

КУРИННЫЙ Д.А., КОСТИКОВ И.Ю.

Государственное учреждение «Национальный научный центр радиационной медицины НАМН Украины»,

ул. Мельникова, 53, Киев 04050, Украина

Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко,

ул. Владимирская, 60, Киев 01033, Украина

### СОВМЕСТНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ (*CHLOROPHYTA*, *CHLOROPHYCEAE*) И ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА КАК ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Предложена новая модельная тест-система для проведения фундаментальных радиобиологических исследований (в частности, «эффекта свидетеля»), основанная на совместном культивировании клеток филогенетически отдалённых видов — лимфоцитов периферической крови человека и зелёных водорослей. Данная тест-система позволяет сократить количество анализируемых факторов путем ограничения разновидностей межклеточного сигналинга от вероятного донора повреждающего сигнала — зелёной водоросли (тест-объект 2) на тест-объект 1 (лимфоциты периферической крови человека). Установлено, что варианты тест-системы, где вторым тест-объектом выступают разные виды одноклеточных зелёных водорослей (*Chlamydomonas moewusii* Gerloff 1940, *Chlamydomonas* sp. АСКУ 221-03, *Haematococcus pluvialis* Flotow emend. Wille 1903, *Ettlia carotinoso* Komárek 1989), соответствуют требованиям, предъявляемым в радиобиологии к двухкомпонентным тест-системам: а) они совместимы с культурой лимфоцитов по условиям культивирования и методике окраски хромосомного материала; б) не проявляют токсичности, мутагенности и не влияют на клеточный рост лимфоцитов.

Ключевые слова: зелёные водоросли, лимфоциты, совместное культивирование, тест-система, радиобиология, «эффект свидетеля».

#### Введение

В настоящее время в экспериментальных генетических исследованиях по изучению ближайших и отдалённых эффектов мутагенного действия ионизирующей радиации на живые организмы применяются различные тест-системы (Гродзинский, 1989; Beyzadeoglu et al., 2010; Radiation..., 2010). Использование широкого спектра тест-систем вызвано необходи-

© Куринный Д.А., Костиков И.Ю., 2017

мостью изучения прямого действия ионизирующей радиации, а также непрямых эффектов облучения, к которым относится «эффект свидетеля».

«Эффект свидетеля» (bystander effect) – немишеневый эффект радиации, заключающийся в воздействии облученных клеток на необлученные. Поскольку стохастическая и нестохастическая патология у лиц, подвергшихся действию ионизирующей радиации, может быть обусловлена не только прямым радиационным повреждением клеток-мишеней, но и непрямыми изменениями в необлученных клетках (состояние последних при этом может оцениваться как пред-онкологическое), изучение радиационно-индуцированного «эффекта свидетеля» может иметь важное значение при оценке медицинских последствий облучения человека (Sgouros et al., 2007; Widel et al., 2009; Marín et al., 2015; и др.). При «эффекте свидетеля» у необлученных клеток под воздействием облученных наблюдается, в частности, развитие хромосомных aberrаций, хромосомной нестабильности, клеточной трансформации, изменяется генная экспрессия и трансляция (Barcellos-Hoff, Brooks, 2001; Sedelnikova et al., 2007; Kiuru et al., 2014; Shemetun et al., 2014; и др.).

Природа сигнала, вызывающего «эффект свидетеля», а также механизм его передачи от облученной клетки к необлученной, несмотря на многочисленные исследования в этой области, остаются весьма непонятными. В этом процессе принимают участие межклеточные контакты («gap junction») и индукция в клеточную среду цитокинов из повреждённых клеток, оказывают влияние активные формы кислорода, оксидантный стресс, вторичные стресс-мессенджеры (Mothersill, Seymour, 2004; Hill et al., 2006; Buonanno et al., 2011; и др.). Учитывая многофакторность воздействий, приводящих к развитию «эффекта свидетеля», изучение пусковых механизмов клеточной трансформации и роли отдельных факторов в её реализации при использовании классических тест-систем крайне затруднено. Поэтому особый интерес вызывают работы, в которых описывается «эффект свидетеля» при совместном культивировании представителей филогенетически отдаленных групп, что позволяет существенно ограничить механизмы межклеточного сигналинга. В частности, было показано развитие «эффекта свидетеля» в совместной культуре необлучённых лимфоцитов периферической крови человека и облучённых клеток дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), т. е. тест-объектов, филогенетически весьма отдаленных друг от друга (Vasylenko et al., 2011).

