

**АНТИМУТАГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ ЛІГНОГУМАТУ НАТРІЯ ЩОДО КЛАСТОГЕННИХ
ЕФЕКТІВ ІНДУКОВАНИХ ТІОФОСФАМІДОМ В *ALLIUM*-ТЕСТІ**

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова (м. Вінниця)

Shkarupa_vlad@bigmir.net

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота є фрагментом НДР «Дослідження антимутагенної та радіопротекторної дії деяких гумінових речовин різного походження» (№ державної реєстрації 0108U000618).

Вступ. Гумінові речовини є широко відомими стимуляторами росту, які також проявляють детоксикаційні, адаптогенні, протизапальні, протипухлинні та ряд інших властивостей, що характеризують їх як біологічно активні, хоча механізми їх дії залишаються остаточно не з'ясованими [1-4]. Широкий спектр їх фізіологічної активності обумовив зацікавленість в дослідженні їх можливих антимутагенних властивостей. Виявлено генопротекторну активність гумінових сполук щодо дії ряду хімічних мутагенів та радіації [5-9]. Поряд з цим, гумати виявилися неефективними щодо мутагенності AF-2, 4-NQO, MN-NG [5].

Метою дослідження був аналіз впливу гумінового препарату лігногумату натрію на кластогенні ефекти, індуковані алкілуючим мутагеном тіофосфамідом в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa L.*

Об'єкт і методи дослідження. В якості тест-системи використовували клітини кореневої меристеми проростків насіння *Allium cepa L.* (вік насіння – 9 місяців). Насіння *Allium cepa L.* пророщували в розчинах лігногумату натрію (марка А, НПО РЕТ, РФ) – 100 мг/л, тіофосфаміду (Ленс ОOO, РФ) – 1 мг/л та при одночасній експозиції тіофосфаміду з гуміновим препаратом протягом 72 годин. В контролі – дистильована H_2O . Цитогенетичний аналіз проводили ана-тeloфазним методом в першому мітозі. Для оцінки кластогенних ефектів тіофосфаміду та їх модифікації лігногуматом натрію використовували наступні параметри: частота аберантних ана-тeloфаз (ЧАА, %), частота абераций хромосом (кількість абераций/100 клітин), частота мультиаберантних клітин (МАК) %, по клітинний розподіл абераций, спектр абераций, співвідношення «мостів» і фрагментів. Ана-тeloфазним методом важко або неможливо розрізнити типи абераций в клітинах з більше, ніж 6-ма аберациями, тому до МАК відносили такі, що містять 6 або більше абераций (в т. ч. клітини з невизначеними множинними аберациями, в яких при розрахунку загальної кількості абераций умовно приймали їх кількість за 6). Ефективність дії лігногумату натрію оцінювали за показником редукційний фактор (РФ), який характеризує ступінь пригнічення індукованого мутагенезу під впливом модифікатора. РФ розраховували за критеріями ЧАА (Φ_1) та частоти абераций (Φ_2):

$$\text{РФ} = (\text{M} - (\text{AM} + \text{M}) \cdot 100\%) / \text{M} \quad (1)$$

де М – ЧАА (для Φ_1) або частота абераций (для Φ_2) за дії мутагену; АМ + М – ЧАА або частота абераций за умов одночасної дії мутагену та антимутагену.

Статистичну значущість відмінностей цитогенетичних показників оцінювали за критерієм Фішера.

Результати дослідження та їх обговорення. Результати аналізу впливу лігногумату натрію на частоту аберантних клітин та абераций хромосом, індукованих тіофосфамідом, представлені в табл. 1.

Таблиця 1.

Модифікуючий вплив лігногумату натрію на рівень пошкоджень, індукованих тіофосфамідом в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa L.*

Тіофосфамід, мг/л	Лігногумат натрію, мг/л	ЧАА ± Sp, %	Φ_1 , %	Кількість абераций /100 клітин	Φ_2 , %
0	0	2,11 ± 0,54	–	2,25 ± 0,56	–
0	100	2,50 ± 0,64	–	2,50 ± 0,64	–
1,0	0	20,08 ± 1,82	–	27,12 ± 2,02	–
1,0	100	9,71 ± 1,29*	51,64	10,48 ± 1,34*	61,36

Примітка. *- $p < 0,0001$, порівняно з окремо дією мутагена.

