

УДК 579.253.2:614.876:616-008.841.5:678.48

Д. А. Курінний¹✉, О. М. Демченко¹, М. Г. Романенко², С. Р. Рушковський²¹Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна²Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, 01601, Україна

ВПЛИВ АСТАКСАНТИНУ НА РІВЕНЬ МЕТИЛЮВАННЯ ДНК В ОПРОМІНЕНИХ *IN VITRO* ЛІМФОЦИТАХ ЛЮДИНИ

Мета. Визначити вплив астаксантину на рівень глобального метилювання ДНК в опроміненіх *in vitro* лімфоцитах периферичної крові людини

Методи. Цільну кров додавали у культуральне середовище RPMI-1640 у співвідношенні 1 : 10 і витримували 3 години при 37 °С. Опромінювання γ -квантами здійснювали з використанням випромінювача IBL-237C (доза 1,0 Гр, потужність 2,34 Гр/хв). Астаксантин у кінцевій концентрації 20,0 мкг/мл додавали перед опроміненням.

Аналіз статусу глобального метилювання ДНК в лімфоцитах периферичної крові людини проводили за допомогою модифікованого методу кометного електрофорезу (Comet assay) в нейтральних умовах з використанням чутливого до метилювання ферменту рестрикції HpaII.

Результати. Для кожного варіанту експерименту було проведено дослідження частотного розподілу «комет». Додавання астаксантину до неопроміненіх і опроміненіх лімфоцитів людини призвело до статистично значущого ($p < 0,05$) зсуву розподілів «комет» у напрямку збільшення виходу ДНК, що вказує на зростання пулу клітин зі зниженим рівнем метилювання ДНК.

Висновки. Встановлено, що астаксантин в кінцевій концентрації 20,0 мкг/мл призводить до зниження рівня глобального метилювання ДНК в опроміненіх *in vitro* та неопроміненіх лімфоцитах людини, що свідчить про його здатність впливати на епігенетичні механізми контролю генної експресії.

Ключові слова: астаксантин, лімфоцити периферичної крові людини, γ -опромінення, метилювання ДНК.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2018. Вип. 23. С. 235–245. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-235-245.

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

D. A. Kurinnyi¹✉, O. M. Demchenko¹, M. G. Romanenko², S. R. Rushkovsky²

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

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

THE IMPACT OF ASTAXANTHIN ON THE LEVEL OF DNA METHYLATION IN IRRADIATED *IN VITRO* HUMAN LYMPHOCYTES

Objective. To investigate an effect of astaxanthin on global DNA methylation in human peripheral blood lymphocytes exposed to γ -radiation *in vitro*.

Methods. Samples of whole blood were diluted with RPMI-1640 medium in proportion 1 : 10 and incubated at 37 °C for 3 h. Samples were exposed to γ -ray (emitter IBL-237C, dose-rate 2.34 Gy/min) in dose 1.0 Gy. Astaxanthin was added into culture medium in final concentrations 20.0 μ g/ml before irradiation. The analysis of the global DNA methylation state was carried out using modified method of neutral single-cell gel electrophoresis (Comet assay) after digestion with the methylation-sensitive endonuclease HpaII.

Results. For every experiment the analysis of the frequency distribution of «comets» was carried out. The treatment of non-irradiated and irradiated human peripheral blood lymphocytes with astaxanthin resulted to a statistically significant ($p < 0.05$) shift of comet distribution with tendency to increasing level of DNA migration which indicates increase in the pool of cells with a reduced level of DNA methylation.

Conclusions. It has been found that astaxanthin in concentration of 20.0 μ g/ml reduced the levels of global DNA methylation both in irradiated *in vitro* and native human lymphocytes. It suggests that astaxanthin has an effect on mechanisms of epigenetic regulation of gene expression.

Key words: astaxanthin, human peripheral blood lymphocytes, γ -irradiation, DNA methylation.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2018;23:235-245. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-235-245.

ВСТУП

Реалізація спадкової інформації залежить не тільки від генотипу, але й від епігенетичних механізмів контролю експресії генів [1]. Метилування цитозину ДНК в 5-му положенні відіграє центральну роль в епігенетичних процесах [2, 3]. У випадку, якщо метильовані сайти розташовані в промоторній ділянці та першому екзоні – відбувається повне вимикання генів [4]. Аномальні зміни інтенсивності метилування ДНК тісно пов'язані з розвитком цілого ряду хвороб, серед яких діабет II типу, хвороби порушення геномного імпринтингу (наприклад синдроми Ангельмана, Прадера-Віллі, Беквіта-Відемана), онкологічні захворювання [5–9]. Для популяцій онкотрансформованих клітин епігенетичні зміни у генах-супресорах чи протоонкогенах можуть бути більш суттєвими і розповсюдженими, ніж мутації [10].

Іонізуюче випромінювання (ІВ) є потужним мутагенним фактором, під дією якого в клітині формується весь спектр пошкоджень ДНК (одно- та дволанцюгові розриви, хімічні модифікації основ, зшивки ДНК-ДНК та ДНК-білок), які є причинами точкових мутацій і геномних перебудов (структурних та кількісних аномалій хромосом) [11–13]. Дані сто-

INTRODUCTION

Realization of hereditary information is not solely a function of genotype but depend on epigenetic regulation of gene expression [1]. DNA methylation at the C5 position of cytosine plays central role in epigenetic processes [2, 3]. If methylation sites spread a promoter and first exon the complete gene silencing occur [4]. Abnormal changes of DNA methylation are closely associated with development of diseases, such as type II diabetes, genomic imprinting disorders (Prader-Willi syndrome, Angelman syndrome, Beckwith-Wiedemann syndrome etc.) and cancer [5–9]. For cancer cell populations epigenetic alterations of tumor suppressor genes or oncogenes may be more significant and prevailing than mutations [10].

Ionizing radiation (IR) is a powerful mutagen. It causes the whole spectrum of DNA damages (single- and double-strand breaks, chemical modifications of nitrogenous bases, DNA-DNA and DNA-protein crosslinks) which results in point mutations and genomic rearrangements (structural and numerical chromosomal abnormalities) [11–13].

совно індукованої ІВ затриманої та трансгенеративної нестабільності геному [14] та радіаційного канцерогенезу [15] свідчать, що окрім численних порушень геному ІВ призводить до епігенетичних змін генної експресії. Дія ІВ *in vivo* та *in vitro* призводить до зниження рівня глобального метилювання ДНК в лімфоцитах периферичної крові (ЛПК) людини [16]. Важливим аспектом є відмічена пряма кореляція між зниженням рівня метилювання і зростанням хромосомної нестабільності [16].

