

УДК 579.253.2: 614.876: 616-008.841.5: 678.048

М. А. Пілінська¹✉, Д. А. Курінний¹, С. Р. Рушковський², О. Б. Дибська¹¹Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», 53, вул. Мельникова, м. Київ, 04050, Україна²Навчально-науковий центр «Інститут біології і медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, 01601, Україна

ГЕНОПРОТЕКТОРНІ ВЛАСТИВОСТІ АСТАКСАНТИНУ, ВИЯВЛЕНІ ПРИ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ *IN VITRO* НА ЛІМФОЦИТИ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

Мета: визначити можливі радіопротекторні властивості атаксантину за цитогенетичними критеріями.**Методи.** Культивування лімфоцитів крові 5 умовно здорових волонтерів; обробка культур лімфоцитів атаксантином в концентрації 20,0 мкг/мл на G0 стадії мітотичного циклу перед гамма-опроміненням культур лімфоцитів *in vitro* в дозі 1,0 Гр; приготування та цитогенетичний аналіз рівномірно забарвлених препаратів метафазних хромосом. Метод кометного електрофорезу окремих клітин (Comet assay); візуалізація результатів під люмінесцентним мікроскопом; підрахування кількості нуклеоїдів четвертого класу, які відповідають апоптичному стану клітин.**Результати.** Встановлено, що атаксантин в кінцевій концентрації 20,0 мкг/мл при дії в культурі лімфоцитів периферичної крові людини на ранній пресинтетичній (G0) стадії мітотичного циклу призводить до суттєвого зниження цитогенетичного ефекту, індукованого гамма-опроміненням *in vitro* в дозі 1,0 Гр {з $26,05 \pm 1,81$ до $9,08 \pm 0,78$ на 100 клітин, відповідно} та значного зростання частоти апоптичних клітин на 48-й годині культивування {з $3,78 \pm 0,24$ до $8,26 \pm 0,91$ %, відповідно}.**Висновки.** отримані результати показали спроможність атаксантину до суттєвого ослаблення мутагенної дії іонізуючого випромінювання в лімфоцитах периферичної крові людини, що свідчить про його потужний радіопротекторний потенціал.**Ключові слова:** атаксантин, культура лімфоцитів периферичної крові людини, аберації хромосом, апоптоз, радіопротекторний ефект.*Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2016. Вип. 21. С. 141–148.*

✉ Пілінська Марія Андріївна, e-mail: pww@ukr.net

M. A. Pilinska¹✉, D. A. Kurinnyi¹, S. R. Rushkovsky², O. B. Dybska¹

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

²*Institute of Biology of Taras Shevchenko National University, Volodymyrska str., 64/13, Kyiv, 01601, Ukraine*

Genoprotective properties of astaxanthin revealed by ionizing radiation exposure *in vitro* on human peripheral blood lymphocytes

Objective: to identify possible radioprotective properties of astaxanthin by means of cytogenetic criteria.

Methods. Cultivation of peripheral blood lymphocytes from five apparently healthy volunteers; treatment of lymphocytes' cultures by astaxanthin in final concentrations 20 µg/ml in G₀ phase of mitotic cycle, prior to γ -irradiation *in vitro* in a dose 1 Gy; cytogenetic analysis the uniformly stained slides of metaphase chromosomes. The electrophoresis of individual cells (Comet assay); visualization of results under fluorescent microscope; accounting the number of nucleoid the fourth grade that correspond to apoptosis of the cells.

Results. Established that astaxanthin in final concentration 20.0 µg/ml exposed to the culture of human peripheral blood lymphocytes in the early G₀ phase of mitotic cycle leads to significant reduction of cytogenetic effects induced by gamma irradiation *in vitro* in dose 1.0 Gy (from 26.05 ± 1.81 to 9.08 ± 0.78 per 100 cells, respectively) and to significant increase the frequency of apoptotic cells at the 48 hour of cultivation (from (3.78 ± 0.24) to (8.26 ± 0.91) %, respectively).

Conclusions. The results obtained show the ability of astaxanthin to considerable weakening of radioinduced mutagenic effect in human peripheral blood lymphocytes, which testify its powerful radioprotective potential.

Key words: astaxanthin, culture of human peripheral blood lymphocytes, chromosome aberrations, apoptosis, radioprotective effect.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2016;21:141–148.

ВСТУП

Аварії на атомних станціях Чорнобиля та Фукусіми, зростання в останні роки загрози ядерного тероризму підкреслюють важливість робіт, спрямованих як на вивчення впливу іонізуючої радіації на біологічні об'єкти, так і на пошук нових ефективних радіопротекторних речовин, бажано, природного походження.