Лігногумат натрію у використаній концентрації не спричиняє достовірних змін спонтанного рівня абераций хромосом у *Allium cepa L.* Виявлено антимутагенні властивості гумінового препарату щодо кластогенних ефектів тіофосфаміду – частота аберантних ана-тeloфаз, індукованих мутагеном при сумісній 72-годинній експозиції з лігногуматом натрію зменшується на 51,64 % ($p < 0,0001$), а частота абераций хромосом – на 61,36 % ($p < 0,0001$).

Значення частоти аберантних клітин і частоти абераций може мати різні чисельні значення, які обумовлені різним рівнем пошкодженості аберантної клітини, що, певним чином, відображає деякі аспекти механізмів як мутаційного процесу, так і його модифікації. Вплив гумінового препарату в наших експериментах призводить до зменшення рівня пошкодженості аберантної клітини, індукованого тіофосфамідом. При цьому значення показника Φ_2 , перевищує значення Φ_1 , тобто механізми модифікації лігногуматом натрію кластогенних ефектів тіофосфаміду призводять до більш ефективного зменшення частоти абераций, ніж аберантних клітин. Антимуватагенні ефекти, які обумовлюють різні варіанти співвідношення частоти аберантних клітин та частоти абераций можуть реалізовуватись, як на внутрішньоклітинному – хромосомному рівні, так і на рівні популяції клітин. На внутрішньоклітинному рівні, при репарації пошкоджень ДНК, в першому наближенні, можна вважати, що в клітинах з різною кількістю пошкоджень ДНК репарація відбувається як процес випадкових незалежних подій. Тобто кількість «подій» репарації буде рівномірно розподілятись серед мало пошкоджених та сильно пошкоджених клітин. При стимуляції репарації клітини, в яких мала б реалізуватися одна аберація можуть ставати неаберантними (переходять до класу клітин з 0 абераций), інші клітини, в яких мало б реалізуватись більша кількість абераций, залишаються аберантними, проте з мен-

шим числом реалізованих абераций хромосом. Частота аберантних клітин при цьому зменшується меншою мірою, ніж частота абераций. У випадку, коли процеси репарації відбуваються з різною інтенсивністю в клітинах з різним ступенем навантаження пошкодженнями ДНК будуть проявлятися протилежні закономірності співвідношення зменшення рівня частоти абераций і аберантних клітин. На рівні популяції клітин наявність та інтенсивність таких антимутагенних процесів як елімінація клітин з великою кількістю пошкоджень чи стимуляція репопуляції (коли при стимуляції вступу непошкоджених мутагенами клітин до поділу в популяції збільшується частка клітин із спонтанним рівнем мутагенезу, «розбавляючи» таким чином субпопуляцію аберантних клітин) також обумовлює особливості співвідношення зменшення рівня частоти абераций і аберантних клітин.

Зміни співвідношення показників частота аберантних клітин та загальна частота абераций є кінцевим проявом особливостей динаміки описаних вище процесів. Тому аналіз за двома показниками (частота абераций та частота аберантних клітин) є більш інформативним з точки зору дослідження можливих механізмів антимутагенезу, ніж за одним з них. Додатковими цитогенетичними критеріями для досліджень можливих механізмів антимутагенної дії є аналіз поклітинного розподілу абераций, спектру абераций, співвідношення різних типів абераций, співвідношення «мости»/фрагменти. Особливості розподілу абераций хромосом по клітинах при модифікації лігногуматом натрію мутагенезу, індукованого тіофосфамідом представлени в таблиці 2.

Сумісна пролонгована експозиція лігногумату натрію з тіофосфамідом призводить до зменшення частоти всіх типів клітин з різною кількістю абераций (порівняно з окремою дією мутагена). Привертає увагу повна елімінація МАК, індукованих тіофосфамідом під впливом гумінового препарату. Частково це пояснює більші значення показника РФ₂. Найбільш ймовірним механізмом елімінації сильно пошкоджених клітин під впливом лігногумату натрію може бути стимуляція апоптозу, що підтверджується результатами ряду досліджень, в яких показана активація апоптозу гуміновими речовинами в культурі клітин [10-11]. Проте, внаслідок незначної частоти МАК (0,83%) індукованих тіофосфамідом, їх елімінація

Таблиця 3.
Спектр абераций хромосом в клітинах *Allium cepa L.* при модифікації лігногуматом натрію мутагенезу, індукованого тіофосфамідом

Тіофосфамід, мг/л	Лігногумат натрію, мг/л	Хроматидні «мости», %, M±m	Хромосомні «мости», %, M±m	Одиночні фрагменти, %, M±m	Парні фрагменти, %, M±m	Кільцеві хромосоми, %, M±m	МАК, %, M±m
0	0	1,55±0,46	0,56± 0,28	0,14± 0,14	—	—	—
0	100	2,00± 0,57	—	0,33± 0,23	0,17± 0,17	—	—
1	0	14,29± 1,59	0,83± 0,41	10,56± 1,40	1,04± 0,46	0,41± 0,29	0,83± 0,41
1	100	8,95± 1,25*	0,19± 0,19	1,33± 0,50**	—	—	—

Примітка. * p = 0,01, порівняно з окремою дією мутагена; **- p < 0,0001, порівняно з окремою дією мутагена.