Для відвернення негативного впливу ІВ на геном та епігеном клітин актуальним завданням залишається пошук речовин, бажано природного походження, дія яких зменшує наслідки реалізації первинних і вторинних радіаційних процесів. При цьому їх власна токсичність та мутагенна активність мають бути низькими.

Починаючи з 2015 року нами проводяться дослідження радіопротекторних властивостей астаксантину [17–20] – каротиноїду з групи ксантофілів, найбільш потужного з відомих на сьогодні антиоксидантів природного походження [21, 22]. За результатами власних досліджень та даними інших наукових груп, астаксантин відрізняється відсутністю токсичності та мутагенної активності [23–25]. В експериментах *in vitro* була продемонстрована здатність астаксантину значно зменшувати цитогенетичні ефекти іонізуючої радіації при опроміненні ЛПК людини на стадії G₀ клітинного циклу. Було показано, що найбільш вірогідно радіопротекторний вплив астаксантину можна пояснити не так його антиоксидантними властивостями, як активацією процесів апоптозу в популяції сильно пошкоджених клітин [26]. Крім того, було відмічено посилення контролю на звірочних точках клітинного поділу при опроміненні ЛПК на S стадії клітинного циклу [20]. Виходячи з цього, можна припустити вплив астаксантину на епігенетичні процеси, які регулюють клітинний цикл та апоптоз.

МЕТА

Метою представленої роботи було визначення впливу астаксантину на рівень глобального метилювання ДНК в опроміненних *in vitro* в дозі 1,0 Гр ЛПК людини.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Зразки венозної крові були отримані від чотирьох умовно здорових волонтерів (2 жінки, 2 чоловіка) віком 20–51 років, середній вік – 41 рік, які заперечували свідомий контакт зі знаними чи потенційними мутагенами (включаючи іонізуючу радіацію), вели здоровий спосіб життя.

The data concerning IR-induced delayed and transgenerational genomic instability [14] and radiation carcinogenesis [15] suggests that IR can not only lead to severe genomic damages but to epigenetic changes of gene expression. Exposure to IR *in vivo* and *in vitro* causes global DNA hypomethylation in human peripheral blood lymphocytes (PBL). The substantial fact is direct connection between decrease in the level of DNA methylation and growth of chromosomal instability [16].

To avoid negative influence of IR on cell genome and epigenome the extensive search for new compounds, preferably of natural origin, that reduce end-points of primary and secondary radiation processes. Moreover, these substances must have low mutagenicity and toxicity.

Since 2015, we have started investigation of the radioprotective effects of astaxanthin [17–20] – a carotenoid of xanthophyll group, and one of the most powerful, well-known natural antioxidant [21, 22]. According to results of our researches and data of other scientific teams, astaxanthin per se had no toxic and mutagenic activity [23–25]. *In vitro* experiments demonstrated that astaxanthin significantly reduced the level of radiation induced cytogenetic effects after irradiation of human PBL at the G₀ phase of the cell cycle. It was shown that the radioprotective action of astaxanthin with the utmost probability may be explained rather by stimulation of apoptosis in population of heavily damaged cells than by its antioxidant properties [26]. In addition, the activation of cell cycle checkpoints after irradiation of PBL cultures at the S phase was observed [20]. Hence we may suggest the influence of astaxanthin on epigenetic processes that regulate the cell cycle and apoptosis.

OBJECTIVE

The objective of our study was to investigate an effect of astaxanthin on global DNA methylation in human peripheral blood lymphocytes exposed to γ -radiation (dose 1.0 Gy) *in vitro*.

MATERIAL AND METHODS

Blood samples were obtained by venepuncture from four conditionally healthy volunteers (2 men and 2 women) at the age of 20–51 years old, average age was 41 years. Only the persons, who denied any conscious contact with well-known or potential mutagenic agents, followed a healthy lifestyle were chosen

Всі особи були залучені за умов поінформованої згоди.

Цільну кров додавали у культуральне середовище RPMI-1640 у співвідношенні 1 : 10. Частина зразків була опромінена γ -квантами (випромінювач IBL-237C, доза 1,0 Гр, потужність 2,34 Гр/хв). Астаксантин (Sigma, USA) у кінцевій концентрації 20 мкг/мл додавали перед опроміненням. Зразки крові витримувались 3 години при 37 °С.

Аналіз статусу глобального метилювання ДНК в ЛПК проводили з використанням модифікованого методу гель-електрофорезу окремих клітин (Comet assay) в нейтральних умовах з використанням метилчутливого ферменту рестрикції HpaII, сайти активності якого відповідають неметилюваній послідовності ДНК 5'-CCGG-3' [27].

Виділення лімфоцитів у градієнті щільності Histopaque 1077 (Sigma, USA) проводили згідно з протоколом виробника. Отриману суспензію клітин змішували з 1% легкоплавкою агарозою (Sigma, USA) при 37 °С. Приготування слайдів та лізис клітин проводили за загальноприйнятою методикою [28]. Після лізису скельця відмивали у буфері, який складався з $5 \cdot 10^{-3}$ М TrisHCl, $5 \cdot 10^{-3}$ М NaCl, $5 \cdot 10^{-4}$ М β -меркаптоетанолу та $1 \cdot 10^{-3}$ М Na₂EDTA. Після цього на слайди наносили розчин з ферментом рестрикції (1,5 Од. HpaII у 100 мкл буфера Tango (Fermentas)) та інкубували у вологій камері при 37 °С протягом 55 хв. Реакцію зупиняли за допомогою буфера TBE (89 мМ Tris-borat, 2 мМ EDTA, pH 7,5), після чого проводили електрофорез у TBE буфері 7

for the investigation. All persons were involved in research under conditions of informed consent.

The whole blood were diluted in RPMI-1640 medium at the ratio 1:10. Some samples were exposed to γ -ray (dose 1 Gy, emitter IBL-237C, dose-rate 2.34 Gy/min). Astaxanthin (Sigma, USA) was added into culture medium in final concentrations 20.0 μ g/ml before irradiation. The blood samples were incubated at 37 °C for 3 h.

The analysis of global DNA methylation in peripheral blood lymphocytes was carried out using a modified method of single-cell gel electrophoresis (Comet assay) in neutral conditions using the methylation-sensitive endonuclease HpaII, which recognition site corresponds to the unmethylated DNA sequence of 5'-CCGG-3' [27].

