

УДК. 575.224.6: 631.417.2: 575.224.4

## МОДИФІКУЮЧИЙ ВПЛИВ ГУМАТУ НАТРІЮ НА ГЕНОТОКСИЧНІСТЬ, ІНДУКОВАНУ МІТОМІЦИНОМ С

В. М. ШКАРУПА

ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»

Україна, 04050, м.Київ, вул. Мельникова, 53

e-mail: Shkarupa\_vlad@bigmir.net

**Мета.** Досліджені потенціальні антимуутагенні ефекти гумату натрію щодо генотоксичності, індукованої мітоміцином С (МС) в *Allium*-тесті. **Методи.** Гумат натрію був протестований у концентрації 100 мг/л окремо або після 72-годинної експозиції з 0,025 мг/л МС при додаванні до насіння *Allium* сера L. Антикластогенну дію визначали за здатністю зменшувати рівень хромосомних пошкоджень, підраховуючи аберантні анателофази в клітинах корінців. **Результати.** При дії МС спостерігали інгібування мітотичної активності, дезінтеграцію пулів мітотичних клітин, збільшення частоти аберантних клітин ( $21,92 \pm 1,08$  % порівняно з  $1,94 \pm 0,09$  % в контролі). Гумат натрію інгібував мітотоксичність МС та на 62,45 % зменшував частоту аберантних клітин, індукованих мутагеном. **Висновки.** Гумат натрію проявляє антимуутагенні властивості щодо цитогенетичних ефектів, індукованих мітоміцином С в *Allium*-тесті.

**Ключові слова:** гумат натрію, антимуутагенез, *Allium*-тест.

**Вступ.** В умовах зростаючого антропогенного забруднення довкілля генотоксикантами антимуутагени розглядаються як фактори, що поліпшують якість життя та знижують ризик захворювань, в етіології та патогенезі яких головну роль відіграє мутаційний компонент [1, 2]. Важливим напрямком в дослідженнях з антимуутагенезу є пошук агентів, здатних зменшувати рівень генетичних ушкоджень при застосуванні лікарських препаратів з мутагенними властивостями за життєвими показниками без значного інгібування їхніх терапевтичних ефектів [3]. Однією з передумов цього є те, що для деяких антимуутагенів притаманні множинність механізмів дії, адаптогенні властивості. Тому акцент в пошуку антимуутагенів останнім часом зміщується у напрямку дослідження природних, часто комплексних, біологічно активних сполук, здатних підвищувати захисний потенціал організму.

Гумінові речовини, зокрема їх біологічно активні форми у вигляді солей гумінових кислот, є добре відомими природними адаптогенами з широким спектром фізіологічної активності, яка реалізується стимулюючим впливом на процеси синтезу нуклеїнових кислот, білка, стан рибосомного апарату, мітотичну активність, експресію генів і обмін речовин. Показана участь гумінових речовин у детоксикації пестицидів, важких металів, радіонуклідів, стимуляції процесів росту рослин і тварин, радіоадаптивній відповіді організму, виявлено їхні імуностимулюючі ефекти [4–9]. Унікальні властивості гумінових речовин обумовили широкий спектр їх застосування: від аграрної промисловості до медицини і нанотехнологій [10–12]. Використання препаратів на основі фізіологіч-

но активних гумінових речовини при лікуванні ревматичних та інфекційних захворювань не вичерпує їхнього фармакологічного потенціалу. На сьогодні виявлено цілий ряд властивостей гумінових та гуміноподібних речовин, які дозволяють значно розширити спектр їх можливого використання в медицині [12–14].

Раніше нами виявлено генопротекторні властивості гумату натрію щодо цитогенетичних ефектів, індукованих прооксидантним антибіотиком – діоксидином [15]. Метою данної роботи було дослідження особливостей модифікуючого впливу гумату натрію на цитогенетичні ефекти, індуковані алкілувальним протипухлинним цитостатиком – мітоміцином С в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa* L.

