

УДК 575.224.6:624.131.26

В. Н. Шкарупа¹✉, С. В. Клименко², В. В. Талько²¹Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018, Україна²Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», 53, вул. Мельникова, м. Київ, 04050, Україна

МОДИФІКАЦІЯ ГУМАТОМ НАТРІЮ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНИХ ПОШКОДЖЕНЬ ХРОМОСОМ В *ALLIUM*-ТЕСТІ

Мета роботи: цитогенетичний аналіз ефектів гумату натрію при індукованому γ -опроміненні мутагенезі в *Allium*-тесті.

Матеріали і методи. Аналіз клітин кореневої меристеми проростків насіння *Allium* сера L. проводили ана-телофазним методом. Досліджували вплив гумату натрію (100 мг/л) на цитогенетичні ефекти γ -опромінення (¹³⁷Cs) в дозах 5, 10 і 20 Гр.

Результати. Було виявлено антимуутагенний ефект гумату натрію, що дозволяє розглядати його в якості потенційного терапевтичного модифікатора радіаційних пошкоджень. Антимуутагенний ефект гумату натрію зростає зі збільшенням дози опромінення. Виявлена диференційна активність препарату по відношенню до різних типів аберацій, найбільш ефективним є зменшення частоти маркерів радіаційного мутагенезу – аберацій хромосомного типу, менша ефективність проявляється по відношенню до довготривалих потенційних змін хромосом, порівняно з короткоживучими.

Висновки. Показано множинність механізмів реалізації антимуутагенних властивостей гумату натрію при індукованому γ -опроміненні мутагенезі в *Allium*-тесті.

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

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2016. Вип. 21. С. 159–171.

V. M. Shkarupa¹✉, S. V. Klymenko², V. V. Talko²¹National Pirogov Memorial Medical University, 56 Pyrohova str., Vinnytsya, 21018, Ukraine²State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Melnykov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

Modification of radiation-induced chromosome damage in *Allium*-test by sodium humate

Objective. Cytogenetic analysis of the effects of sodium humate in induced γ -irradiation mutagenesis in *Allium*-test.

Materials and methods. Analysis of the root meristem cells of *Allium cepa* L. seeds carried by ana-telophase. Investigated the effect of sodium humate (100 mg/l) on cytogenetic effects γ -irradiation (¹³⁷Cs) at doses of 5, 10 and 20 Gy.

Results. Antimutagenic effect of sodium humate was revealed, what allows to consider it as potential therapeutic modifier of radiation damage. Antimutagenic effect of sodium humate increased with increasing irradiation dose. Spotted differential activity of the drug with respect to various types of aberrations are most effectively reducing the frequency of radiation markers mutagenesis – chromosomal aberrations manifested in lower efficiency of long term survivors against potential changes of chromosomes compared with short-lived.

Conclusions. Revealed different mechanisms for implementing antimutagenic properties of sodium humate in condition of γ -irradiation-induced mutagenesis in *Allium*-test.

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

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2016;21:159–171.

✉ Шкарупа Володимир Миколайович, e-mail: shkarupa_vlad@bigmir.net

ВСТУП

Вивчення механізмів дії природних біологічно активних речовин з адаптогенними властивостями є перспективним щодо розробки антимуtagenних радіопротекторних засобів на їх основі. На сьогодні в науковій літературі зростає кількість публікацій, присвячених дослідженням біологічної активності гумінових речовин (ГР) та використанню гумінових препаратів в медицині [1–6]. ГР – комплекс природних полімерних сполук, продуктів процесів гуміфікації, які містяться в ґрунті, торфі, бурому вугіллі, сапропелях та ін. Основний компонент ГР – гумінові кислоти, фізіологічно активною формою яких є їх солі (гумати). Особливістю будови ГР є насиченість їх макромолекул різноманітними функціональними групами: карбоксильними, фенольними і спиртовими гідроксилами, хіноїдними групами, метоксилами, аміно- і амідогрупами [2]. Такі структурні особливості ГР дозволяють їм брати участь у різноманітних окисно-відновних реакціях, фермент-субстратних взаємодіях, впливати на осмотичний тиск, утворювати комплексні сполуки халатного типу, що в кінцевому рахунку й обумовлює широкий спектр фізіологічної активності [3, 5].

Надзвичайно інтенсивні дослідження ГР протягом останнього десятиріччя свідчать про потенційні можливості значного розширення фармакологічного спектру їх застосування. Окрім стимуляції процесів росту, мембранотропної активності, посилення енергетичної забезпеченості клітинних процесів, ГР є ефективними сорбентами важких металів, поліароматичних вуглеводнів, пестицидів, радіонуклідів [3–9]. Виявлено, що ГР призводять до зміни ступеня окислення актинидів, переводячи їх в малорухомі форми, що сприяє обмеженню їх міграційної здатності у довкіллі [9]. Описана антиоксидантна, імуностимулююча, протизапальна, антивірусна і протипухлинна активність ГР [2–5, 10–15]. Показано, що вплив ГР обумовлює зміни профілю експресії понад 30 генів, процеси метилювання ДНК [16, 17].

Незважаючи на тривалу історію дослідження ГР, у зв'язку зі складністю гетерополімерної структури гумінових кислот, на сьогодні неможливо виділити в їхніх макромолекулах визначені дескриптори, які обумовлюють фізіологічну активність. Різноманітність біологічних ефектів ГР неможливо звести до єдиного механізму, підтвердженням цього є поліфункціональність препаратів з гумінових речовин. Відповідно, механізм дії таких продуктів не зводиться до єдиної функції, а може бути комплексним, кінцевий ефект же визначається певною рівнодійною. Можливий варі-

INTRODUCTION

The study of the mechanisms of action of natural bioactive substances with adaptogenic properties is perspective to develop antimutagenic radioprotective tools based on them. Currently, the scientific literature contains a large amount of information about the biological activity of humic substances (HS) and applying the preparations on their basis in medicine [1–6]. HS – is a complex of natural polymer compounds, products of humification, which are contained in the soil, peat, brown coal, sapropel and others. The main component of the HS – humic acid, the physiologically active form of which are salts (humates). The feature of HS is the saturation of its molecules by most diverse functional groups: carboxyl, phenolic and alcoholic hydroxyls, quinoid groups, methoxy, amino and amido groups [2]. These structural features of HS allow them to participate in a variety of redox reactions, enzyme-substrate interactions, affect the osmotic pressure, to form complex compounds chelated type, that ultimately provides the widest range of HS biological activity [3, 5].

Extremely intense study of HS in the last decade show the potential of a significant expansion of the existing today pharmacological spectrum of their application. In addition to the stimulation of growth, membranotropic activity, enhancing energy security of cellular processes, the activation of protein synthesis, HS are effective adsorbents of heavy metals, radionuclides, surfactants, pesticides [3–9]. Revealed that HS lead to a change in oxidation actinides, translating them into inactive forms, which helps limit the ability of migration in the environment [9]. The scientific literature describes their antioxidant, immunostimulatory, anti-inflammatory, antiviral and antitumor activity [2–5, 10–15]. It is shown, that under the influence of HS varies expression profile of more than 30 genes, DNA methylation processes [16, 17].

Despite a long history of studying HS, due to the extreme complexity of the heteropolymer structure of humic acids, is not yet possible to identify in their macromolecules certain descriptors, causing physiological activity. The diversity of their biological effects can not be reduced to a single mechanism. Proof of this is the multifunctionality of products of humic substances. Accordingly, the mechanism of action of these products can not be reduced to a single function, but be complex, but the effect is determined by a certain resultant. The

ант, коли діє лише комплекс в цілому і неможливо виокремити його окремі компоненти, кожен з яких сам по собі виявляється неефективним [1, 4, 5].

