

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК. 575.224.6:624.131.26

В. М. Шкарупа, Л. В. Неумержицька, С. В. Клименко

Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини
Національної академії медичних наук України”,
вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна

**РАДІОПРОТЕКТОРНИЙ ЕФЕКТ ГУМАТУ НАТРИЮ
В КУЛЬТУРІ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ
КРОВІ ЛЮДИНИ**

Гумат натрію в концентрації 100 мкг/мл не чинить мутагенного впливу в культурі лімфоцитів периферичної крові людини. Показано терапевтичний радіопротекторний цитогенетичний ефект гумату натрія при дії в цій концентрації після γ -опромінення в дозі 1 Гр.

Ключові слова: γ -опромінення, антимутагенез, гумат натрію

Вступ. Більшість традиційних синтетичних радіопротекторів, які в модельних хімічних системах виявляють значний протекторний ефект, не можуть використовуватись з належною повнотою, бо в ефективних концентраціях вони виявляються токсичними. Тому сьогодні в дослідженнях з антимутагенезу все більше звертаються до пошуку радіопротекторів серед біологічно активних, нетоксичних речовини природного походження — адаптогенів, які здатні підвищувати резистентність організму до несприятливих факторів середовища. Особливу увагу серед таких речовин привертають гумінові речовини (гумати), фізологічно активною формою яких є солі гумінових кислот. Ці природні полімери, продукти процесів гуміфікації, які за хімічною структурою є азотовмісними високомолекулярними фенольними окси-карбоновими кислотами, містяться в ґрунтах, торфах, бурому вугіллі, сапропелях та ін. [1, 2].

Завдяки високій біологічній активності гумінові препарати вважаються адаптогенами. Проте точний механізм дії цих сполук залишається нез'ясованим, радше мова йде про поліфункціональність в реалізації механізмів фізіологічної активності гуматів. За сучасними

* Клименко Сергій Вікторович, e-mail: klymenko_sergiy@yahoo.co.uk
© Шкарупа В. М., Неумержицька Л. В., Клименко С. В., 2012

уявленнями гумінові речовини є факторами росту, підвищують продуктивність рослин та тварин, викликаючи позитивні зміни обміну речовин [1]. Вони стимулюють імунну систему, мають антистресові, протизапальні, антивірусні, антиоксидантні властивості [1–7]. Активно сьогодні досліджуються протипухлинні властивості гумінових речовин, виявлено їх антиангіогенні та проапоптичні ефекти [8–10]. Виявлено, що гумати можуть брати участь у регуляції реалізації генетичної інформації як тригери неспецифічної природи, показано їх вплив на процеси метилювання ДНК, експресію генів [11, 12]. Крім того, вони ефективні як сорбенти важких металів, радіонуклідів та інших токсичних сполук [1, 2, 13–17]. Показана також генопротекторна активність гуматів щодо дії ряду хімічних мутагенів та сумарної мутагенної активності антропогенно забруднених ґрунтів [18–22].

Відомі на сьогодні й радіопротекторні властивості гумату натрію, зокрема надзвичайно висока його ефективність щодо збільшення виживаності щурів, опромінених в летальніх дозах [23]. Але можливість модифікації гуматами цитогенетичних ефектів опромінення досліджена недостатньо. Раніше нами було показано, що гумат натрію зменшує рівень хромосомних пошкоджень, індукованих іонізуючим опроміненням в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa L.* [24]. Очевидно, що для адекватної екстраполяції виявлених в *Allium*-тесті радіопротекторних властивостей гумату натрію на клітини людини виникла потреба в подальших дослідженнях на тваринних об'єктах.

Метою роботи було дослідити вплив фізіологічно активної форми гумінових кислот — гумату натрію на рівень хромосомних пошкоджень, індукованих γ -опроміненням в культурі лімфоцитів людини.

Матеріал та методи дослідження. Радіопротекторні цитогенетичні властивості гумату натрію (“АгроХімпак”, Україна) досліджували в соматичних клітинах людини за допомогою тест-системи культури лімфоцитів периферичної крові. Для тест-системи використовували периферичну (венозну) кров двох умовно здорових донорів, яку культивували загальноприйнятим напівмікрометодом [25]. γ -опромінення (Cs^{137}) цільної крові проводили на установці IBL 437C (Франція) в дозі 1 Гр, потужність дози становила 2,46 Гр/хв.

