

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ И ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕБИОТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ

Л. А. Сафронова¹
С. И. Войчук¹
Б. Г. Сухов²
В. С. Подгорский¹

¹Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев
²Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского
СО РАН, РФ

E-mail: safronova_larisa@ukr.net

Получено 04.07.2013

В связи с неблагоприятной экологией и широким распространением заболеваний желудочно-кишечного тракта людей и животных наблюдается повышенный интерес к пробиотическим препаратам (пробиотики, пребиотики и синбиотики), которые показали свою эффективность и безопасность при профилактическом и лечебном приеме. На модели клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и культуре рака гортани НЕр-2 проведена оценка цитотоксических и ДНК-повреждающих свойств ряда полисахаридов (арабиногалактан, нанобиокомпозит арабиногалактана с флавоноидами, каррагинан, галактоманнан и их гидролизованные производные) — новых перспективных пребиотических субстанций. Цитотоксический потенциал веществ определяли по результатам МТТ-теста, ДНК-повреждающее действие — по морфолого-структурным особенностям ядер клеток. Изучено синергическое цито- и ДНК-повреждающее действие указанных полисахаридов с известными индукторами клеточного химического повреждения (пероксид водорода, уксусная кислота, нитрозометилмочевина). В результате проведенных исследований установлено отсутствие цито- и ДНК-повреждающих свойств у этих веществ. Оценка комплексного воздействия показала, что они в различной степени способны усиливать действие пероксида водорода, уксусной кислоты и нитрозометилмочевины. Природа выявленных эффектов остается невыясненной, однако можно предположить, что исследованные пребиотические субстанции могут быть использованы для усиления действия некоторых химических соединений и перспективны для применения в комплексных биомедицинских препаратах различного спектра действия.

Ключевые слова: цито- и ДНК-повреждающее действие, арабиногалактан, каррагинан, галактоманнан, *Saccharomyces cerevisiae*, клетки рака гортани НЕр-2.

В последнее время в мире наблюдается возрастание интереса к пробиотическим препаратам, к которым относятся пробиотики, пребиотики и синбиотики. Это связано с неблагоприятной экологией и широким распространением заболеваний желудочно-кишечного тракта (дисбактериоз, диарея, воспаление кишечника и инфекции *Helicobacter pylori*), при которых показана эффективность и безопасность использования этих препаратов [1]. Из всех биотопов организма микробиоценоз желудочно-кишечного тракта является наиболее сложным по составу и функционально значимым для поддержания биохимического, метаболического и иммунологического равновесия организма хозяина. Кишечник — иммунологически важный орган, в слизистой оболочке которого локализовано около 80% всех иммунокомпетентных клеток организма (Т-, В-, плазматические клетки и лимфоциты) [2].

Вещества немикробного происхождения, которые селективно стимулируют рост и биологическую активность полезной кишечной микрофлоры, называют пребиотиками. Это, как правило, углеводы, которые не перевариваются ферментами человека и, соответственно, не усваиваются в верхних отделах желудочно-кишечного тракта. Пробиотики — живые микроорганизмы, которые при использовании в адекватных количествах оказывают благоприятное воздействие на здоровье организма-хозяина [2]. Синбиотики — препараты, полученные в результате рациональной комбинации пробиотиков и пребиотиков. Оптимально подобранные компоненты комплексного препарата позволяют получить более эффективное лечебно-профилактическое средство, которое будет сочетать в себе свойства пробиотика и пребиотика [3].

Установлено, что применение пробиотиков и пребиотиков может приводить к уменьшению частоты кишечных заболеваний, восстановлению состава кишечной микрофлоры, коррекции метаболизма липидов, стимуляции иммунной системы и детоксицирующей способности печени, снижению частоты возникновения онкологических заболеваний [4, 5].

Однако, несмотря на предлагаемый арсенал медицинских и ветеринарных пробиотических препаратов, проблема создания новых современных средств, а также выяснения механизмов их взаимодействия с макроорганизмом остается актуальной. Многие из рекомендованных препаратов малоэффективны и не обеспечивают колонизацию слизистой оболочки кишечника нормальными симбионтами, а некоторые из благоприятных эффектов требуют научного подтверждения.

Целью работы было изучение цито- и ДНК-повреждающего действия новых пребиотических субстанций — галактозосодержащих β -полисахаридов — арабиногалактана, арабиногалактана с флавоноидами, каррагинана, галактоманнана и их гидролизированных форм.