Хоча доведені антимутагенні властивості ГР по відношенню до ряду хімічних мутагенів, дані щодо антимутагенних/мутагенних властивостей ГР залишаються неоднозначними, незважаючи на їх низьку токсичність [17, 18]. Існуючі дослідження радіопротекторних властивостей ГР переважно стосуються таких параметрів як виживаність опромінених тварин, антиоксидантний статус, «детоксикація радіонуклідів» [8, 9, 19, 20]. Особливості ж модифікації гуматами цитогенетичних ефектів опромінення залишаються мало дослідженими.

МЕТА

Метою роботи було провести цитогенетичний аналіз ефектів препарату, який найчастіше використовується в дослідженнях біологічної активності ГР – гумату натрію, при його дії після γ -опромінення в *Allium*-тесті.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Як тест-систему використовували клітини апікальної меристеми проростків насіння *Allium cepa* L.; γ -опромінення (^{137}Cs) насіння проводили на установці IBL 437C (Франція) в дозах: 5, 10, 20 Гр (потужність дози 2,46 Гр/хв). Насіння вносили в експериментальні розчини протягом (30 ± 15) хв після опромінення і пророщували при температурі 25 °C протягом 72 год. Використовували гумат натрію («Агрохімпак», Україна) в концентрації 100 мг/л, в контролі – дистильована вода.

Цитогенетичний аналіз клітин кореневої меристеми проводили в першому мітотичному циклі ана-телофазним методом на тимчасових препаратах, пофарбованих ацетоорсеїном. Для оцінки впливу гумату натрію використовували комплекс цитогенетичних критеріїв: частота аберантних ана-телофаз (ЧАА) і аберацій хромосом; пошкодженість аберантної клітини (ПАК – кількість аберацій на аберантну клітину); частота мультиаберантних клітин (МАК); розподіл аберацій хромосом по клітинах; спектр аберацій – враховували аберації хроматидного і хромосомного типів.

Ефективність антимутагенної дії оцінювали за величиною редукційного фактора (РФ), що характеризує ступінь інгібування індукованого мутагенезу під впливом модифікатора. РФ розраховували для критеріїв ЧАА (РФ₁) і частота аберацій хромосом (РФ₂):

$$RF = \frac{M - (AM + M)}{M} \cdot 100 \%, \quad (1)$$

variant is only valid when the complex is in general, impossible to distinguish individual components, each of which in itself is ineffective [1, 4, 5].

Identified anti-mutagenic properties of HS in relation to a number of chemical mutagens, and the data on the antimutagenic / mutagenic properties of HS are inconsistent, in spite of their low toxicity [17, 18]. Existing research of radioprotective properties of HS primarily related to such parameters as survival of irradiated animals, antioxidant status, «detoxification radionuclides» [8, 9, 19, 20]. Studies of the modification of HS cytogenetic effects of radiation are still poorly understood.

OBJECTIVE

The aim of this work was to conduct a cytogenetic analysis of effects of the preparation, which is most commonly used in studies of the biological activity of HS – sodium humate, with his actions after γ -irradiation *Allium*-test.

MATERIALS AND METHODS

As a test system using cell apical meristem seedlings *Allium cepa* L.; γ -irradiation (^{137}Cs) seeds was carried out by setting the IBL 437C (France) at doses of 5, 10, 20 Gy (dose rate 2.46 Gy/min). Seeds were added to experimental solution for 30 ± 15 min. after irradiation and were grown at 25 °C for 72 h. We used sodium humate («Ahrohimpak», Ukraine) at a concentration of 100 mg/l in the control – distilled water.

Cytogenetic analysis of root meristem cells was carried out in the first mitotic cycle, using anatelophase method on temporary preparations stained atsetoorseinom. Cytogenetic criteria were applied to evaluate the effect of sodium humate complex: frequency of aberrant ana-telophases (FAA) and aberrations, damage aberrant cells (PAC – the number of aberrations per aberrant cell), frequency of multiaberrant cells (FMC), distribution of aberrations in cells, the spectrum of aberrations – were accounted aberrations of chromatid and chromosome types.

Efficiency of antimutagenic action was estimated on a reduction factor (RF), which characterizes the degree of inhibition induced mutagenesis under the influence of modifier. RF was calculated by the FAA criteria (RF₁) and the frequency of aberrations (RF₂):

$$RF = \frac{M - (AM + M)}{M} \cdot 100 \%, \quad (1)$$

де M – ЧАА або частота аберацій (для RF_1 і RF_2 , відповідно), індукованих мутагеном; $AM + M$ – ЧАА або частота аберацій (для RF_1 і RF_2 , відповідно) при дії і мутагена, і модифікатора. Статистичну обробку результатів проводили відповідно до загальноприйнятих методик, вірогідність відмінностей оцінювали за допомогою точного двостороннього критерію Фішера [21].

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження впливу гумату натрію на рівень пошкоджень хромосом, індукованих γ -опроміненням представлені в таблиці 1.

Вплив гумату натрію в концентрації 100 мг/л на неопромінене насіння не призводив до достовірних змін спонтанного рівня мутагенезу. Пророщування опроміненого насіння в розчині препарату призводило до достовірного зменшення частоти радіаційно-індукованих ана-телофаз \sim на 40–55 %. В даному випадку гумат натрію можна вважати терапевтичним радіопротектором, оскільки його ефективність проявляється при дії після опромінення [22].

Поліфенольна структура гуматів дозволяє прогнозувати у них наявність антиоксидантних властивостей, що було підтверджено в багатьох дослідженнях [1, 4, 5, 14, 15, 20, 23]. Найбільш ефективно зниження частоти аберацій хромосом відбувається при застосуванні антиоксидантів перед опроміненням, оскільки радіаційно-індуковані АФК є реакційно активними і «короткоживучими». Однак, існують дані і

where M – FAA or aberration frequency (for RF_1 and RF_2 respectively) induced by mutagen; $AM + M$ – FAA or aberration frequency (for RF_1 and RF_2 , respectively) at the combined action of the mutagen and the modifier. Statistical processing of the experimental data was performed according to conventional methods, reliability of differences was assessed using the exact two-tailed Fisher's criterion [21].

RESULTS AND DISCUSSION

The results of studying the effect of the level of sodium humate chromosome damage, induced by γ -irradiation are presented Table 1.

Effect of sodium humate concentration of 100 mg/l in the irradiated seeds did not result in significant changes in the level of spontaneous mutagenesis. When irradiated seeds were germinated in a solution of sodium humate, it leads to a significant decrease in the frequency of radiation-induced ana-telophase at \sim 40–55 %. In this case sodium humate can be considered as therapeutic radioprotectors, because its effectiveness is manifested in action after irradiation [22].

Polyphenolic structure of humates suggests presence of antioxidant properties, that have been repeatedly described in the literature [1, 4, 5, 14, 15, 20, 23]. The most effective reduction in the frequency of chromosome aberrations is in the application of antioxidants prior to irradiation, since the radiation-induced ROS are reactive and short-lived. However, there are data of their anti-

Таблиця 1

Цитогенетичні показники в клітинах меристеми проростків опроміненого насіння *Allium cepa* L. при дії гумату натрію

Table 1

Cytogenetic indices in meristematic cells of seedlings irradiated seeds *Allium cepa* L. under the influence of sodium humate

Доза γ -опромінення, Гр	Концентрація гумату Na, мг/л	ЧАА, % M \pm m	RF ₁ , %	Кількість аберацій / 100 клітин, M \pm m	RF ₂ , %	ПАК
γ -irradiation dose Gy	Concentration of Na humate, mg/l	FAA, % M \pm m	RF ₁ , %	Aberrations / 100 cells, M \pm m	RF ₂ , %	PAC
0	0	2,00 \pm 0,51	-	2,00 \pm 0,51	-	1,00
0	100	2,01 \pm 0,55	-	2,32 \pm 0,59	-	1,15
5	0	5,80 \pm 0,81	-	6,88 \pm 0,88	-	1,19
10	0	9,64 \pm 1,10	-	15,43 \pm 1,34	-	1,60
20	0	20,15 \pm 1,42	-	27,61 \pm 1,58	-	1,37
5	100	3,45 \pm 0,49*	40,52	4,95 \pm 0,58**	28,05	1,44
10	100	4,88 \pm 0,51*	49,38	7,13 \pm 0,61*	53,79	1,46
20	100	9,05 \pm 0,97*	55,09	14,34 \pm 1,19*	48,06	1,58

Примітка. * – $p < 0,05$, порівняно з варіантом – тільки опромінення; ** – $p = 0,07$, порівняно з варіантом – тільки опромінення.
Note. * – $p < 0.05$, compared to the effect of irradiation; ** – $p = 0.05$, compared to the effect of irradiation.