Астаксантин — каротиноїд, який відноситься до ксантофілів і відповідає всім вимогам, які висуваються до потенційних генопротекторів — низька токсичність, висока антирадикальна та антиоксидантна активність, антиканцерогенна дія, здатність проходити крізь клітинну мембрану і досягати генетичного апарата в ядрі клітини [1–8]. Незважаючи на чисельність робіт, спрямованих на вивчення різних сторін дії астаксантину, його можливі радіопротекторні властивості вивчені недостатньо.

Критеріями радіопротекторної дії можуть слугувати показники ослаблення радіаційно-індукованих пошкоджень геному на різних рівнях його організації. На цитогенетичному рівні визнаним кількісним показником інтенсивності радіаційного мутагенезу вважається дозозалежна частота специфічних для дії іонізуючого випромінювання типів

INTRODUCTION

Accidents at nuclear power plants of Chernobyl and Fukushima, the growth in recent years the threat of nuclear terrorism, emphasizing the importance of research aimed both at studying the influence of ionizing radiation on biological objects and the search for new effective radioprotective substances, preferably of natural origin.

Astaxanthin — carotenoid, which belongs to the xanthophylls and meets all the requirements that apply to potential genoprotectors — low toxicity, high antiradical and antioxidant activity, anti-carcinogenic effect, the ability to pass through the cell membrane and reach the genetic apparatus in the cell nucleus [1–8]. Despite the number of researches aimed at the study of various aspects of the astaxanthin's action its possible radioprotective properties insufficiently investigated.

The criteria of radioprotective action can serve the indicators of weakening the radiation-induced damages in the genome at different levels of its organization. On the cytogenetic level accepted quantitative indicator of the radiation mutagenesis intensity considered dose-dependent frequency of chromosome aberrations types in human periph-

аберацій хромосом в лімфоцитах периферичної крові людини, що широко використовується для біологічної дозиметрії аварійного опромінення [9]. Саме цей критерій обрано нами на першому етапі оцінки можливих генопротекторних властивостей астаксантину.

Оскільки класичний метод «Comet assay» дає можливість аналізу зміни кількості апоптичних клітин, що дозволяє оцінити стан внутрішньоклітинних систем репарації та супресії, цей метод було обрано нами на другому етапі досліджень можливих генопротекторних властивостей астаксантину.

Отримані дані дозволять зробити висновки щодо радіопротекторних властивостей астаксантину, що становить кінцеву мету наших досліджень.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для цитогенетичних досліджень використали загальноприйнятую класичну тест-систему – культуру лімфоцитів периферичної крові, одержану від 5 умовно здорових волонтерів (2 жінки, 3 чоловіків) віком 20–51 років, середній вік – 41 рік, які заперечували свідомий контакт зі знаними чи потенційними мутагенами, вели здоровий спосіб життя. Провели добровільне цитогенетичне обстеження осіб із сформованої групи, в яких встановили частоту та спектр аберацій хромосом в лімфоцитах периферичної крові людини – фонову (вихідну) та при окремії і сумісній дії астаксантину та іонізуючого випромінювання *in vitro*. Всі особи були залучені до цитогенетичного обстеження за умов поінформованої згоди.

Культивування лімфоцитів периферичної крові людини проводили протягом 48 годин за модифікованим нами стандартним мікрометодом [10, 11]. При постановці експериментів використовували астаксантин (Sigma, USA), який додавали до культур лімфоцитів периферичної крові людини в кінцевій концентрації 20,0 мкг/мл, визначеній під час власних попередніх досліджень [12]. Астаксантин вводили в культуральне середовище на ранній пресинтетичній (G0) стадії першого мітотичного циклу – до початку інкубації лімфоцитів периферичної крові, перед опроміненням культур гамма-квантами випромінювачем IBL-237C (потужність 2,34 Гр/хв) в дозі 1,0 Гр.

При цитогенетичному аналізі враховували всі аберації хроматидного (одиначні фрагменти, хроматидні обміни) та хромосомного (вільні парні фрагменти, ацентричні кільця, дицентричні та кільцеві хромосоми, аномальні моноцентрики, які формуються за рахунок повних та неповних транслокацій, інверсій,

eral blood lymphocytes specific for radiation exposure that are widely used for biological dosimetry of emergency irradiation [9]. It is this criterion was chosen by us in the first phase of assessment the possible genoprotective properties of astaxanthin.