під впливом лігногумату натрію не може виступати в ролі основного антимутагенного механізму. Крім МАК, найбільш ефективно антимутагенний ефект лігногумату натрію проявляється щодо клітин з 2-ма аберациями – їх частка зменшується більш, ніж в 10 разів з 2,07 % до 0,19 %. Частка клітин з 1-єю та 3-ма аберациями під впливом лігногумату натрію зменшується в 1,8 та 2,2 рази, відповідно.

Особливості спектру абераций хромосом при індукованому тіофосфамідом мутагенезі та за умов його модифікації лігногуматом натрію представлені в таблиці 3. В цілому, вплив лігногумату натрію призводив до зменшення абераций всіх типів, проте, різною мірою. Частота абераций хроматидного та хромосомногого типу при дії тіофосфаміду становила 24,85±1,97 абераций /100 клітин та 2,28±0,68 абераций /100 клітин, відповідно. Сумісна експозиція лігногумату натрія з мутагеном призводила до зменшення частоти абераций хроматидного типу в 2,42 рази (p < 0,0001). Значно більш ефективно відбувалось зменшення частоти абераций хромосомногого типу – в 12 разів (p = 0,002). Проте, на сумарний антимутагенний ефект таке зменшення не мало сильного впливу внаслідок незначної частоти абераций цього типу, індукованих тіофосфамідом. Частота хроматидних «мостів» та хроматидних фрагментів зменшувалась в 1,6 (p = 0,01) та 7,9 (p < 0,0001) разів, відповідно.

Зменшення частоти хромосомні «мостів» мало недостатній рівень статистичної значущості (p = 0,19), що обумовлено низькою частотою абераций цього типу. Парні фрагменти та кільцеві хромосоми, які спостерігали в спектрі абераций хромосом, індукованих тіофосфамідом, після одночасної експозиції лігногумату натрію з мутагеном не були виявлені.

Порівняння співвідношення частоти «мостів» та фрагментів у ряду рослинних об'єктів (в т. ч. у *Allium*) дає можливість опосередковано судити про інтенсивність репаративних процесів. «Мости» утворюються внаслідок асиметричної транслокації при злитті центрічних фрагментів. Як було показано в роботі Дубініна М.П. та співавт., таке злиття є енергозалежним процесом [12]. Оскіль-

Поклітинний розподіл абераций хромосом при модифікації лігногуматом натрію мутагенезу, індукованого тіофосфамідом

Тіофосфамід, мг/л	Лігногумат натрію, мг/л	Кількість абераций в клітині						
		0	1	2	3	4	5	≥6
Кількість клітин з аберациями (%)								
0	0	97,89	1,97	0,14	0	0	0	0
0	100	97,5	2,50	0	0	0	0	0
1	0	79,91	16,77	2,07	0,41	0	0	0,83
1	100	90,29	9,33	0,19	0,19	0	0	0

ки утворення «мостів» в зазначеному дослідженні зростало на тлі зниження частоти аберрацій, автори розглядали переважання утворення «мостів» над фрагментами, як показник інтенсивності репарації. Подальші дослідження інших авторів, проведені на *Allium* підтвердили це припущення [13]. Результати аналізу співвідношення «мости» / фрагменти при модифікації лігногуматом натрію мутагенезу, індукованого тіофосфамідом представлени в **таблиці 4**.

Враховуючи, що аберрації хромосомного типу в ряді варіантів були представлені лише «мостами»

Таблиця 4.

Співвідношення «мости»/фрагменти при модифікації лігногуматом натрію мутагенезу, індукованого тіофосфамідом

Тіофосфамід, мг/л	0	0	1	1
Лігногумат натрію, мг/л	0	100	0	100
Співвідношення типів аберрацій:				
Всі «мости» / всі фрагменти	3,00	4,00	1,26	6,86
Хромосомні «мости» / хромосомні фрагменти	*	**	0,57	*
Хроматидні «мости» / хроматидні фрагменти	2,75	6,00	1,35	6,71

Примітка. * – аберрації хромосомного типу представлені лише «мостами»; ** – аберрації хромосомного типу представлені лише парними фрагментами.