Материалы и методы

β -Галактозосодержащие полисахариды (арабиногалактан, нанобиоконъюгаты флавоноидов и арабиногалактана, галактоманнан, каррагинан, а также гидролизированные формы галактоманнана и каррагинана) предоставлены сотрудниками Иркутского института химии им. А. Е. Фаворского СО РАН.

Для исследования использовали 1%-е водные растворы пребиотических субстанций, из которых готовили двукратные разведения до минимальной исследованной концентрации $5 \cdot 10^{-3}\%$. Максимальную исследуемую концентрацию опытных полисахаридов подбирали согласно рекомендациям Департамента здравоохранения и социальных служб США [6].

В исследованиях использованы дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, штамм Y-517, из Украинской коллекции микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины (Киев, Украина) и культура клеток рака гортани НЕР-2. Дрожжи выращивали на агаризованной среде YEPD и смывали фосфатным буфером (pH 7,2). Клетки НЕР-2 культивировали на среде MEM в модификации Дульбекко (Dulbecco's modified Eagle's medium — DMEM, Sigma, США) в анаэробных условиях при 37 °С. Суспензию

клеток получали после обработки трипсином и ресуспендировали в фосфатном буфере (pH 7,2). Использовали суспензию в концентрации 10^5 кл/мл.

МТТ-тест проводили согласно [7]. Активность энзимов определяли через 2 ч по показателю оптической плотности при 570 нм. Концентрация МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) (Sigma-Aldrich, Германия) составляла 0,5% для дрожжей и 0,25% для клеток НЕР-2.

Цитотоксический индекс ($I_{Ц}$) определяли по результатам МТТ-теста как соотношение показателя оптической плотности в контрольном образце ($ОП_{\text{контроль}}$) и показателя оптической плотности в образце с исследуемым веществом ($ОП_{\text{опыт}}$):

$$I_{Ц} = ОП_{\text{контроль}} / ОП_{\text{опыт}}.$$

Для исследования ДНК-повреждающего действия полисахаридов дрожжевые клетки и пребиотические субстанции в известных концентрациях тщательно перемешивали и оставляли на 2 ч при 37 °С. Окраску клеток акридиновым оранжевым и анализ с помощью люминесцентной микроскопии проводили согласно [8].

Индекс ДНК-повреждений ($ДНК_{ИП}$, %) определяли по результатам теста как соотношение процента клеток с измененными ядрами в опытной группе с исследуемым веществом ($K_{\text{опыт}}$) к таковому с измененными ядрами в контроле ($K_{\text{контроль}}$):

$$ДНК_{ИП} = K_{\text{опыт}} / K_{\text{контроль}}.$$

Оценку комплексного действия углеводов и факторов химического повреждения осуществляли с помощью пероксида водорода (индуктор апоптоза и ПОЛ), уксусной кислоты (аналогичное действие) и нитрозометилмочевины (мутаген). В случае клеток дрожжей концентрация пероксида водорода составляла 0,3 мМ, уксусной кислоты — 0,15 М, нитрозометилмочевины — 0,01 мМ. В случае клеток НЕР-2 концентрация пероксида водорода равнялась 0,2 мкМ, уксусной кислоты — 0,15 мМ и N-нитрозо-N-метилмочевины — 1 мкМ (Isopac, Sigma-Aldrich, США). Оценивали как обособленное действие факторов клеточного химического повреждения на показатели цито- и ДНК-повреждающего действия в пересчете на соответствующие индексы, так и эффективность последовательного действия исследованных углеводов и факторов химического повреждения. В последнем случае отдельно пребиотическое вещество и отдельно фактор химического повреждения вносили в среду

с клетками и выдерживали в течение 30 мин при оптимальной температуре (28 °C для дрожжей и 37 °C для клеток НЕР-2), после чего пребиотик отмывали центрифугированием и заменяли фактором химического повреждения, а фактор химического повреждения — исследуемым веществом на следующие 30 мин. Затем клетки повторно отмывали и использовали для определения цито- и ДНК-повреждающих эффектов действия факторов химического повреждения.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica версия 6.0 (StatSoft. Ink., 2002). Для проверки гипотезы на нормальность распределения полученных данных использовали критерий Шапиро-Уилки (*W*-тест). Различия между полученными показателями оценивали по критерию Стьюдента (*t*-тест) для данных, отвечающих критерию нормальности распределения, а в других случаях применяли непараметрический критерий знаков (Sign test). Исследования проводили минимум в трех параллелях.