Because the classic variant of «Comet assay» gives an opportunity to analyze changes in the number of apoptotic cells that allows to evaluate the condition of intracellular repair and suppression systems, this method was chosen for the second phase of research the possible genoprotective properties of astaxanthin.

The data received allow make conclusion about the radioprotective properties of astaxanthin, which is the ultimate goal of our study.

MATERIALS AND METHODS

For cytogenetic investigations was used conventional classical test system – the culture of peripheral blood lymphocytes obtained from 5 conditionally healthy volunteers (2 female, 3 male) aged 20–51 years old, average age – 41 years, who denied conscious contact with well-known or potential mutagens, lead a healthy lifestyle. Voluntary cytogenetic examination of persons from such group was conducted in which the frequency and spectrum of chromosome aberrations in blood lymphocytes was established – background (output) and with separate and combined exposure of astaxanthin and ionizing radiation *in vitro*. All persons were involved in cytogenetic examination under conditions of informed consent.

Cultivation of human peripheral blood lymphocytes was performed within 48 hours per standard micromethod modified in the cytogenetics laboratory of NRCRM [10, 11]. In experiments was used astaxanthin (Sigma, USA), which was added to lymphocytes' cultures in final concentration 20.0 µg/ml, defined during own previous studies [12]. Astaxanthin was introduced into culture medium at early G0 stage of the first mitotic cycle – before incubation of lymphocytes' cultures prior gamma irradiation by emitter IBL-237C (dose-rate 2.34 Gy/min) in dose of 1.0 Gy.

When analyzing took into account all aberrations both chromatid (single fragments, chromatid exchanges) and chromosome (free double fragments, acentric rings, dicentric and ring chromosomes, abnormal monocentrics which are derived from complete and incomplete translocations, inversions,

інсерцій) типів, які вірогідно можна розпізнати при груповому каріотипуванні на рівномірно пофарбованих препаратах метафазних хромосом [10].

Для дослідження дії астаксантину *in vitro* за допомогою методу кометного електрофорезу цільну кров (~3 ml від кожної особи) культивували за напівмікрометодом у нашій модифікації. Культуру лімфоцитів інкубували в живильному середовищі RPMI 1640 з L-глутаміном (Sigma, USA), фітогемаглютиніном (PHA, Difco-P, USA) та астаксантином в концентрації 20,0 мкг/мл впродовж 48 годин. Культуральну суміш центрифугували протягом 10 хвилин при 1000 об/хв. Знімали верхній шар клітин над осадом (0,75 мкл) та проводили обробку згідно з класичним протоколом. Для візуалізації результатів слайди фарбували DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) з концентрацією 2 мкг/мл відразу після електрофорезу без фіксації слайдів. Аналіз результатів проводили під люмінесцентним мікроскопом, до якого приєднували фотоапарат Canon D1000. На фотографіях підраховували кількість нуклеоїдів четвертого класу, які відповідають апоптичному стану клітин, серед 200 індивідуальних нуклеоїдів (так званих «комет»). Зображення аналізували за допомогою програми Comet Score (TriTek Corp) [13–15].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведених досліджень встановили, що фонові середньогрупові частоти аберантних метафаз та аберацій хромосом в лімфоцитах периферичної крові складала $2,46 \pm 0,30$ на 100 клітин з міжіндивідуальними коливаннями від 1,33 до 3,02 на 100 метафаз. Пошкодження хромосом були представлені переважно одиночними та парними ацентричними фрагментами ($1,60 \pm 0,28$ та $0,97 \pm 0,22$ на 100 метафаз, відповідно).

В експериментах з опроміненням виявили зростання середньогрупової частоти аберантних метафаз до $(23,53 \pm 1,67) \%$ та аберацій хромосом до $26,05 \pm 1,81$ на 100 метафаз з розкидом індивідуальних коливань в межах 20,26–24,67 % та 22,11–32,67 на 100 метафаз, відповідно. Суттєво розширився спектр радіоіндукованих хромосомних порушень. Серед пошкоджень хромосом значно переважали аберації хромосомного типу, що характерно для хромосомного мутагенезу при дії іонізуючого випромінювання на G0 стадії мітотичного циклу: вільні парні фрагменти та ацентричні кільця (із сумарною частотою $8,83 \pm 1,05$ на 100 метафаз); дицентрики, центричні кільця та аномальні моноцентрики ($12,25 \pm 0,67$; $2,55 \pm 0,66$; $1,06 \pm 0,60$ на 100 метафаз,

insertions) types, which probably can be recognized with use of the group karyotyping of uniformly stained slides of metaphase chromosomes [10].