The lymphocytes were isolated by separation of cells in a density gradient Histopaque 1077 (Sigma, USA), according to instructions of the manufacturer. The cell suspension was mixed with 1% low-melting point agarose (Sigma, USA) at 37 °C. Preparation of microscopic slides and lysis of cells was carried out according to the generally accepted method [28]. After the lysis, slides were washed by buffer composed of $5 \cdot 10^{-3}$ М TrisHCl, $5 \cdot 10^{-3}$ М NaCl, $5 \cdot 10^{-4}$ М β -mercaptoethanol and $1 \cdot 10^{-3}$ М Na₂EDTA. Each slide was then overlaid with enzyme mixture (1.5 U of HpaI in 100 μ l of Tango buffer (Fermentas)) and incubated in a damp chamber at 37 °C for 55 min. The reaction was stopped by washing in TBE buffer (89 мМ Tris-borat, 2 мМ EDTA, pH 7.5). Slides

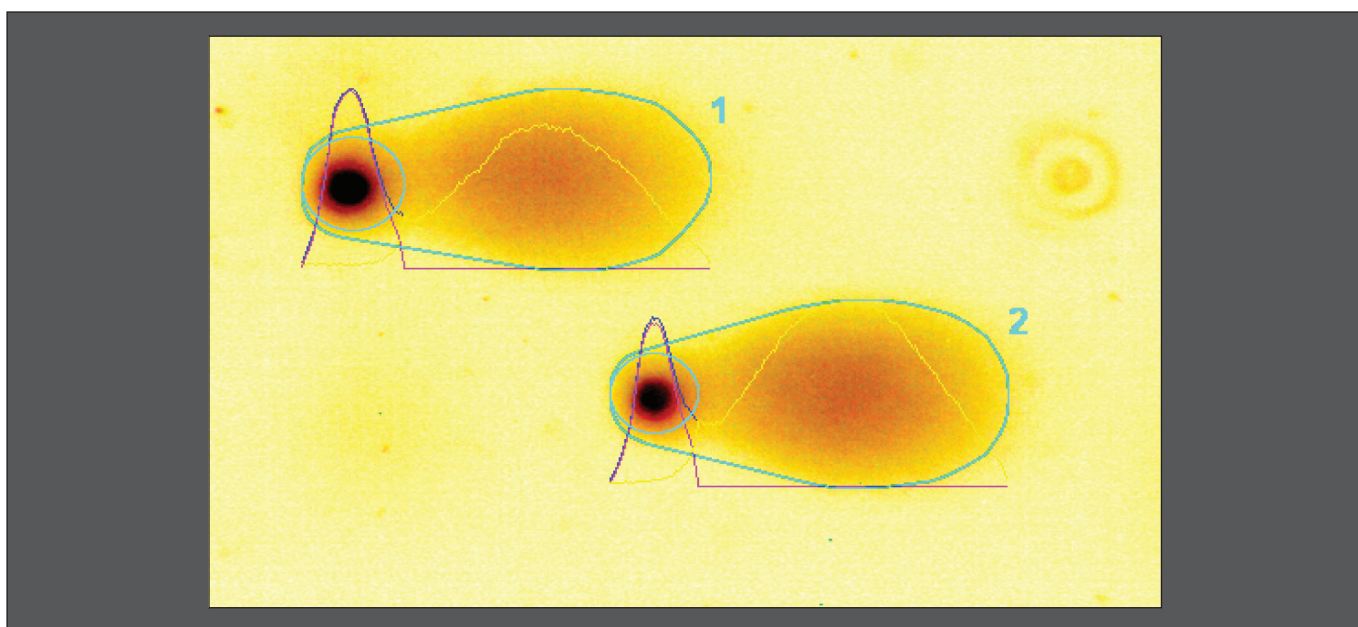


Рисунок 1. Аналіз хвостових частин комет, після обробки рестриктазою HpaII, за допомогою OpenComet
Figure 1. Analysis of the comet tails after digestion with restriction enzyme HpaII using OpenComet

хв. при температурі 4 °С, напрузі 1 В/см і силі струму у 200 мА.

Для візуалізації результатів слайди фарбували DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) в концентрації 2,0 мкг/мл відразу після електрофорезу без фіксації слайдів. Аналіз результатів проводили під люмінесцентним мікроскопом Opton Axioskop (Zeiss, Germany), до якого приєднували фотоапарат Canon D1000. З кожного слайду загалом було обраховано 100 випадково обраних нуклеоїдів (т. з. «комет»). Зображення аналізували за допомогою програми ImageJ (imagej.nih.gov) з плагіном OpenComet [29]. Для кількісної оцінки міграції ДНК в агарозний гель використовували показник Tail Moment (TM), який одночасно враховує як кількість ДНК у хвостовій частині «комети», так і довжину хвостової частини [30].

Для статистичного аналізу зміни рівня загального метилювання ДНК нами було проведено дослідження частотного розподілу окремих клітин залежно від рівня TM. Загальна вибірка «комет», які зустрічались в експерименті, була поділена на дванадцять груп за значеннями TM, від 20 до 260 з кроком 20 (від мінімального до максимального значення TM). Якщо значення TM дорівнювало граничному – «комету» відносили до наступної групи. Достовірність різниці між рядами даних та напрямом зсуву розподілу значень TM розраховували за критерієм Ман-Вітні [31].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Розподіл за показником TM, який було зареєстровано після проведення обробки рестриктазою HpaII неопромінених ЛПК людини (контроль), представлено на рис. 2.

were electrophoresed 7 min. in TBE buffer at 4 °С, voltage of 1 V/cm and amperage 200 mA.

To visualize the results, after electrophoresis, slides without fixation were stained with 2 µg/ml of DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma, USA). the slides were analyzed with a fluorescent microscope Opton Axioskop (Zeiss, Germany), connected with a Canon EOS 1000 D camera. A total of 100 randomly chosen nucleoids («comets») on each slide were examined using image processing program ImageJ (imagej.nih.gov) with OpenComet plugin [29]. Tail moment (TM), that bring together both the amount of DNA in the «comet» tail and the length of the tail [30], was chosen as a parameter to quantify the migration of DNA into an agarose gel.

To estimate changes in global DNA methylation we have studied the frequency distribution of individual cells depending on their TM value. According to TM the sampling of «comets» from all variants was divided into eleven groups from 20 (minimum excremental value of TM) to 260 (maximum excremental value) with increment of 20. If the value of TM was equal to the boundary index then «comet» was referred to the next group. Significance of differences between the data series and trend of the distribution shift for TM values was estimated by the Man-Whitney criterion [31].

RESULTS AND DISCUSSION

The distribution of TM values after digestion of non-irradiated human peripheral blood lymphocytes (control) with restriction enzyme HpaII is presented in Figure 2.