Гумат натрію (100 мкг/мл) вносили в культуральну суміш на початку культивування (G0) протягом 45 ± 15 хв. після опромінення цільної крові. Препарати метафазних хромосом фарбували барвником Гімза (Sigma, США) для проведення цитогенетичного аналізу рівномірно забарвлених хромосом. Розраховували частоту aberrantних метафаз

(%) та частоту абераций хромосом (кількість абераций/100 клітин). Ефективність дії гумату натрію оцінювали за величиною редукційного фактора (РФ), який характеризує ступінь пригнічення індукованого мутагенезу під впливом модифікатора:

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

де M — частота абераций хромосом, індукованих мутагеном; $AM + M$ — частота абераций хромосом при комбінованій дії мутагену і модифікатора. Статистичний аналіз проводили у відповідності з критерієм χ^2 .

Результати та їх обговорення. Результати цитогенетичного аналізу радіопротекторної активності гумату натрію представлені в табл. 1.

В контролі середня частота аберантних метафаз складала $(3,29 \pm 0,98)\%$, а частота абераций — $(3,59 \pm 1,01)$ абераций/100 клітин, що в межах статистичної похибки відповідає верхній межі спонтанного рівня соматичного хромосомного мутагенезу в лімфоцитах периферичної крові людини. Частота аберантних метафаз при культивуванні лімфоцитів з гуматом натрію (100 мкг/мл) становила $(2,72 \pm 0,63)\%$. При цьому не було виявлено клітин з більш ніж однією аберацією. Відмінності від спонтанного рівня були статистично недостовірними ($\chi^2 = 0,54$, $p = 0,46$), що свідчить про відсутність мутагенного ефекту гумату натрію в культурі лімфоцитів людини при дії у цій концентрації.

Опромінення цільної крові в дозі 1 Гр призводило до вірогідного збільшення рівня хромосомних пошкоджень в культурі лімфоцитів до $(16,89 \pm 1,76)\%$ за критерієм частоти аберантних метафаз та $(20,00 \pm 1,89)$ абераций/100 клітин за критерієм частоти абераций хромосом ($\chi^2 = 36,1$,

Таблиця 1. Радіопротекторний ефект гумату натрію в культурі лімфоцитів людини

Дослід	Частота аберантних метафаз, %	Кількість абераций / 100 метафаз	РФ, %
Контроль	$3,29 \pm 0,98$	$3,59 \pm 1,01$	-
Гумат натрію, 100 мг/л	$2,72 \pm 0,63$	$2,72 \pm 0,63$	-
γ -опромінення, 1 Гр	$16,89 \pm 1,76$	$20,00 \pm 1,89$	-
γ -опромінення, 1 Гр + + гумат натрію, 100 мг/л	$11,75 \pm 1,61^*$	$12,48 \pm 1,47^*$	37,60

Примітка. * $p < 0,05$, порівняно з дослідом тільки з опроміненням

p<0,001). Додавання в культуру лімфоцитів гумату натрію в концентрації 100 мкг/мл в G₀ стадії, протягом (45±15) хв після опромінення призводило до вірогідного зменшення частоти радіаційно-індукованих аберацій хромосом на 37,6% ($\chi^2 = 2,94$, p = 0,009). Частота аберантних метафаз при цьому зменшувалась на 30,43%.

Порівнюючи отримані результати з даними літератури слід за-значити наступне. За результатами попередніх досліджень було ви-явлено радіопротекторний цитогенетичний ефект гумату натрію при пророщуванні опроміненого (рентгенівське опромінення в дозі 10 Гр) насіння *Allium cepa L.* в розчині препарату з концентрацією 100 мкг/мл [24]. Рівень аберантних клітин кореневої меристеми *Allium cepa L.* при цьому зменшувався на 51,27%. Однак, на нашу думку, це не обов'язково свідчить про більшу цитогенетичну радіопротекторну ефективність гумату натрію в *Allium*-тесті, ніж в культурі лімфоцитів людини. Відомо, що антимутагенний ефект може залежати від рівня індукованого мутагенезу, зменшуючись при зростанні мутагенного на-вантаження. Так, за результатами досліджень В. В. Семенова і співавт. [26], при частоті індукованих γ -опроміненням абераций хромосом в клітинах *Crepis capilaris*, що дорівнювала 4,62%, антимутагенний ефект парааміnobензойної кислоти (ПАБК) складав 50,6%. При підвищенні рівня індукованих абераций до 13,33% антимутагенний ефект ПАБК знижувався до 30,8%, а при частоті абераций 31,97% ПАБК втрачала здатність відновлювати пошкодження хромосом. Тому однією з причин виявленої відмінності в радіопротекторній ефективності гумату натрію в різних тест-системах може бути різний рівень радіаційно-індукованого мутагенезу, оскільки частота радіаційно-індукованих аберантних клі-тин в *Allium*-тесті становила (9,05±0,87)%, а в представлений роботі – (16,89±1,76)%.

