

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/319090434>

Cytogenetic analysis of antimutagenic action of sodium lignogumate at mutations induction by mitomycin C in Allium-test

Article · January 2016

CITATIONS

0

READS

30

1 author:



Volodymyr Shkarupa

National Pirogov Memorial Medical University

23 PUBLICATIONS 9 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Biological activity of humic substances [View project](#)



The genetic basis of orthodontics anomalies [View project](#)

УДК: 575.224.6: 631.417.2: 575.224.4

Цитогенетичний аналіз антимутагенної дії лігногумату натрію при індукції мутацій мітоміцином С в *Allium*-тесті
В.М.Шкарупа

ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» (Київ, Україна)
Shkarupa_vlad@bigmir.net

Досліджено цитогенетичні ефекти лігногумату натрію щодо генотоксичності, індукованої мітоміцином С в *Allium*-тесті. Лігногумат натрію був протестований у концентрації 100 мг/л при сумісній з мітоміцином С 72-годинній експозиції. Аналіз клітин корневої меристеми проростків насіння *Allium cepa* L. проводили ана-телофазним методом. Встановлено, що лігногумат натрію проявляє антимутагенні властивості, знижуючи частоту індукованих мітоміцином С аберацій хромосом на 54,90% та аберацій хромосом на 64,51%. При цьому спостерігається повна елімінація мультиабераційних клітин. Виявлено диференційну активність препарату щодо зниження частоти аберацій хромосом різних типів. Частота всіх типів «мостів» внаслідок дії лігногумату натрію зменшувалась в 1,98 разів, а всіх типів фрагментів – в 8,03 разів. При цьому відбувалась повна елімінація парних фрагментів (хромосомного типу), частота одиночних фрагментів (хроматидного типу) зменшувалась в 8,2 разів. Ефективна елімінація мультиабераційних клітин та одиночних фрагментів свідчить про наявність не тільки десмутагенних, але й інших антимутагенних механізмів дії лігногумату натрію. Таким чином, показана множинність механізмів реалізації антимутагенних властивостей лігногумату натрію при індукованому мітоміцином С мутагенезі в *Allium*-тесті.

Ключові слова: антимутагенез, лігногумат натрію, мітоміцин С, *Allium*-тест.

Cytogenetic analysis of antimutagenic action of sodium lignogumate at mutations induction by mitomycin C in *Allium*-test
V.M.Shkarupa

Cytogenetic effects of sodium lignogumate on genotoxicity induced by mitomycin C in *Allium*-test were studied. Sodium lignogumate was tested at a concentration of 100 mg/l at the joint 72-hour exposure with mitomycin C. Analysis of the root meristem cells of *Allium cepa* L. seedlings was carried by ana-telophase method. It was found that sodium lignogumate had antimutagenic properties, reducing the frequency of mitomycin C induced chromosome aberrations by 64,51%. Complete elimination of multiaberrant cells was revealed. There was observed differential activity of the drug to reduce the frequency of chromosome aberrations of different types. The frequency of all types of "bridges" at the influence of sodium lignogumate reduced by 1.98 times, and the frequency of all types of fragments – by 8.03 times. There was revealed the complete elimination of double fragments (of chromosomal type), the frequency of single fragments (of chromatid type) decreased by 8.2 times. The effective elimination of multiaberrant cells and fragments indicates the presence of not only desmutagenic but also other mechanisms of antimutagenic properties of sodium lignogumate. Therefore, multiple mechanisms were revealed for implementing antimutagenic properties of sodium lignogumate by mitomycin C induced mutagenesis in *Allium*-test.

Key words: antimutagenesis, sodium lignogumate, mitomycin C, *Allium*-test.

