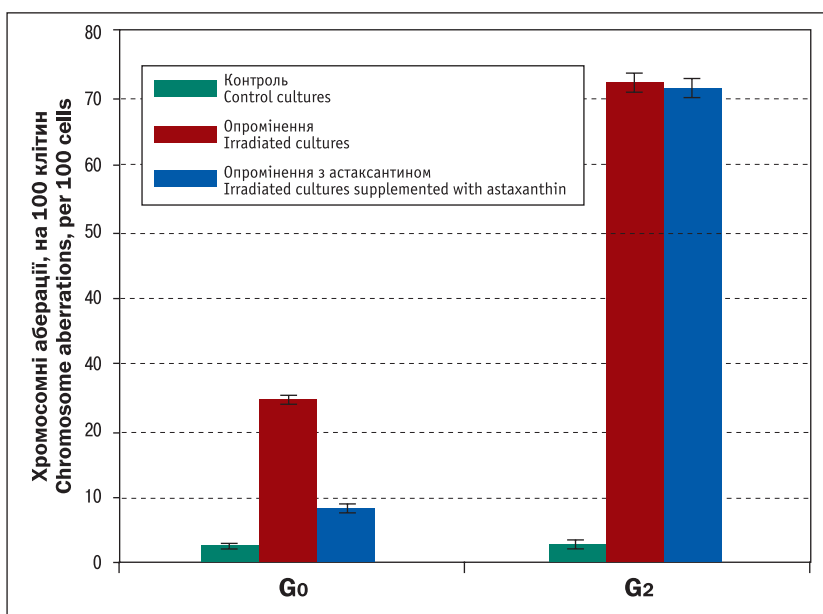
**Figure 1.** Spectra of chromosomal aberrations in irradiated on G<sub>2</sub> phase of mitotic cycle cultures of human peripheral blood lymphocytes and in irradiated cultures supplemented with astaxanthin.

При використанні методу електрофорезу окремих клітин було встановлено, що середньогруповий показник відносного рівня пошкодження ДНК («Tail Moment») підвищився з  $3,84 \pm 0,36$  в неопромінену контролі до  $12,06 \pm 1,88$  при опроміненні культур лімфоцитів ( $p < 0,01$ ). Додавання астаξανтину в концентрації 20,0 мкг/мл перед опроміненням культур лімфоцитів не призвело до статистично значущих змін середньогрупового значення цього показника ( $8,96 \pm 2,39$ ,  $p > 0,05$ ). Таким чином, на відміну від наших попередніх результатів стосовно радіопротекторної дії астаξανтину на G<sub>0</sub> стадії клітинного циклу [1–3], він не впливав на відносний рівень пошкоджень ДНК при опроміненні культур лімфоцитів людини на G<sub>2</sub> стадії (рис. 3).

Не виявлено також вірогідних змін середньогрупових частот апоптотичних клітин при всіх варіантах

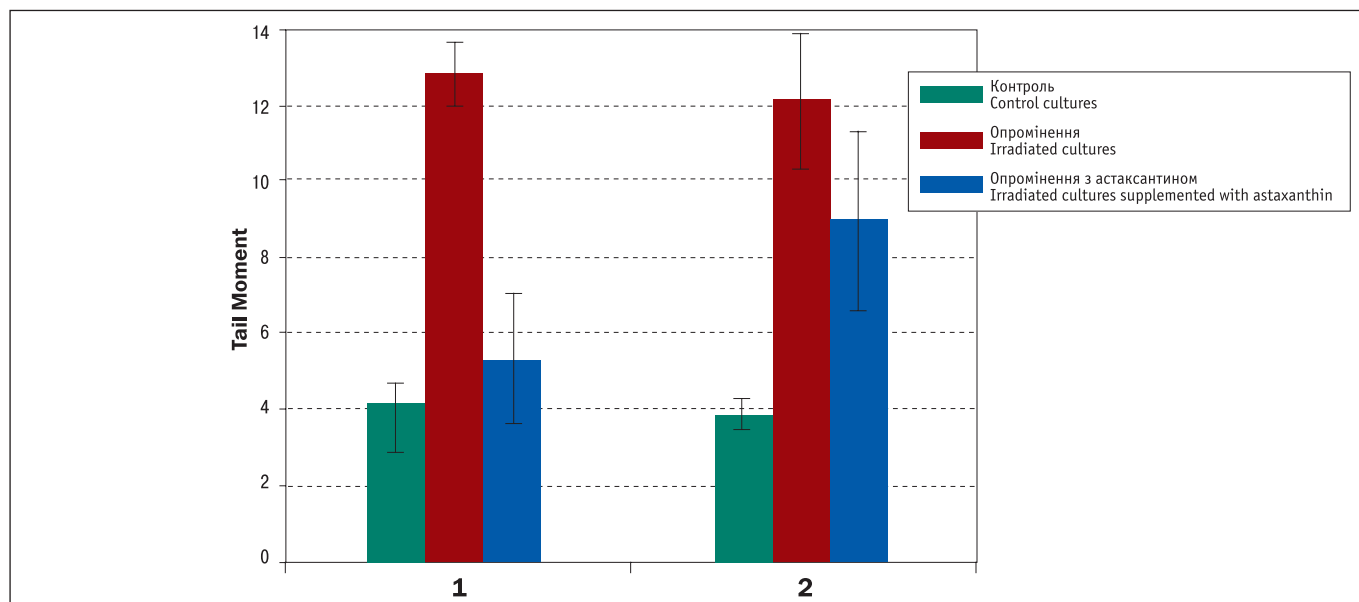
When using the method of individual cells electrophoresis (Comet assay) found that the mean-group index «Tail Moment» increased from  $3.84 \pm 0.36$  in the non-irradiated lymphocyte cultures to  $12.06 \pm 1.88$  after irradiation ( $p < 0.01$ ). Addition of astaxanthin in concentration 20.0 mg/ml to the cultures prior of their irradiation did not lead to significant change the mean-group value of this index ( $8.96 \pm 2.39$ ,  $p > 0.05$ ). Thus, in contrast to our previous data concerning astaxanthin action on G<sub>0</sub> phase of cell cycle [1–3] it did not affect the relative level of DNA damages in human peripheral blood lymphocytes irradiated on G<sub>2</sub> phase (Fig. 3).