Дальнейшее исследование механизмов, лежащих в основе «эффекта свидетеля», требует расширения спектра тест-систем, в частности путем разработки совместных систем культивирования традиционного тест-объекта – лимфоцитов периферической крови человека с филогенетически еще более отдаленными организмами в качестве вероятного донора повреждающего сигнала. Перспективным новым тест-объектом двухкомпонентной тест-системы могут быть зеленые водоросли. В этом

случае тест-система будет включать представителей двух разных супергрупп, имеющих статус двух сестринских царств – Opisthokonta (тест-объект – лимфоциты периферической крови *Homo sapiens*) и Archaeplastida (тест-объект – клетки представителей *Chlorophyta*) (Adl et al., 2005, 2012). По сравнению с тест-системой, построенной на совместном культивировании лимфоцитов периферической крови человека (далее – ЛПКЧ) и дрожжей, где тест-объекты относятся к разным мегакладам (Animalia и Fungi) одной супергруппы (Opisthokontae), тест-система на основе совместной культуры ЛПКЧ и зеленых водорослей может быть использована для исследования «эффекта свидетеля» на еще больших филогенетических дистанциях.

Культура зеленой водоросли в качестве второго тест-объекта должна отвечать двум главным требованиям, предъявляемым ко второму тест-объекту подобных тест-систем (Seabright, 1971; Цитогенетичні..., 2003; Шеметун та ін., 2006): а) быть совместимой с культурой лимфоцитов по условиям культивирования и методике окраски хромосомного материала; б) в нормальном состоянии (т. е. без воздействия любых мутагенных факторов) не проявлять токсичности по отношению к лимфоцитам.

Подбор культур таких зеленых водорослей и тестирование их на соответствие главным требованиям в условиях тест-системы ЛПКЧ – зеленая водоросль и было целью данной работы.

### Материалы и методы

Первым объектом двухкомпонентной системы была культура лимфоцитов периферической крови условно здорового человека. В качестве второго тест-объекта апробированы четыре штамма зеленых микроводорослей из коллекции культур Киевского национального университета им. Тараса Шевченко (Костиков и др., 2009) (акроним АСКУ), регистрационный номер во Всемирной федерации коллекций культур WDCM994. Эти штаммы представляли три рода одноклеточных зеленых водорослей класса *Chlorophyceae* (см. таблицу): *Chlamydomonas* Ehrenb. s.l. (АСКУ 221-03 и АСКУ 751-06) *Ettlia* J. Komárek (АСКУ 573-06) и *Haematococcus* Flotow (АСКУ 301-04).

Все выбранные штаммы водорослей относятся к группам или молекулярным кладам, у которых клеточные покровы представлены гликопротеиновой оболочкой, которая обогащена гидроксипролинами, не содержит кристаллически упорядоченной целлюлозы и дополнительных хитиновых или спорополениновых слоев (Adair et al., 1987; Goodenough, Neuser, 1988; Hagen et al., 2002). Такие «мягкие» оболочки могут быть разрушены помещением клеток в гипотонический раствор КС1 одновременно с разрушением клеточных мембран лимфоцитов.

**Штаммы, апробированные как второй тест-объект системы  
совместного культивирования**

Штамм	Таксон	Локалитет
АСКУ 221-03	<i>Chlamydomonas</i> sp.	Украина, Полесье, лесная почва
АСКУ 751-06 (= SAG 1.98)	<i>Chlamydomonas moewusii</i> Gerloff 1940	Германия, Геттинген, почва теплицы
АСКУ 301-04	<i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow emend. Wille 1903	Украина, гранитно-степное Побужье, пересохшая лужа
АСКУ 573-06 (= SAG 213-4)	<i>Ettlia carotinos</i> a Komárek 1989	Чехия, почва

Тестирование пригодности выбранных штаммов в качестве тест-объекта проводили по нескольким критериям: а) совместимости условий культивирования водорослей и лимфоцитов; б) совместимости методик окраски хромосомного материала водорослей и лимфоцитов; в) отсутствию проявлений токсичности водорослей по отношению к лимфоцитам.