Цитогенетический анализ антимутагенного действия лигногумата натрия при индукции мутаций митометицином С в *Allium*-тесте
В.Н.Шкарупа

Исследованы цитогенетические эффекты лигногумата натрия на генотоксичность, индуцированную митометицином С в *Allium*-тесте. Лигногумат натрия был протестирован в концентрации 100 мг/л при совместной с митометицином С 72-часовой экспозиции. Анализ клеток корневой меристемы проростков семян *Allium cepa* L. проводили ана-телофазным методом. Показано, что лигногумат натрия проявляет антимутагенные свойства, снижая частоту индуцированных митометицином С аберацій хромосом на 54,90% и аберацій хромосом на 64,51%. При этом наблюдается полная элиминация мультиабераційных клеток. Выведена дифференциальная активность лигногумата натрия по снижению частоты аберацій разных типов. Частота всех типов «мостов» вследствие действия лигногумата натрия уменьшалась в 1,98 раз, а всех типов фрагментов – в 8,03 раз. При этом

происходила полная элиминация парных фрагментов (хромосомного типа), частота одиночных фрагментов (хроматидного типа) уменьшалась в 8,2 раза. Эффективная элиминация мультиаберантных клеток и одиночных фрагментов свидетельствует о наличии не только десмутагенных, но и других антимутагенных механизмов действия лигногумата натрия. Таким образом, показана множественность механизмов реализации антимутагенных свойств лигногумата натрия при индуцированном митомицином C мутагенезе в *Allium*-тесте.

Ключевые слова: антимутагенез, лигногумат натрия, митомицин C, *Allium*-тест.

Вступ

В умовах значного антропогенного забруднення довкілля генотоксикантами антимутагени розглядаються як фактори захисту геному людини, що здатні знижувати ризик захворювань, в етіології та патогенезі яких головну роль відіграє мутаційний компонент (Дворник та ін., 2004; Ferguson, De Flora, 2005). Важливим напрямком в дослідженнях з антимутагенезу є пошук фізіологічно активних речовин, здатних зменшувати рівень генетичних пошкоджень при застосуванні лікарських препаратів з мутагенними властивостями за життєвими показами без значного інгібування їх терапевтичних ефектів (Дурнев, 2001; Ferguson, De Flora, 2005). Однією з передумов цього є те, що для деяких антимутагенів притаманна множинність механізмів дії, адаптогенні властивості (Ślarczyńska et al., 2014).

Гумати (солі гумінових кислот) – фізіологічно активна форма гумінових речовин, природних азотовмісних поліфенольних високомолекулярних сполук змінного складу, продуктів процесів гуміфікації, що містяться в ґрунтах, торфі, бурому вугіллі, сапропелях та ін. Особливістю будови їх макромолекул є насиченість різноманітними функціональними групами. Це дозволяє їм приймати участь в різноманітних окисно-відновних реакціях, в фермент-субстратних взаємодіях, впливати на осмотичний тиск, утворювати комплексні сполуки хелатного типу, що в кінцевому рахунку і обумовлює широкий спектр їх біологічної активності (Pena-Mendez et al., 2005; Zhou et al., 2012). Показано, що гумінові речовини здатні зменшувати рівень генетичних пошкоджень, індукованих хімічними мутагенами, проте результати досліджень в цьому напрямі залишаються суперечливими, в деяких роботах повідомляється про генотоксичні ефекти гумінових речовин, незважаючи на їх низьку токсичність (Agar et al., 2014; Cozzi et al., 1993; Ferrara et al., 2006; Hseu et al., 2008; Kubešová et al., 2011).

Останнім часом проводяться інтенсивні дослідження біологічної активності не тільки природних гумінових речовин, але й їх синтетичних аналогів, зокрема лігногуматів, які є промисловими гуміновими препаратами, виготовленими на основі технології окисно-гідролітичної деструкції промислових лігносульфонатів (Бузлама, 2010; Poloskin et al., 2013).

Метою роботи було дослідження впливу лігногумату натрію на цитогенетичні ефекти, індуковані алкілувальним протипухлинним цитостатиком – митомицином C в *Allium*-тесті.

Об'єкти та методи дослідження

В якості модельної системи використовували кореневу меристему проростків насіння *Allium* сера L. Досліджували вплив лігногумату натрію (марка А, НВО РЕТ, Росія) в концентрації 100 мг/л на цитогенетичні ефекти, індуковані митомицином C (Киова, Японія) в концентрації 0,025 мг/л, при одночасній експозиції мутагену з модифікатором протягом 72 годин. В контролі – дистильована H₂O. Цитогенетичні ефекти досліджували в ана-телофазі першого поділу меристематичних клітин. Для оцінки модифікації мутагенної дії використовували наступні параметри: частота аберантних ана-телофаз (ЧАА, %), частота аберацій хромосом (кількість аберацій/100 клітин), частота мультиаберантних клітин (МАК), %, поклітинний розподіл аберацій, спектр аберацій. Виділяли аберації хроматидного (одиночні «мости», одиночні фрагменти) та хромосомного типів (парні «мости», парні фрагменти). Оскільки в *Allium*-тесті важко або неможливо розрізнити типи аберацій в клітинах з більше, ніж 6-ма абераціями, до МАК відносили такі, що містять ≥ 6 аберацій хромосом (в т.ч. клітини з невизначеними множинними абераціями, в яких для розрахунку загальної частоти аберацій кількість аберацій в клітині умовно приймали 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 (РФ₁) та частоти аберацій (РФ₂):