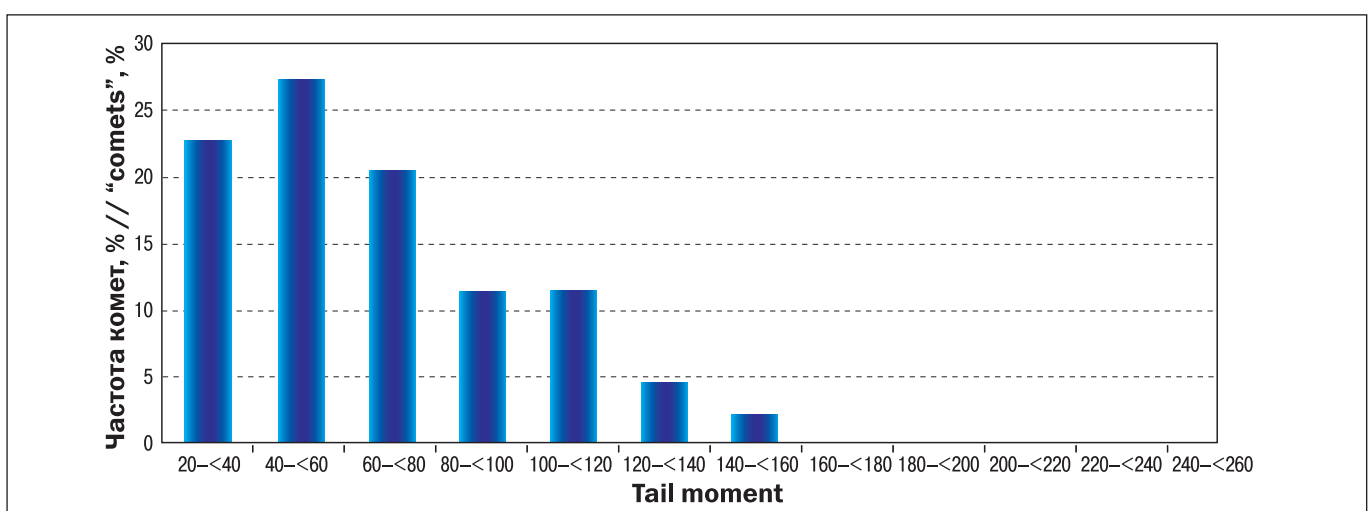


Рисунок 2. Розподіл за показником TM після обробки рестриктазою HpaII неопромінених ЛПК людини (контроль)

Figure 2. The distribution of TM values after digestion of non-irradiated cells (control) with HpaII

Аналіз розподілу, представлений на рисунку 2, свідчить, що серед неопромінених ЛПК переважали клітини, які формували комети із значеннями ТМ в межах від 20 до 80. Слід відзначити, що комет зі значенням ТМ від 160 (п'ять останніх груп) виявлено не було. Отриманий результат свідчить про високий рівень метилювання ДНК в інтактних клітинах, що збігається з літературними даними [32, 33].

Додавання астаξανтину до неопромінених ЛПК людини призвело до статистично значущого ($p < 0,05$) зсуву розподілу ТМ (рис. 3). Було зафіксовано зниження частот комет в групах з ТМ 40 – < 60 та з ТМ 60 – < 80. Також були зареєстровані комети з ТМ від 180 до 240, яких не було зафіксовано в попередньому експерименті. Зсув розподілу у напрямку збільшення значень ТМ виявився статистично достовірним ($p < 0,05$). Оскільки зростання хвостової частини комети є наслідком збільшення сайтів впізнавання ферменту рестрикції HpaII, отриманий результат свідчить про наявність популяції клітин, в яких додавання астаξανтину призвело до зниження рівня метилювання ДНК.

Розподіл значень ТМ після опромінення лімфоцитів в дозі 1,0 Гр та подальшої обробки ферментами рестрикції представлений на рис. 4. Даний розподіл статистично достовірно відрізнявся як від контрольного ($p < 0,05$), так і від отриманого після додавання астаξανтину до неопромінених ЛПК ($p < 0,05$).

Після опромінення ЛПК спостерігалось збільшення числа комет в діапазоні ТМ від 80 до 160 та зменшення частот клітин в перших трьох групах (діапазон ТМ від 20 до 80). Аналіз змін розподілу показав статистично достовірне ($p < 0,05$) збільшення числа

Analysis of the distribution, presented in Figure 2, indicated that among non-irradiated PBL cells which produced «comets» with TM values in the range of 20 to 80 were prevalent. It should be noted that «comets» with a TM values from 160 (the last five groups) were not detected. This result demonstrates the high level of DNA methylation in intact cells and our findings are consistent with the literature data [32, 33].

The treatment of non-irradiated human peripheral blood lymphocytes with astaxanthin resulted to a statistically significant ($p < 0.05$) shift of TM distribution (Figure 3). There was a decrease in the frequency of «comets» with TM 40 – < 60 and TM 60 – < 80. Moreover, the «comets» with TM from 180 to 240, which were not detected in the previous experiment, were registered as well. The shift of the distribution has statistically significant ($p < 0.05$) tendency to increasing TM values. Considering that the growth of the comet tail is due to the increase in the sites of recognition of HpaII, the received data indicates the presence of a cell population in which the astaxanthin treatment reduces the level of methylation of DNA.

The distribution of TM values after irradiation of lymphocytes in a dose of 1.0 Gy and further digestion with restriction enzyme is presented in Figure 4. This distribution was statistically significantly different from the control ($p < 0.05$) and the one obtained after treatment with astaxanthin of non-exposed PBL ($p < 0.05$).

After irradiation of PBL, an increase in the number of comets in the range of TM from 80 to 160 and a decrease in the frequencies of cells in the first three groups (TM range from 20 to 80) was observed. The analysis of distribution changes showed a statistically

