

## РОЛЬ АНТИОКСИДАНТІВ У ІНДУКОВАНОМУ РЕНТГЕНІВСЬКИМ ОПРОМІНЕННЯМ МУТАГЕНЕЗИ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Н. Кімак-Голуб, М. Смик, Я. Черник

Львівський національний університет імені І.Франка,  
вул. Грушевського, 4, м. Львів 79005, Україна,  
e-mail: [herbarium@franko.lviv.ua](mailto:herbarium@franko.lviv.ua)

Досліджено вплив різних доз антиоксидантів  $\alpha$ -токоферолу і  $\beta$ -каротину на виживання та частоту виникнення домінантних летальних мутацій і видимих мутацій у X-хромосомі в *Drosophila melanogaster*; проаналізовано їхню роль в індукованому рентгенівським опроміненням мутагенезі дрозофіли. З'ясовано, що токсичний ефект у разі дії різних концентрацій  $\alpha$ -токоферолу й  $\beta$ -каротину, внесених у поживне середовище, виявлявся на різних стадіях раннього онтогенезу; методом домінантних летальних мутацій, визначено, що найчутливішою є стадія ембріогенезу. За умови внесення  $\alpha$ -токоферолу в середовище до опромінення, починаючи з F2 (F2-F5), частота виникнення мутантів по X-хромосомі на порядок зменшується порівняно з дією опромінення дозою 774 мКл/кг, що свідчить про пролонгований радіопротекторний ефект.

*Ключові слова:* дрозофіла, опромінення, антиоксиданти, мутагенез, ДЛМ.

Останніми роками помітно посилився інтерес до ролі антиоксидантів (АО) в організмі, оскільки вони руйнують вільні радикали, які, як відомо, призводять до розвитку багатьох захворювань і пришвидшують старіння. Одним із факторів, що посилюють вільнорадикальні реакції в живих організмах, є іонізуюче випромінювання. Радіобіологи з'ясували, що є два типи дії радіації на живі організми – прямий та опосередкований. Пряма дія на геном ґрунтується на безпосередній взаємодії йонізуючого опромінювання з молекулами нуклеїнових кислот. Опосередкована дія відбувається у три етапи: прямий вплив на молекули води, реакція первинних реакційноздатних продуктів радіолізу молекул води, реакції радикалів розчинених речовин, які призводять до утворення кінцевих стійких продуктів [3]. Унаслідок процесу, радіолізу виникають вільні радикали  $O_2^{\cdot}$ ,  $HO_2^{\cdot}$ ,  $OH^{\cdot}$ , які вступають у реакцію і хімічно змінюють нормальну структуру важливих для клітини макромолекул з утворенням стабільних органічних радикалів: ліпідних, перекиселіпідних, пуринових, піримідинових. Отже, йонізуюче опромінення призводить до нагромадження вільних радикалів і є дуже несприятливим фактором, що впливає

на метаболізм клітини. Дослідження останніх років засвідчили, що в разі хронічного низькодозового опромінення, а саме такого опромінення зазнає значна частина населення після чорнобильської катастрофи, а також з огляду на інтенсивне використання йонізуючого опромінення в господарській діяльності й медицині, ефективними є як природні, так і синтетичні антиоксиданти. Триває інтенсивний пошук таких природних радіопротекторів, які мали б антимутагенний і геропротекторний ефект, пролонговану захисну дію, однак не були б токсичними для організму. Ефективними природними АО є каротиноїди, зокрема,  $\beta$ -каротин (провітамін А), вітаміни Е і С, цистеїн, меланін, гепарин, порфірини, убіхінони, цистамін. Проте останнім часом щораз більше наголошують на потребі правильного підходу до підбирання доз АО, оскільки їхнє передозування може бути небезпечним.

Суттєвою в разі виявлення антиоксидантного захисту від йонізуючого опромінення є проблема вибору об'єкта дослідження. Хороший модельний еукаріотичний об'єкт у радіобіологічних експериментах і зручна тест-система генотоксикологічних досліджень – *Drosophila melanogaster*.