To investigate the effects of astaxanthin *in vitro* usage «Comet assay» the whole blood (~ 3 ml from each person) was cultivated by accepted semi-micromethod. Lymphocytes were incubated in culture medium RPMI 1640 with L-glutamine (Sigma, USA), PHA (Difco-P, USA) and astaxanthin in concentration 20.0 µg/ml within 48 hours. The cultural mixture was centrifuged during 10 min at 1000 rev/min. Top layer above the sediment cells (0.75 µl) was removed and the processing was performed according to the classical protocol. For visualization of the results the slides were stained by DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) in concentration 2 µg/ml immediately after electrophoresis without fixing of slides. Analysis of the results was carried out under the fluorescent microscope to which was attached camera Canon D1000. On photographs the number of fourth grade's nucleoids that correspond to apoptotic state cells per 200 individual nucleoids (ie. «comets») was counted. Images were analyzed using the program «Comet Score» (TriTek Corp) [13–15].

RESULTS AND DISCUSSION

As a result of the research was determined that background mean-group frequencies of aberrant metaphases and chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes was 2.46 ± 0.30 per 100 cells with varying from 1.33 to 3.02 per 100 metaphases. Chromosome damages were represented mainly by single and double acentric fragments (1.60 ± 0.28 and 0.97 ± 0.22 per 100 metaphases, respectively).

In experiments with radiation exposure was established increase in the frequency of aberrant metaphases to $(23.53 \pm 1.67) \%$ and chromosome aberrations to 26.05 ± 1.81 per 100 metaphases with scatter of individual fluctuations in the range 20.26–24.67 % and 22.11–32.67 per 100 metaphases, respectively. Significantly was expanded the spectrum of radiation induced chromosomal disorders. Aberrations of chromosome type was dominated among the chromosome damages which is typical for chromosomal mutagenesis under ionizing radiation exposure in G0 phase of the mitotic cycle – free double fragments and acentric rings (with a total frequency 8.83 ± 1.05 per 100 metaphases); dicentric, centric rings and abnormal monocentrics ($12.25 \pm$

відповідно) (Рис. 1, 2). Рівень аберацій хроматидного типу ($1,61 \pm 0,30$ на 100 метафаз), що були представлені тільки одиночними ацентричними фрагментами, не змінився порівняно з їх фоновим значенням.

0.67, 2.55 ± 0.66 , 1.06 ± 0.60 per 100 metaphases, respectively) (Figure 1, 2). Level of chromatid type aberrations (1.61 ± 0.30 per 100 metaphases), which were presented only by single acentric fragments, unchanged compared with their background value.