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

де M – ЧАА або частота аберацій (для $P\Phi_1$ і $P\Phi_2$, відповідно) за дії мутагену (мітоміцину С); $AM + M$ – ЧАА або частота аберацій (для $P\Phi_1$ і $P\Phi_2$, відповідно) за умов одночасної дії мутагену та модифікатора (лігногумату натрію). Статистичний аналіз результатів експериментальних досліджень проводили відповідно до загальноприйнятих методик, достовірність відмінностей оцінювали з використанням точного двостороннього критерію Фішера.

Результати та обговорення

Результати аналізу впливу лігногумату натрію на частоту абераційних клітин та аберацій хромосом, індукованих мітоміцином С, представлені в табл. 1.

Дія лігногумату натрію у концентрації 100 мг/л не призводила до достовірного збільшення рівня спонтанного мутагенезу в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa*. За умов сумісної довготривалої експозиції мітоміцину С з гуміновим препаратом проявляється виражений антимуутагенний ефект останнього. Хоча повного інгібування кластогенних ефектів мітоміцину С не відбувається, частота абераційних ана-телофаз, індукованих мутагеном, зменшується досить істотно – на 54,90% (з $20,20 \pm 2,00$ % до $8,23 \pm 1,06$ %). Ще більш ефективним є зменшення загальної частоти аберацій хромосом – на 64,51% (з $30,18 \pm 2,29$ аберацій/100 клітин до $10,71 \pm 1,48$ аберацій/100 клітин). Це свідчить про ефективну елімінацію сильно пошкоджених клітин внаслідок дії лігногумату натрію, що підтверджується аналізом поклітинного розподілу аберацій хромосом (табл. 2).

Таблиця 1.

Вплив лігногумату натрію на частоту абераційних клітин та частоту аберацій хромосом, індукованих мітоміцином С

Мітоміцин С (мг/л)	Лігногумат натрію (мг/л)	ЧАА, %	$P\Phi_1$, %	Кількість аберацій /100 клітин	$P\Phi_2$, %
0	0	$2,11 \pm 0,54$	-	$2,25 \pm 0,56$	-
0	100	$2,50 \pm 0,64$	-	$2,50 \pm 0,64$	-
0,025	0	$20,20 \pm 2,00$	-	$30,18 \pm 2,29$	-
0,025	100	$9,11 \pm 1,37^*$	54,90	$10,71 \pm 1,48^*$	64,51

Примітка: * $p < 0,05$, порівняно з роздільною дією мутагену.

Таблиця 2.

Поклітинний розподіл аберацій хромосом при модифікації лігногуматом натрію мутагенезу, індукованого мітоміцином С

Мітоміцин С (мг/л)	Лігногумат натрію (мг/л)	Кількість аберацій в клітині						
		0	1	2	3	4	5	≥ 6
		Кількість клітин (%)						
0	0	97,89	1,97	0,14	0	0	0	0
0	100	97,50	2,50	0	0	0	0	0
0,025	0	79,80	15,46	2,49	1,00	0,25	0,25	0,75
0,025	100	90,89	7,97	0,68	0,46	0	0	0

Вплив гумінового препарату обумовлює зменшення частоти всіх типів клітин з різною кількістю аберацій, індукованих мітоміцином С. Частка клітин з 1-єю аберацією зменшується в 1,94 раза, з 2-ма абераціями – в 3,66 раза, з 3-ма абераціями – в 2,17 раза. Привертає увагу, що антимуутагенний ефект лігногумату натрію характеризується повною елімінацією МАК та клітин з 4

та 5 абераціями. Особливості спектру аберацій хромосом при індукованому мітоміцином С мутагенезі та за умов його модифікації лігногуматом натрію представлені в табл. 3.