Нашою метою було дослідити вплив різних доз АО  $\alpha$ -токоферолу і  $\beta$ -каротину на виживання та частоту виникнення домінантних летальних мутацій (ДЛМ) і видимих мутацій у Х-хромосомі в *Drosophila melanogaster*; проаналізувати роль цих АО в індукованому рентгенівським опроміненням (РО) мутагенезі дрозофіли. В дослідженнях використано стабільну лабораторну лінію  $y^2w^{a4}$  і лінію дикого типу *Oregon*. Опромінювали триденних самців сумарною дозою 774 мКл/кг за потужності дози 2,58 мА/кг. АО вносили в поживне середовище для личинкового згодовування до опромінення із такого розрахунку: 1,0 мл 10%  $\alpha$ -токоферилацетату (Уманське ВАТ „Вітаміни”, Україна) на 100 мл середовища й 1,0 мг 10%  $\beta$ -каротину (F.Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) на 100 мл середовища. Тест на виявлення ДЛМ, який дає змогу реєструвати як генні мутації, так і хромосомні аберації, а також враховувати частоту ранньої (РЕЗ) і пізньої (ПЕЗ) ембріональної загибелі, виконували згідно з Ватті [2]. Видимі мутації в Х-хромосомі виявляли з використанням самок лінії *C(1)DX, yf*, які несуть зчеплені Х-хромосоми [9]. Для визначення дозозалежного впливу антиоксидантів на виживання імаго сполуки вносили в середовище у концентраціях:  $\alpha$ -токоферолу – 0,2, 1,0 та 5,0 мл на 100 мл середовища;  $\beta$ -каротину – 0,2, 1,0 і 5,0 мг на 100 мл середовища

У працях [4, 8] показано, що  $\alpha$ -токоферол дозою 1,0 мл на 100 мл середовища підвищував середню тривалість життя і приводив до підвищення активної життєздатності імаго короткоживучих ліній *bcnvg* та *see*, тобто виявляв геропротекторний ефект. У дослідженнях ми використали цю дозу як початкову під час тестування на ДЛМ. Як контроль використали інтактну лінію  $y^2w^{a4}$ , у якої частота виникнення домінантних леталей становила 3,97% і майже не відрізнялася від цього показника в лінії дикого типу *Oregon* (3,74%) (табл.1). Унаслідок впливу РО дозою 774 мКл/кг сумарна частота ДЛМ становила 13,75 %, що в декілька разів

перевищувало дані контролю. Частота РЕЗ – 12,8 % (див. табл.1).

Таблиця 1

Частота появи ДЛМ, індукованих РО й антиоксидантами в лінії  $y^2w^{a4}$ , %

Вид досліджу	Частота РЕЗ	Частота ПЕЗ	Частота ДЛМ	t, контр.	t, досл.
Oregon	3,02	0,72	3.74	0,85	----
Контроль	2.06	1.91	3.97	----	----
РО (774мКл/кг)	12.8	0.95	13.75	9.61	---
$\alpha$ –токоферол (1мл на 100 мл середовища)	10,01	1,21	11,22	13,44	10,13
$\alpha$ -ТФ + РО	19,58	3,77	23,37	27,03	
$\beta$ –каротин (1 мг на 100 мл середовища)	7,71	1,57	9,28	14,28	13,53
$\beta$ -карот.+ РО	9,63	6,94	16,57	24,8	