щодо антимутагенних ефектів антиоксидантів при їх застосуванні після опромінення. Одним з можливих пояснень терапевтичних (а не тільки профілактичних) антимутагенних властивостей АО може бути те, що дія радіації призводить до порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, а дія антиоксидантів у постпроменевої період сприяє його стабілізації. В дослідженнях А. В. Бузлама [9] введення лігногумату тваринам після індукції оксидантного стресу забезпечувало не тільки зниження вмісту продуктів ПОЛ, але й компенсаторне зменшення надлишкової активації ферментативного ланцюга антиоксидантного захисту. Вплив гумінового препарату на антирадикальну і антиокислювальну активність гідро- та ліпофільних фракцій тканин характеризувався перерозподілом ліпофільних АО з печінки в кров і тканини, а гідрофільних, навпаки, з тканин в печінку [15]. Таким чином, вплив гуматів на прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз не вичерпується «перехопленням» АФК, а має більш складний, системний характер, коли відбувається активація різноманітних регуляторних шляхів на клітинному та тканинному рівнях. Терапевтичний антимутагенний ефект гумату натрію за критерієм ЧАА в наших експериментах, дозволяє зробити припущення про наявність подібних, системних механізмів впливу на прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз.

Про складний механізм радіопротекторного впливу гумату натрію на генетичному рівні свідчать особливості залежності антимутагенного ефекту від рівня індукованого мутагенезу. Зокрема, це більша ефективність препарату при збільшенні дози опромінення. За критерієм ЧАА спостерігається дозова залежність такого ефекту – значення RF_1 при опроміненні в дозах 5, 10 і 20 Гр складають 40,52; 49,38 та 55,09 %, відповідно (див. табл. 1). За критерієм загальної частоти аберацій хромосом (показник RF_2) – картина дещо інша. Зниження загальної частоти аберацій хромосом на 28,05 % під впливом гумату натрію після опромінення насіння в дозі 5 Гр (при частоті радіаційно-індукованих аберацій хромосом $6,88 \pm 0,88$ аберацій/100 клітин) мало недостатній рівень статистичної значущості ($p = 0,07$). При підвищенні рівня радіаційно-індукованого мутагенезу до $15,43 \pm 1,34$ аберацій/100 клітин (при опроміненні в дозі 10 Гр) антимутагенний ефект гумату був достовірним і більш сильним ($RF_2 = 53,79\%$). При подальшому збільшенні рівня радіаційно-індукованого мутагенезу до $27,61 \pm 1,58$ аберацій/100 клітин (при опроміненні в дозі 20 Гр) антимутагенний ефект гумінового препарату ($RF_2 = 48,06\%$)

mutagenic effects of antioxidants after exposure. One possible explanation of therapeutic (not only preventive) antimutagenic effects of AO may be that the radiation exposure leads to disruption of prooxidant-antioxidant homeostasis and action AO contributes to its stability. In studies A. V. Buzlama [9], injection of lignohumate to animals after induction of prooxidant stress not only provides reduction of lipid peroxidation products, but also a compensatory reduction in excessive activation of the enzymatic antioxidant defense level. Effect of humic preparation on antioxidant and antiradical activity of hydro- and lipophilic fractions of tissues is characterized by the redistribution of the lipophilic antioxidant from the liver in the blood and tissues, and hydrophilic, conversely, from the tissues to the liver [15]. Thus, the effect of humates on prooxidant-antioxidant homeostasis is not confined to the interception of the ROS, and has a more complex, systemic character, when occurs the activation of various intracellular regulatory pathways, and their selection of a cell may depend on the concentration of HS. Antimutagenic therapeutic effect of sodium humate on criterion of FAA in our experiments, suggest the presence of similar, systematic mechanisms to influence the prooxidant-antioxidant homeostasis.

On the complex mechanism of radioprotective sodium humate influence on the genetic level show features of antimutagenic effect depending on the level of induced mutagenesis. In particular, this is greater efficiency with increasing dose. On the criterion of the FAA was observed dose dependence of this effect – RF_1 indexes by irradiation on 5, 10 and 20 Gy values up to 40.52 %, 49.38 and 55.09 %, respectively (see Table 1). On criterion of overall incidence of chromosomes aberrations (figure RF_2) – the picture is somewhat different. Reducing the total frequency of chromosomal aberrations on 28.5 % under the influence of sodium humate after irradiation seeds in dose of 5 Gy (when the frequency of radiation-induced aberrations chromosome aberrations $6.88 \pm 0.88 / 100$ cells) had insufficient statistical significance ($p = 0.07$). With increased level of radiation-induced mutagenesis to 15.43 ± 1.34 aberrations / 100 cells (irradiation dose of 10 Gy) humate antimutagenic effect was significant and stronger ($RF_2 = 53.79\%$). With further increase of radiation-induced mutagenesis to 27.61 ± 1.58 aberrations / 100 cells (irradiation dose of 20 Gy) antimutagenic effect of humic preparation ($RF_2 =$

достовірно не змінювався (див. табл. 1). Тобто, порівняння значення параметрів RF_1 та RF_2 при аналізі залежності антимутагенної дії гумату від рівня радіаційно-індукованого мутагенезу дає можливість припустити, що одним з механізмів реалізації радіопротекторних властивостей препарату при збільшенні рівня мутагенезу може бути не тільки зменшення загальної частоти аберацій, а й збільшення частки непошкоджених клітин.

Отримані результати опосередковано свідчать про те, що в реалізацію остаточного генопротекторного ефекту при різних рівнях індукованого мутагенезу можуть бути задіяні різні механізми. Можливо, виявлені в нашій роботі закономірності, певною мірою, обумовлені проявом еліситорних властивостей ГР, активацією механізмів неспецифічної резистентності до дії пошкоджуючих факторів [24, 25]. В науковій літературі неодноразово підкреслюються саме адаптогенні і антистресові властивості ГР, коли їх фізіологічна активність проявляється сильніше не за нормальних умов, а при біотичних та абіотичних стресах [23–25].

Як видно з табл. 1, антимутагенний ефект гумату натрію, в цілому, сильніше проявляється за критерієм ЧАА, ніж за критерієм загальної частоти аберацій хромосом: $RF_1 > RF_2$ (хоча слід зазначити, що у варіанті з опроміненням у дозі 10 Гр, ці показники достовірно не відрізняються). При дії гумату натрію, на фоні зменшення ЧАА і частоти аберацій хромосом спостерігається тенденція збільшення пошкодженості абераційної клітини (див. табл. 1). Тобто, під впливом гумінового препарату відбувається переважне зменшення кількості клітин з меншим числом аберацій, порівняно з більш пошкодженими клітинами. Розглядаючи можливі механізми таких ефектів, можна припустити, що за дії гумату натрію відбувається більш ефективна репарація пошкоджень в клітинах з малою кількістю пошкоджень ДНК при менш ефективній репарації в клітинах з більшим числом пошкоджень. В результаті клітини, які без впливу препарату при цитогенетичному аналізі входили до класу з однією реалізованою аберацією хромосом «переходять» до класу клітин без аберацій. Таке припущення опосередковано підтверджується результатами аналізу структури поклітинного розподілу аберацій хромосом. На рисунку 1 представлено співвідношення абераційних клітин з різним числом аберацій, виявлених в експерименті.