Тесты на совместимость условий культивирования проводили путем совместного культивирования подготовленной культуры микроводорослей и лимфоцитов периферической крови человека. Подготовка культуры включала: а) наращивание водорослевой биомассы до численности около 400 тыс. кл/мл (определяли прямым подсчетом в камере Горяева) в накопительной жидкой культуре на среде Болда с тройным количеством азота (3N BBM) (Ettl, Gärtner, 1995) при обычных условиях на люминистате с лампами дневного света (освещенность 1800–2500 лк, чередование световой и темновой фаз 12/12 ч, температура 16–23 °С); б) отделение клеток водорослей от культуральной среды 3N BBM трехкратным центрифугированием (3 мин при скорости 1000 об/мин); после каждого центрифугирования надосадок отбирали, а осадок ресуспендировали в физиологическом растворе такого же объема; в) компоновку совместной культуры лимфоцитов и водоросли. Для этого в культивационную пробирку, содержащую 4,5 мл культуральной среды для лимфоцитов RPMI-1640 вносили по 250 мкл отмытой и ресуспендированной в физиологическом растворе культуры водоросли (около 100 тыс. клеток) и цельной крови условно здорового донора. Полученную систему культивировали в термостате, в темноте, при 37 °С в течение 48 ч. Снятие культуры и подготовку хромосомных препаратов проводили по общепринятой методике (Seabright, 1971).

Совместимость методик окраски хромосомного материала оценивали по результатам окраски хромосом лимфоцитов и водорослей в совместной культуре. Препараты метафазных хромосом ЛПКЧ получали согласно рекомендованной МОЗ Украины методике с последующим равномерным или дифференциальным G-окрашиванием

(Цитогенетичні..., 2003). Дифференциальное G-окрашивание препаратов метафазных хромосом выполняли с использованием трипсина и красителя Гимза (Seabright, 1971). Цитогенетический анализ проводили под микроскопом Axiolab ( $\times 1000$ ).

Токсичность и мутагенность культуры водорослей по отношению к культуре лимфоцитов оценивали по изменению митотического индекса и количеству хромосомных aberrаций на метафазных пластинках лимфоцитов периферической крови человека, культивируемых совместно с микроводорослями по стандартной методике цитогенетического анализа (Seabright, 1971; Цитогенетичні..., 2003). Соответствие частот хромосомных aberrаций контролю, наблюдаемому в чистой культуре лимфоцитов, являлось показателем отсутствия токсического влияния водорослей на лимфоциты.

### Результаты

В результате совместного культивирования для всех четырех апробированных вариантов тест-системы ЛПКЧ – зеленые водоросли (ЛПКЧ – *Chlamydomonas* sp. АСКУ 221-03, ЛПКЧ – *Chlamydomonas moewusii*, ЛПКЧ – *Haematococcus pluvialis*, ЛПКЧ – *Ettlia carotinos*) по стандартной методике окраски хромосомного материала лимфоцитов были успешно получены препараты, содержащие метафазные пластинки лимфоцитов и соответствующих штаммов зеленых водорослей.

Полученные метафазные хромосомы лимфоцитов человека были четкими и соответствовали стандартным требованиям, необходимым для проведения цитогенетического анализа (рис. 1, 1; 2, 1; 3, 1, 2).

Метафазные хромосомы микроводорослей присутствовали на тех же препаратах, что и хромосомы лимфоцитов человека, однако четкие метафазные пластинки, пригодные для качественного цитогенетического анализа, практически отсутствовали (см. рис. 1, 2, 3; 2, 4, 5; 3, 3–5). При проведении дифференциального G-окрашивания была обнаружена сверхчувствительность к трипсину у хромосом всех четырех изученных водорослей по сравнению с хромосомами лимфоцитов человека: после обработки трипсином при визуальном контроле у водорослей, в отличие от лимфоцитов, наблюдалось полное обесцвечивание хроматина (см. рис. 1, 4, 5; 2, 2). Это может свидетельствовать о более низком уровне спирализации хромосомного аппарата микроводорослей по сравнению с хромосомами человека.

Превышение частоты хромосомных aberrаций на метафазных пластинках лимфоцитов, культивируемых совместно с водорослями, по отношению к частоте хромосомных aberrаций в контрольных чистых культурах лимфоцитов, не выявлено. Митотический индекс лимфоцитов при совместном культивировании с микроводорослями колебался в пределах 38–52%, что является средним показателем и свидетельствует об отсутствии угнетения их роста в культуре. Таким образом, токсического влияния отобранных штаммов микроводорослей на культуру лимфоцитов периферической крови человека не обнаружено.