$p \geq 0.95$

У випадку використання  $\alpha$ -токоферолу частота появи ДЛМ зростала майже втричі порівняно з контролем (11,22%) теж, головню, завдяки збільшенню частоти РЕЗ (10,01%). У разі внесення  $\alpha$ -токоферолу в поживне середовище до опромінення паралельно отримані з використанням іншого антиоксиданта -  $\beta$ -каротину в співвідносній концентрації 1 мг на 100 мл середовища. Як і у випадку згодовування личинкам  $\alpha$ -токоферолу, частота виникнення ДЛМ зростала майже втричі й становила 9,28 %. Таке зростання зумовлене підвищенням показника РЕЗ (7,71%) (див. табл.1). З додаванням у середовище  $\beta$ -каротину до опромінення частота РЕЗ дещо знизилася порівняно з впливом радіації (9,63 %), проте показники ПЕЗ і сумарної частоти появи ДЛМ збільшилися і становили, відповідно, 6,94 і 16,57 %. Отже, отримані результати свідчать, що  $\alpha$ -токоферол і  $\beta$ -каротин у використаних концентраціях негативно впливали на ембріогенез дрозофіли, не виявляли радіопротекторного ефекту, а навпаки, значно посилювали дію РО.

у низці праць з'ясовано [5, 7, 10, 11], що мегадозы  $\beta$ -каротину є небезпечними – супроводжуються порушеннями фізіологічної рівноваги. Наприклад, надмірні домішки провітаміну А можуть призводити до підвищеного ризику раку легенів, особливо серед курців та робітників, пов'язаних з виробництвом азбесту [7]. Дослідження, виконані на щурах, засвідчили, що згодовування високих доз домішок  $\beta$ -каротину тваринам теж можуть бути пов'язані із передраковим станом [11]. Щодо  $\alpha$ -токоферолу, то в літературі такі дані не трапляються.

Далі ми дослідили вплив різних доз цих АО на виживання імаго лінії  $y^2w^{a4}$ . В експерименті використано вихідну концентрацію, а також у п'ять разів більшу і в п'яти разів меншу від неї (табл. 2). Як контроль використано кількість імаго, що вилетіли, інтактної лінії  $y^2w^{a4}$ .

Таблиця 2

Вживання у лінії  $u^2w^{a4}$  з різними концентраціями  $\alpha$ -токоферолу й  $\beta$ -каротину

Тип досліджу	Імаго, що вилетіли					
	n	%	n	%	n	%
Контроль	257	100				
$\alpha$ -токоферол	0,2 мл/100 мл		1 мл/100 мл		5 мл/100 мл	
	211	82,5	62	24,1	-----	
$\beta$ -каротин	0,2 мг/100 мл		1 мг/100 мл		5 мг/100 мл	
	149	58	150	58,4	90	3,9

Як видно з наведених результатів,  $\alpha$ -токоферол концентрацією 1 мл на 100 мл зумовлював високий токсичний ефект у лінії  $u^2w^{a4}$  (виліт імаго становив лише 24,1% порівняно з контролем). Такий низький відсоток виживання зумовлений, очевидно, високою частотою загибелі саме на ембріональній стадії розвитку. Концентрація  $\alpha$ -токоферолу 0,2 мл на 100 мл середовища не сильно впливала на виживання порівняно з контролем (82,5 %), а збільшення концентрації до 5,0 мл на 100 мл середовища призводило до 100 %-ї летальності – вильоту імаго не було, розвиток повністю припинявся на стадії лялечки. Щодо дії  $\beta$ -каротину, то з наведених у табл. 2 даних бачимо, що найвищий відсоток виживання (73,9%) порівняно з контролем простежувався на максимальній із використаних концентрацій – 5,0 мг на 100 мл середовища. Меншими концентраціями (0,2 мг на 100 мл і 1,0 мг на 100 мл середовища) цей АО виявляв однаковий ефект – показники виживання практично не відрізнялися між собою (див. табл. 2).

У тесті на ДЛІМ досліджено вплив  $\alpha$ -токоферолу концентрацією 0,2 мл на 100 мл середовища, яка зумовлювала найвищий відсоток виживання (табл. 3). Як видно з даних табл. 3, сумарна частота ДЛІМ була навіть дещо нижчою порівняно з контролем (2,35 %). У цьому разі знизилася показники як ранньої (1,14 %), так і пізньої (1,21 %) ембріональної загибелі. Аналогічні результати отримані й за умов використання  $\beta$ -каротину концентрацією 0,2 мг на 100 мл: частота РЕЗ дорівнювала 1,03 %, ПЕЗ – 0,96 %, а показник сумарної частоти появи ДЛІМ становив 1,99 %. Отже, отримані результати свідчать про сприятливий вплив вітаміну С і провітаміну А низькими концентраціями на ембріогенез дрозофіли. Токсична дія цих антиоксидантів виявляється на пізніших етапах індивідуального розвитку (стадіях личинки й лялечки).