Таблиця 3.

Спектр аберацій хромосом при модифікації лігногуматом натрію мутагенезу, індукованого мітоміцином С

Мітоміцин С, (мг/л)	Лігногумат натрію (мг/л)	Хроматидні мости/100 клітин	Хромосомні мости	Одиночні фрагменти	Парні фрагменти	МАК
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	–
0,025 мг/л	0	17,96±1,92	0,50±0,25	11,22±1,58	0,50±0,25	0,75±0,43
0,025 мг/л	100	9,11±1,37	0,23±0,22	1,37±0,55	–	–

В усіх варіантах експерименту в спектрі аберацій хромосом переважали аберації хроматидного типу. В контролі частка аберацій цього типу складала 75%. Мутагенна дія мітоміцину С, поряд із збільшенням частоти аберацій, призводила до зміни їх спектру – частка аберацій хроматидного типу збільшувалася до 97%. Антимутагенна дія лігногумату натрію була більш ефективною щодо зменшення частоти аберацій хромосомного типу, ніж хроматидного – в 4,35 та 2,78 рази відповідно. Проте це не обумовило достовірних змін в спектрі аберацій за показником співвідношення аберацій хроматидного та хромосомного типів (98% та 2% відповідно), що пояснюється низькою частотою останніх. Привертає увагу диференційована антимутагенна ефективність гумінового препарату щодо таких типів аберацій, як «мости» та фрагменти. Як видно з табл. 3, більш ефективним є зменшення частоти фрагментів. Так, загальна частота всіх типів «мостів» внаслідок дії лігногумату натрію зменшувалась в 1,98 рази, а всіх типів фрагментів – в 8,03 рази. При цьому відбувалась повна елімінація парних фрагментів, частота одиночних фрагментів зменшувалась в 8,20 рази. Частота хроматидних «мостів» зменшувалась в 1,97 рази, зменшення частоти хромосомних мостів в 2,17 рази мало недостатній рівень статистичної значущості.

Порівнюючи отримані результати з даними літератури, слід зазначити наступне. В цитогенетичних дослідженнях на клітинах тварин було показано інгібування гуміновими речовинами мутагенності мітоміцину С (Cozzi et al., 1993). Зокрема, зменшення частоти сестринських хроматидних обмінів (СХО), індукованих мітоміцином С, внаслідок дії гуматів різного походження (в діапазоні діючих концентрацій препаратів від 30 до 700 мг/л), на 12–73 %. Величина антимутагенного ефекту в цих дослідженнях більшою мірою залежала від виду гумінових речовин, ніж від їх концентрації. При цьому автори вказують на десмутагенний механізм дії гуматів за рахунок їх зв'язування з молекулами мутагену. Разом з тим, антимутагенні ефекти лігногумату натрію неможливо звести виключно до десмутагенних механізмів, оскільки було показано його ефективність щодо зниження частоти аберацій хромосом за умов радіаційно-індукованого мутагенезу (Shkarupa et al., 2014). Використання в даній роботі комплексу таких цитогенетичних критеріїв, як частота абераційних клітин і аберацій, частота МАК, спектр аберацій та їх поклітинний розподіл дозволило збільшити інформативність аналізу і вийти за рамки спрощеного висновку так/ні щодо наявності антимутагенних властивостей. Зокрема, ефективна елімінація МАК та одиночних фрагментів внаслідок дії лігногумату натрію свідчить про наявність не тільки десмутагенних, але й інших антимутагенних механізмів. Про можливу наявність біоантимутагенних механізмів впливу гумінових речовин щодо мутагенності мітоміцину С вказують дослідження Ferraga та ін. (Ferraga et al., 2006). Зокрема, в мікроядерному тесті в клітинній культурі ТК6 лімфобластів людини леонардитові гумінові кислоти проявляли антимутагенний ефект щодо мітоміцину С. За умов сумісної дії мутагену та гумінового препарату у концентрації 100 мг/л антимутагенна ефективність останнього становила 61% при 2-годинній преінкубації мутагену та модифікатора та 21% без преінкубації. Проте мікроядерний тест дозволяє виявити лише наявність та ефективність антимутагенної дії без врахування цитогенетичних особливостей, які верифікуються при ана-телофазному чи метафазному аналізі.