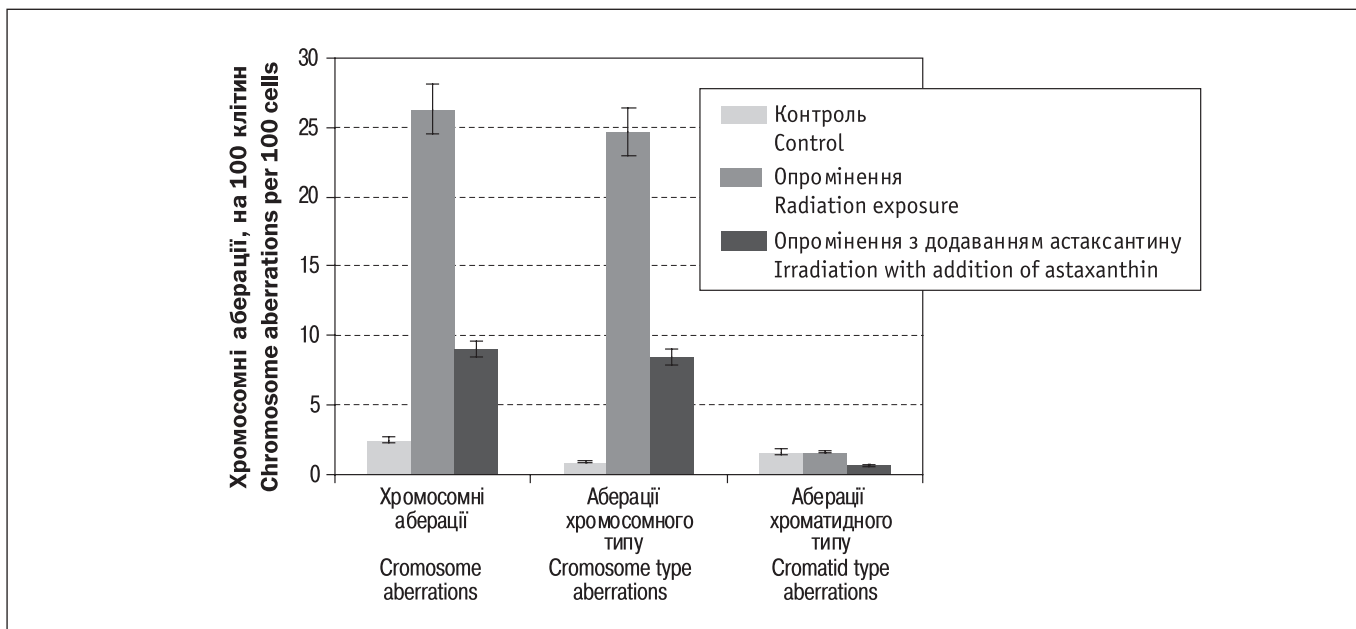


Рисунок 1. Зміна радіаційно-індукованої частоти та типів аберацій хромосом під дією іонізуючого опромінення в дозі 1,0 Гр та астаξανтину в концентрації 20,0 мкг/мл

Figure 1. Changing the radiation-induced frequency and types of chromosome aberrations under the influence of ionizing radiation in dose 1.0 Gy and astaxanthin in concentration 20.0 µg/ml

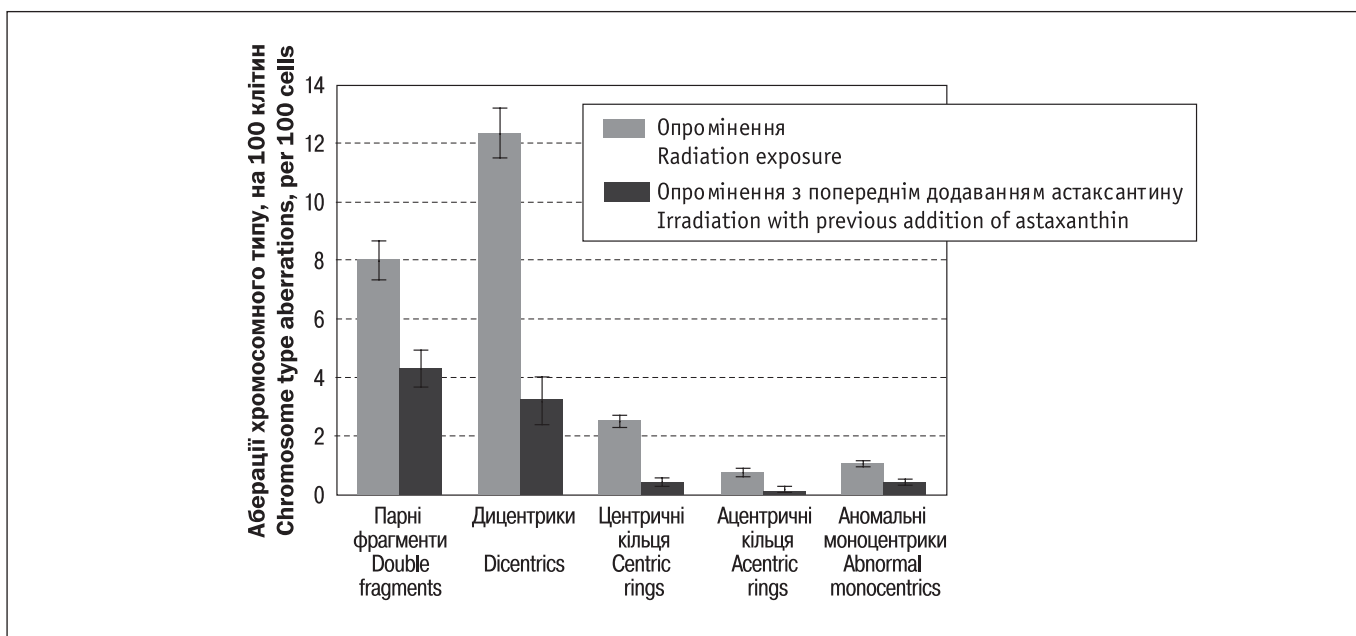


Рисунок 2. Порівняння частот аберацій хромосомного типу в лімфоцитах периферичної крові людини при окремій дії іонізуючого опромінення в дозі 1,0 Гр і сумісній дії іонізуючого випромінювання та астаξανтину в концентрації 20,0 мкг/мл