У варіантах експерименту за умов дії гумату натрію на опромінене насіння частка клітин з

48.06 %) was not significantly changed (see Table 1). That is, the comparison values RF_1 and RF_2 in analysis of antimutagenic effect depending on the level of radiation-induced mutagenesis of suggests that one of the mechanisms of radioprotective properties of the preparation in condition of increasing the level of mutagenesis can be not only reduce the overall frequency of aberrations, but also increase the share of undamaged cells.

The results indirectly suggest that the final implementation of gene-protective effect at different levels of induced mutagenesis can be employed various mechanisms. Perhaps identified patterns, to a certain extent, are due to the manifestation of eliciting properties of humic substances, the activation of mechanisms of nonspecific resistance to damaging factors [24, 25]. Researchers have repeatedly underlined exactly adaptogenic and anti-stress properties of HS, when their physiological activity shows up stronger not in the conditions of norm, but in the conditions of biotic and abiotic stresses [23–25].

As can be seen from Table 1, antimutagenic effect of sodium humate shows up stronger for FAA criteria, than for the criterion frequency of aberrations: $RF_1 > RF_2$ (in a variant with an irradiation of 10 Gy, these indexes were not significantly different). Under the action of sodium humate, on a background of reduction the FAA and the frequency of aberrations, there is a tendency to increase the damage of aberrant cells (see Table 1). That is under the influence of humic preparation was observed preferential reduction cells with a less number of aberrations, compared to the more damaged cells. Considering the possible mechanisms, we can assume that the action of sodium humate is more effective in the repair of damaged cells with less number of aberration, with less efficient repair in cells with a large number of injuries. As a result, cells that without the influence of the preparation in cytogenetic analysis included in the class with 1-st realized chromosome aberration «transition» to a class of cells without aberrations. This is indirectly confirmed by analysis of whole-cell distribution of aberrations. Figure 1 shows the relationship of aberrant cells with a different number of aberrations, detected in the experiment.

In variants of the experiment by action of humate on irradiated seeds proportion of cells with

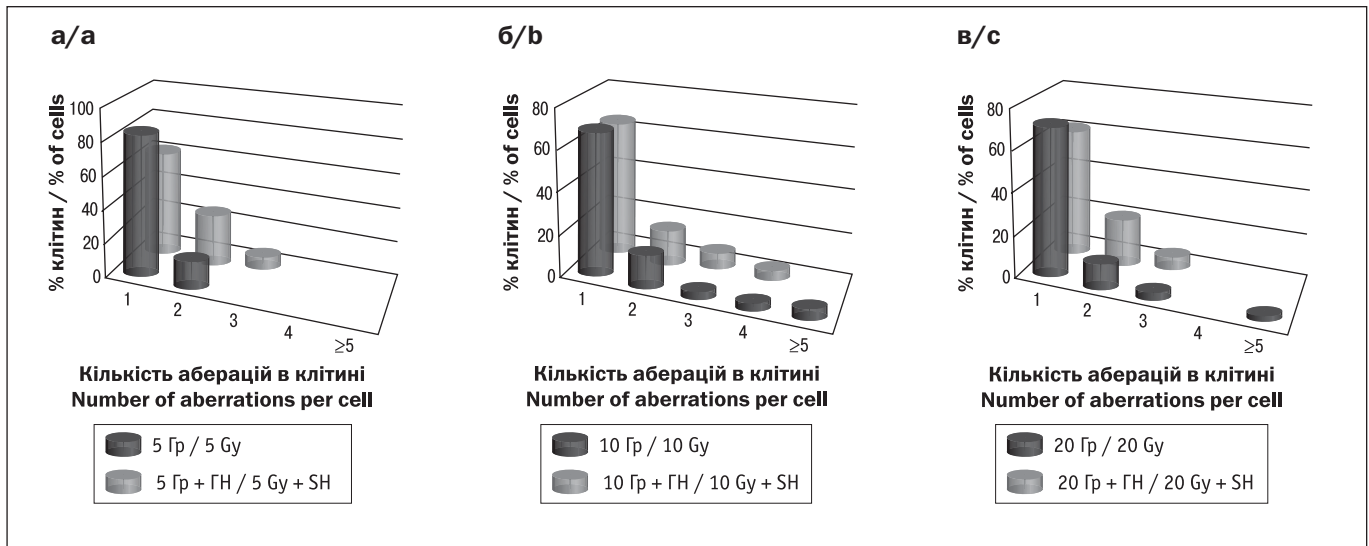


Рисунок 1. Співвідношення клітин з різним числом аберацій хромосом (% від всіх абераційних клітин) при опроміненні в дозах 5 Гр (а), 10 Гр (б) і 20 Гр (в); 5 Гр + ГН, 10 Гр + ГН, 20 Гр + ГН – при дії гумату натрію на опромінене насіння, 5Гр, 10 Гр, 20 Гр – варіанти експерименту лише з опроміненням

Figure 1. Value cells with different number of chromosome aberrations (% of total aberrant cells) when irradiated at doses 5 Gy (a), 10 Gy (b) and 20 Gy (c); 5 Gy + SH, 10 Gy + SH, 20 Gy + SH – with impact of humate sodium on irradiated seeds, 5 Gy, 10 Gy, 20 Gy – variants of the experiment only with exposure.

однією аберацією менша, ніж тільки при опроміненні. При цьому серед абераційних клітин спостерігається переважання частки клітин з двома та трьома абераціями при дії гумату, порівняно з варіантами дослідів тільки з опроміненням (див. рис. 1).

При опроміненні в дозі 5 Гр у препаратах не виявлено клітин з трьома абераціями. Але при дії гумату натрію на насіння, опромінене в цій дозі, незважаючи на достовірне значне зменшення (на 40,52 %) частоти абераційних клітин, у препаратах спостерігається поява клітин з трьома абераціями, частка яких складала 6,25 % серед абераційних клітин (див. рис. 1а). Одним з можливих пояснень цього є припущення, що вплив гумінового препарату на репаративні процеси виявився недостатнім для ефективної елімінації всіх пошкоджень, але це обумовило відсутність «переключення» сильно пошкоджених клітин на шлях апоптозу. Разом з тим, слід зазначити, що радіопротекторний вплив гумату натрію обумовлює повну елімінацію мультиабераційних клітин з більше ніж п'ятьма абераціями (див. рис. 1б і рис. 1в). Можливо, в даному випадку, маємо приклад реалізації різних шляхів антимутагенезу, індукованого гуматом натрію.

Привертає увагу різна ефективність гумінового препарату щодо зниження частоти аберацій хроматидного та хромосомного типів (рис. 2).

one aberration among aberrant cells is smaller, than in variants with only irradiation. Moreover, among the aberrant cells observed prevalence proportion of cells with 2 and 3-aberration by the action of humate, compared with variants with only irradiation experiments (see Figure 1).

By irradiation dose of 5 Gy in preparations were not found cells with 3 aberrations. But under the influence of sodium humate on seeds irradiated in that dose, despite the significant decrease (by 40.52 %) frequency of aberrant cells, in preparations were observed cells with 3 aberrations, whose share amounted to 6.25 % of aberrant cells (see Figure 1). One possible explanation for this is the assumption that the effect of humic preparation on reparative processes is insufficient for effective elimination of all damage, but it caused no «switch» severely damaged cells on the path of apoptosis. However, it should be noted that the radioprotective effect of sodium humate makes complete elimination of multyaberant cells with more than 5- th aberrations (see. Figures 1b and 1c). Perhaps, in this case, we have the example of the different ways of realization anti mutagenesis, induced by sodium humate.