### Матеріали і методи

Як модельну систему використовували кореневу меристему проростків насіння *Allium cepa* L. Досліджували вплив гумату натрію (100 мг/л) на цитогенетичні ефекти, індуковані мітоміцином С (0,025 мг/л), при одночасній експозиції мутагену з модифікатором протягом 72 годин. Вибір концентрації гумату натрію базувався на результатах попередніх досліджень [15]. Раніше визначено ефективну діючу концентрацію мітоміцину С в *Allium*-тесті – 0,025 мг/л, при якій індукується  $\approx 20$ –25 % аберантних клітин, що збігається з рекомендованим для модельних мутагенів діапазоном мутагенності [16, 17]. При цьому

не відбувається значного інгібування мітотичної активності, що дозволяє отримати адекватні результати.

Цитогенетичні ефекти досліджували в ана-телофазі першого поділу меристематичних клітин. Для оцінки модифікації генотоксичних ефектів застосовували такі цитогенетичні параметри рослинної тест-системи: мітотичний індекс (МІ, ‰), розподіл клітин за фазами мітозу, частота аберантних ана-телофаз (ЧАА, ‰). Ефективність дії гумату натрію оцінювали за редукційним фактором (РФ), який характеризує ступінь пригнічення індукованого мутагенезу під впливом модифікатора:

$$РФ = \frac{M - (AM + M)}{M} \cdot 100\%,$$

де М – частота аберантних ана-телофаз, індукованих мутагеном; АМ + М – частота аберантних ана-телофаз при комбінованій дії мутагену і модифікатора. Статистичну значущість відмінностей оцінювали за критерієм  $\chi^2$ .

### Результати та обговорення

Результати досліджень модифікуючого впливу гумату натрію на частоту аберантних клітин, індукованих мітоміцином С, наведено в табл. 1.

Одночасна довготривала експозиція гумату натрію з МС призводить до вірогідного ( $p < 0,05$ ) зменшення кластогенної активності останнього. При цьому повного інгібування мутагенності МС не відбувається – частота індукованих МС аберант-

Таблиця 1. Антикластогенний ефект гумату натрію щодо мутагенності мітоміцину С

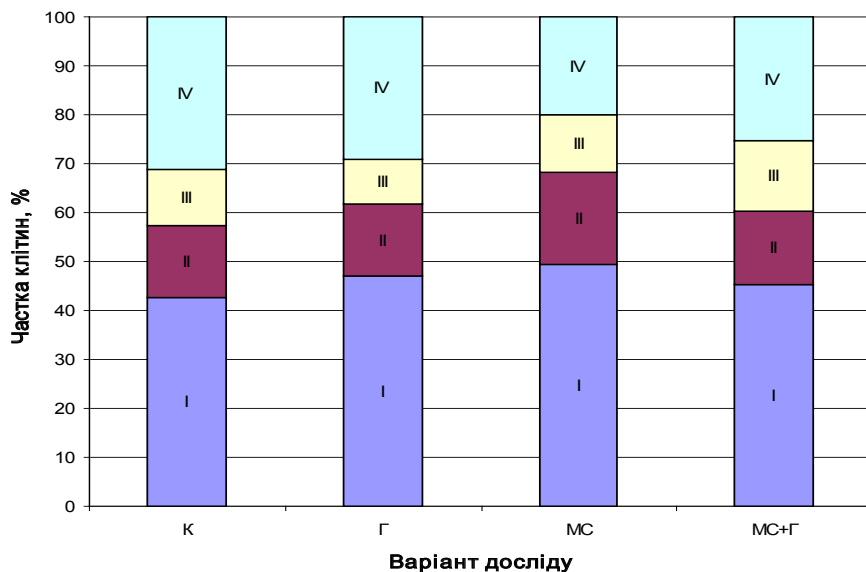
Варіант дослідю	Всього ана-телофаз, <i>n</i>	Аберантних ана-телофаз, <i>n</i>	ЧАА $\pm$ Sp, %	РФ, %
контроль	1903	37	1,94 $\pm$ 0,09	–
гумат натрію, 100 мг/л	2388	47	1,97 $\pm$ 0,21	–
мітоміцин С, 0,025 мг/л	1460	320	21,92 $\pm$ 1,08	–
мітоміцин С, 0,025 мг/л + гумат натрію, 100 мг/л	668	55	8,23 $\pm$ 1,06*	62,45

