

Корисна модель базується на модифікації прояву пухлинно-індукованого ефекту свідка, а саме на можливості ослаблення негативного впливу зл�акісних пухлин на клітини, які не знаходяться в стані онкологічної трансформації. Дослідження виконуються *in vitro* у контрольованих умовах, які дозволяють оцінити наслідки взаємодії пухлинних та нормальних клітин. Корисна модель може бути використана при проведенні науково-практичних досліджень в медичній генетиці та онкології і при розробці нових методичних підходів до терапії онкозахворювань.

Актуальність розробки визначається тим, що даний підхід заснований на застосуванні атаксантину (каротиноїду з групи ксантофілів), речовини з низькою власною токсичністю (LD50 не знайдено), як засобу, що запобігає прояву пухлинно-індукованого ефекту свідка (tumor-induced bystander effect - TIBE).

В наш час проведення робіт з дослідження впливу речовин *in vitro*, спрямованих на пригнічення прояву онкологічних патологій та забезпечення способу профілактики і корекції радіотерапії є важливим і перспективним напрямком, як для радіаційної генетики, онкології, так і для медицини в цілому.

Результати досліджень *in vitro*, отримані нашою групою дослідників у 2015-2025 рр., свідчать про високу активність атаксантину, як модифікатора радіаційно-індукованих генетичних пошкоджень в соматичних клітинах людини. Використання атаксантину призводить до суттєвого зменшення частоти цитогенетичних та молекулярно-генетичних маркерів пошкодження ДНК та стимуляції апоптозу.

Атаксантин було протестовано в експериментах як *in vitro* так і *in vivo*. крім цього проведено ряд клінічних випробувань. Атаксантин блокує молекули з активними формами кисню, тим самим запобігаючи пошкодженню ДНК [1].

Було відмічено імуностимулюючий ефект атаксантину [2]. У добровольців, які отримували атаксантин щодня, протягом 8 тижнів встановлено підвищення регуляції лімфопроліферації, спричиненої мітогеном, підвищення цитотоксичної активності природних клітин-кілерів та підвищення загальної кількості лейкоцитів Т та В [3].

В роботі J. Shin, описано застосування атаксантину в клітинній лінії астрогліоми U251-MG. Встановлено, що додавання каротиноїду до культури клітин лінії астрогліоми U251-MG призводить до зростання рівня апоптичних клітин [4].

В експериментах на дослідних щурах показано, що прогресування гліобластоми інгібовано пероральним введенням атаксантину в дозах 10 та 30 мг/кг, відповідно, протягом 10 днів [5]. Відомо про застосування атаксантину при лікуванні аутоімунних захворювань, хронічних вірусних та внутрішньоклітинних бактеріальних інфекцій, шляхом пригнічення імунних реакцій, опосередковано клітинами Th1, та стимуляція імунних реакцій, опосередкована клітинами Th2. [3]. Було показано, що атаксантин може знижувати ступінь пошкоджень клітин головного мозку завдяки здатності проходити крізь гематоенцефалічний бар'єр [6]. Застосування атаксантину, призвело до пригнічення росту клітин раку ротової порожнини хом'яка, завдяки блокуванню сигналізації STAT, ERK або PI3K/Akt, що вказує на протипухлинний потенціал каротиноїду [7]. Відомо, що атаксантин може стимулювати мітохондріально-залежний апоптоз у клітинах гепатоцелюлярної карциноми [8]. Атаксантин може інгібувати активність ферменту 5 $\alpha$ -редуктази і, таким чином, вважається, що його можна використовувати для лікування або профілактики розладів, що виникають в результаті порушення активності ферменту, зокрема доброякісної гіперплазії передміхурової залози та раку передміхурової залози [3]. Є науково-дослідні роботи, в яких автори описують можливість застосування ксантофілів для пригнічення росту пухлинних клітин у клітинних культурах хворих з верифікованими клінічними діагнозами, а саме: адренокортикальної карциноми, остеосаркоми або мультиформної гліобластоми [8-12].

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб модифікації прояву пухлино-індукованого ефекту свідка, викликаного негативним впливом онкологічно трансформованих клітин на здорові клітини, включає культивування лімфоцитів периферичної крові, які взаємодіяли з пухлинними клітинами, і додавання до них атаксантину в концентрації 20 мкг/мл, які вводять в культуру клітин.