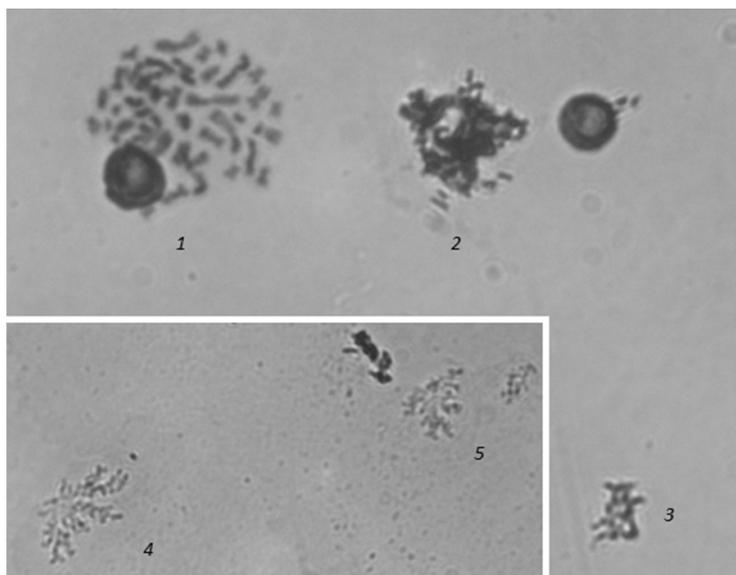


Рис. 1. Совместная культура ЛПКЧ – *Chlamydomonas* sp. АСКУ 221-03: 1 – метафазные хромосомы лимфоцита; 2, 3 – две группы неразделившихся хромосом *Chlamydomonas* sp.; 4, 5 – две группы хромосом *Chlamydomonas* sp., обесцвечившихся при обработке трипсином

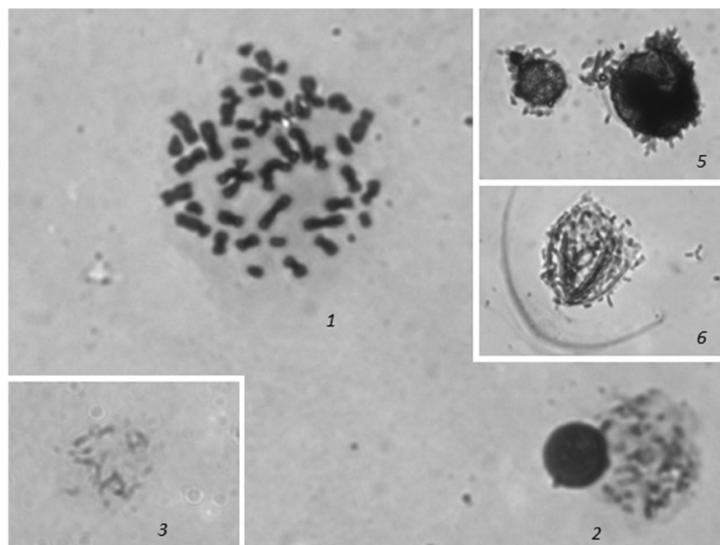


Рис. 2. Совместная культура ЛПКЧ – *Ectlia carotinoso* АСКУ 573-06: 1, 2 – метафазные хромосомы лимфоцита (1) и *E. carotinoso* (2); 3 – группа хромосом *E. carotinoso*, обесцвечившихся при обработке трипсином; 4, 5 – хромосомы *E. carotinoso*, полностью отделившиеся от ядерной ламинаы (4) и частично вышедшие из неполностью разрушенного ядра (5)

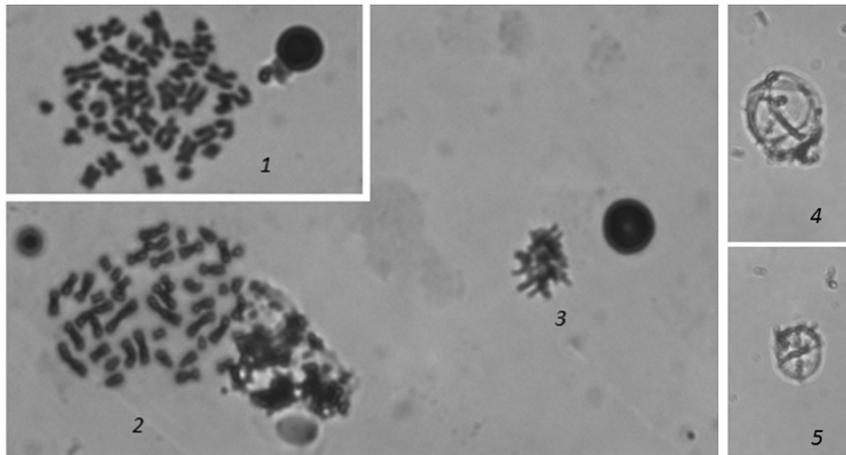


Рис. 3. Совместные культуры ЛПКЧ – *Chlamydomonas moewusii* АСКУ 751-06 (1–3) и ЛПКЧ – *Haematococcus pluvialis* АСКУ 301-04 (4, 5): метафазные хромосомы лимфоцитов (1, 2) и частично вышедшие из полностью разрушенного ядра хромосомы *Ch. moewusii* (3); хромосомы *H. pluvialis*, полностью отделившиеся от ядерной ламина (4, 5)