Таблиця 3

Частота появи ДЛМ (в %) у лінії  $y^2w^{a4}$ , індукованих  $\alpha$ -токоферолом і  $\beta$ -каротином

Тип досліджу	Частота РЕЗ	Частота ПЕЗ	Частота ДЛМ	t, контр.
Контроль	2,06	1,91	3,97	
$\alpha$ -токоферол (0,2 мл на 100 мл середовища)	1.14	1.21	2,35	5, 61
$\beta$ -каротин (0,2 мг на 100 мл середовища)	1.03	0,96	1,99	6,76

Таблиця 4

Частота появи мутантів у лінії  $y^2w^{a4}$ , індукованих комплексною дією РО (774 мКл/кг) і  $\alpha$ -токоферолу (1 мл на 100 мл середовища)

Тип досліджу	Кількість проанал. самців	Кількість отриман. мутантів	Частота появи мутантів	t, коеф. Стьюдента контр.
Контроль ( $y^2w^{a4}$ )	11222	1	$8,9 \times 10^{-5}$	
$\alpha$ -токоферол (1 мл на 100 мл середовища)				
F <sub>1</sub>	6162	---		
F <sub>2</sub>	3866	---		
F <sub>3</sub>	4704	---		
F <sub>4</sub>	4944	---		
РО + $\alpha$ -ТФ				
F1	3055	7	$3.3 \times 10^{-3}$	2.3
F2	3410	1	$5.9 \times 10^{-4}$	0.85
F3	3601	2	$5.6 \times 10^{-4}$	1.16
F4	3313	---	---	---
F5	3248	1	$3.1 \times 10^{-4}$	0.87
РО (774 мКл/кг)				
F <sub>1</sub>	2447	4	$1.6 \times 10^{-3}$	
F <sub>2</sub>	2295	5	$2.1 \times 10^{-3}$	

$p \geq 0,95$

Методом індивідуальних схрещувань із використанням самок лінії  $C(1)DX, yf$ , які несуть зчеплені X-хромосоми, досліджено дію  $\alpha$ -токоферолу на частоту появи видимих мутантів по X-хромосомі в лінії  $y^2w^{a4}$ . Серед чотирьох проаналізованих поколінь-потомків мутантів виявлено не було. В попередніх наших працях [1, 6]

проаналізовано дію РО (774 мКл/кг). З'ясовано, що опромінення зумовлювало високий рівень мутування локусів X-хромосоми ( $1,6-2,1 \times 10^{-3}$ ) у низці поколінь (табл. 4). З метою дослідження дії  $\alpha$ -токоферолу в радіоіндукованому мутагенезі дрозофіли цей антиоксидант концентрацією 1,0 мл на 100 мл середовища згодували личинкам до опромінення. В  $F_1$  виявлено високий показник рівня мутування ( $3,3 \times 10^{-3}$ ). Однак, починаючи з  $F_2$ , частота появи мутантів на порядок знизилася ( $3,1-5,9 \times 10^{-4}$ ), що свідчить про пролонгований радіопротекторний ефект цього антиоксиданту, тоді як у разі дії радіації показник мутування в  $F_2$  був високим і навіть незначно перевищував ці дані  $F_1$  (див. табл. 4). Як бачимо, отримані результати засвідчують, що  $\alpha$ -токоферол виявляє антимутагенний ефект, стабілізуючи геном дрозофіли.