Дослідження *in vitro* проводили з використанням цитогенетичного методу та методу кометного електрофорезу (Comet assay), що дозволило коректно оцінити відносний рівень пошкоджуваності ДНК в ЛПК. Як параметри для визначення відносного рівня пошкодження ДНК використовували % ДНК у хвості "комети", Tail Moment (TM), а також відсоток атипичних "комет" з великою фрагментацією ДНК.

Запропоновані положення корисної моделі, що стосуються модифікації пухлино-індукованих пошкоджень геному в ЛПК, що взаємодіяли з пухлинними клітинами *in vitro* та *in vivo*, заявникам не відомо. Це підкреслює новизну та дослідницький характер моделі, яка спрямована на вивчення клітинних реакцій в умовах *in vitro* та може бути використана для фундаментальних досліджень у галузі медичної генетики та онкології.

Автори корисної моделі почали першими використовувати методичну комбінацію цитогенетичного аналізу та методу Comet assay для досліджування впливу атаксантину на онкологічно трансформовані та не трансформовані клітини.

Поставлена задача вирішується завдяки використанню комбінації цитогенетичних та молекулярно-

генетичних критеріїв (маркерів) для фіксації особливостей змін в соматичних клітинах.

Фіг. 1. Загальна схема запропонованої моделі.

Спосіб модифікації астаксантином пухлино-індукованих пошкоджень генома в соматичних клітинах реалізується у форматі досліджень *in vitro*. Для цього каротиноїд у концентрації 20 мкг/мл додають до культур ЛПК, які взаємодіяли з пухлинними клітинами, інкубують у живильному середовищі RPMI 1640 (Sigma, USA) без додавання ембріональної телячої сироватки та антибіотиків, у присутності фітогемаглютиніну (PHA, Gibco) протягом 48 годин. Після закінчення терміну інкубації культивовані ЛПК відбирають для молекулярно-генетичного аналізу пошкоджень ДНК.

Для проведення цитогенетичних досліджень після 48 годин культивування в культурі ЛПК додають колcemід, обробляють гіпотонічним розчином KCL, фіксують спиртово-оцтовою сумішшю, центрифугують, готують препарати метафазних хромосом, виконують цитогенетичний аналіз з визначенням частоти аберацій хромосом.

Приклад 1. Представлено результати роботи власних досліджень авторів (Жінка, 56 років). Дослідження *in vitro*. На фіг. 2. наведено порівняння індивідуальних цитогенетичних та молекулярно-генетичних показників без та за дії астаксантину в концентрації 20 мкг/мл на прояв пухлино-індукованого ефекту свідка в культурі лімфоцитів периферичної крові пацієнтів з діагнозом гліобластома. Показано, що частота аберацій хромосом дорівнювала  $5,0 \pm 1,2$  та  $2,0 \pm 1,0$ , відповідно ( $p > 0,05$ ). Аналіз індивідуальних показників, отриманих за допомогою методу кометного електрофорезу показав достовірне зниження значень по всіх параметрах досліджень ( $p < 0,05$ ). Індивідуальні значення ТМ у культурі ЛПК пацієнта з гліобластомою складав  $20,18 \pm 1,89$ , при додаванні астаксантину ТМ знижувався до  $9,7 \pm 1,09$ ; % ДНК у даного пацієнта знизився після додавання у культурі ЛПК астаксантину із  $25,46 \pm 1,55$  (під впливом пухлинно-індукованого ефекту свідка) до  $16,92 \pm 0,33$ . Аналізуючи атипові клітини з великою фрагментацією ДНК, було відмічено зниження відсотка клітин з  $5,37 \pm 1,57$  до  $2,03 \pm 1,2$ .