Also we observed no significant changes of the mean-group frequencies of apoptotic cells in all



**Рисунок 2.** Порівняння впливу астаξανтину на частоти аберацій хромосом, індукованих іонізуючим випромінюванням *in vitro* в дозі 1,0 Гр на G<sub>0</sub> та G<sub>2</sub> стадіях клітинного циклу.

**Figure 2.** Comparison of astaxanthin impact on the frequencies of chromosome aberration induced by ionizing radiation *in vitro* in dose 1.0 Gy on G<sub>0</sub> and G<sub>2</sub> phases of cell cycle.



**Рисунок 3.** Відносні рівні пошкоджень ДНК (Tail Moment) в лімфоцитах периферичної крові людини після опромінення в дозі 1,0 Гр та при сумісній дії опромінення та астаксантину. 1 – опромінення перед початком культивування; 2 – опромінення на 46-й годині культивування.

**Figure 3.** The relative levels of DNA damages (Tail Moment) in human peripheral blood lymphocytes after 1.0 Gy irradiation and under joined action of radiation and astaxanthin. 1 – irradiation before beginning of cultivation; 2 – irradiation at 46 h of cultivation.

експерименту, які становили  $(2,25 \pm 1,49)$  % в культурах інтактних лімфоцитів,  $(2,08 \pm 1,54)$  % в опроміненних культурах та  $(1,78 \pm 1,25)$  % при сумісній дії гамма-опромінення та астаксантину ( $p > 0,05$ ), що свідчить про відсутність активації астаксантином запрограмованої клітинної загибелі на цій стадії мітотичного циклу (рис. 4).

Таким чином, на відміну від генопротекторної дії астаксантину на лімфоцити периферичної крові людини при опроміненні на ранній пресинтетичній ( $G_0$ ) стадії клітинного циклу, отримані дані свідчать про відсутність подібного ефекту після опромінення лімфоцитів на постсинтетичній ( $G_2$ ) стадії клітинного циклу. Механізм модифікуючого впливу астаксантину на радіаційно-індуковану нестабільність геному соматичних клітин людини потребує подальшого вивчення.

**ВИСНОВКИ**

Встановлено відсутність впливу астаксантину на радіаційно-індуковану геномну нестабільність при гамма-опроміненні культури лімфоцитів периферичної крові людини в дозі 1,0 Гр на постсинтетичній ( $G_2$ ) стадії першого мітотичного циклу.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. 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. Вісник Ук-

variants of the experiment, which were  $(2.25 \pm 1.49)$  % in cultures of intact lymphocytes,  $(2.08 \pm 1.54)$  % in irradiated cultures and  $(1.78 \pm 1.25)$  % under joint action of  $\gamma$ -irradiation and astaxanthin ( $p > 0.05$ ), that testified the lack of activation by astaxanthin the programmed cell death in  $G_2$  phase of the mitotic cycle in contrast to our previous data [2] (Fig. 4).

Thus, unlike genoprotective action of astaxanthin in human peripheral blood lymphocytes irradiated in early presynthetic ( $G_0$ ) phase of the cell cycle, the data received demonstrated no such effect of it in lymphocytes exposed in postsynthetic ( $G_2$ ) phase of the cell cycle. The mechanism of such difference in modifying influence of astaxanthin on radiation-induced genomic instability in human somatic cells needs further study.

**CONCLUSIONS**

The results showed the lack of astaxanthin impact on genomic instability induced by gamma irradiation in vitro in cultures of human peripheral blood lymphocytes on postsynthetic ( $G_2$ ) phase of first mitotic cycle.