Результаты и обсуждение

Применение новых биологически активных веществ (БАВ) в медицине, ветеринарии, растениеводстве, пищевой промышленности требует тщательной проверки их влияния на процессы жизнеобеспечения клеток. Основные необходимые тесты при этом — оценка их цито- и ДНК-повреждающих свойств. Цитотоксичность предполагает способность исследуемого вещества оказывать ингибирующее влияние на процессы клеточного деления и ферментативную активность. ДНК-повреждающее действие указывает на непосредственное или косвенное влияние исследуемого вещества на генетический аппарат клетки. Оценку этих показателей проводили на модельном микроорганизме, дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, которые являются общепризнанной модельной системой для оценки цито- и ДНК-повреждающего действия новых препаратов медико-биологического назначения на эукариотические организмы, в том числе и человека [9, 10]. Дополнительные тесты были проведены на модели культуры эпителиальных клеток рака гортани НЕР-2, которые схожи с раковыми клетками HeLa и широко используются для различных диагностических целей [11].

ДНК-повреждающее действие пребиотических субстанций

Многочисленные методы оценки ДНК-повреждающего действия позволяют оце-

нить различные аспекты структуры и функций ДНК, вовлеченные в данный процесс, такие как индукция мутаций, изменения в количестве (полиплоидия или анеуплоидия) и структуре хромосом (разрывы, делеции, перестройки). В исследовании на модели клеток дрожжей мы оценивали способность полисахаридов и их производных (арабиногалактан, нанобиокомпозит арабиногалактана с флавоноидами, каррагинан, галактоманнан и их гидролизованные производные) влиять на общее состояние ядерного аппарата клетки. Критериями оценки служили следующие показатели: цвет и форма, наличие фрагментации и плотность ядра.

Окраска акридиновым оранжевым позволила выявить, что ядра клеток дрожжей в норме имеют округлую форму, окрашены в зеленый цвет, имеют достаточно четкую пространственную организацию (рис. 1, А, В). Действие нитрозометилмочевины, известного ДНК-повреждающего агента, на *Saccharomyces cerevisiae* в концентрации 0,01 мМ привело к появлению клеток с ядрами, не имеющими четких границ (аморфные ядра), с множеством ядерных фрагментов, а также с уплотненными ядрами, в которых, вероятно, произошла конденсация хроматина (рис. 1, Г). В присутствии исследованных пребиотических субстанций в концентрациях 0,005–1,0% ядра клеток дрожжей не отличались от таковых в контрольных образцах и имели округлую форму с равномерным окрасом, были плотными, без проявлений фрагментации (рис. 1, В). В контрольных образцах было выявлено 5–10% клеток с поврежденными ядрами, в то же время количество клеток с поврежденными ядрами в образцах, обработанных полисахаридами, достоверно уменьшалось, что приводило к снижению ДНК-повреждающего индекса на 30–40% ($P \leq 0,02$). Такой же эффект наблюдали и на клетках НЕР-2 (рис. 2).

Дополнительно оценили количество клеток, окрашенных в красный цвет, увеличение которого может свидетельствовать о стимуляции апоптотических или некротических процессов, как результат цито- и ДНК-повреждающего действия исследуемых субстанций. В норме в контрольных образцах около 5% клеток имеют красную окраску. Действие пребиотических субстанций на дрожжи не приводило к увеличению количества окрашенных в красный цвет клеток, что дополнительно свидетельствует об отсутствии у этих веществ цито- и ДНК-повреждающих эффектов.

Таким образом, арабиногалактан, нано-биокомпозит арабиногалактана с флавоноидами, каррагинан, галактоманнан и их производные в диапазоне концентраций 0,005–1,0% не оказывают ДНК-повреждающего действия на клетки дрожжей и НЕР-2.

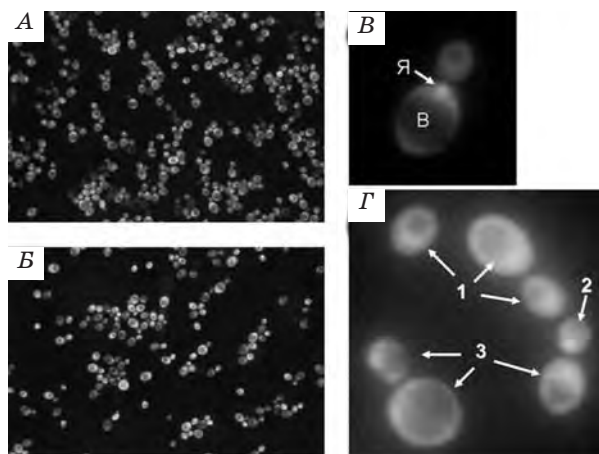


Рис. 1. Окраска клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* акридиновым оранжевым: (А и В) в норме (контроль); в присутствии арабиногалактана (В) и химического мутагена нитрозометилмочевины (Г). Обозначения на фото: Я — ядро; В — вакуоль; 1 — клетки с аморфным ядром без четких границ; 2 — клетка с уплотненным ядром; 3 — клетки с фрагментированным ядром.