\*  $p < 0,05$ , порівняно з варіантом експозиції тільки з мутагеном.

**Таблиця 2.** Модифікуючий вплив гумату натрію на значення мітотичного індексу в клітинах кореневої меристеми *Allium sera* L.

Варіант досліджу	Проаналізовано клітин:		MI, ‰
	всього	з них мітотичних	
контроль	9351	890	95,2±1,0
гумат натрію, 100 мг/л	9102	1090	119,8±2,0*
мітоміцин С, 0,025 мг/л	5325	355	66,7±3,4
мітоміцин С, 0,025 мг/л + гумат натрію, 100 мг/л	5789	517	89,3±3,8**

\*  $p < 0,05$ , порівняно з контролем; \*\*  $p < 0,05$ , порівняно з варіантом експозиції тільки з мутагеном.



**Рисунок.** Розподіл клітин *Allium sera* L. за фазами мітозу: К – контроль; Г – експозиція з гуматом натрію; МС – експозиція з мітоміцином С; МС+Г – одночасна експозиція з мітоміцином С та гуматом натрію; I – профаза, II – метафаза, III – анафаза, IV – телофаза

них ана-телофаз зменшується на 62,45 % (з 21,92±1,08 % при окремій дії мутагену до 8,23±1,06 % при одночасній дії мутагену з гуматом натрію). Враховуючи отримані результати, а також результати попередніх досліджень, в яких було виявлено зменшення кластогенної активності діоксидину під впливом гумату натрію на 50,29 % [15], та відповідно до критеріїв кількісної оцінки ефективності антимутагенів [17] гумат натрію можна віднести до антимутагенів середньої ефективності.

Слід зазначити, що ефекти гумату натрію супроводжуються також модифікацією мітотичної активності клітин кореневої меристеми *Allium sera* L. В табл. 2 наведено показники MI в різних варіантах досліджу. Експозиція насіння з розчином гумату натрію призводила до вірогідного, порівняно з контролем, збільшення MI (119,8±2,0 ‰ та 95,2±1,0 ‰ відповідно). Цитогенетична дія мітоміцину С, навпаки, характеризується деяким пригніченням мітотичної активності, MI при цьому на 30 % вірогідно ( $p < 0,05$ ) менший, ніж в

контролі ( $66,7 \pm 3,4$  ‰ та  $95,2 \pm 1,0$  ‰ відповідно). Одночасна експозиція гумату натрію з мітоміцином С призводить до вірогідного зменшення мітотоксичності мутагену ( $89,3 \pm 3,8$  ‰ та  $66,7 \pm 3,4$  ‰ відповідно).

Цитогенетична дія мітоміцину С характеризується також дезінтеграцією пулів мітотичних клітин, зокрема збільшенням частки клітин на стадіях профази та метафази. Під впливом гумату натрію відбувається нормалізація співвідношення клітин на різних стадіях мітозу (рисунок).

### **Висновки**

Таким чином, модифікуючий вплив гумату натрію щодо цитогенетичних ефектів мітоміцину С характеризується зменшенням частоти аберантних клітин, індукованих мутагеном, на  $62,45$  %. Антикласогенна активність гумату натрію супроводжується нормалізуючим впливом на процеси мітотичної активності, пригнічення яких спостерігається при окремій дії мутагену.