Figure 2. Comparison the frequency of chromosome type aberrations in human peripheral blood lymphocytes with separate exposure of ionizing radiation in dose 1.0 Gy and combined action of ionizing radiation with astaxanthin in concentration 20.0 µg/ml

Дія астаксантину на опромінені лімфоцити *in vitro* призвела до суттєвого зменшення (~на 68 %) середньогрупового радіоіндукованого цитогенетичного ефекту - частоти аберантних клітин (до $8,04 \pm 0,88$ %) та аберацій хромосом (до $8,40 \pm 0,90$ на 100 метафаз) за рахунок вірогідного ($p < 0,001$) зниження рівня класичних нестабільних цитогенетичних маркерів радіаційного впливу – дицентричних та кільцевих хромосом (до $3,26 \pm 0,78$ та $0,33 \pm 0,18$ на 100 метафаз, відповідно), а також сумарної частоти вільних парних фрагментів і ацентричних кілець (до $4,49 \pm 0,82$ на 100 метафаз) (Рис. 1, 2).

Частота аномальних моноцентриків ($0,31 \pm 0,15$ на 100 метафаз), які є стабільними цитогенетичними маркерами дії іонізуючого випромінювання, а також рівень одиночних ацентричних фрагментів ($0,62 \pm 0,21$ на 100 метафаз), які вважаються індикаторами хромосомної нестабільності, виявляли тенденцію до зниження.

Таким чином, результати цитогенетичних досліджень підтвердили статистично значуще ослаблення за допомогою астаксантину радіаційно-індукованого хромосомного мутагенезу в соматичних клітинах людини.

При використанні методу електрофорезу окремих клітин («Comet assay») після додавання астаксантину в концентрації 20,0 мкг/мл перед опроміненням в дозі 1,0 Гр встановили зростання частоти комет 4-го класу («атипових комет»), які відповідають апоптичному стану клітини [15]. Зі збільшенням тривалості культивування опромінених культур виявили зростання частоти апоптозів з $0,79 \pm 0,08$ на 100 клітин

Effects of astaxanthin *in vitro* on exposed cells resulted in significant decrease (by ~ 68 %) of mean-group radiation-induced cytogenetic effect - the frequency of aberrant cells (up to 8.04 ± 0.88 %) and chromosome aberrations (up to 8.40 ± 0.90 per 100 metaphases) (Figure 1), due to significant ($p < 0.001$) decline the level of classic unstable cytogenetic markers of radiation exposure – dicentric and ring chromosomes (up to 3.26 ± 0.78 and 0.33 ± 0.18 per 100 metaphases, respectively), and total frequency of free double fragments and acentric rings (up to 4.49 ± 0.82 per 100 metaphases) (Figure 2).

The frequency of abnormal monocentrics (0.31 ± 0.15 per 100 metaphases) which are stable cytogenetic markers of radiation exposure, as well as the level of single acentric fragments (0.62 ± 0.21 per 100 metaphases) that are considered as indicators of chromosomal instability showed a tendency to decrease.

Thus, the results of cytogenetic studies show a statistically significant reduction by astaxanthin the radiation-induced chromosome mutagenesis in human somatic cells.

With the help of electrophoresis of individual cells («Comet assay») after adding the astaxanthin in concentration 20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ prior to irradiation in dose 1.0 Gy a growth the frequency of 4th class comets («atypical comets») that corresponded the apoptotic state of cells was revealed [15]. With increasing duration of incubation the irradiated cultures increased the incidence of apoptosis – from 0.79 ± 0.08 per 100