Different efficiency of humate preparation attracts attention in relation to the reduction of frequency of chromatid and chromosomal types aberrations (see Figure 2).

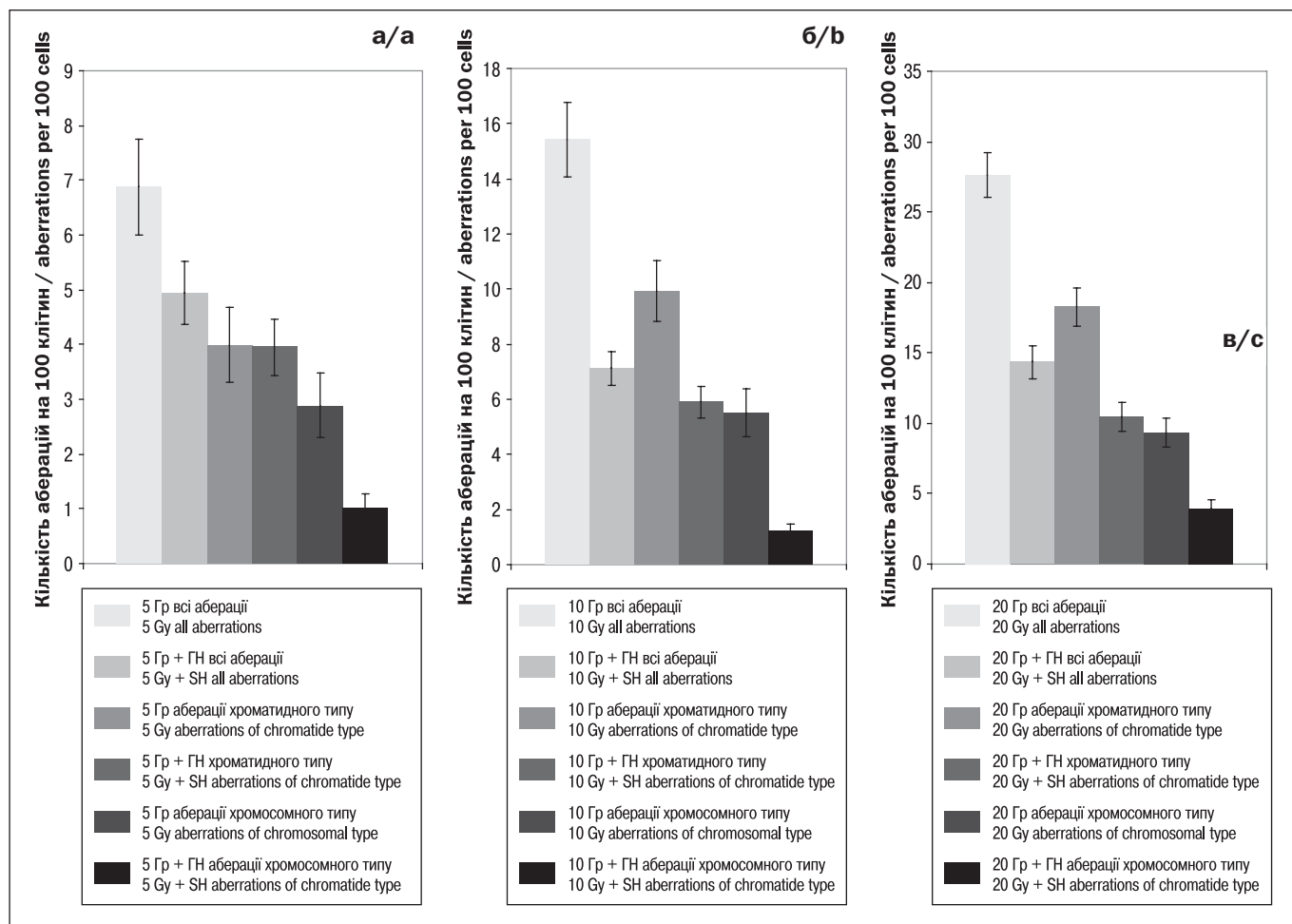


Рисунок 2. Співвідношення аберацій хроматидного та хромосомного типів в клітинах кореневої меристеми проростків насіння *Allium cepa L.*, опромінених в дозах 5 Гр (а), 10 Гр (б), 20 Гр (в) при дії гумату натрію (ГН)

Figure 2. Value of chromatid and chromosome aberrations in the cells of the root meristem of seedlings seeds *Allium cepa L.*, exposed to doses of 5 Gy (a), 10 Gy (b), 20 Gy (c) under the action of sodium humate (SH)

Так, при опроміненні в дозі 5 Гр, зниження частоти аберацій внаслідок впливу гумату натрію відбувалось лише за рахунок аберацій хромосомного типу (див. рис. 2а). Частота аберацій цього типу при дії гумату натрію на опромінене насіння достовірно ($p < 0,05$) зменшується в 2,89 рази. Саме тому достовірність відмінностей за критерієм загальної частоти всіх типів аберацій має недостатній рівень статистичної значущості: $p = 0,07$ (див. табл. 1). Це обумовило також менший загальний антимутагенний ефект гумінового препарату при опроміненні в дозі 5 Гр, порівняно з його дією при більших дозах опромінення (10 і 20 Гр). При збільшенні рівня радіаційно-індукованого мутагенезу вплив гумату натрію призводить до достовірного зменшення частоти аберацій обох типів, хоча зниження частоти аберацій хромосомного типу залишається при цьому більш ефективним (див. рис. 2б і 2в). Так, при опроміненні в дозі 10 Гр частота аберацій хроматидного типу

Thus, the irradiation of 5 Gy, reducing the frequency of aberrations under the influence of sodium humate, only due to chromosomal aberrations (see Figure 2a). The frequency of aberrations of this type by the action of sodium humate on irradiated seeds was significantly ($p < 0,05$) 2.89-fold decrease. That is why the reliability differences in the overall incidence criterion for all types of aberrations has insufficient statistical significance: $p = 0,07$ (see Table 1). It also caused a smaller overall antimutagenic effect of humic preparation by irradiation dose of 5 Gy, compared with its impact at higher doses (10 and 20 Gy). By increasing the level of radiation-induced mutagenesis effect of sodium humate leads to a significant decrease in the frequency of both types of aberrations, while reducing the frequency of chromosomal aberrations is more effective (see Figures 2b and 2c). Thus, by the irradiation dose of 10 Gy frequency of chromatid aberrations due to the impact of

внаслідок впливу гумату натрію знижується в 1,7, а аберацій хромосомного типу – в 4,4 раза. При опроміненні в дозі 20 Гр частота хроматидних аберацій знижується в 1,8 раза, а зменшення рівня аберацій хромосомного типу відбувається менш ефективно, ніж при опроміненні в дозі 10 Гр – у 2,39 раза. Це свідчить про те, що при різних рівнях радіаційно-індукованого мутагенезу вплив гумату натрію обумовлює індукцію різних механізмів антимутагенезу, а величина зниження частоти аберацій того чи іншого типу залежить від різного внеску кожного з механізмів у кінцевий ефект.

Як зазначали вище, аналіз розподілу аберацій хромосом по клітинах показав, що дія препарату сильніше проявляється по відношенню до клітин з однією аберацією, щодо клітин з двома і трьома абераціями – його вплив менш ефективний (див. рис. 1). Разом з тим, найбільша антимутагенна активність гумату натрію проявляється щодо МАК, які під впливом препарату повністю елімуються. Такі відмінності свідчать про наявність іншого механізму антимутагенної дії гумату натрію, ніж стимуляція репараційних процесів. Найбільш імовірним механізмом впливу гумату натрію на елімінацію МАК може бути стимуляція апоптотичної загибелі сильно пошкоджених клітин, про що свідчить цілий ряд робіт, в яких було показана індукція гуматами апоптозу [26, 27]. Не виключаючи можливості апоптотичної загибелі клітин з менше ніж п'ятьма абераціями, результати наших досліджень свідчать про переважну елімінацію саме МАК під впливом гумату натрію (див. рис. 1).