### **Перелік літератури**

1. *Барилляк І.Р.* Проблеми екогенетики в Україні // Вісн. Укр. т-ва генет. і селек. – 2005. – Т.3, № 1–2. – С. 223–224.
2. *Дворник А.С., Перерва Т.П., Кунах В.А.* Антимутагенез як система захисту організму від ушкоджуючих факторів ендогенного та екзогенного походження // Цитологія і генетика. – 2004. – Т. 38, № 5. – С. 62–71.
3. *Дурнев А.Д.* Модифікація мутаційного процесу в клітках людини // Вестник РАМН. – 2001. – № 10. – С. 70–76.
4. *Горовая А.И., Орлов Д.С., Щербенко О.В.* Гуминовые вещества. – К., 1995. – 303 с.
5. *Исследование* связывающей способности модифицированных гуминовых препаратов по отношению к пирену в гомогенной и гетерогенной фазах / Н.Ю. Гречищева, Х. Пань, Г.С. Будылин, И.В. Перминова, С.В. Мещеряков // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2011. – № 6. – С.24–29.
6. *Генотоксические* эффекты кадмия и свинца и модифицирующее влияние гумата калия при выращивании пшеницы в почве, загрязнен-

ной тяжелыми металлами / Н.С. Степанчикова, Л.Н. Ульяненко, А.С. Филипас, С.В. Круглов // Сельскохозяйственная биология. – 2008. – № 5. – С. 28–32.

7. *Radionuclide* Diagnostics of Hydrophobicity and Surface Activity of Humic Substances / G.A. Baidun, M.G. Chernysheva, A.I. Konstantinova, N.A. Kulikova, I.V. Perminova // Advances in natural organic matter and humic substances research 2008–2010, XV Meeting of the International Humic Substances Society, Puerto de la Cruz, Tenerife, Canary Islands, 27 June – 2 July 2010. Proceeding, Vol. 2. – P. 155–157.
8. *Влияние* гумата калия на накопление  $^{137}\text{Cs}$  ячменем при выращивании растений на почве с различной обеспеченностью элементами минерального питания / Л.Н. Ульяненко, С.В. Круглов, А.С. Филипас, А.В. Маркина, Н.Н. Лой, С.П. Арышева, Н.С. Степанчикова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2008. – Т. 48, №1. – С.110–116.
9. *Joone G.K., Dekker J., van Rensburg C.E.* Investigation of the immunostimulatory properties of oxihumate // Z. Naturforsch. – 2003. – Vol. 58, № 3–4. – P. 263–267.
10. *Pena-Mendez E.M., Havel J., Patočka J.* Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine // J. Appl. Biomed. – 2005. – № 3. – P. 13–24.
11. *Дизайн* адгезионных гуминовых полимеров и их самосборка в биосовместимые нанопокрyтия / И.В. Перминова, Л.А. Карпюк, Н.С. Щербина, А.Б. Воликов, С.А. Пономаренко, А.М. Музафаров, В.А. Холодов, К. Хатфилд // Матер. междунар. конфер. «Руснанотех-2009», М., 2009. – С. 521–523.
12. *Klöcking R., Helbig B.* Medical aspects and applications of humic substances / Biopolymers for medical and pharmaceutical applications. – Weinheim. – 2005. – P. 3–15.
13. *Kornilaeva G.V., Perminova I.V., Karamov E.V.* Humic substances as active anti-HIV components for microbicides // Abstract Book of the First International Conference on Humics-based Innovative Technologies «Natural and Synthetic Polyfunctional Compounds and Nanomaterials in Medicine and Biomedical Technologies», November 4–8, 2010, Lomonosov Moscow State University, Moscow. – 2010. – P. 27.
14. *Humic acid* induces apoptosis in human premyelocytic leukemia HL-60 cells / H.-L. Yang, Y.-C. Hseu, Y.-T. Hseu, F.-J. Lu, E. Lin, J.-S. Lai // Life Sciences. – 2004. – Vol. 75, № 15. – P. 1817–1831.