Приклад 2. Представлено результати роботи власних досліджень авторів (Чоловік, 46 р.). На фіг. 3 наведено порівняння індивідуальних цитогенетичних та молекулярно-генетичних показників за дії астаксантину в концентрації 20 мкг/мл на прояв пухлино-індукованого ефекту свідка в культурі лімфоцитів периферичної крові пацієнтів з діагнозом хронічна лімфоцитарна лейкемія (ХЛЛ). Дослідження *in vitro*. Показано, що при додаванні астаксантину у культуру ЛПК пацієнтів з верифікованим діагнозом ХЛЛ спостерігали зниження числових значень досліджуваних параметрів. У випадку 2, частота аберацій клітин у культурі ЛПК хворого з ХЛЛ становила  $4,39 \pm 1,92$ , при додаванні астаксантину  $2,0 \pm 1,4$ , що достовірно не відрізняється між собою, відповідно ( $p > 0,05$ ). Результати Comet assay показали, що в ЛПК хворого на ХЛЛ значення ТМ пацієнта складав  $18,85 \pm 2,53$ , що істотно відрізняється від ТМ при додаванні астаксантину, що становить  $9,89 \pm 1,02$  ( $p < 0,05$ ). Показник % ДНК у пацієнта складав  $25,17 \pm 1,59$ , а після введення астаксантину, дорівнював  $18,93 \pm 1,04$  ( $p < 0,05$ ). При аналізі атипових клітин з великою фрагментацією ДНК у культурі ЛПК було відмічено ( $p < 0,05$ ) достовірне зниження відсотка атипових клітин з великою фрагментацією ДНК при додаванні астаксантину, що становить  $18,0 \pm 1,3$  та  $9,6 \pm 1,02$ .

Приклад 3. Представлено результати роботи власних досліджень авторів (Жінка, 45 р.). На фіг. 4 наведено порівняння індивідуальних цитогенетичних та молекулярно-генетичних показників за дії астаксантину в концентрації 20 мкг/мл на прояв пухлино-індукованого ефекту свідка в культурі лімфоцитів периферичної крові здорових осіб з мутацією 5382insC в гені BRCA 1. Дослідження *in vitro*. Аналіз даних вказує на статистично недостовірне, зниження частоти аберацій хромосом після додавання астаксантину: фонові частота аберацій хромосом становила  $3,04 \pm 1,13$  %, а при додаванні астаксантину у культуру ЛПК частота аберацій хромосом знизилася до  $2,95 \pm 1,19$  % ( $p > 0,05$ ). Індивідуальні значення показника ТМ у даної особи складало  $30,51 \pm 2,64$ , при додаванні астаксантину спостерігали достовірне зниження ( $p < 0,05$ ) цього показника до  $10,47 \pm 0,96$ . % ДНК у здорової особи з мутацією 5382insC в гені BRCA1 становив  $32,98 \pm 1,63$ , а при додаванні астаксантину  $18,64 \pm 0,98$  ( $p < 0,05$ ). Частота атипових клітин з великою фрагментацією ДНК у культурі ЛПК особи з мутацією 5382insC в гені BRCA1 знизилася з  $13,33 \pm 2,77$  до  $10,00 \pm 0,52$  ( $p > 0,05$ ).

Підсумовуючи результати наших прикладів, можна зробити висновок про те, що вплив астаксантину призводить до модифікації геномної нестабільності в культурах нормальних клітин осіб з верифікованими клінічними онкологічними діагнозами, це вказує на пригнічення розвитку пухлино-індукованого ефекту свідка.

Джерела інформації:

1. Higuera-Ciapara I., Felix-Valenzuela L., Goycoolea F. M. Astaxantin: A Review of its Chemistry and Applications. Food Science and Nutrition. Vol. 46. 2006. P. 185-196. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>.

2. Kim, Y. J., Kim Y. A., Yokozawa T. Protection against oxidative stress, inflammation, and apoptosis of high-glucose-exposed proximal tubular epithelial cells by astaxanthin. Journal of agricultural and food chemistry. - 2009. - Vol. 57, № 19. - P. 8793-8797.

3. US 6,773,708 B1 Aug. 10, 2004 (10) P Use of xanthophylls, astaxanthin e. g., for treatment of

autoimmune diseases, chronic viral and intracellular bacterial infections Appl. /Ake Lignell, Per Bottiger. No.: 10/088,496 (22) PCT Filed: Oct. 5, 2000 (86) PCT No.: PCT/SE00/01923 S371 (c)(1), (2), (4) Date: Mar. 28, 2002

(87) PCT Pub. No.: WO01/24787 PCT Pub. Date: Apr. 12, 2001.