Увеличение: А и В — $\times 400$, В и Г — $\times 1\,000$

Комплексное ДНК-повреждающее действие пребиотических субстанций и индукторов клеточного химического повреждения

ДНК-повреждающие вещества — потенциальные мутагены или канцерогены, которые могут привести к генетическим мутациям в клетке и развитию опухолей. В ряде случаев ДНК-повреждающие вещества используют для лечения онкологических заболеваний. В нашем исследовании мы изучали действие субстанций на эффекты, вызванные влиянием нитрозометилмочевины (НММ). НММ является цитостатическим алкилирующим средством и обладает противоопухолевым эффектом по отношению к ряду злокачественных опухолей (лимфогранулематозу, раку легких, меланоме, злокачественным лимфомам) [12].

Было показано, что в присутствии НММ количество клеток с дефектными ядрами в образцах, обработанных исследуемыми веществами, возрастало у клеток дрожжей максимум в 1,5 раза, а в культуре НЕР-2 — почти в 2 раза (рис. 2), индекс ДНК-повреждающего действия увеличивался с 0,6–0,7 до 1,0–1,4 у дрожжей ($P \leq 0,02$) и до 1,5–2,4 у НЕР-2 ($P \leq 0,04$). При этом действие комплекса арабиногалактана с флавоноидами, а также гидролизированных форм каррагинана и галактоманнана в случае клеток НЕР-2 отличалось от действия негидролизированных форм полисахаридов. В первом случае гидролизированные формы усиливали эффекты НММ, а во втором — отмечено как усиление, так и ослабление действия НММ, по сравне-

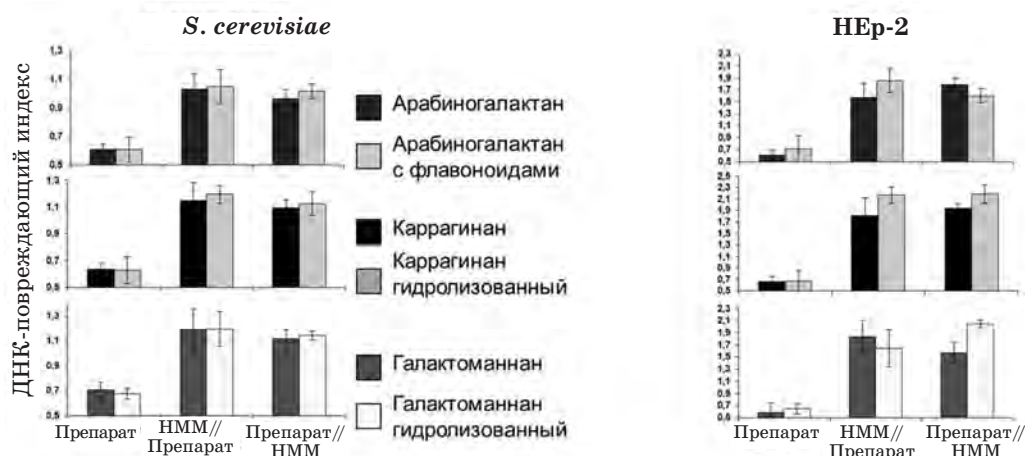


Рис. 2. Влияние нитрозометилмочевины на ДНК-повреждающий индекс на модели клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и рака гортани НЕР-2:

показано действие отдельно исследуемого полисахарида (препарат), а также результат последовательного действия нитрозометилмочевины, затем исследуемого вещества (НММ // препарат), и наоборот, — исследуемого вещества, а затем — нитрозометилмочевины (препарат // НММ). ДНК-повреждающий индекс в вариантах опыта, в которых оценивали комплексное воздействие полисахарида с фактором химического повреждения, достоверно ($P \leq 0,05$) отличается от действия только одного полисахарида

нию с негидролизрованными формами. Для клеток дрожжей такого отличия между эффективностью действия различных форм пребиотиков не отмечено.