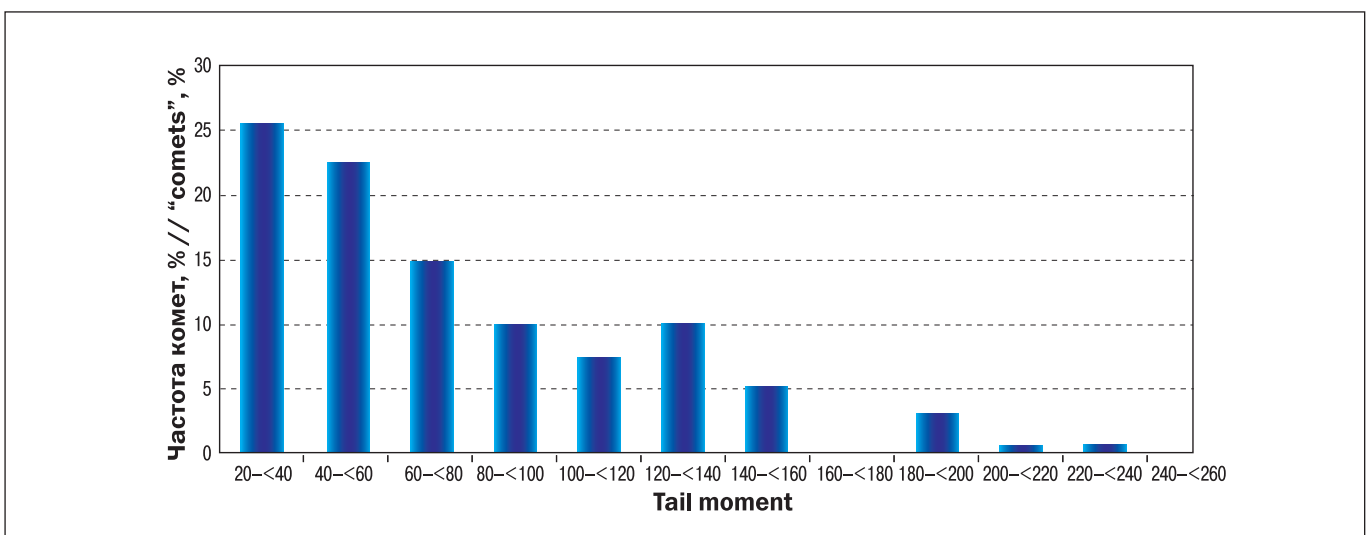


Рисунок 3. Розподіл за показником ТМ після додавання астаξανтину до неопромінених ЛПК людини
Figure 3. The distribution of the TM values after treatment of non-irradiated lymphocytes with astaxanthin

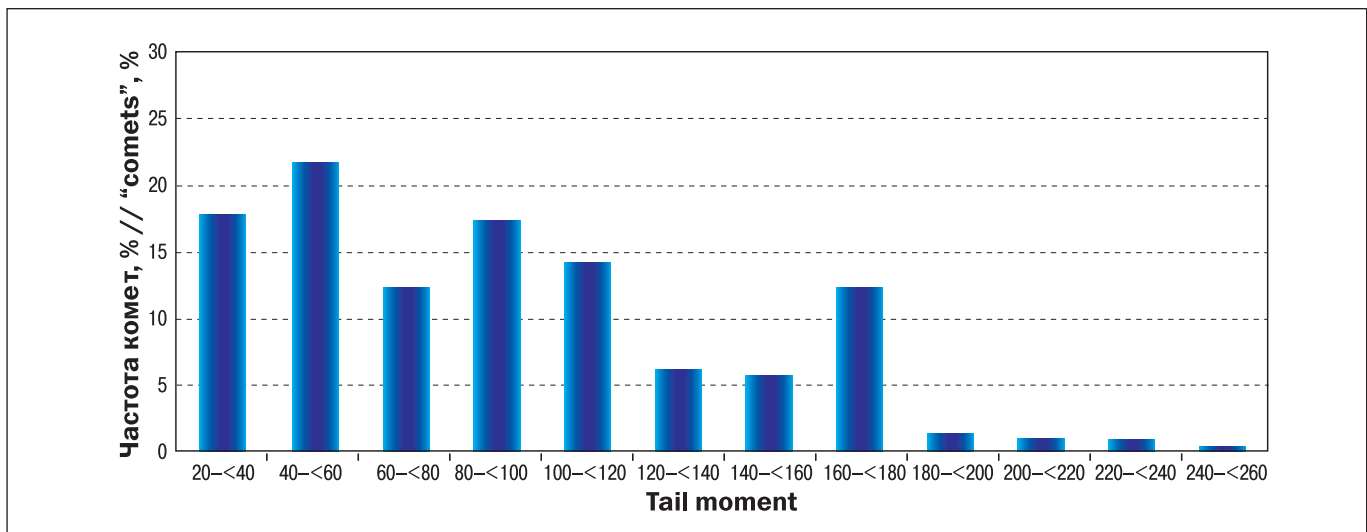


Рисунок 4. Розподіл за показником ТМ після опромінення ЛПК в дозі 1,0 Гр та подальшої обробки рестриктазою HpaII

Figure 4. The distribution of TM after PBL irradiation in a dose of 1.0 Gy and further digestion with HpaII

комет з високим рівнем ТМ, як по відношенню до контролю, так і при додаванні астаξανтину до неопромінених лімфоцитів.

Відомо, що дія ІВ в дозі 1,0 Гр призводить до виникнення приблизно 1000 одноланцюгових та до 40 дволанцюгових розривів ДНК на клітину [34]. Спираючись на дані щодо збільшення ТМ після опромінення [20] та враховуючи, що HpaII є дрібно ріжучою рестриктазою, можемо дійти висновку, що зсув розподілу ТМ після опромінення ЛПК вірогідно пов'язаний саме зі зменшенням загального рівня метилювання ДНК, що узгоджується з літературними даними [16].

Обробка ЛПК астаξανтином та подальше опромінення призвело до зменшення чисельності комет з ТМ від 20 до 80, натомість було зафіксовано зростання частоти клітин, які формували комети з ТМ від 80 до 160 (рис. 5). Розподіл за показником ТМ вказує на статистично значуще збільшення пулу опромінених клітин зі зниженим рівнем метилювання ДНК порівняно з даними, отриманими для ЛПК, що зазнали дії радіації без додавання астаξανтину ($p < 0,05$).

Отримані результати дослідження свідчать, що астаξανтин призводить до вірогідного зниження рівня загального метилювання ДНК як в неопромінених, так і в опромінених клітинах. Відомо, що глобальне гіпометилювання ДНК є характерною ознакою онкологічної трансформації, що супроводжується активацією онкогенів і блокуванням, за рахунок локус-специфічного гіперметилювання, генів супресорів пухлин [10, 35]. Однак, при дослідженні властивостей астаξανтину, у кароти-

significant ($p < 0.05$) growth of comets with a high level of TM compared both with untreated and treated with astaxanthin non-irradiated lymphocytes.

It is known that γ -irradiation in a dose of 1.0 Gy induces about 1000 single-stranded and up to 40 double-stranded DNA breaks per cell [34]. Based on the data concerning the increase of TM after irradiation [20] and taking account that HpaII is a frequent-cutter restriction enzyme, we can conclude that distribution shift of TM after PBL irradiation is evidently associated with decrease in the level of global DNA methylation, which is consistent with the literature data [16].

The treatment of PBL with astaxanthin and subsequent irradiation resulted to decrease in the number of «comets» with TM from 20 to 80, whereas the increase in the number of cells that formed comets with TM from 80 to 160 was observed (Fig. 5). Distribution of the TM values indicates a statistically significant increase in the pool of irradiated cells with a reduced level of DNA methylation compared with the data obtained for PBL exposed to radiation without astaxanthin treatment ($p < 0.05$).