4. Shin J., Saini R. K., Oh Ja-W. Low Dose Astaxanthin Treatments Trigger the Hormesis of Human Astrogloma Cells by Up-Regulating the Cyclin-Dependent Kinase and Down-Regulated the Tumor Suppressor Protein P53. *Biomedicines*. 2020, Vol. 8. № 10.P.434. doi.org/10.3390/biomedicines8100434.

5. Shohei Tsuji, Shinsuke Nakamura, Takashi Maoka, Tetsuya Yamada, Takahiko Imai, Takuya Ohba, Tomohiro Yako, Masahiro Hayashi, Ken Endo, Masanao Saio, Hideaki Hara, Masamitsu Shimazawa Antitumour Effects of Astaxanthin and Adonixanthin on Glioblastoma. *Mar. Drugs*. - 2020. - Vol. 18, № 9.

P. 474. doi.org/10.3390/md18090474.

6. Wu, Q., Zhang X. S., Wang H. D., Zhang X., Yu Q., Li W., Zhou M. L., Wang. X. L. Astaxanthin activates nuclear factor erythroid-related factor 2 and the antioxidant responsive element (Nrf2-ARE) pathway in the brain after Subarachnoid hemorrhage in rats and attenuates early brain injury. *Marine drugs*. - 2014. - Vol. 12. - P. 6125-6141.

7. Kavitha, K., Kowshik J., Kishore T. K., Baba A. B., Nagini S. Astaxanthin inhibits NF-kappaB and Wnt/beta-catenin signaling pathways via inactivation of Erk/MAPK and PI3K/Akt to induce intrinsic apoptosis in a hamster model of oral cancer. *Biochimica et biophysica acta*. - 2013. - Vol. 1830. - P. 4433-4444.

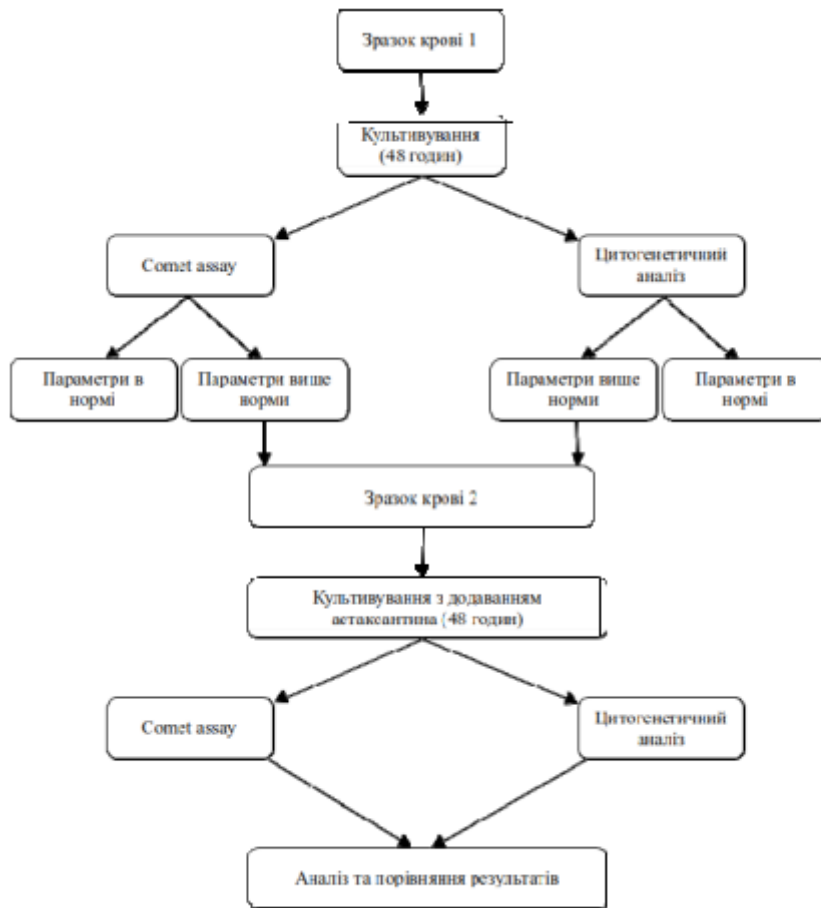
8. Stupp, R., Hegi M. E., Mason W. P., van den Bent M. J., Taphoorn M. J., Janzer R. C., Ludwin S. K., Allgeier A., Fisher B., Belanger K., Hau P., Brandes A. A., Gijtenbeek J., Marosi C., Vecht C. J., Mokhtari K., Wesseling P., Villa S., Eisenhauer E., Gorlia T., Weller M., Lacombe D., Cairncross J. G., Mirimanoff R. O., European R. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on Survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet. Oncology*. - 2009. - Vol. 10. - P. 459-466.