У зв'язку з цим викликає також зацікавленість порівняння отри-маних результатів з даними про антимутагенний ефект гумату натрію в культурі лімфоцитів людини щодо цитогенетичних ефектів діоксидину [27]. Діоксидин є прооксидантним мутагеном, оскільки його ефекти опосередковані утворенням H₂O₂ і продуктами його вільно-радикаль-ного розкладу, перш за все гідроксильним радикалом, що наближає механізм цитогенетичної дії цього мутагену до дії іонізуючого опро-мінення. Крім того, механізм ремінерації пошкоджень ДНК, індукованих діоксидином, подібний до ремінерації пошкоджень ДНК, індукованих γ -опроміненням [28]. Гумат натрію навіть в концентрації в два рази менший (50 мкг/мл), ніж використана нами в даній роботі та в *Allium*-

тесті, повністю гальмував цитогенетичні ефекти діоксидину в культурі лімфоцитів людини. При цьому, рівень індукованого діоксидином мутагенезу був подібний до індукованого рентгенівським опроміненням в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa L.* — (12,5±4,13)% та (9,05±0,87)% аберантних клітин відповідно. Тобто, ефект гумату натрію був значно сильнішим, ніж в *Allium*-тесті. Оскільки діоксидин та гумат натрію вносили в культуру лімфоцитів в пізній G₂ стадії міtotичного циклу — в даному випадку можливе переважання десмутагенного, а не антиоксидантного (чи іншого) механізму в реалізації захисного ефекту.

Таким чином, аналіз отриманих результатів в порівнянні з даними літератури свідчить на користь уявлень про поліфункціональність механізмів реалізації антимутагенних ефектів гумату натрію. Разом з тим особливий інтерес викликає здатність гумату натрію зменшувати рівень цитогенетичних ефектів іонізуючої радіації при його дії після опромінення. Це створює передумови розробки фармакологічних заходів на основі фізіологічно активних гумінових речовин не тільки з профілактичними, але й терапевтичними радіопротекторними властивостями.

Висновки. Гумат натрію в концентрації 100 мкг/мл не проявляє мутагенного впливу в культурі лімфоцитів периферичної крові людини. Виявлено терапевтичний радіопротекторний цитогенетичний ефект гумату натрію при дії в цій концентрації після γ -опромінення в дозі 1 Гр.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. 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. Patočka // J. Appl. Biomed. — 2005. — N 3. — P. 13—24.
2. Klöcking R. Medical aspects and applications of humic substances / R. Klöcking, B. Helbig // Biopolymers for medical and pharmaceutical applications. — 2005. — N 1. — P. 3—15.
3. Бузлама А.В. Экспериментальный анализ адаптогенной активности лигногумата / А. В. Бузлама, Ю. Н. Чернов, А. И. Сливкин // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2010. — № 2. — С. 135—139.
4. Effects of humic acids *in vitro* / J. Vašková [et al.] // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. — 2011. — Vol. 47. — P. 376—82.
5. Joone G. K. Investigation of the immunostimulatory properties of oxihumate / G. K. Joone, J. Dekker, C. E. van Rensburg // Z. Naturforsch. — 2003. — N 3—4. — P. 263—267.
6. Glucan and humic acid: Synergistic effects on the immune system / V. Větvička [et al.] // J. Med. Food. — 2010. — N 4. — P. 863—869.
7. 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 Inter-