The results of our study indicate that astaxanthin causes an evident reduction in the level of global DNA methylation in non-irradiated and irradiated cells. It has been established that the global DNA hypomethylation is a hallmark of oncological transformation, which is associated with activation of oncogenes and silencing, due to locus specific hypermethylation, genes of suppressor tumors [10, 35]. However, according to the data concerning astaxanthin properties, the

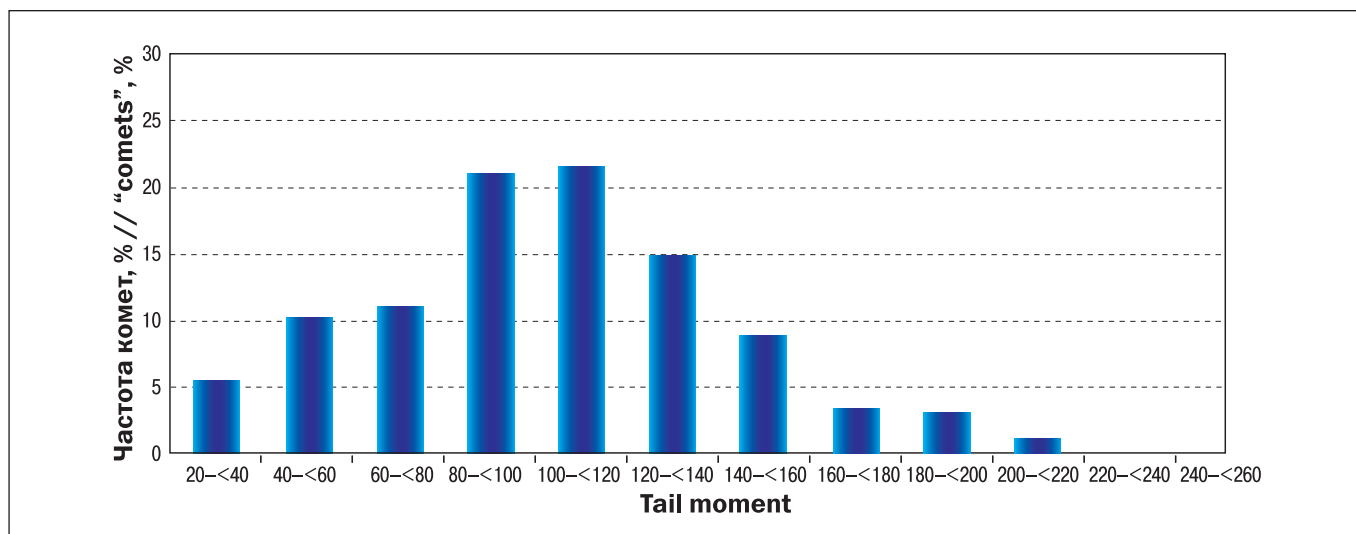


Рисунок 5. Розподіл за показником ТМ після γ -опромінення ЛПК з попереднім додаванням астаксантину та обробкою рестриктазою HpaII

Figure 5. The distribution of TM after γ -irradiation of PBL treated with astaxanthin and further digestion with HpaII

ноїду не було відмічено канцерогенної дії. Навпаки, астаксантин активно інгібує проліферацію онкотрансформованих клітин і активує в них процеси апоптозу [36–39].

Зважаючи на апоптогенні властивості астаксантину, які проявлялися при опроміненні культур ЛПК на G_0 стадії клітинного циклу по відношенню до клітин з сублетальним рівнем пошкоджень геному [17], та відсутність у астаксантину канцерогенної дії, можна припустити, що його здатність знижувати рівень метилювання ДНК пов'язана з додатковою активацією генів, які беруть участь в регуляції процесів клітинного поділу та клітинної загибелі і знаходяться в неактивному стані за рахунок метилювання. Це припущення потребує подальшого вивчення.

ВИСНОВКИ

Астаксантин у концентрації 20,0 мкг/мл призводить до зниження рівня глобального метилювання ДНК в опроміненних *in vitro* та неопроміненних лімфоцитах людини, що свідчить про його здатність впливати на епігенетичні механізми контролю генної експресії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- Weinhold B. Epigenetics: the science of change. *Environ. Health Perspect.* 2006. Vol. 114. P. 160–167.
- Jin B., Li Ya., Robertson K. D. DNA methylation. Superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer.* 2011. Vol. 2 (6). P. 607–617. doi: 10.1177/1947601910393957
- Moore L. D., Le T., Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 2013. Vol. 38. P. 23–38. doi: 10.1038/npp.2012.112

carcinogenic effect of the carotenoid was not detected. On the contrary, astaxanthin heavily inhibits proliferation and induces apoptosis in cancer cells [36–39].

In view of apoptogenic properties of astaxanthin against the cells with a sublethal level of genome damage manifested when PBL cultures were irradiated at the G_0 stage of the cell cycle [17] and the absence of its carcinogenic action, it can be assumed that astaxanthin ability to reduce the level of DNA methylation is associated with additional activation of genes that regulate processes of cell division and cell death and are inactive due to methylation. This assumption requires further research.

CONCLUSION

Astaxanthin in concentration of 20.0 $\mu\text{g/ml}$ reduced the levels of global DNA methylation both in irradiated *in vitro* and native human lymphocytes. It suggests that astaxanthin has an effect on mechanisms of epigenetic regulation of gene expression.

REFERENCES

- Weinhold B. Epigenetics: The Science of Change *Environ Health Perspect.* 2006;114:160-7.
- Jin B, Li Ya, Robertson KD. DNA methylation. Superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer.* 2011;2(6): 607-17. doi: 10.1177/1947601910393957
- Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38:23-38. doi: 10.1038/npp.2012.112.

4. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing / F. Brenet, M. Moh, P. Funk et al. *PLoS One*. 2011. Vol. 6(1). P. e14524. doi: 10.1371/journal.pone.0014524.
5. Sharma S., Kelly T. K., Jones P. A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010. Vol. 31. P. 27–36.
6. Li E., Beard C., Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*. 1993, Vol. 366. P. 362–365.
7. Zoghbi H. Y., Beaudet A. L. Epigenetics and human disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2016. Vol. 8(2). P. a019497. doi: 10.1101/cshperspect.a019497.
8. Epimutation and cancer: a new carcinogenic mechanism of Lynch syndrome (Review) / K. Banno, I. Kisu, M. Yanokura et al. *Int. J. Oncol.* 2012. Vol. 41, no. 3. P. 793–797. doi:10.3892/ijo.2012.1528.
9. Novak K. Epigenetics changes in cancer cells: Highlights of the American Association for Cancer Research Special Conference on Chromatin, Chromosomes, and Cancer Epigenetics, November 10-14, 2004; Waikoloa, Hawaii. *Medscape General Medicine*. 2004. Vol. 6(4). P. 17.
10. Simmons D. Epigenetic influences and disease. *Nature Education*. 2008. Vol. 1(1). P. 6.
11. Obe G., Durante M. DNA double strand breaks and chromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res.* 2010. Vol. 28. P. 8–16. doi: 10.1159/000303328.
12. Turgeon M., Perry N., Poulogiannis G. DNA damage, repair, and cancer metabolism. *Front Oncol.* 2018. Vol.8. P. 15. doi:10.3389/fonc.2018.00015.
13. Lloyd D. C., Dolphin G. W. Radiation-induced chromosome damage in human lymphocytes. *Br. J. Ind. Med.* 1977. Vol. 34(4). P. 261-273.
14. Merrifield M., Kovalchuk O. Epigenetics in radiation biology: a new research frontier. *Front. Genet.* 2013; Vol. 4. P. a40. doi: 10.3389/fgene.2013.00040.
15. Shah D. J., Sachs R. K., Wilson D. J. Radiation-induced cancer: a modern view. *Br. J. Radiol.* 2012. Vol. 1020. P. 1166–1173. doi: 10.1259/bjr/25026140.
16. Radiation-induced changes in DNA methylation and their relationship to chromosome aberrations in nuclear power plant workers / Y. Lee, Y. J. Kim, Y. J. Choi et al. *Int. J. Radiat. Biol.* 2015. Vol. 91. P. 142–149.
17. 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.
18. Kurinnyi D. A., Rushkovsky S. R., Dybska O. B., Dubrovina G. V., Pilinska M. A. 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.
19. Kurinnyi D. A., Rushkovsky S. R., Demchenko O. M., Pilinska M. A. Study the impact of astaxanthin on developing of genomic instability in human peripheral blood lymphocytes irradiated in vitro on G2 phase of cell cycle. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2017. Vol. 22. P. 208–216.
20. Kurinnyi D. A., Rushkovsky S. R., Demchenko O. M., Pilinska M. A. Peculiarities of modification by astaxanthin the radiation-induced damages in the genome of human blood lymphocytes exposed in vitro
4. Brenet F, Moh M, Funk P, Feierstein E, Viale AJ, Socci ND, Scandura JM. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS One*. 2011;6(1):e14524. doi: 10.1371/journal.pone.0014524.
5. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010;31:27-36.
6. Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*. 1993;366:362-5.
7. Zoghbi HY, Beaudet AL. Epigenetics and human disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(2):a019497. doi: 10.1101/cshperspect.a019497.
8. Banno K, Kisu I, Yanokura M, Tsuji K, Masuda K, Ueki A, et al. Epimutation and cancer: a new carcinogenic mechanism of Lynch syndrome (Review). *Int J Oncol*. 2012;41(3):793-7. doi:10.3892/ijo.2012.1528. PMC 3582986. PMID 22735547.
9. Novak K. Epigenetics changes in cancer cells: highlights of the American Association for Cancer Research Special Conference on Chromatin, Chromosomes, and Cancer Epigenetics. *Medscape General Medicine*. 2004;6(4):17. doi:10.3892/ijo.2012.1528.
10. Simmons D. Epigenetic influences and disease. *Nature Education*. 2008;1(1):6.
11. Obe G, Durante M. DNA double strand breaks and chromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res*. 2010;28:8-16. doi: 10.1159/000303328.
12. Turgeon M, Perry N, Poulogiannis G. DNA damage, repair, and cancer metabolism. *Front Oncol*. 2018;8:15. doi:10.3389/fonc.2018.00015.
13. Lloyd DC, Dolphin G. W. Radiation-induced chromosome damage in human lymphocytes. *Br J Ind Med*. 1977;34(4):261-73.
14. Merrifield M., Kovalchuk O. Epigenetics in radiation biology: a new research frontier. *Front Genet*. 2013;4:a 40. doi: 10.3389/fgene.2013.00040.
15. Shah DJ, Sachs RK, Wilson DJ. Radiation-induced cancer: a modern view. *Br J Radiol*. 2012;1020:1166-73. doi: 10.1259/bjr/25026140.
16. Lee Y, Kim YJ, Choi YJ, Lee JW, Lee S, Cho YH, et al. Radiation-induced changes in DNA methylation and their relationship to chromosome aberrations in nuclear power plant workers. *Int J Radiat Biol*. 2015;91:142-9. doi: 10.3389/fgene.2013.00040.
17. 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.
18. Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Dybska OB, Dubrovina GV, Pilinska MA. Astaxanthin modifies clastogenic effects of ionizing radiation in vitro in peripheral blood lymphocytes of the persons recovered from acute radiation sickness. *Exp Onc*. 2016;38(4):280-2.
19. Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Demchenko OM, Pilinska MA. Study the impact of astaxanthin on developing of genomic instability in human peripheral blood lymphocytes irradiated in vitro on G2 phase of cell cycle. *Probl Radiac Med Radiobiol*. 2017;22:208-16.