Отже,  $\alpha$ -токоферол і  $\beta$ -каротин у певних концентраціях спричиняють токсичний ефект, який виявляється на різних стадіях онтогенезу. Найчутливішою є стадія раннього ембріогенезу, що показано з використанням методу ДЛМ. Концентрацією 1,0 мл на 100 мл середовища  $\alpha$ -токоферол не спричиняє появи мутантів по X-хромосомі й знижує протягом декількох поколінь мутабільність локусів X-хромосоми, зумовлену впливом РО.

1. Бобак Я.П., Шоханов С.О., Кімак Н.Я., Черник Я.І. Індукована рентгенівським опроміненням генетична нестабільність по локусах X-хромосоми у лабораторних ліній *Drosophila melanogaster* // Актуальні проблеми медицини, біології, ветеринарії і сільського господарства. 1996. Вип. 2. С. 78–84.
2. Ватти К.В., Джанаридзе Л.А. Сравнительное изучение мутабельности особей разных полов: РСПЛ и ДЛМ у *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1980. № 8. С. 1389–1395.
3. Войцицький В. Радіобіологія. К., 1990.
4. Черник Я.І. Алкоголь-, малат-, лактатдегідрогеназы,  $\alpha$ -амилаза, аспартат- и аланинаминотрансферазы при старении *Drosophila melanogaster* // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Киев, 1985. 26 С.
5. Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В. Биодоступность каротиноидов // Вопр. мед. химии. 1999. № 2. С. 30–37.
6. Шоханов С.О., Щербата Г.Р., Черник Я.І. Геномная изменчивость лабораторных линий и природных популяций *Drosophila melanogaster* при действии рентгеновского излучения // Генетика. 1997. Т. 33. № 1. С. 25–30.
7. Albanes D., Taylor P.R., Edwards B.K. et. at. Alpha-tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study // J. of the National Cancer Institute. 1996. Vol. 88. N 21. P.1560–1580.
8. Belokon E.M., Chernik Ya.I., Bodnar L.S. Investigations of biochemical genetics of *Drosophila melanogaster*// Arh.Biol.Nauka. Beograd. 1991. Vol.43. N1–2. P.1–14.

9. *Lindsley D., Zimm G.* The genome of *Drosophila melanogaster*. N.Y.: Academic Press, Inc. 1992.
10. *Silvio de Flora, Maria Bagnasco, Harri Vainio.* Modulation of genotoxic and related effects by carotenoids and vitamin A in experimental models: mechanistic issues // *Mutagenesis*. 1999. Vol. 14. N 2. P. 153–172.
11. *Xiang-Dong Wong.* Too much beta-carotene raises cancer risk // *Journal of the National cancer Institute*. 1999. Vol. 115. N 11. P.1204–1220.

## THE ROLE OF ANTIOXIDANTS IN X-RAYS INDUCED MUTAGENESIS IN DROSOPHILA MELANOGASTER

**N.Kimak-Holub, M.Smyk, Ya.Chernyk**

*Ivan Franko National University of L'viv,  
Hrushevskoho st.4, L'viv 79005, Ukraine,  
e-mail: biolog@franko.lviv.ua*

The influence of different doses of antioxidants (AO) –  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene-on survival and the frequency of dominant lethal mutations (DLM) appearance and visible mutations in X-chromosome of *D.melanogaster* has been investigated; the role of these AO in X-rays induced mutagenesis has been analyzed. It has been shown that toxic effect of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in certain concentrations reveals on different stages of early ontogeny. By the method of DLM it has been testified that the embryogeny stage is the most sensitive to the AO influence. When  $\alpha$ -tocopherol has been added to the fly food before irradiation we observed decreasing of frequency of X-chromosome mutants appearance since  $F_2$  comparing to the frequency obtained after 3000 R action. This was an evidence that this antioxidant ( $\alpha$ -tocopherol) had prolonged radioprotective effect.

*Keywords:* *Drosophila*, irradiation, antioxidants, mutagenesis, DLM.

Стаття надійшла до редколегії 02.07.2001

Прийнята до друку 09.07.2001