**REFERENCES**

1. Pilinska MA, Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Dybska OB. [The impact of astaxanthin on radiation-induced chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes in vitro]. Visnyk

- раїнського товариства генетиків і селекціонерів. 2016. Т. 14, № 1. С. 52-57.
2. Pilinska M. A., Kurinnyi D. A., Rushkovsky S. R., Dybska O. B. Genoprotective properties of astaxanthin revealed by ionizing radiation exposure in vitro on human peripheral blood lymphocytes. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2016. Vol. 21. P. 141-148.
3. Kurinnyi D. A., Rushkovsky S. R., Dybska O. B., Dubrovina G. V. Astaxanthin modifies clastogenic effects of ionizing radiation in vitro in peripheral blood lymphocytes of the persons recovered from acute radiation sickness. *Exp. Onc.* 2016. Vol. 38, No. 4. P. 280-282.
4. Dyomina E. A., Ryabchenko N. M. Increased individual chromosomal radiosensitivity of human lymphocytes as a parameter of cancer risk. *Exp. Oncol.* 2007. Vol. 29. P. 217-220.
5. Baert A., Depuydt J., Van Maerken T., Poppe B., Malfait F., Storm K., ... Vral A. Increased chromosomal radiosensitivity in asymptomatic carriers of a heterozygous BRCA1 mutation. *Breast Cancer Res.?: BCR.* 2016. Vol. 18. P. 52. doi:10.1186/s13058-016-0709-1.
6. 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. Vol. 34. P. 57-62.
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. Доповіді Національної Академії наук України. 2004. № 5. С. 175-179.
8. Захаров А.Ф., Бенюш В. А., Кулешов Н. П., Барановская Л. И. Хромосомы человека. Атлас. М. : медицина, 1982. 263 с.
9. Liao W. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods.* Vol. 48. P. 46-53.
10. Afanasieva K., Chopei M., Zazhytska M., Vikhрева M., Sivolob A. DNA loop domain organization as revealed by single - cell gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. Vol. 1833. P. 3237-3244.
11. Afanasieva K. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: Loops and fragments. *Electrophoresis.* 2010. Vol. 31. P. 512-519.
12. Gyori B. M., Venkatachalam G., Thiagarajan P. S., Hsu D., Clement M. V. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology.* 2014. Vol. 2. P. 457-465.
13. Rosner B. *Fundamentals of Biostatistics, Eighth Edition.* Cengage Learning, 2015. 962 p.
- ukrainskoho tovarystva genetykiv i seleksioneriv. 2016;14(1):52-7. Ukrainian.
2. Pilinska MA, Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Dybska OB. Genoprotective properties of astaxanthin revealed by ionizing radiation exposure in vitro on human peripheral blood lymphocytes. *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2016;21:141-8.
3. Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Dybska OB, Dubrovina GV. Astaxanthin modifies clastogenic effects of ionizing radiation in vitro in peripheral blood lymphocytes of the persons recovered from acute radiation sickness. *Exp Oncol.* 2016;38(4):280-2.
4. Dyomina EA, Ryabchenko NM. Increased individual chromosomal radiosensitivity of human lymphocytes as a parameter of cancer risk. *Exp Oncol.* 2007;29:217-20.
5. Baert A, Depuydt J, Van Maerken T, Poppe B, Malfait F, Storm K, et al. Increased chromosomal radiosensitivity in asymptomatic carriers of a heterozygous BRCA1 mutation. *Breast Cancer Res : BCR.* 2016;18:52.
6. Ryabchenko NM, Glavin OA, Shtefura VV, Anikushko MF. Chromosomal radiosensitivity in Ukrainian breast cancer patients and healthy individuals. *Exp Oncol.* 2013;34:57-62.
7. Pedan LR, Pilinska MA. [Assessment of the stability of chromosomes in peripheral blood lymphocytes of people affected by the factors of the Chernobyl accident, through testing mutagenic exposure in vitro]. *Dopovidi Natsionalnoi Akademii Nauk Ukrainy.* 2004;(5):175-9. Ukrainian.
8. Zakharov AF, Benyush VA, Kuleshov NP, Baranovskaya LI. [Human chromosomes: atlas]. Moscow: Medicina; 1982. 263 p. Russian.
9. Liao W, McNut MA, Zhu WXG. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods.* 2009;48:46-53.
10. Afanasieva K, Chopei M, Zazhytska M, Vikhрева M, Sivolob A. DNA loop domain organization as revealed by single - cell gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833:3237-44.
11. Afanasieva K, Zazhytska M, Sivolob A. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: Loops and fragments. *Electrophoresis.* 2010;31:512-19.
12. Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS, Hsu D, Clement M. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology.* 2014;2:457-65.
13. Rosner B. *Fundamentals of biostatistics.* 8th ed. Cengage Learning; 2015. 962 p.

Стаття надійшла до редакції 19.04.2017

Received: 19.04.2017