Цитотоксическое действие пребиотических субстанций

Результаты МТТ-теста показали, что исследованные вещества не оказывают цитотоксического действия на клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-517 (рис. 3) и рака гортани НЕр-2 (рис. 4) в диапазоне концентраций 0,005–1,0%, поскольку не снижают активность дегидрогеназ низших и высших эукариотов. Средние значения активности энзимов под действием исследованных соединений не были ниже контрольных показателей ($0,20 \pm 0,02$ — для клеток дрожжей и $0,39 \pm 0,02$ — для НЕр-2).

Некоторые из исследованных пребиотиков обладали способностью усиливать энзиматическую активность у исследованных модельных организмов. Так, на клетках дрожжей водные растворы нанокомпозита арабиногалактана с флавоноидами, а также галактоманнана и его гидролизованной формы приводили к росту активности энзимов по данным МТТ-теста, что свидетельствует о способности этих полисахаридов

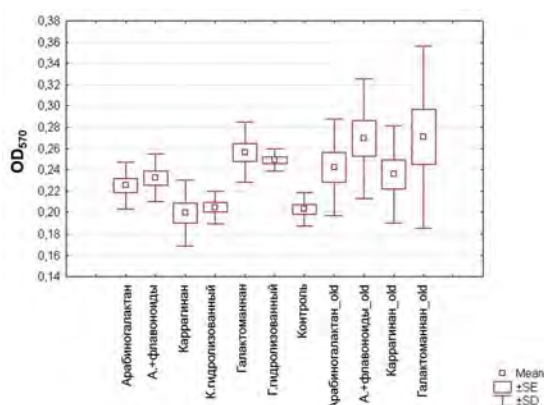


Рис. 3. Описательная статистика влияния водных растворов арабиногалактана и комплекса арабиногалактана с флавоноидами (А.+флавоноиды), каррагинана и его гидролизованной формы (К. гидролизанный), галактоманнана и его гидролизованной формы (Г. гидролизанный) в диапазоне концентраций 0,005%–1% на активность энзимов дегидрогеназного комплекса дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-517.

На графике представлены средние значения (Mean), стандартная ошибка (SE) и стандартное отклонение (SD) для каждого из исследованных соединений. Полисахариды, которые хранили в течение 7 недель в виде водных растворов (1%) при +4 °С, отмечены дополнительно «old». OD₅₇₀ — оптическая плотность при длине волны 570 нм

стимулировать метаболические процессы [13]. Наиболее выраженное стимулирующее действие выявлено у галактоманнана, который увеличивал активность энзимов на 25% ($P \leq 0,02$) по сравнению с контролем во всем диапазоне исследованных концентраций. Кроме того, галактоманнан оказался единственным полисахаридом, который по данным МТТ-теста, хотя и незначительно (в среднем на 5%, $P \leq 0,03$), увеличивал метаболические процессы в клетках НЕр-2.

Таким образом, анализ полученных данных показал, что арабиногалактан, нанобиокомпозит арабиногалактана с флавоноидами, каррагинан, галактоманнан и их производные не проявляют цитотоксического действия и способны оказывать стимулирующее действие на метаболические процессы в клетках дрожжей и клетках НЕр-2.

Комплексное цитотоксическое действие пребиотических субстанций и индукторов клеточного химического повреждения

Для исследования комплексного цитотоксического действия были выбраны индукторы клеточного химического повреждения, активирующие ПОЛ (пероксид водорода), апоптоз (уксусная кислота) и повреждения генома (нитрозометилмочевина).

ПОЛ является причиной или важной составляющей многих заболеваний, в част-

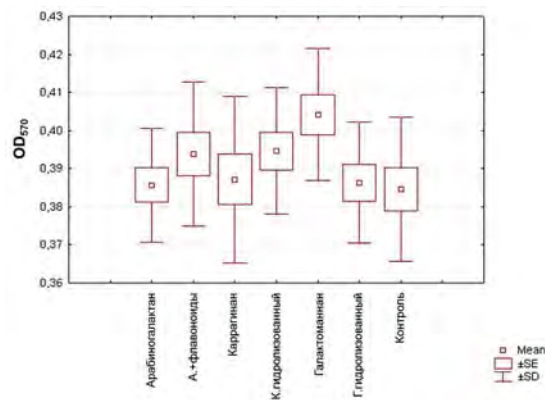


Рис. 4. Описательная статистика влияния водных растворов арабиногалактана и комплекса арабиногалактана с флавоноидами (А.+флавоноиды), каррагинана и его гидролизованной формы (К. гидролизанный), галактоманнана и его гидролизованной формы (Г. гидролизанный) в диапазоне концентраций 0,005%–0,5% на активность энзимов дегидрогеназного комплекса клеток НЕр-2.