Таким чином, встановлено, що лігногумат натрію проявляє антимутагенні властивості в *Allium*-тесті, знижуючи частоту індукованих мітоміцином С аберацій хромосом на 64,51%. При

цьому спостерігається повна елімінація мультиабераційних клітин. Виявлена диференційна активність препарату щодо зниження частоти аберацій хромосом різних типів – найбільш ефективним є зменшення частоти одиночних фрагментів.

Список літератури

- Бузлама А.В. Модулирующее влияние лигногумата на интенсивность процессов перекисного окисления и активность компонентов антиоксидантной защиты организма в экспериментальных условиях // *Фундаментальные исследования*. – 2010. – №9. – С. 36–40. /Buzlama A.V. Moduliruyushcheye vliyaniye lignogumata na intensivnost' protsessov perekisnogo okisleniya i aktivnost komponentov antioksidantnoy zashchity organizma v eksperimentalnykh usloviyakh // *Fundamentalnyye issledovaniya*. – 2010. – №9. – С. 36–40./
- 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. /Dvornik A.S., Pererva T.P., Kunakh V.A. Antimutagenез yak systema zakhystu organizmu vid ushkodzhuyuchykh faktoriv endogenного та ekzogenного pokhodzhennya // *Tsitologiya i genetyka*. – 2004. – Т.38, №5. – С. 62–71./
- Дурнев А.Д. Модификация мутационного процесса в клетках человека // *Вестник РАМН*. – 2001. – №10. – С. 70–76. /Durnev A.D. Modifikatsiya mutatsionного protsessa v kletkah cheloveka // *Vestnik RAMN*. – 2001. – №10. – С. 70–76./
- Agar G., Taspinar M.S., Turan M. et al. 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. – Vol.64, no 2. – P. 141–148.
- Cozzi R., Nicolai M., Petricone P. et al. Desmutagenic activity of natural humic acids: Inhibition of mitomycin C and maleic hydrazide mutagenicity // *Mutat. Res.* – 1993. – Vol.299. – P.37–44.
- Ferguson L.R., De Flora S. Multiple drug resistance, antimutagenesis and anticarcinogenesis // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol.591, no 1–2. – P. 24–33.
- Ferrara G., Loffredo E., Senesi N., Marcos R. Humic acids reduce the genotoxicity of mitomycin C in the human lymphoblastoid cell line TK6 // *Mutat. Res.* – 2006. – Vol.603, no 1. – P. 27–32.
- Hseu Y.-Ch., Chen S.-Ch., Chen Y.-L. et al. Humic acid induced genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes using comet and sister chromatid exchange assay // *Journal of Hazardous Materials*. – 2008. – Vol.153. – P. 784–791.
- Kubešová J., Turková V., Mikulcová A. et al. Antimutagenic and/or genotoxic effects of processed humic acids as tested upon *S. cerevisiae* D7 // *Environ. Chem. Lett.* – 2011. – Vol.9, iss.2. – P. 229–233.
- 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. – No 3. – P. 13–24.
- Poloskin R.B., Gladkov O.A., Osipova O.A., Yakimenko O.S. Comparable evaluation of biological activity of new liquid and dry modifications of the humic product “Lignohumate” // *Functions of Natural Organic Matter in Changing Environment* / Eds. J.Xu, Y.He, J.Wu. – Vol.I. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. – P. 1095–1110.
- Shkarupa V.M., Klymenko S.V., Talko V.V. Cytogenetic analysis of radioprotective properties of sodium lignogumate after γ -exposure in Allium-test // *Problems of Radiation Medicine and Radiobiology*. – 2014. – Vol.19. – P. 490–508.
- Słoczyńska K., Powroźnik B., Pękala E., Waszkielewicz A.M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action // *J. Appl. Genetics*. – 2014. – Vol.55. – P. 273–285.
- Zhou X.P., Zhang Y.Ch., Zhang Sh.W. et al. New progress in medical research of Bio-humic acid // *Applied Mechanics and Materials*. – 2012. – Vol. 138–139. – P. 1228–1233.

Представлено: Р.П.Піскун / Presented by: R.P.Piskun

Рецензент: Н.В.Багацька / Reviewer: N.V.Bagatska

Подано до редакції / Received: 22.09.2016