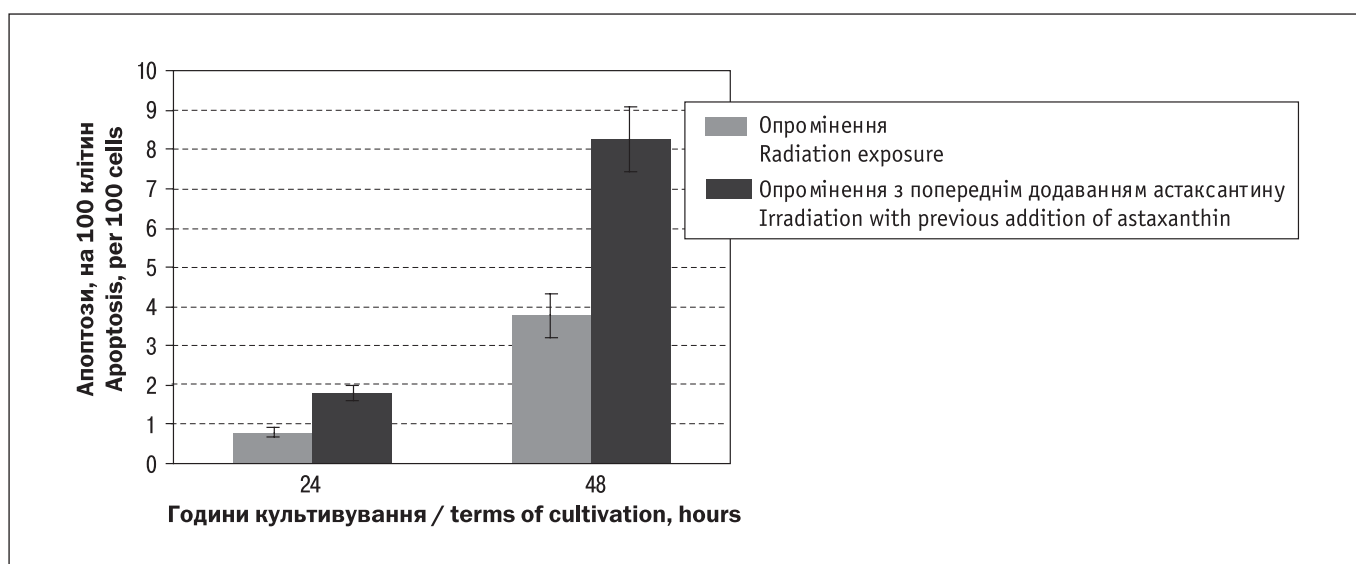


Рисунок 3. Зміна кількості апоптозів в лімфоцитах, опроміненних в дозі 1,0 Гр при попередньому застосуванні астаксантину в концентрації 20,0 мкг/мл

Figure 3. Changing the frequency of apoptosis in lymphocytes exposed to radiation in dose 1.0 Gy and previous use of astaxanthin in concentration of 20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$

через 24 години до $3,78 \pm 0,24$ на 100 клітин на 48-й годині культивування. При додаванні астаксантину перед опроміненням спостерігали суттєве зростання частоти атипичних комет, який досягав максимуму на 48-й годині культивування ($8,26 \pm 0,91$ на 100 клітин), що може свідчити про активацію внутрішнь-оклітинних супресорних систем за безпосередньою участю астаксантину (Рис. 3).

ВИСНОВКИ

Отримані результати показали спроможність астаксантину суттєво ослаблювати чутливість лімфоцитів периферичної крові людини до мутагенної дії іонізуючого випромінювання *in vitro* за цитогенетичними критеріями, що свідчить про його потужний радіопротекторний потенціал.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Naguib Y. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids / Y. Naguib // *Agric. Food Chem.* - 2000. - Vol. 48. - P. 1150-1154.
2. Guerin M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition / M. Guerin, M. E. Huntley, M. Olaizola // *Trends Biotechnol.* - 2003. - Vol. 21. - P. 210-216.
3. Yasuhiro N. Quenching activities of common hydrophilic and lipophilic antioxidants against singlet oxygen using chemiluminescence detection system / N. Yasuhiro, Y. Eiji, M. Wataru // *Carotenoid Science.* - 2007. - Vol. 121. - P. 116-120.
4. Effective inhibition of skin cancer, tyrosinase, and antioxidative properties by astaxanthin and astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis* / Rao A. Ranga, H. Sindhuja, S. Dharmesh, K. Sankar, R. Sarada, G. Ravishankar // *J. Agric. Food Chem.* - 2013. - Vol. 61. - P. 3842-3851.
5. In vivo bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from micro algal biomass-A repeated dose study / Rao A. Ranga, V. Baskaran, R. Sarada, G. Ravishankar // *Food Res. Int.* - 2013. - Vol. 54. - P. 711-717.
6. Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* / B. Kamath, B. Srikanta, S. Dharmesh, R. Sarada, G. Ravishankar // *Eur. J. Pharmacol.* - 2008. - Vol. 590. - P. 387-395.
7. Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress / H. Kurihara, H. Koda, S. Asami, Y. Kiso, T. Tanaka // *Life Sci.* - 2002. - Vol. 70. - P. 2509-2520.
8. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin / S. Goto, K. Kogure, Y. Abe, E. Kimata, H. Yamashita, K. Terada // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2001. - Vol. 1512. - P. 251-258.
9. Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies. - Vienna: International atomic energy agency, 2011. - 229 p.
10. Хромосомы человека: атлас / А. Ф. Захаров, В. А. Бенюш, Н. П. Кулешов, Л. И. Барановская. - М. : Медицина, 1982. - 263 с.

cells following 24 hours till 3.78 ± 0.24 per 100 cells in 48 hours of cultivation. Under adding of astaxanthin before radiation exposure subsequent significant increase in the incidence of atypical comets was observed, that reached maximum in 48 hours of cultivation (8.26 ± 0.91 per 100 cells) (Figure 3), which may denote the activation of intracellular suppressor system with the direct participation of astaxanthin.