### Обсуждение

Цитология хромосом у одноклеточных зеленых водорослей, особенно монадных, изучена недостаточно. Из четырех апробированных в модельной системе таксонов водорослей данные о числе хромосом приводятся для *Chlamydomonas moewusii* ( $n = 8, 16, 32, 36 \pm 2, 64$ ), одной его разновидности (*Ch. moewusii* var. *eugametos* = *Ch. eugametos*,  $n = 8, 10, 16, 32, 36 \pm 4, 64$ ) и *Haematococcus pluvialis* ( $n = 20–30, 32$ ), причем работы по определению числа хромосом содержат неоднозначные результаты и датируются периодом 1909–1959 гг. (Седова, 1996). Фактически, в пределах большой сборной группы одноклеточных водорослей *Chlamydomonadaceae* s.l. / *Haematococcaceae*, к которой относятся все виды, исследованные в совместной культуре с лимфоцитами, только для одного вида – *Chlamydomonas reinhardtii*, детально изученного в плане генетики, наследования пола, организации генома (размера, набора генов и их полных последовательностей), число хромосом можно считать достоверно установленным ( $n = 8$ ). При этом даже в отношении данного вида вплоть до начала XXI ст. велись дискуссии о базовом числе хромосом (7–18), диплоидном наборе, выявляемом при электронной микроскопии синаптонемного комплекса (16 или более), количестве групп сцепления (17 или 16) (Седова, 1996; Walther, Hall, 1995; Harris, 1998, 2001).

Полученные нами результаты показали, что методика, применяемая для кариологического анализа лимфоцитов, позволяет наблюдать также хромосомы зеленых водорослей. Однако качественного разделения

водорослевых хромосом, требуемого для общепринятого кариологического анализа, при этом получить не удастся, т. к. наблюдаемое количество дискретных структур в одном препарате варьирует в широком диапазоне – от 10–15 до 40 и более у каждого из изученных штаммов.

Результаты дифференциального G-окрашивания, при котором после обработки трипсином хроматин водорослей выглядит полностью обесцвеченным, с одной стороны, свидетельствуют о том, хромосомный материал водорослей по сравнению с таковым лимфоцитов менее спирализован (Захаров и др., 1982). С другой стороны, сверхчувствительность водорослевого хромосомного материала к обработке трипсином позволяет на хромосомных препаратах, полученных из объектов в совместной культуре, однозначно разграничивать хромосомы лимфоцитов и хромосомный материал водорослей, что, собственно, и требуется от тест-системы для изучения «эффекта свидетеля» на значительных филогенетических дистанциях.

Поскольку после завершения совместного экспонирования в термостате культуры водорослей и лимфоцитов сразу обрабатываются коллемеидом, то наблюдение на препаратах метафазных пластинок водорослей прямо указывает на прохождение митоза во время периода совместного культивирования. Таким образом, наличие метафазных хромосом водорослей в совместной культуре с лимфоцитами однозначно свидетельствует о том, что в данной тест-системе водоросли не только остаются жизнеспособными, но и репродуцируются.

Известно, что токсическое воздействие какого-либо фактора в культуре лимфоцитов приводит либо к гибели культуры, либо к появлению хромосомных аномалий, выявляемых стандартными методами кариологического анализа. В случае совместного культивирования всех четырех изученных штаммов микроводорослей с лимфоцитами не зарегистрировано ни гибели последних, ни появления хромосомных аномалий. Это позволяет сделать вывод об отсутствии токсического влияния на лимфоциты со стороны изученных культур зеленых водорослей.