Представлены средние значения (Mean), стандартная ошибка (SE) и стандартное отклонение (SD) для каждой из исследованных проб. OD₅₇₀ — оптическая плотность при длине волны 570 нм

ности атеросклероза, гипертензии, болезни Альцгеймера, диабета, а также одной из составляющих процесса старения. Эффект оксидативного химического повреждения зависит от силы его выраженности. Клетки способны вернуться в исходное состояние при небольших нарушениях клеточных процессов. ПОЛ, так же как и кислотное повреждение, способны инициировать процессы апоптоза [14]. Апоптоз — процесс запрограммированной гибели клеток, который регулируется самой клеткой. Одной из основных функций апоптоза является уничтожение дефектных (поврежденных, мутантных, инфицированных) клеток. Процесс апоптоза необходим для физиологического регулирования количества клеток организма, для формирования лимфоцитов, цитотоксического действия Т-лимфоцитов киллеров и др. [14].

На примере пероксида водорода было показано, что исследованные полисахариды не способны подавлять деструктивные процессы, вызванные действием индукторов окислительного химического повреждения (рис. 5). В случае клеток дрожжей каррагинан, галактоманнан и их гидролизанные производные незначительно усиливали действие пероксидных соединений на клетку и тем самым увеличивали цитотоксический индекс на 10–25%. На клетках рака гортани только каррагинан и его гидролизованная форма увеличивали цитотоксический индекс в среднем на 10%.

Оценка влияния тестируемых растворов на кислотное повреждение показала, что арабиногалактан и его нанокомпозит с фла-

воноидами, а также галактоманнан и его гидролизованная форма оказывают лишь незначительный модулирующий эффект на данный тип химического повреждения, и в среднем показатели мало отличались от контроля (рис. 6).

Каррагинан и его гидролизованная форма были способны усиливать внутриклеточные процессы, вызванные кислотным повреждением, на 10–50% как у дрожжей, так и у клеток НЕр-2. При этом действие каррагинана и его гидролизованной формы обладало противоположным эффектом для дрожжей и клеток НЕр-2. Так, в первом случае гидролизованная форма каррагинана усиливала эффект уксусной кислоты, а во втором, наоборот, ослабляла его (рис. 6).

Таким образом, в работе были оценены цито- и ДНК-повреждающие свойства новых пребиотических субстанций — β -галактозо-содержащих полисахаридов и их производных: арабиногалактана, нанобиокомпозита арабиногалактана с флавоноидами, каррагинана, галактоманнана и их гидролизанных производных. Исследованные вещества не проявляли цитотоксического и ДНК-повреждающего действия на модельные организмы — дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и эпителиальные клетки рака гортани НЕр-2, однако обладали способностью стимулировать ферментативные процессы у дрожжей и эпителиальных клеток. Эти полисахариды и их производные были способны усиливать химическое повреждение, вызванное действием на клетки пероксида водорода и уксусной кислоты. Природа

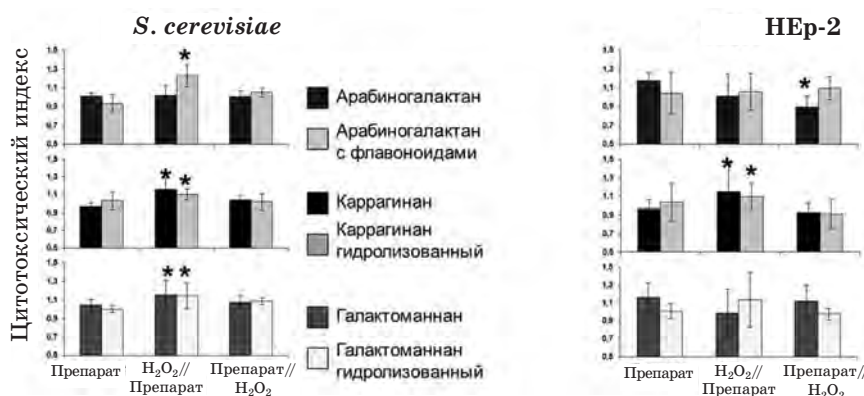


Рис. 5. Влияние пероксида водорода на цитотоксический индекс на модели клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и рака гортани НЕр-2.