Наявність, крім хромосомних аберацій, значного числа аберацій хроматидного типу при опроміненні на G0 або ранній G1 стадії у *Allium cepa L.* пов'язують також з потенційними змінами хромосом, що мають різну тривалість існування. Зазвичай радіація спричиняє появу короткоживучих пошкоджень хромосом, які реалізуються в мутації у тій чи іншій фазі клітинного циклу, в якій опромінюється клітина. Можливість появи хроматидної мутації внаслідок впливу радіації на хромосому з однією ефективною ниткою вказує на існування тривало існуючих потенційних змін хромосом, які «доживають» до S чи G2 фази, де й реалізуються у вигляді хроматидних мутацій. В наших дослідженнях виявлена диференційна ефективність гумату натрію щодо зменшення частоти радіаційно-індукованих аберацій хромосом різних типів (див. рис. 2). Враховуючи вищевказане, можна припустити, що менш ефективне

sodium humate in 1.7, and chromosome aberration type – 4.4 times decrease. By the irradiation dose of 20 Gy frequency of chromatid aberration is reduced by 1.8 times, while reducing of chromosome type aberrations is less effective, than by irradiated dose on 10 Gy – in 2.39 times. This suggests, that an increase in the level of radiation-induced mutagenesis, under the influence of sodium humate, involved different mechanisms of anti-mutagenesis, and the level of reduction in the frequency of aberrations of a particular type, depends on the contribution of each of the various mechanisms in the resulting effect.

As mentioned above, whole-cell analysis of the aberrations distribution showed, that the impact of preparation stronger shows up with regard to cells with one aberration. With respect to the cells with 2 and 3 aberrations, its action is considerably less efficient (see Figure 1). However, the highest antimutagenic activity of sodium humate appears on the FMC, which under the influence of the preparation is completely eliminated. These differences indicate the presence of another mechanism of antimutagenic action of sodium humate, than stimulation of repair. The most probable mechanism of reducing the FMC by sodium humate impact can be stimulated apoptosis of severely damaged cells. This possibility was demonstrated by a number of works, that show the induction by humates the stimulation of apoptosis [26, 27]. Even if you do not exclude the possibility, that to apoptotic death are exposed cells with less than 5 aberrations, our results show, that under the influence of sodium humate this process leads to preferential elimination the FMC (see Figure 1).

The presence, in addition to chromosomal aberrations, a significant number of chromatid type aberrations at an irradiation on G0 or early G1 stage in *Allium cepa L.* has also been associated with the existence of potential changes in the chromosomes, with different life span. Usually radiation causes short-lived damage, which are implemented in a mutation in the phase of the cell cycle, in which the cells are irradiated. Possibility of appearance of chromatid mutations due to the impact of radiation on chromosome with one effective thread indicates the existence of long term potential changes in the chromosomes, which are «live» to the S or G2 phase, where are implemented as chromatid mutations. In our studies revealed differential effectiveness of sodium humate to reduce the frequency of radiation-induced chromosome aberrations of different types (see Figure 2). Taking into account a much smaller decline in chro-

зниження рівня аберацій хроматидного типу, порівняно з абераціями хромосомного типу, під впливом гумату натрію обумовлено тим, що препарат не впливає (наприклад, при опроміненні в дозі 5 Гр, див. рис. 2а), або є менш ефективним щодо стимуляції репарації тривало існуючих потенційних змін хромосом, порівняно з короткоживучими.

У зв'язку з цим привертають увагу результати апроксимації експериментальних залежностей доза-ефект при опроміненні та при дії модифікатора після опромінення відповідно до лінійно-квадратичної моделі (рис. 3).

matid type aberrations in comparison with chromosomal aberrations, detected in our experiments (by irradiation dose 5 Gy, see Figure 2a), it can be explained by the fact, that the impact of sodium humate does not affect or is less effective with respect to stimulation of repair of long term potential changes of chromosome, compared with short term.

In this regard, take attention the results of approximating experimental dose-effect of irradiation and under the influence of the modifier after exposure under the linear-quadratic model (Figure 3).

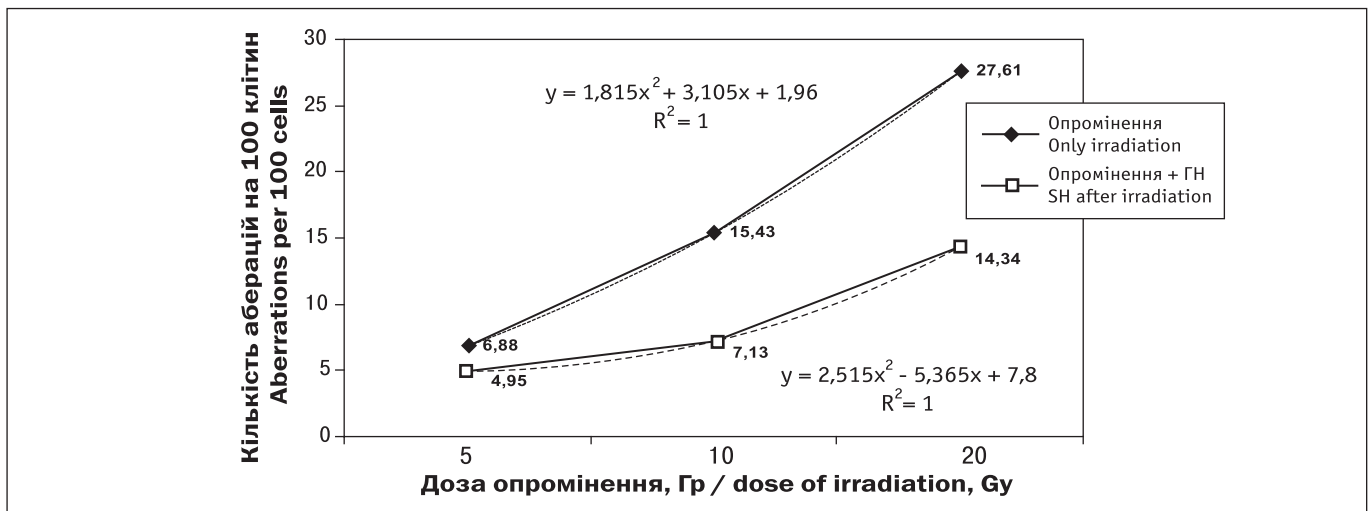


Рисунок 3. Лінійно-квадратична модель апроксимації залежностей доза – частота аберацій хромосом при опроміненні та дії модифікатора (гумату натрію – ГН) після опромінення

Figure 3. Linear-quadratic approximation model dependencies dose – rate of chromosome aberrations by irradiation and actions of modifier (sodium humate – SH) after exposure

Відомо, що залежність частоти аберацій хромосом від дози іонізуючого опромінення добре описується лінійно-квадратичною моделлю: $y = \alpha D^2 + \beta D + C$. В основі останньої лежить припущення про те, що коефіцієнт при квадратичному члені описує залежність доза-ефект для частоти аберацій хромосом «двоударного» типу, а при лінійному – для частоти аберацій «одноударного» типу. Як видно з рис. 3, залежність доза-ефект в обох випадках добре описується цією моделлю ($R^2 = 1$, $p < 0,01$). Рівняння регресії мають вид:

$$y = 1,82x^2 + 3,11x + 1,96 \quad (2)$$

(при опроміненні)

та

$$y = 2,52x^2 - 5,37x + 7,80 \quad (3)$$

(при дії гумату натрію після опромінення)