### **Выводы**

В экспериментах с четырьмя штаммами одноклеточных зеленых водорослей класса *Chlorophyceae* (*Chlamydomonas moewusii* АСКУ 751-06, *Chlamydomonas* sp. АСКУ 221-03, *Haematococcus pluvialis* АСКУ 301-04, *Ettlia carotinos* АСКУ 573-06) показана возможность их совместного культивирования с лимфоцитами периферической крови человека и возможность получения хромосомных препаратов по методике, применяемой для кариологического анализа лимфоцитов. В условиях совместного культивирования с лимфоцитами изученные водоросли

сохраняют жизнеспособность и способность к репродукции, не проявляют токсичных эффектов по отношению к лимфоцитам. Сверхчувствительность хромосомного материала водорослей к обработке трипсином позволяет четко отличать на препаратах хромосомы водорослей от хромосом лимфоцитов.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования тест-системы «лимфоциты человека – зеленые водоросли» как модельной для проведения радиобиологических, биодозиметрических и других исследований, включая изучение механизмов развития «эффекта свидетеля», на филогенетически отдаленных объектах.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гродзинский Д.М. Радиобиология растений, Киев: Наук. думка, 1989, 384 с.
- Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. Хромосомы человека: Атлас, М.: Медицина, 1982, 264 с.
- Костиков И.Ю., Демченко Э.Н., Березовская М.А. Коллекция культур водорослей Киевского национального университета им. Тараса Шевченко. Каталог штаммов (2008 г.). *Черномор. бот. журн.*, 2009, 5(1): 37–79.
- Седова Т.В. Кариология водорослей, СПб: Наука, 1996, 368 с.
- Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: Методичні рекомендації, КМАПО МОЗ України, Київ, 2003, 23 с.
- Шеметун О.В., Талан О.О., Пілінська М.А. Модель для дослідження радіаційно індукованого «ефекту свідка» з використанням лімфоцитів периферичної крові людини. *Журн. АМН України*, 2006, 12(3): 556–565.
- Adair W.S., Steinmetz S.A., Mattson D.M., Goodenough U.W., Heuser J.E. Nucleated Assembly of *Chlamydomonas* and *Volvox* Cell Walls. *J. Cell Biol.*, 1987, 105: 2373–2382.
- Adl S.M., Simpson A.G.B., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G., Fensome R.A., Fredericq S., James T.Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C.E., Lewis L.A., Lodge J., Lynn D.H., Mann D.G., McCourt R.M., Mendoza L., Moestrup Ø., Mozley-Stanridge S.E., Nerad T.A., Shearer C.A., Smirnov A.V., Spiegel F.W., Taylor M.F.J.R. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 2005, 52(5): 399–451.
- Adl S.M., Simpson A.G.B., Lane C.E., Lukes J., Bass D., Bowser S.S., Brown M.W., Burki F., Dunthorn M., Hampl V., Heiss A., Hoppenrath M., Lara E., Gall L.L., Lynn D.H., McManus H., Mitchell E.A.D., Mozley-Stanridge S.E., Parfrey L.W., Pavlowski J., Rueckert S., Shadwick L., Schoch C.L., Smirnov A., Spiegel F.W. The Revised Classification of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 2012, 59(5): 429–493.
- Barcellos-Hoff M.H., Brooks A.L. Extracellular signaling through the microenvironment: a hypothesis relating carcinogenesis, bystander effects, and genomic instability. *Radiat. Res.*, 2001, 156: 618–627.
- Beyzadeoglu M., Ozyigit G., Ebruli C. Basic Radiation Oncology, Berlin; Heidelberg: Springer Verlag, 2010, 576 pp.