або лише парними фрагментами, найбільш інформативним виявився показник співвідношення всі «мости» / всі фрагменти. При дії тіофосфаміду це співвідношення менше, ніж в контролі та при окремій дії лігногумату натрію – 1,26, 3,0 та 4,0 відповідно. Вплив лігногумату натрію при його одночасній експозиції з тіофосфамідом призводить до значного збільшення цього показника. який при цьому становить 6,86. Це опосередковано вказує на інтенсифікацію репаративних процесів як один з антимутагенних механізмів дії лігногумату натрію щодо кластогенних ефектів індукованих тіофосфамідом в *Allium*-тесті.

Висновки. Показано наявність антимутагенних властивостей у лігногумату натрія щодо кластогенних ефектів, індукованих тіофосфамідом в *Allium*-тесті. Зниження частоти аберантних клітин на 51,64 % та частоти аберрацій хромосом на 61,36 % дозволяє віднести цей гуміновий препарат до антимутагенів середньої ефективності. Виявлено множинність механізмів реалізації антимутагенних властивостей лігногумату натрію, серед яких може бути стимуляція репаративних процесів та апоптозу.

Перспективи подальших досліджень. Необхідні подальші дослідження механізмів за допомогою яких гумінові препарати різного походження здатні зменшувати рівень індукованого мітагенезу.

Література

1. Weber K, Chen Y, Jamroz E, Miano T. Preface: humic substances in the environment. Journal of Soils and Sediments. 2018;18(8):2665-7.
2. de Melo BAG, Motta FL, Santana MHA. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. Materials Science and Engineering. 2016;62:967-74.
3. Zhou XP, Zhang YC, Zhang SW, Ban WJ, Yu WF, Zhang Z. New progress in medical research of bio-humic acid. Applied Mechanics and Materials. 2012;138:1228-33.
4. Peña-Méndez EM, Havel J, Patočka J. Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. J. Appl. Biomed. 2005;3(1):13-24.
5. Sato T, Ose Y, Nagase H. Desmutagenic effect of humic acid. Mutat. Res. 1986;162(2):173-8.
6. Yildirim N, Agar G, Taspinar MS, Turan M, Aydin M, Arslan E. Protective role of humic acids against dicamba-induced genotoxicity and DNA methylation in Phaseolus vulgaris L. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science. 2014;64(2):141-8.
7. Shkarupa VN, Barilyak IR, Neumerzitskaya LV, Gumenyuk ID. The gene-protective effect of sodium humate under conditions of induced oxidative stress. Cytology and genetics. 2010;44(1):43-5.
8. Cozzi R, Nicolai M, Perticone P, De Salvia R, Spuntarelli F. Desmutagenic activity of natural humic acids: inhibition of mitomycin C and maleic hydrazide mutagenicity. Mutat. Res. 1993;299(1):37-44.
9. Shkarupa VM, Klymenko SV. Radioprotective properties of sodium humate in radiation-induced mutagenesis in cultured lymphocytes of thyroid cancer patients. Experimental oncology. 2016;38(2):108-11.
10. Yang HL, Hsieh YC, Hsieh YT, Lu FJ, Lin E, Lai JS. Humic acid induces apoptosis in human premyelocytic leukemia HL-60 cells. Life sciences. 2004;75(15):1817-31.
11. Pant K, Yadav AK, Gupta P, Rathore AS, Nayak B, Venugopal SK. Humic acid inhibits HBV-induced autophagosome formation and induces apoptosis in HBV-transfected Hep G2 cells. Scientific reports. 2016;6:634496. DOI: 10.1038/srep34496
12. Dubinin NP, Rudneva SV, Scherbakov VK. Spetsificheskaya modifikatsiya spektra strukturnykh mutatsiy hromosom, voznikayushchih pri estestvennom mutirovaniyu. Genetika. 1967;9:35-9. [in Russian].
13. Lazarenko LM, Bezrukov VF. Dinamika hromosomnoy nestabilnosti batuna (*Allium fistulosum* L.): gammaobluchenie semyan raznogo sroka hraneniya. Tsitologiya i genetika. 2006;4:31-6. [in Russian].

АНТИМУТАГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ ЛІГНОГУМАТУ НАТРІЯ ЩОДО КЛАСТОГЕННИХ ЕФЕКТІВ ІНДУКОВАНИХ ТІОФОСФАМІДОМ В *ALLIUM*-ТЕСТИ

Шкарупа В. М.