15. Шкарупа В.М., Бариляк І.Р., Неумержицька Л.В., Гуменюк І.Д. Генопротекторний ефект гумату натрію за умов індукованого оксидантного стресу // Цитологія і генетика. – 2010. – Т. 44, № 1. – С. 54–56.
16. Шкарупа В.М., Бариляк І.Р. Кількісний аналіз цитогенетичних ефектів, індукованих митоміцином С. Характеристика дозових залежностей // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2008. – Т. 6, № 1. – С. 157–165.
17. Семенов В.В., Студенцова І.А. Количественные и качественные критерии оценки эффективности антимуагенов в эксперименте // Вестн. РАМН. – 1993. – № 3. – С. 16–20.

Представлено Л.Л. Лукаш  
Надійшла 20.03.2012

#### МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ГУМАТА НАТРИЯ НА ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ, ИНДУЦИРОВАННУЮ МИТОМИЦИНОМ С

В.Н. Шкарупа

ГУ «Национальный научный центр радиационной  
медицины НАМН Украины»  
Украина, 04050, г. Киев, ул. Мельникова, 53  
e-mail: Shkarupa\_vlad@bigmir.net

**Цель.** Исследованы потенциальные антимуагенные эффекты гумата натрия на генотоксичность, индуцированную митомыцином С в *Allium*-тесте. **Методы.** Гумат натрия был протестирован в концентрации 100 мг/л при отдельной или совместной с митомыцином С (МС) 72-часовой экспозиции при добавлении к семенам *Allium cepa* L. Антикластогенное действие определяли по способности уменьшать уровень хромосомных повреждений при подсчете aberrантных ана-телофаз в клетках корешков. **Результаты.** При действии МС наблюдали ингибирование митотической активности, дезинтеграцию пулов митотических клеток, увеличение частоты aberrантных клеток ( $21,92 \pm 1,08\%$  по сравнению с  $1,94 \pm 0,09\%$  в контроле). Гумат натрия ингибировал митотоксичность МС и на 62,45 % уменьшал час-

тоту aberrантных клеток, индуцированных муагеном. **Выводы.** Гумат натрия проявляет антимуагенные свойства по отношению к цитогенетическим эффектам, индуцированных митомыцином С в *Allium*-тесте.

**Ключевые слова:** гумат натрия, антимуагенез, *Allium*-тест.

#### MODIFYING INFLUENCE OF SODIUM HUMATE ON GENOTOXICITY INDUCED BY MITOMYCIN C

V.M. Shkarupa

National Scientific Center for Radiation Medicine  
of National Academy of Medical Sciences  
of Ukraine  
Ukraine, 04050, Kyiv, 53 Melnikova str.  
e-mail: Shkarupa\_vlad@bigmir.net

**Aim.** To investigate the potential antimutagenic effects of a sodium humate on genotoxicity induced by mitomycin C (MC) in *Allium*-test. **Methods.** Sodium humate has been tested at concentration of 100 mg l<sup>-1</sup>, either alone or after 72-hour interaction with 0,025 mg l<sup>-1</sup> of MC by addition to the *Allium cepa* L. seeds. Anticlastogenicity action defined as the capacity for minimizing chromosome breakages, was evaluated by counting aberrant ana-telophases (AAT) in root-tip cells. **Results.** Upon action of a MC inhibition of mitotic activity, decomposition of mitotic cell pools, increase in aberrant cells frequency ( $21,92 \pm 1,08\%$  in comparison with  $1,94 \pm 0,09\%$  in the control) were observed. Sodium humate completely inhibited mitotoxic influence of MC, and by 62,45 % reduced frequency of aberrant cells induced by mutagen. **Conclusions.** Sodium humate seems to display antimutagenic characteristics in relation to cytogenetic effects, induced by mitomycin C in *Allium*-test.

**Key words:** sodium humate, antimutagenesis, *Allium*-test.