Показано действие отдельно исследуемого полисахарида (Препарат), а также последовательного действия пероксида водорода, затем исследуемого вещества (H₂O₂ // Препарат), и наоборот, — исследуемого вещества, а затем — пероксида водорода (Препарат // H₂O₂). Символом «*» обозначены варианты опыта, в которых исследуемый показатель при комплексном воздействии полисахарида с фактором химического повреждения достоверно ($P \leq 0,05$) отличается от действия только одного полисахарида

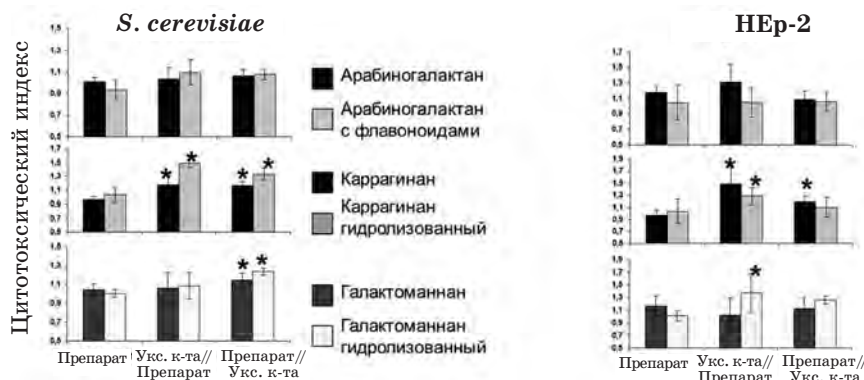


Рис. 6. Влияние уксусной кислоты на цитотоксический индекс на модели клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и рака гортани HEP-2.

Показано действие отдельно исследуемого полисахарида (Препарат), а также последовательного действия уксусной кислоты, затем исследуемого вещества (Укс. к-та // Препарат), и наоборот, — исследуемого вещества, а затем — уксусной кислоты (Препарат // Укс. к-та). Символом «*» обозначены варианты опыта, в которых исследуемый показатель при комплексном воздействии полисахарида с фактором химического повреждения достоверно ($P \leq 0,05$) отличается от действия только одного полисахарида

выявленных эффектов остается невыясненной, однако можно предположить, что исследованные пребиотические субстанции могут быть использованы для усиления действия некоторых БАВ и перспективны для

применения в комплексных биомедицинских препаратах различного спектра действия.

Работа поддержана грантом 04.49-2012 НАН Украины–РФФИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В. М., Грачева Н. М., Мацулевич Т. В., Воробьев А. А. Микроразбиорческие изменения кишечника и их коррекция с помощью лечебно-профилактических препаратов // Журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. — 2003. — Т. 4, прил. 20. — С. 66–76.
2. Александрова В. А. Основы иммунной системы желудочно-кишечного тракта: Метод. пособие. — СПб: МАПО. — 2006. — 44 с.
3. Guarner F., Khan A. G., Garisch J. et al. Probiotics and prebiotics // World Gastroenterol. Organisation Pract. Guideline. — 2008. — http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/en/pdf/guidelines/19_probiotics_prebiotics.pdf.
4. Roberfroid M., Gibson G. R., Hoyle L. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits // Br. J. Nutr. — 2010. — V. 104, Suppl. 2. — S. 1–63.
5. Andersson Y., Asp N.-G., Bruce A. et al. Health effects of probiotic and prebiotics. A literature review on human studies // Scand. J. Nutr. — 2001. — V. 45. — P. 58–75.
6. Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use // Federal Register, 7 June 2012. — V. 77, N 110. — P. 33748–33749.
7. Carmichael J., DeGraff W. G., Gazdar A. F. et al. Evaluation of a tetrazolium-based semi-automated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing // Cancer Res. — 1989. — V. 47. — P. 936–942.
8. Kregiel D., Berowska J. Evaluation of yeast cell vitality using different fluorescent dyes // Sci. Bul. Tech. Un. . Food Chem. Biotechnol. — 2009. — V. 73, N 1058. — P. 5–14.
9. Karathia H., Vilaprinoy E., Sorribas A., Alves R. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study // PLoS ONE. — 2011. — V. 6, N 2. — P. e16015. doi:10.1371/journal.pone.0016015.
10. Zimmermann F. K. et al. Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program // Mutat. Res. — 1984. — V. 133, N 3. — P. 199–244.
11. Chen T. R. Re-evaluation of HeLa, HeLa S3, and HEP-2 karyotypes // Cytogenet. Cell Genet. — 1988. — N 48. — P. 19–24.
12. Stephanou G., Vlastos D., Vlachodimitropoulos D., Demopoulos N. A. A comparative study on the effect of MNU on human lymphocyte cultures in vitro evaluated by O6-mdG formation, micronuclei and sister chromatid exchanges induction // Cancer Lett. — 1996. — V. 109, N 1–2. — P. 109–114.
13. Weyermann J., Lochmann D., Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays // Intern. J. Pharmaceut. — 2005. — V. 288. — P. 369–376.
14. Krysko D. V., Vanden Berghe T., D'Herde K., Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis // Methods. — 2008. — V. 44, N 3. — P. 205–221.