- Buonanno M., de Toledo S.M., Pain D., Azzam E.I. Long-term consequences of radiation-induced bystander effects depend on radiation quality and dose and correlate with oxidative stress. *Radiat. Res.*, 2011, 175(4): 405–415.
- Ettl H., Gärtner G. Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen, Stuttgart, etc.: Gustav Fisher Verlag, 1995, 721 S.
- Goodenough U.W., Heuser J.E. Molecular organization of the cell wall and cell-wall crystals from *Chlamydomonas eugamatos*. *J. Cell Sci.*, 1988, 90: 735–750.
- Hagen C., Siegmund S., Braune W. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *Eur. J. Phycol.*, 2002, 37: 217–226.
- Harris E.H. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 2001, 52: 363–406.
- Harris E.H. Introduction to *Chlamydomonas*, *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, Dordrecht (The Netherlands): Kluwer Acad. Publ., 1998, pp. 1–11.
- Hill M.A., Stevens D.L., Kadhim M., Blake-James M., Mill A.J., Goodhead D.T. Experimental techniques for studying bystander effects in vitro by high and low-LET ionising radiation. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 2006, 122(1–4): 260–265.
- Kiuru A., Kämäräinen M., Heinävaara S., Pylkäs K., Chapman K., Koivistoinen A., Parviainen T., Winqvist R., Kadhim M., Launonen V., Lindholm C. Assessment of targeted and non-targeted responses in cells deficient in ATM function following exposure to low and high dose X-rays. *PLoS One*, 2014, 9(3). doi: 10.1371/journal.pone.0093211
- Marín A., Martín M., Liñán O., Alvarenga F., López M., Fernández L., Büchser D., Cerezo L. Bystander effects and radiotherapy. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.*, 2015, 20(1): 12–21.
- Mothersill C., Seymour C.B. Radiation-induced bystander effects—implications for cancer. *Nat. Rev. Cancer.*, 2004, 4(2): 158–164.
- Radiation biology: A Handbook for teachers and students, Vienna: IAEA, 2010, 166 pp.
- Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet.*, 1971, 2: 971–972.
- Sedelnikova O.A., Nakamura A., Kovalchuk O., Koturbash I., Mitchell S.A., Marino S.A., Brenner D.J., Bonner W.M. DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models. *Cancer Res.*, 2007, 67(9): 4295–4302.
- Sgouros G., Knox S.J., Joiner M.C., Morgan W.F., Kassis A.I. MIRD Continuing Education: Bystander and Low-Dose-Rate Effects: Are These Relevant to Radionuclide Therapy? *JNM*, 2007, 48(10): 1683–1691.
- Shemetun O.V., Talan O.O., Pilinska M.A. Cytogenetic peculiarities of induction and persistence the bystander effect in human blood lymphocytes. *Cytol. and Genet.*, 2014, 48(4): 51–58.
- Vasilenko O.P., Pronina O.V., Rushkovsky S.R. Bystander effect in human lymphocytes incubated with irradiated mitochondrial DNA deficient yeast cells. *Radioprotection*, 2011, 46(6): 555–559.
- Walther Z., Hall J.L. The uni chromosome of *Chlamydomonas*: histone genes and nucleosome structure. *Nucl. Acids Res.*, 1995, 23: 3756–3763.

Widel M., Przybyszewski W., Rzeszowska-Wolny J. Radiation-induced bystander effect: the important part of ionizing radiation response. Potential clinical implications. *Post. Higieny i med. doswiad.*, 2009, 63: 88–94.

Поступила 12 октября 2016 г.

Подписал в печать А.И. Божков

#### REFERENCES

- Adair W.S., Steinmetz S.A., Mattson D.M., Goodenough U.W., Heuser J.E. *J. Cell Biol.*, 1987, 105: 2373–2382.
- Adl S.M., Simpson A.G.B., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G., Fensome R.A., Fredericq S., James T.Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C.E., Lewis L.A., Lodge J., Lynn D.H., Mann D.G., McCourt R.M., Mendoza L., Moestrup Ø., Mozley-Standridge S.E., Nerad T.A., Shearer C.A., Smirnov A.V., Spiegel F.W., Taylor M.F.J.R. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 2005, 52(5): 399–451.
- Adl S.M., Simpson A.G.B., Lane C.E., Lukes J., Bass D., Bowser S.S., Brown M.W., Burki F., Dunthorn M., Hampl V., Heiss A., Hoppenrath M., Lara E., Gall L.L., Lynn D.H., McManus H., Mitchell E.A.D., Mozley-Stanridge S.E., Parfrey L.W., Pavlovski J., Rueckert S., Shadwick L., Schoch C.L., Smirnov A., Spiegel F.W. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 2012, 59(5): 429–493.
- Barcellos-Hoff M.H., Brooks A.L. *Radiat. Res.*, 2001, 156: 618–627.
- Beyzadeoglu M., Ozyigit G., Ebruli C. *Basic Radiation Oncology*, Berlin; Heidelberg: Springer Verlag, 2010, 576 pp.
- Buonanno M., de Toledo S.M., Pain D., Azzam E.I. *Radiat. Res.*, 2011, 175(4): 405–415.
- Ettl H., Gärtner G. *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*, Stuttgart: Gustav Fisher Verlag, 1995, 721 pp.
- Goodenough U.W., Heuser J.E. *J. Cell Sci.*, 1988, 90: 735–750.
- Grodzinskiy D.M., *Radiobiologiya rasteniy [Radiobiology of Plants]*, Kiev: Nauk. Dumka Press, 1989, 384 pp.
- Hagen C., Siegmund S., Braune W. *Eur. J. Phycol.*, 2002, 37: 217–226.
- Harris E.H. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 2001, 52: 363–406.
- Harris E.H. *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, Dordrecht (The Netherlands): Kluwer Acad. Publ., 1998, pp. 1–11.
- Hill M.A., Stevens D.L., Kadhim M., Blake-James M., Mill A.J., Goodhead D.T. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 2006, 122(1–4): 260–265.
- Kiuru A., Kämäräinen M., Heinävaara S., Pylkäs K., Chapman K., Koivistoinen A., Parviainen T., Winqvist R., Kadhim M., Launonen V., Lindholm C. *PLoS One*, 2014, 9(3). doi: 10.1371/journal.pone.0093211
- Kostikov I.Yu., Demchenko E.N., Berezovskaya M.A. *Chernomor. Bot. J.*, 2009, 5(1): 37–79.
- Marin A., Martín M., Liñán O., Alvarenga F., López M., Fernández L., Büchser D., Cerezo L. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.*, 2015, 20(1): 12–21.
- Mothersill C., Seymour C.B. *Nat. Rev. Cancer.*, 2004, 4(2): 158–164.
- Radiation biology: A Handbook for teachers and students*, Vienna: IAEA, 2010, 166 pp.