- on different stages of the mitotic cycle. *Cytol. Genet.* 2018. Vol. 52, no. 1. P. 40–45.
21. Ambati R. R., Phang S. M., Ravi S., Aswathanarayana R. G. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications. *Mar. Drugs.* 2014. Vol. 12, no. 1. P. 128–152. doi: 10.3390/md12010128.
22. Scavenging of hydroxyl radicals in aqueous solution by astaxanthin encapsulated in liposomes / S. Hama, S. Uenishi, A. Yamada et al. *Biol. Pharm. Bull.* 2012. Vol. 35. P. 2238–2242.
23. Safety assessment of astaxanthin - rich microalgae biomass: Acute and subchronic toxicity studies in rats / J. Stewart, A. Lignell, A. Pettersson et al. *Food Chem. Toxicol.* 2008. Vol. 46, no. 9. P. 3030–3036. doi: 10.1016/j.fct.2008.05.038.
24. Genotoxicity and subacute toxicity studies of a new astaxanthin-containing *Phaffia rhodozyma* extract / Y. Tago, T. Fujii, J. Wada et al. *J. Toxicol. Sci.* 2014. Vol. 39, no. 3. P. 373–382.
25. Kurinnyi D. A., Kostikov I. Yu. Co-cultivation of unicellular green algae (Chlorophyta, Chlorophyceae) and human peripheral blood lymphocytes as a test system for radiobiological studies. *Int. J. Algae.* 2017. Vol. 19, no. 2. P. 163–172. doi.org/10.15407/alg27.02.215.
26. Kurinnyi D. A., Rushkovsky S. R., 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/ ed. by T. Reeve. NY : Nova science publishers, 2018. P. 221–240.
27. Lewies A., Van Dyk E., Wentzel J. F., Pretorius P. J. Using a medium-throughput comet assay to evaluate the global DNA methylation status of single cells. *Front. Genet.* 2014. Vol. 5, no. 215. P. 1–6. doi: 10.3389/fgene.2014.00215.
28. Olive P. L., Banath J. P. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the «comet» assay. *Radiat. Res.* 2012. Vol. 178. P. 35–42.
29. Open Comet: An automated tool for comet assay image analysis / B. M. Gyori, G. Venkatachalam, P. S. Thiagarajan et al. *Redox Biology.* 2014. Vol. 2. P. 457–465.
30. Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies / E. Lee, E. Oh, J. Lee et al. *Toxicol. Sci.* 2004. Vol. 81. P. 121–132.
31. 30 years of the Comet Assay: an overview with some new insights / ed. by A. Azqueta, S. Langie, A. Collins. Frontiers, 2007. 560 p.
32. Rosner B. Fundamentals of biostatistics. 8th ed. Cengage Learning, 2015. 962 p.
33. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells / M. Ehrlich, M.A. Gama Sosa, L.-H. Huang et al. *Nucleic Acids Res.* 1982. Vol. 10. P. 2709–2721. doi:10.1093/nar/10.8.2709.
34. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences / R. Lister, M. Pelizzola, R. Downen et al. *Nature.* 2009. Vol. 462, no. 7271. P. 315–322. doi: 10.1038/nature08514. PMC 2857523.
35. Ahnstrom G., Erixon K. Measurement of strand breaks by alkaline denaturation and hydroxyapatite chromatography, in DNA Repair. A labora-
20. Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Demchenko OM, Pilinska MA. Peculiarities of modification by astaxanthin the radiation-induced damages in the genome of human blood lymphocytes exposed in vitro on different stages of the mitotic cycle. *Cytol Genet.* 2018;52(1):40-5.
21. Ambati RR, Phang SM, Ravi S, Aswathanarayana RG. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications. *Mar Drugs.* 2014;12(1):128-52. doi: 10.3390/md12010128.
22. Hama S, Uenishi S, Yamada A, Ohgita T, Tsuchiya H, Yamashita E, et al. Scavenging of hydroxyl radicals in aqueous solution by astaxanthin encapsulated in liposomes. *Biol Pharm Bull.* 2012;35:2238-42.
23. Stewart J, Lignell A, Pettersson A, Elfving E, Soni G. Safety assessment of astaxanthin - rich microalgae biomass: Acute and subchronic toxicity studies in rats. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(9):3030-6. doi: 10.1016/j.fct.2008.05.038.
24. Tago Y, Fujii T, Wada J, Kato M, Wei M, Wanibuchi H, et al. Genotoxicity and subacute toxicity studies of a new astaxanthin-containing *Phaffia rhodozyma* extract. *J Toxicol Sci.* 2014;39(3):373-82.
25. Kurinnyi DA, Kostikov IYu. Co-cultivation of unicellular green algae (Chlorophyta, Chlorophyceae) and human peripheral blood lymphocytes as a test system for radiobiological studies. *Int J Algae.* 2017, Vol. 19, no. 2, P. 163-172. doi.org/10.15407/alg27.02.215.
26. Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Demchenko OM, Pilinska MA. Radioprotective properties of astaxanthin: The Impact on radiation induced chromosomal aberrations and DNA breaks in human lymphocytes in vitro. In: Reeve T., editor. Ionizing radiation. Advances in research and applications. NY: Nova science publishers; 2018. p. 221-40.
27. Lewies A, Van Dyk E, Wentzel JF, Pretorius PJ. Using a medium-throughput comet assay to evaluate the global DNA methylation status of single cells. *Front Genet.* 2014;5(215):1-6. doi: 10.3389/fgene.2014.00215.
28. Olive PL, Banath JP. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the «comet» assay. *Radiat Res.* 2012;178:35-42.
29. 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.
30. Lee E, Oh E, Lee J, Sul D, Lee J. Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. *Toxicol Sci.* 2004;81:121-32.
31. Azqueta A, Langie S, Collins A, editors. 30 years of the Comet Assay: an overview with some new insights. Frontiers; 2007. 560 p.
32. Rosner B. Fundamentals of biostatistics. 8th ed. Cengage Learning; 2015. 962 p.
33. Ehrlich M, Gama Sosa MA, Huang L-H, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C. Amount and distribution of 5-methylcyto-

- tory manual of research procedures / ed. by E. C. Friedberg, P. C. Hanawalt. New York, NY : Marcel Dekker. 1981. P. 403-418.
36. Kulis M., Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv. Genet.* 2010. Vol. 70. P. 27–56. doi: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2.
37. Zhang L., Wang H. Multiple mechanisms of anti-cancer effects exerted by astaxanthin. *Mar. Drugs.* 2015. Vol. 13. P. 4310–4330. doi:10.3390/md13074310.
38. Glasauer A., Chandel N. S. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.* 2014. Vol. 92. P. 90–101.
39. Carotenoids inhibit proliferation and regulate expression of peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPARgamma) in K562 cancer cells / X. Zhang, W. E. Zhao, L. Hu et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 2011. Vol. 512. P. 96–106.
40. Astaxanthin inhibits JAK/STAT-3 signaling to abrogate cell proliferation, invasion and angiogenesis in a hamster model of oral cancer / J. Kowshik, A. B. Baba, H. Giri et al. *PLoS One.* 2014. Vol. 9. P. e109114. doi: 10.1371/journal.pone.0109114. eCollection 2014.
41. Lister R, Pelizzola M, Dowen R, Hawkins RD, Hon Gary, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 2009;462(7271): 315-22. doi:10.1038/nature08514.
42. Ahnstrom G, Erixon K. Measurement of strand breaks by alkaline denaturation and hydroxyapatite chromatography, in DNA Repair. In: Friedberg EC, Hanawalt PC, editors. A laboratory manual of research procedures. New York, NY: Marcel Dekker; 1981. p. 403-18.
43. Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet.* 2010;70:27-56. doi: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2.
44. Zhang L, Wang H. Multiple mechanisms of anti-cancer effects exerted by astaxanthin. *Mar Drugs.* 2015;13:4310-30. doi:10.3390/md13074310.
45. Glasauer A, Chandel NS. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* 2014;92:90-101.
46. Zhang X, Zhao WE, Hu L, Zhao L, Huang J. Carotenoids inhibit proliferation and regulate expression of peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPARgamma) in K562 cancer cells. *Arch Biochem Biophys.* 2011;512:96-106.
47. Kowshik J, Baba AB, Giri H, Deepak RG, Dixit M, Nagini S. Astaxanthin inhibits JAK/STAT-3 signaling to abrogate cell proliferation, invasion and angiogenesis in a hamster model of oral cancer. *PLoS One.* 2014;9:e109114. doi: 10.1371/journal.pone.0109114. eCollection 2014.

Стаття надійшла до редакції 16.07.2018

Received: 16.07.2018