

АНТИМУТАГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ ЛІГНОГУМАТУ НАТРІЯ ЩОДО КЛАСТОГЕННИХ ЕФЕКТИВ 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 алкілюючим 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 ООО, РФ) – 1 мг/л та при одночасній експозиції тіофосфаміду з гуміновим препаратом протягом 72 годин. В контролі – дистильована H₂O. Цитогенетичний аналіз проводили ана-телофазним методом в першому мітозі. Для оцінки кластогенних ефектів тіофосфаміду та їх модифікації лігногуматом натрію використовували наступні параметри: частота аберантних ана-телофаз (ЧАА, %), частота аберацій хромосом (кількість аберацій/100 клітин), частота мультиаберантних клітин (МАК) %, по клітинний розподіл аберацій, спектр аберацій, співвідношення «мостів» і фрагментів. Ана-телофазним методом важко або неможливо розрізнити типи аберацій в клітинах з більше, ніж 6-ма абераціями, тому до МАК відносили такі, що містять 6 або більше аберацій (в т. ч. клітини з невизначеними множинними абераціями, в яких при розрахунку загальної кількості аберацій 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 (РФ₁) та частоти аберацій (РФ₂):

$$РФ = (M - (AM + M) 100%) / M \quad (1)$$

де М – ЧАА (для РФ₁) або частота аберацій (для РФ₂) за дії мутагену; АМ + М – ЧАА або частота аберацій за умов одночасної дії мутагену та антимутагену.

Статистичну значущість відмінностей цитогенетичних показників оцінювали за критерієм Фішера.

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

Таблиця 1.

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

Тіофосфамід, мг/л	Лігногумат натрію, мг/л	ЧАА ± Sp, %	РФ ₁ , %	Кількість аберацій /100 клітин	РФ 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 окремою дією мутагена.

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

Значення частоти аберантних клітин і частоти аберацій 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 РФ₂ перевищує значення РФ₁, тобто механізми модифікації лігногуматом натрію кластогенних ефектів тіофосфаміду призводять до більш ефективного зменшення частоти аберацій, ніж аберантних клітин. Антимутагенні ефекти, які обумовлюють різні варіанти співвідношення частоти аберантних клітин та частоти аберацій 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 розподілятися 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 аберацій), інші клітини, в яких мало б реалізуватись більша кількість аберацій, залишаються аберантними, проте з мен-

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

Тіофосфамід, мг/л	Лігногумат натрію, мг/л	Хроматидні «мости», % М±m	Хромосомні «мости», % М±m	Одиночні фрагменти, % М±m	Парні фрагменти, % М±m	Кільцеві хромосоми, % М±m	МАК, % М±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.

шим числом реалізованих аберацій хромосом. Частота аберантних клітин при цьому зменшується меншою мірою, ніж частота аберацій. 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 аберацій 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 аберацій і аберантних клітин.

Зміни співвідношення показників частота аберантних клітин та загальна частота аберацій є кінцевим проявом особливостей динаміки описаних вище процесів. Тому аналіз за двома показниками (частота аберацій 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 аберацій, спектру аберацій, співвідношення різних типів аберацій, співвідношення «мости»/фрагменти. Особливості розподілу аберацій хромосом по клітинах при модифікації лігногуматом натрію мутагенезу, індукованого тіофосфамідом представлені в **таблиці 2**.

Сумісна пролонгована експозиція лігногумату натрію з тіофосфамідом призводить до зменшення частоти всіх типів клітин з різною кількістю аберацій (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

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 аберацій хромосом при індукованому тіофосфамідом мутагенезі та за умов його модифікації лігногуматом натрію представлені в **таблиці 3**. В цілому, вплив лігногумату натрію призводив до зменшення аберацій всіх типів, проте, різною мірою. Частота аберацій хроматидного та хромосомного типу при дії тіофосфаміду становила 24,85±1,97 аберацій /100 клітин та 2,28±0,68 аберацій /100 клітин, відповідно. Сумісна експозиція лігногумату натрію з мутагеном призводила до зменшення частоти аберацій хроматидного типу в 2,42 рази (p < 0,0001). Значно більш ефективно відбувалось зменшення частоти аберацій хромосомного типу – в 12 разів (p = 0,002). Проте, на сумарний антимутагенний ефект таке зменшення не мало сильного впливу внаслідок незначної частоти аберацій 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 хромосомних «мостів» мало недостатній рівень статистичної значущості (p = 0,19), що обумовлено низькою частотою аберацій цього типу. Парні фрагменти та кільцеві хромосоми, які спостерігали в спектрі аберацій 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 центричних фрагментів. Як було показано в роботі Дубініна М.П. та співавт., таке злиття є енергозалежним процесом [12]. Оскільки

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

Тіофосфамід, мг/л	Лігногумат натрію, мг/л	Кількість аберацій в клітині						
		0	1	2	3	4	5	≥ 6
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 аберацій, 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 «мостів» / фрагменти при модифікації лігногуматом натрію мутагенезу, індукованого тіофосфамідом представлені в таблиці 4.

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

Таблиця 4.

Співвідношення «мостів»/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 аберацій:				
Всі «мостів» / всі фрагменти	3,00	4,00	1,26	6,86
Хромосомні «мостів» / хромосомні фрагменти	*	**	0,57	*
Хроматидні «мостів» / хроматидні фрагменти	2,75	6,00	1,35	6,71

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

або лише парними фрагментами, найбільш інформативним виявився показник співвідношення всі «мостів» / 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 аберацій хромосом на 51,64 % та частоти аберацій 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 мутагенезу.

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, Taspınar 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, Hseu YC, Hseu 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, voznykayuschih pri estestvennom mutirovanii. *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 ЕФЕКТИВ ІНДУКОВАНИХ ТІОФОСФАМІДОМ В *ALLIUM*-ТЕСТІ

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 аберацій хромосом на 61,36% і аберацій хромосом на 51,64%. Була виявлена диференціальна активність препарату щодо зниження частоти аберацій хромосом різних типів. Дія гумінових препаратів приводила до повної елімінації мультіабераційних клітин, більш ефективно відбувалося зменшення аберацій хромосомного типу, хроматидного фрагментів, в порівнянні з хроматидними «мостами». Збільшення співвідношення «мостів»/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.

АНТИМУТАГЕННЫЕ СВОЙСТВА ЛИГНОГУМАТА НАТРИЯ ПО ОТНОШЕНИЮ К КЛАСТОГЕННЫМ ЭФФЕКТАМ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ТИОФОСФАМИДОМ 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 мультиaberrантных 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 репарации как об одном из возможных механизмов антимутагенного действия гуминового препарата.

Ключевые слова: антимутагенез, 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.* seed lings 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 lignohumate 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 substance different origin on induced mutagenesis.

Key words: antimutagenesis, thiophosphamide, sodium lignogumate.

*Рецензент – проф. Білаш С. М.
Стаття надійшла 03.05.2019 року*