- Seabright M. *Lancet*, 1971, 2: 971–972.
- Sedelnikova O.A., Nakamura A., Kovalchuk O., Koturbash I., Mitchell S.A., Marino S.A., Brenner D.J., Bonner W.M. *Cancer Res.*, 2007, 67(9): 4295–4302.
- Sedova T.V. *Kariologiya vodorosley [Algae karyology]*, St. Petersburg: Nauka Press, 1996, 368 pp.
- Sgouros G., Knox S.J., Joiner M.C., Morgan W.F., Kassis A.I. *JNM*, 2007, 48(10): 1683–1691.
- Shemetun O.V., Talan O.O., Pilinska M.A. *J. Acad. Med. Sci. Ukr.*, 2006, 12(3): 556–565.
- Shemetun O.V., Talan O.O., Pilinska M.A. *Cytol. and Genet.*, 2014, 48(4): 51–58.
- Tsytogetnychni metody doslidzhennya khromosom lyudyni: Metodychni rekomendatsiyi [Cytogenetic methods of human chromosomes: Method recommendations]*, Kyiv, 2003, 23 pp.
- Vasylenko O.P., Pronina O.V., Rushkovsky S.R. *Radioprotection*, 2011, 46(6): 555–559.
- Walther Z., Hall J.L. *Nucl. Acids Res.*, 1995, 23: 3756–3763.
- Widel M., Przybyszewski W., Rzeszowska-Wolny J. *Post. Higieny i med. doswiad.*, 2009, 63: 88–94.
- Zakharov A.F., Benyush V.A., Kuleshov N.P., Baranovskaya L.I. *Khromosomy cheloveka: Atlas [Human chromosomes: Atlas]*, Moscow: Meditsina Press, 1982, 264 pp.

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2017, 27(2): 215–226

doi.org/10.15407/alg27.02.215

Kurinyy D.A.<sup>1</sup>, Kostikov I.Yu.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State Institution “National Scientific Center for Radiation Medicine of National Academy of Medicinal Sciences of Ukraine”,

53, Melnikova Str., Kiev 04050, Ukraine

<sup>2</sup>Taras Shevchenko Kiev National University,

64, Vladymirskaya Str., Kiev 01001, Ukraine

#### CO-CULTIVATION OF UNICELLULAR GREEN ALGAE (*CHLOROPHYTA*, *CHLOROPHYCEAE*) AND LYMPHOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD OF HUMANS AS A TEST SYSTEM FOR RADIOBIOLOGICAL STUDIES

The study proposes a new model test system for fundamental radiobiological studies (in particular, for “bystander effect” research). It is based on the co-cultivation of phylogenetically distant human peripheral blood lymphocytes and unicellular green algae. The test system allows reducing the number of analyzed factors by limiting the types of intercellular signaling from test object 2 as the probable donor of the damaging signal (green alga) to test object 1 (human peripheral blood lymphocytes). It was found that variants of the test system, wherein the second test objects are represented by different species of unicellular green algae (*Chlamydomonas moewusii* Gerloff 1940, *Chlamydomonas* sp. ACKU 221-03, *Haematococcus pluvialis* Flotow emend. Wille 1903, and *Ettlia carotinos* Kombræk 1989), which conform to the radiobiological requirements to the two-component test system. All investigated species are compatible with the culture of lymphocytes, both in cultural conditions and the procedure of chromosomal material staining. The studied strains of algae do not cause toxic or mutagenic effect and do not affect the cell growth of lymphocytes.

**Key words:** green algae, lymphocytes, co-cultivation, test system, radiobiology, bystander effect