- national 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.
8. Pant K. Shilajit: A Humic Matter Panacea for Cancer / K. Pant, B. Singh, N. Thakur // Internat. J. Toxicol. Pharmacol. Res. — 2012. — N 2. — P. 17–25.
 9. Denso H. K. Antitumor effect of humus extract on murine transplantable L1210 leukemia / H. K. Denso // J. Vet. Med. Sci. — 2007. — N 10. — P. 1069–1071.
 10. Humic acid induces apoptosis in human premyelocytic leukemia HL-60 cells / H.-L. Yang [et al.] // Life Sciences. — 2004. — Vol. 75. — P. 1817–1831.
 11. Dissolved humic substances initiate DNA-methylation in cladocerans // S. Menzel [et al.] // Aquatic Toxicology. — 2011. — Vol. 105. — P. 640–642.
 12. Humic Substances and Crude Oil Induce Cytochrome P450 1A Expression in the Amazonian Fish Species Colossoma macropomum (Tambaqui) / A. Y. Matsuo [et al.] // Environ. Sci. Technol. — 2006. — Vol. 40 (8). — P. 2851–2858.
 13. Таран Д. О. Токсическое действие ароматических соединений на гидробионты и его ослабление гуминовыми веществами / Д. О. Таран, М. Н. Саксонов, С. Е. Плеханов // Вестник ИрГСХА. — 2012. — Вып. 50. — С. 87–93.
 14. Klavins M. Immobilized humic substances as sorbents / M. Klavins, L. Eglite, A. Zicmanis // Chemosphere. — 2005. — N 2. — P. 339–343.
 15. Natural humics impact uranium bioreduction and oxidation / B. Gu [et al.] // Environ. Sci. Technol. — 2005. — Vol. 39. — P. 5268–5275.
 16. Дизайн адгезионных гуминовых полимеров и их самосборка в биосовместимые нанопокрытия / И. В. Перминова [и др.] // Материалы междунар. конфер. “Руснанотех-2009”, Москва, 2009. — М. : [б. и.], 2009. — С. 521–523.
 17. Влияние гумата калия на накопление ^{137}Cs ячменем при выращивании растений на почве с различной обеспеченностью элементами минерального питания / Л. Н. Ульяненко [и др.] // Радиац. биология. Радиоэкология. — 2008. — № 1. — С. 110–116.
 18. Antimutagenic and/or genotoxic effects of processed humic acids as tested upon *S. cerevisiae* D7 / J. Kuběšová [et al.] // Environ. Chem. Lett. — 2011. — N 9. — P. 229–233.
 19. Humic acids reduce the genotoxicity of mitomycin C in the human lymphoblastoid cell line TK6 / G. Ferrara [et al.] // Mutat. Res. — 2006. — N 1. — P. 27–32.
 20. Ferrara G. Anticlastogenic, antitoxic and sorption effects of humic substances on the mutagen maleic hydrazide tested in leguminous plants / G. Ferrara, E. Loffredo, N. Senesi // Eur. J. Soil Sci. — 2004. — Vol. 55. — P. 449–458.
 21. Генотоксические эффекты кадмия и свинца и модифицирующее влияние гумата калия при выращивании пшеницы в почве, загрязненной тяжелыми металлами / Н. С. Степанчикова [и др.] // Сельскохозяйственная биология. — 2008. — № 5. — С. 28–32.
 22. Gorova A. I. The rise of human genome stability under conditions of anthropogenic transformation of the environment / A. I. Gorova, I. I. Klimkina, V. Y. Gruntovaya // NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security. Simulation and assessment of chemical processes in a multiphase environmental. — Springer Scince. — 2008. — P. 395–402.
 23. 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.
 24. Шкарупа В. М. Вплив гумату натрію на цитогенетичні ефекти Х-опромінення / В. М. Шкарупа // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології : зб. наук. праць. — 2010. — Вип. 15. — С. 333–337.

25. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини : метод. рекомендації / КМДПО МОЗ України. — К. : [б. в.], 2003. — 23 с.
26. Семенов В. В. Количественные и качественные критерии оценки эффективности антимутагенов в эксперименте / В. В. Семенов, И. А. Студенцова // Вестник РАМН. — 1998. — № 3. — С.16–20.
27. Шкарупа В. М. Антикластогенна активність гумату натрію при мутагенезі, індукованому агентом γ -типу в культурі лімфоцитів людини / В. М. Шкарупа // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології : зб. наук. праць. — 2011. — Вип. 16. — С. 215–220.
28. Бакай Т. С. Характер повреждений ДНК и их ликвидации при действии диоксида на бактерии / Т. С. Бакай, Л. М. Фонштейн // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 1987. — № 4. — С. 35–39.

Стаття надійшла до редакції 25.07.2012.

B. H. Шкарупа, Л. В. Неумерзецкая, С. В. Клименко

*Государственное учреждение “Национальный научный центр радиационной медицины Национальной академии медицинских наук Украины”,
ул. Мельникова, 53, г. Киев, 04050, Украина*

**РАДИОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ГУМАТА НАТРИЯ В КУЛЬТУРЕ
ЛІМФОЦІТІВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЇ КРОВІ ЧЕЛОВЕКА**

Гумат натрия в концентрации 100 мкг/мл не оказывает мутагенного влияния в культуре лимфоцитов периферической крови человека. Показан терапевтический радиопротекторный цитогенетический эффект гумата натрия при действии в этой концентрации после γ -облучения в дозе 1 Гр.

Ключевые слова: γ -облучение, антимутаген, гумат натрия.

V. M. Shkarupa, L. V. Neumerzickaya, S. V. Klymenko

*State Institution “National Research Center for Radiation Medicine
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”,
Melnikov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine*

**RADIOPROTECTIVE EFFECT OF THE SODIUM HUMATE IN HUMAN
PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN CULTURE**

Sodium humate in concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do not render mutagenic influence in human peripheral blood lymphocytes in culture. The therapeutic radioprotective cytogenetic effect of sodium humate in this concentration is shown after γ -irradiation in a dose 1 Gy.

Key words: radiation mutagenesis, antimutagens, sodium humate.