ЦИТОТОКСИЧНА ТА ДНК-УШКОДЖУВАЛЬНА ДІЯ ПРЕБІОТИЧНИХ СУБСТАНЦІЙ

Л. А. Сафронова¹
С. І. Войчук¹
Б. Г. Сухов²
В. С. Підгорський¹

¹Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ
²Іркутський інститут хімії
ім. О. Є. Фаворського СВ РАН, РФ

E-mail: safronova_larisa@ukr.net

У зв'язку з несприятливою екологією і широким розповсюдженням захворювань шлунково-кишкового тракту людей і тварин спостерігається підвищений інтерес до пробіотичних препаратів (пробіотики, пребіотики та синбіотики), які показали свою ефективність і безпеку за профілактичного й лікувального приймання. На моделі клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* та культурі раку гортані HEP-2 проведено оцінювання цитотоксичних і ДНК-ушкоджувальних властивостей низки полісахаридів (арабіногалактан, нанобіокомпозит арабіногалактан із флавоноїдами, карагінан, галактоман та їхні гідролізовані похідні) — нових перспективних пребіотичних субстанцій. Цитотоксичний потенціал речовин визначали за результатами МТТ-тесту, ДНК-ушкоджувальну дію — за морфолого-структурними особливостями ядер клітин. Вивчено синергічну цито- і ДНК-ушкоджувальну дію зазначених полісахаридів із відомими індукторами клітинного хімічного ушкодження (пероксид водню, оцтова кислота, нітрозометилсечовина). У результаті здійснених досліджень встановлено відсутність цито- і ДНК-ушкоджувальних властивостей у цих речовин. Оцінювання комплексного впливу показало, що вони різною мірою здатні посилювати дію перексиду водню, оцтової кислоти і нітрозометилсечовини. Природу виявлених ефектів не з'ясовано, однак можна припустити, що досліджені пребіотичні субстанції можуть бути використані для посилення дії деяких хімічних сполук і перспективні для застосування в комплексних біомедичних препаратах різного спектра дії.

Ключові слова: цито- і ДНК-ушкоджувальна дія, арабіногалактан, карагінан, галактоманан, *Saccharomyces cerevisiae*, клітини раку гортані HEP-2.

CYTOTOXIC AND DNA-DAMAGE ACTIVITY OF THE PREBIOTIC SUBSTANCES

L. A. Safronova¹
S. I. Voychuk¹
B. G. Suhov²
V. S. Pidgorskiy¹

¹Zabolotny Institute of Microbiology and
Virology of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv
²Favorskiy Institute of Chemistry of Siberian
Department of Russian

E-mail: safronova_larisa@ukr.net

Due to the widespread of the ecological disorders and diseases of the gastrointestinal tract of humans and animals there is an increased interest in probiotic products (probiotics, prebiotics and synbiotic), which showed its efficacy and safety in their treatment and prevention. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and cell culture of a human larynx cancer HEP-2 were used to study cyto- and DNA-damage effects of several polysaccharides (arabinogalactan and nanobiocomposite of arabinogalactan with flavonoids, karraginan, galactomannan and their hydrolyzed derivatives), which are new perspective prebiotic substances. Cytotoxic potential of substances was determined from MTT-assay and DNA-damage effects were determined by morphological and structural features of cell nuclei. The synergic action of the polysaccharides with chemical triggers of cellular damages (hydrogen peroxide, acetic acid, nitrosomethylurea) was evaluated. The studied substances possessed no cyto- and DNA-damage action on the yeast and mammalian cells. It was shown that polysaccharides were able to enhance the effects of hydrogen peroxide, acetic acid and nitrosomethylurea. Nature of the marked effects remains unclear, but it may be assumed that the studied prebiotic substances can be used to enhance the effects of some chemical compounds and appear promising for use in integrated biomedical preparations of varied spectrum.

Key words: arabinogalactan, karraginan, galactomannan, *Saccharomyces cerevisiae*, human larynx cancer HEP-2 cells, cytotoxicity, DNA-damage effects.