9. Shin J., Nile A., Saini R. K., Oh Jae-Wook Astaxanthin Sensitizes Low SOD2-Expressing GBM Cell Lines to TRAIL Treatment via Pathway Involving Mitochondrial Membrane Depolarization Antioxidants. - 2022. - Vol. 11, № 2. - P. 375. doi.org/10.3390/antiox11020375.

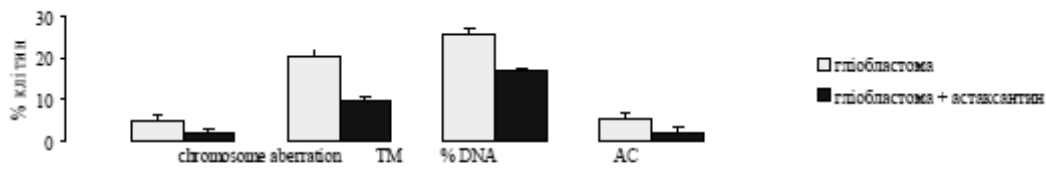
10. Alifieris, C., D. T. Trafalis. Glioblastoma multi forme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology & therapeutics*. 2015. Vol. 152. P. 63-82. doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.05.005.

11. Else, T., Kim A. C., Sabolch A., Raymond V. M., Kandathil A., Caoili E. M., Jolly S., Miller B. S., Giordano T. J., Hammer G. D. Adrenocortical carcinoma. *Endocrine reviews*. - 2014. - Vol. 35. - P. 282-326.

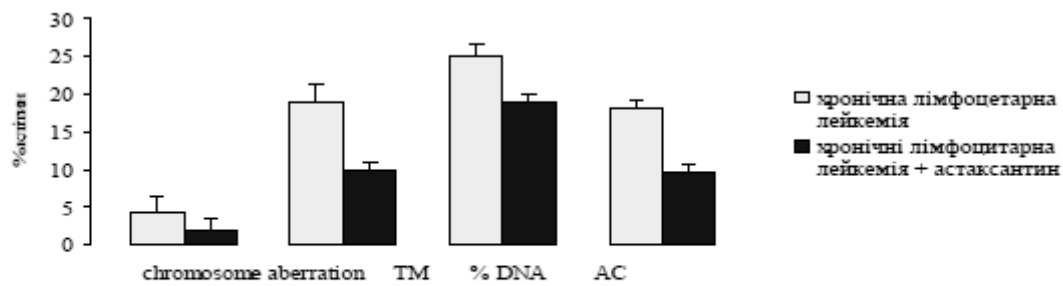
12. Oliveira R., Johansson B. Quantitative. DNA damage and repair measurement with the yeast Comet assay. *Methods Mol. Biol*. - 2012. - Vol. 920. - P. 101-109. doi: 10.1007/978-1-61779-998-3\_8.



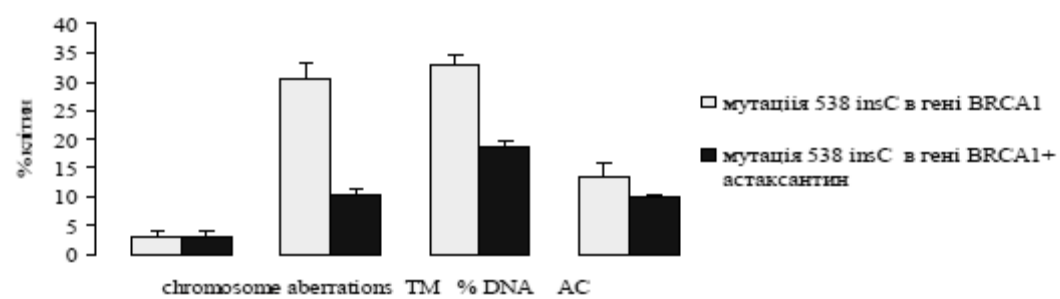
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4