Резюме. Досліджено цитогенетичні ефекти лігногумату натрію щодо генотоксичності, індукованої тіофосфамідом в *Allium*-тесті. Показано, що лігногумат натрію (100 мг/л) при одночасній 72-годинній дії з тіофосфамідом (1 мг/л) знижував частоту індукованих мутагенів аберрацій хромосом на 61,36% і аберантних клітин на 51,64%. Була виявлена диференціальна активність препарату щодо зниження частоти аберрацій хромосом різних типів. Дія гумінових препаратів приводила до повної елімінації мультиаберантних клітин, більш ефективно відбувалося зменшення аберрацій хромосомного типу, хроматидного фрагментів, в порівнянні з хроматидними «мостами». Збільшення співвідношення «мости»/фрагменти при дії Лігногумат натрію свідчить про стимуляцію репарації як про один з можливих механізмів антимутагенної дії гумінових препаратів.

Ключові слова: антимутагенез, тіофосфамід, лігногумат натрію.

АНТИМУТАГЕННІ СВОЙСТВА ЛІГНОГУМАТА НАТРИЯ ПО ОТНОШЕНИЮ К КЛАСТОГЕННИМ ЭФФЕКТАМ, ІНДУЦІРОВАННИХ ТІОФОСФАМИДОМ В ALLIUM-ТЕСТЕ

Шкарупа В. Н.

Резюме. Изучены цитогенетические эффекты лигногумата натрия по отношению к генотоксичности, индуцированной тиофосфамидом в *Allium*-тесте. Показано, что лигногумат натрия (100 мг/л) при совместном 72-часовом действии с тиофосфамидом (1 мг/л) снижал частоту индуцированных мутагеном aberrаций хромосом на 61,36% и aberrантных клеток на 51,64%. Была выявлена дифференциальная активность препарата по снижению частоты aberrаций хромосом разных типов. Действие гуминового препарата приводило к полной элиминации мультиаберрантных клеток, более эффективно происходило уменьшение aberrаций хромосомного типа, хроматидных фрагментов, по сравнению с хроматидными «мостами». Увеличение соотношения «мосты»/фрагменты при действии лигногумата натрия свидетельствует о стимуляции reparации как об одном из возможных механизмов antimутагенного действия гуминового препарата.

Ключевые слова: antimутагенез, тиофосфамид, лигногумат натрия.

THE ANTIMUTAGENIC PROPERTIES OF SODIUM LIGNOGUMATE AGAINST CLASTOGENIC EFFECTS INDUCED BY THIOPHOSPHAMIDE IN ALLIUM-TEST

Shkarupa V. M.

Abstract. Humic substances are group of organic compounds formed by the association of high-molecular-mass substances from microbiological, vegetative and animal origin. The unique properties of humic substance products enable their application in agriculture, environmental and biomedicine. This study has the following purpose: to examine the role of sodium lignogumate on modification of the thiophosphamide induced mutagenesis.

Object and methods. Cytogenetic effects of sodium lignogumate on genotoxicity induced by thiophosphamide in Allium – test were studied. Sodium lignogumate was tested at a concentration of 100 mg/l at the joint 72-hour exposure with thiophosphamide (at a concentration of 1 mg/l). Analysis of the root meristem cells of *Allium cepa L.* seedlings was carried by ana-telophase method.

Results. It was found that sodium lignogumate had antimutagenic properties, reducing the frequency of thiophosphamide induced chromosome aberrations by 61,36 % and aberrant cells by 51,64 %. There was observed differential activity of the drug to reduce the frequency of chromosome aberrations of different types. The action of the humic substance resulted to complete elimination of multiaberrant cells. The frequency aberrations of chromatide type at the influence of sodium lignogumate reduced by 2,4 times, and the frequency of aberrations of chromosomal type 12 times (there was revealed the complete elimination of double fragments). The frequency of chromatide “bridges” at the influence of sodium lignogumate reduced by 1,6 times, and the frequency of chromatide fragments – by 7,9 times. An increase in the “bridges” / fragments ratio under the action of sodium lignogumate indicates stimulation of reparation as one of the possible mechanisms of the antimutagenic action of the humic preparation. Therefore, multiple mechanisms were revealed for implementing antimutagenic properties of sodium lignogumate.

Further research will be study the mechanisms antimutagenic action of humic substunce different origin on induced mutagenesis.

Key words: antimutagenesis, thiophosphamide, sodium lignogumate.

Рецензент – проф. Білаш С. М.

Стаття надійшла 03.05.2019 року