Відповідно до моделі, радіопротекторна дія гумату натрію обумовлена зменшенням частоти аберацій

The frequency of chromosome aberrations dependent on the dose of ionizing radiation is well described by the linear-quadratic model: $y = \alpha D^2 + \beta D + C$. The basis of the latter is the assumption that the coefficient of the quadratic term describing the dose-effect for frequency of chromosome aberrations «two-hit type», while the linear – for frequency aberrations «one-hit type». As shown in Figure 3 dose-effect in both cases is well described by this model ($R^2 = 1$, $p < 0,01$). The regression equation with view:

$$y = 1,82x^2 + 3,11x + 1,96 \quad (2)$$

(by irradiation)

and

$$y = 2,52x^2 - 5,37x + 7,80 \quad (3)$$

(under the influence of Na humate after exposure)

According to the model, the radioprotective effect of sodium humate due to a decrease in the

хромосом «одноударного» типу — коефіцієнти $+3,11x$ та $-5,37x$, відповідно. При ана-телофазному аналізі неможливо чітко відрізнити аберації цих типів, як це має місце при метафазному аналізі. Разом з тим, очевидно, що репарація пошкоджень ДНК, які призводять до аберацій «двоударного» типу є більш ускладненим процесом, ніж «одноударного» типу. Таким чином регресійний аналіз залежності доза-ефект при дії модифікатора передбачає більш ефективне зниження рівня аберацій хромосом того типу, репарація яких є менш ускладненою.

ВИСНОВКИ

Таким чином, показано перспективність розробки радіопротекторних засобів терапевтичної дії на основі гумату натрію. Виявлено множинність механізмів реалізації генопротекторних властивостей гумату натрію, щодо цитогенетичних пошкоджень, індукованих γ -опроміненням в *Allium*-тесті. Гумат натрію здатен проявляти радіопротекторні властивості, зменшуючи рівень індукованого мутагенезу на 40–55 % при його дії після опромінення. Вплив гумату натрію обумовлює більш ефективне зменшення частки клітин з однією аберацією, при менш ефективному зменшенні частки клітин з 2–4 абераціями. Разом з тим, мультиабераційні клітини (≥ 5 аберацій/на клітину) внаслідок дії гумату натрію повністю елімінуються. Виявлена диференційна антимутагенна активність гумінового препарату по відношенню до різних типів аберацій: найбільш ефективним є зменшення частоти маркерів радіаційного мутагенезу — аберацій хромосомного типу, менша ефективність проявляється по відношенню до тривалоіснуючих потенційних змін хромосом, які проявляються у вигляді аберацій хроматидного типу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Berbara R. L. Humic substances and plant defense metabolism / R. L. Berbara, A. C. Garcia // *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment* / ed. by P. Ahmad, M. R. Wani. - Vol. 1. - New York : Springer Science+Business Media, 2014. P. 297-319.
2. Pena-Mendez E. M. Humic substances - compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine / E. M. Pena-Mendez, J. Havel, J. Patocka // *J. Appl. Biomed.* - 2005. - No. 3. - P. 13-24.
3. Zhou, X. New progress in medical research of Bio-humic acid / X. Zhou // *Applied Mechanics and Materials.* - 2012. -Vol.138-139. - P.1228-1233.
4. Klocking R. Medical aspects and applications of humic substances / R. Klocking, B. Helbig // *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications.* - Weinheim. - 2005. - № 1. - P. 3-15.

frequency of chromosome aberrations «one-hit type» — factors $+3.11$ and -5.37 respectively. By ana-telophase analysis is not possible to clearly distinguish these types of aberration, as occurs during metaphase analysis. However, it is obvious that repair DNA damage that leads to aberrations of «two-hit type», is a more complicated process than «one-hit type». So regression analysis of dose-effect by impact of modifier provides to more effective reduction of chromosome aberrations of this type, reparation which is less complicated.

CONCLUSION

Thus, was shown promising means of development radioprotective therapeutic action based on sodium humate. Discovered different mechanisms of implementation gene-protective properties of humate sodium on cytogenetic damage induced by γ -irradiation in *Allium*-test. Sodium humate is able to show radioprotective properties, reducing the induced mutagenesis by 40–55 % by its action after exposure. Antimutagenic effect of sodium humate increased with increasing irradiation dose. Effect of sodium humate makes more efficient reduction of the proportion of cells with one aberration, and the less effective reducing the proportion of cells with 2–4 aberrations. However, multiaberrant cells (≥ 5 aberrations per cell) due to the impact of sodium humate were completely eliminated. Revealed differential antimutagenic activity of humate preparation in relation to various types of aberrations: the most effective reduction in the frequency of markers of radiation mutagenesis — chromosomal aberrations, lower efficiency has been reported for long term potential changes in the chromosomes, which revealed as chromatid aberrations.

REFERENCES

1. Berbara RL, Garcia AC. Humic Substances and Plant Defense Metabolism. In: Ahmad P, Wani MR, editors. *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment*. Vol. 1. New York: Springer Science+Business Media; 2014. p. 297-319.
2. Pena-Mendez EM, Havel J, Patocka J. Humic substances - compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *J Appl Biomed.* 2005;(3):13-24.
3. Zhou X. New progress in medical research of Bio-humic acid. *Applied Mechanics and Materials.* 2012;138-139:1228-33. 10.4028/www.scientific.net/AMM.138-139.1228.