CONCLUSIONS

The results showed the ability of astaxanthin to weakening the response of sensitivity the human peripheral blood lymphocytes on mutagenic exposure of ionizing radiation according cytogenetic criteria, which testify its strong radioprotective potential.

REFERENCES

1. Naguib Y. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Agric Food Chem.* 2000;48:1150-4.
2. Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* 2003;21:210-6.
3. Yasuhiro N, Eiji Y, Wataru M. Quenching activities of common hydrophilic and lipophilic antioxidants against singlet oxygen using chemiluminescence detection system. *Carotenoid Science.* 2007;121:116-20.
4. Ranga RA, Sindhuja H, Dharmesh S, Sankar K, Sarada R, Ravishankar G. Effective inhibition of skin cancer, tyrosinase, and antioxidative properties by astaxanthin and astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *J Agric Food Chem.* 2013;61:3842-51.
5. Ranga RA, Baskaran V, Sarada R, Ravishankar G. In vivo bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from micro algal biomass - a repeated dose study. *Food Res Int.* 2013;54:711-7.
6. Kamath B, Srikanta B, Dharmesh S, Sarada R, Ravishankar G. Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Eur J Pharmacol.* 2008;590:387-95.
7. Kurihara H, Koda H, Asami S, Kiso Y, Tanaka T. Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress. *Life Sci.* 2002;70:2509-20.
8. Goto S, Kogure K, Abe Y, Kimata E, Yamashita H, Terada K. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1512:251-8.
9. Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies. Vienna: International atomic energy agency; 2011. 229 p.

11. Педан Л. Р. Оцінка стабільності хромосом лімфоцитів периферичної крові осіб, постраждалих від дії факторів Чорнобильської аварії, за допомогою тестуючого мутагенного навантаження *in vitro* / Л. Р. Педан, М. А. Пілінська // Доповіді Національної Академії наук України. - 2004. - № 5. - С. 175-179.
12. Дія астаксантину на рівень радіаційно-індукованих аберацій хромосом в лімфоцитах периферичної крові людини *in vitro* / М. А. Пілінська, Д. А. Курінний, С. Р. Рушковський, О. Б. Дибська // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. - Київ, 2016. - Т. 14, № 1.- С. 52-57
13. Olive P. L. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. / P. L. Olive, J. P. Banath // Nature protocols. - 2006. - Vol. 1, № 1 - P. 23-29. -doi:10.1038/nprot.2006.5.
14. DNA loop domain organization as revealed by single - cell gel electrophoresis. / K. Afanasieva, M. Chopei, M. Zazhytska, M. Vikhrev, A. Sivolob // Biochim. Biophys. Acta. - 2013. - Vol. 1833. - P. 3237-3244.
15. Liao W. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells / W. Liao, M. A. McNut, W.-G. Zhu // Methods. - 2009. - Vol. 48, no. 1. - P. 46-53.
10. Zakharov AF, Benyush VA, Kuleshov NP, Baranovskaya LI. [Human chromosomes: atlas]. Moscow: Meditsina; 1982. 263 p. Russian.
11. Pedan LR, Pilinska MA. [Assessment of the stability of chromosomes of peripheral blood lymphocytes of people affected by the factors of the Chernobyl accident, through testing mutagenic burden *in vitro*]. Dopovidi Natsionalnoi Akademii Nauk Ukrainy; 2004(5):175-9. Ukrainian.
12. Pilinska MA, Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Dybska OB. [The impact of astaxanthin on radiation-induced chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*]. Visnyk ukrainskoho tovarystva genetykiv-selektioneriv. 2016;14(1):52-7. Ukrainian.
13. Olive PL, Banath JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. Nature protocols. 2006;1(1):23-9. doi:10.1038/nprot.2006.5.
14. Afanasieva K, Chopei M, Zazhytska M, Vikhrev M, Sivolob A. DNA loop domain organization as revealed by single - cell gel electrophoresis. Biochim Biophys Acta. 2013;1833:3237-44.
15. Liao W, McNut MA, Zhu W-G. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. Methods. 2009;48:46-53.

Стаття надійшла до редакції 29.07.2016

Received: 29.07.2016