5. Бузлама А. В. Экспериментальное изучение фармакологических свойств солей гуминовых кислот / Бузлама Анна Витальевна : дисс. д-ра мед. наук. 14.03.06. - фармакология, клиническая фармакология. - Воронеж, 2014. - 410 с.
6. Tejada-Agredano M.-C. The effect of humic acids on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons depends on the exposure regime / M.-C. Tejada-Agredano, P. Mayer, J.-J. Ortega-Calvo // *Environ. Pollution*. - 2014. - Vol. 184. - P. 435-442.
7. Natural humics impact uranium bioreduction and oxidation / B. Gu, H. Yan, P. Zhou, D. B. Watson, M. Park, J. Istok // *Environ. Sci. Technol.* - 2005. - Vol. 39, no. 14. - P. 5268-5275.
8. Gao Y. U (VI) sorption on illite: effect of pH, ionic strength, humic acid and temperature / Y. Gao, Z. Shao, Z. Xiao // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* - 2015. - Vol. 303. - P. 867-876.
9. Reduction of actinides in higher oxidation states by hydroquinone-enriched humic derivatives / N. S. Shcherbina, St. N. Kalmykov, I. V. Perminova, A. N. Kovalenko // *Journal of Alloys and Compounds*. - 2007. - Vol. 444-445. - P. 518-521.
10. Van Rensburg C. E. J. The antiinflammatory properties of humic substances: A mini review / C. E. J. van Rensburg // *Phytother. Res.* - 2015. - Vol. 29. - P. 791-795.
11. Investigation of the anti-HIV properties of oxihumate / C. E. J. van Rensburg, J. Dekker, R. Weis, T.-L. Smith, E. Janse van Rensburg // *Chemotherapy*. - 2002. - Vol. 48, no. 3. - P. 138-143.
12. Kornilaeva G. V. Humic substances as active anti-HIV components for microbicides / G. V. Kornilaeva, I. V. Perminova, E. V. Karamov // *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.
13. Pant K. Shilajit: a humic matter panacea for cancer / K. Pant, B. Singh, N. Thakur // *Internat. J. Toxicol. Pharmacol. Res.* - 2012. - No. 2. - P. 17-25.
14. Effects of humic acids in vitro / J. Vaskova, B. Velika, M. Pilatova [et al.] // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*. - 2011. - Vol. 47, no. 5-6. - P. 376-382.
15. Бузлама А. В. Модулирующее влияние лигногумата на интенсивность процессов перекисного окисления и активность компонентов антиоксидантной защиты организма в экспериментальных условиях / А. В. Бузлама // *Фундаментальные исследования*. - 2010. - № 9. - С. 36-40.
16. Humic substances affect Arabidopsis physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development / S. Trevisan, A. Botton, S. Vaccaro, S. Nardi // *Environmental and Experimental Botany*. - 2011. - Vol. 74. - P. 45-55.
17. Protective role of humic acids against dicamba-induced genotoxicity and DNA methylation in *Phaseolus vulgaris* L. / G. Agar, M. S. Taspinar, M. Turan, E. Arslan / *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*. - 2014. - Vol. 64, no. 2. - P. 141-148.
18. Antimutagenic and/or genotoxic effects of processed humic acids as tested upon *S. cerevisiae* D7 / I. Marova, J. Kucerik, K. Duronova, A. Mikulcova, Z. Vlckova // *Environ. Chem. Lett.* - 2011. - Vol. 9, no. 2. - P. 229-233.
4. Klocking R, Helbig B. Medical aspects and applications of humic substances. *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications* (Weinheim). 2005;(1):3-15.
5. Buzlama AV. [Experimental study of pharmacological properties of humic acid salts] [dissertation]. Voronezh; 2014. 410 p. Russian.
6. Tejada-Agredano M-C, Mayer P, Ortega-Calvo J-J. The effect of humic acids on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons depends on the exposure regime. *Environ Pollution*. 2014;184:435-42.
7. Gu B, Yan H, Zhou P, Watson DB, Park M, Istok J. Natural humics impact uranium bioreduction and oxidation. *Environ Sci Technol*. 2005;39(14):5268-75.
8. Gao Y, Shao Z, Xiao Z. U (VI) sorption on illite: effect of pH, ionic strength, humic acid and temperature. *J Radioanal Nucl Chem*. 2015;303:867-76.
9. Shcherbina NS, Kalmykov StN, Perminova IV, Kovalenko AN. Reduction of actinides in higher oxidation states by hydroquinone-enriched humic derivatives. *Journal of Alloys and Compounds*. 2007;444-445:518-521.
10. Van Rensburg CEJ. The antiinflammatory properties of humic substances: a mini review. *Phytother Res*. 2015;29:791-5.
11. Van Rensburg CEJ, Dekker J, Weis R, Smith T-L, van Rensburg JE. Investigation of the anti-HIV properties of oxihumate. *Chemotherapy*. 2002;48(3):138-43.
12. Kornilaeva GV, Perminova IV, Karamov EV. Humic substances as active anti-HIV components for microbicides. In: *Abstract Book of the First International Conference on Humics-based Innovative Technologies «Natural and Synthetic Polyfunctional Compounds and Nanomaterials in Medicine and Biomedical Technologies»*; 2010 Nov 4-8; Lomonosov Moscow State University, Moscow. Moscow; 2010. p. 27.
13. Pant K, Singh B, Thakur N. Shilajit: A humic matter panacea for cancer. *Internat J Toxicol Pharmacol Res*. 2012;(2):17-25.
14. Vaskova J, Velika B, Pilatova M, Kron I, Vasko L. Effects of humic acids in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2011 Jun;47(5-6):376-82. doi: 10.1007/s11626-011-9405-8.
15. Buzlama AV. [Modulating the intensity of the effect lignohumate peroxidation and activity of antioxidant defenses of the body components in experimental conditions]. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2010;(9):36-40. Russian.
16. Trevisan S, Botton A, Vaccaro S, Nardi S. Humic substances affect Arabidopsis physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. *Environmental and Experimental Botany*. 2011;74:45-55.
17. Agar G, Taspinar MS, Turan 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):141-48.
18. Marova I, Kucerik J, Duronova K, Mikulcova A, Vlckova Z. Antimutagenic and / or genotoxic effects of processed humic

19. Влияние гумата натрия на животных, облученных в летальных дозах / Г. Г. Пухова, Н. А. Дружина, Л. М. Степченко, Е. Е. Чеботарев // Радиобиология. - 1987. - № 5. - С. 650-653.
20. Muslimova Z. H. Influence of metal humic complexes on activity of antioxidant system of γ -irradiated wheat germs // International Journal of Secondary Metabolite. - 2015. - Vol. 2, no. 1. - P. 13-17.
21. Атраментова Л. А. Статистические методы в биологии : учебник для студентов высших заведений / Л. А. Атраментова, О. М. Утевская. - Горловка : Ліхтар, 2008. - 248 с.
22. Гродзинський Д. М. Радіобіологія : підручник / Д. М. Гродзинський. - Київ : Либідь, 2000. - 448 с.
23. Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress / A. C. Garcia, L. A. Santos, F. G. Izquierdo [et al.] // Ecological Engineering. - 2012. - Vol. 47. - P. 203-208.
24. Механизмы индукции резистентности растений к фитопатогенам гуминовыми веществами / С. Н. Удинцев, Т. И. Бурмистрова, А. В. Заболотская, Т. П. Жилыкова // Вестник Томского государственного университета. Биология. - 2011. - № 4. - С. 100-107.
25. Куликова Н. А. Защитное действие гуминовых веществ по отношению к растениям в водной и почвенной средах в условиях абиотических стрессов / Н. А. Куликова : дисс. д-ра мед наук : 03.00.16 - экология и 03.00.27. - почвоведение. - Москва, 2008. - 302 с.
26. Humic acid induces G1 phase arrest and apoptosis in cultured vascular smooth muscle cells / Y.-Ch. Hseu, E. Lin, J.-Y. Chen [et al.] // Environ Toxicol. - 2009. - Vol. 24, no. 3. - P. 243-258.
27. Humic acid induces apoptosis in human premyelocytic leukemia HL-60 cells / H.-L. Yang, Y.-C. Hseu, Y.-T. Hseu [et al.] // Life Sciences. - 2004. - Vol. 75, no. 15, - P. 1817-1831.
- acids as tested upon *S. cerevisiae* D7. Environ Chem Lett. 2011;9(2):229-233.
19. Pukhova GG, Druzhina NA, Stepchenko LM, Chebotarev EE. [The effect of sodium humate on animals exposed to lethal doses]. Radiobiologiya. 1987;(5):650-3. Russian.
20. Muslimova ZH. Influence of metal humic complexes on activity of antioxidant system of γ -irradiated wheat germs. International Journal of Secondary Metabolite. 2015;2(1):13-7.
21. Atramentova LA, Utevskaia OM. [Statistical methods in biology: the textbook for students of higher institutions]. Gorlovka: Likhtar; 2008. 248 p. Russian.
22. Hrodzyns'kyi D.M. [Radiobiology: the textbook]. Kyiv: Lybid'; 2000. 448 p. Ukrainian
23. Garcia AC, Santos LA, Izquierdo FG, Sperandio MVL, Castro RN, Berbara RLL. Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. Ecological Engineering. 2012;47:203-8.
24. Udintsev SN, Burmistrova TI, Zabolotskaya AV, Zhilyakova TP. [Mechanisms of induction of plant resistance to pathogens humic substances]. Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya. 2011;(4):100-7. Russian.
25. Kulikova NA. [The protective effect of humic substances in relation to plants and soil in the aqueous media under conditions of abiotic stress] [dissertation]. Moskva; 2008. 302 p. Russian.
26. Hseu Y-Ch, Lin E, Chen J-Y, Liua YR, Huang CY, Lu FJ, et al. Humic acid induces G1 phase arrest and apoptosis in cultured vascular smooth muscle cells. Environ Toxicol. 2009;24(3):243-58.
27. Yang H-L, Hseu Y-C, Hseu Y-T, Lu FJ, Lin E, Lai JS. Humic acid induces apoptosis in human premyelocytic leukemia HL-60 cells. Life Sciences. 2004;75(15):1817-31.

Стаття надійшла до редакції 20.06.2016

Received: 20.06.2016