

УДК 575.224.6:624.131.26

В. Н. Шкарупа✉, **С. В. Клименко**, **В. В. Талько**

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

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ЛИГНОГУМАТА НАТРИЯ ПРИ γ -ОБЛУЧЕНИИ В *ALLIUM*-ТЕСТЕ

Цель работы. Комплексный цитогенетический анализ эффектов лигногумата натрия при индуцированном γ -облучением мутагенезе в *Allium*-тесте.

Материалы и методы. Анализ клеток корневой меристемы проростков семян *Allium* сера L. проводили ана-телофазным методом. Исследовали влияние лигногумата натрия (100 мг/л) на цитогенетические эффекты γ -облучения (^{137}Cs) в дозах 5, 10 и 20 Гр.

Результаты. Полифункциональность лигногумата натрия как антимутагена обеспечивается наличием не только антиоксидантных свойств, но и других антимутагенных механизмов. При этом лигногумат натрия проявляет свойства терапевтического радиопротектора. Стимуляция процессов репарации под влиянием лигногумата зависит от дозы облучения. Наиболее эффективна она при дозе 5 Гр. При облучении в дозах 10 и 20 Гр, преобладают другие механизмы, среди которых стимуляция репопуляции и апоптоза. Выявлена дифференциальная активность препарата по отношению к различным типам аберраций, наиболее эффективно уменьшение частоты маркеров радиационного мутагенеза – аберраций хромосомного типа, меньшая эффективность проявляется в отношении длительно живущих потенциальных изменений хромосом по сравнению с короткоживущими.

Выводы. Показана множественность механизмов реализации антимутагенных свойств лигногумата натрия при индуцированном γ -облучением мутагенезе в *Allium*-тесте.

Ключевые слова: антимутагенез, лигногумат натрия, γ -облучение, *Allium*-тест, терапевтический радиопротектор.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2014. Вип. 19. С. 490–508.

V. M. Shkarupa✉, **S. V. Klymenko**, **V. V. Talko**

State Institution ‘National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine’, 53, Melnykov str., Kyiv, 04050, Ukraine

Cytogenetic analysis of radioprotective properties of sodium lignogumate after γ -exposure in *Allium*-test

Objective. Comprehensive cytogenetic analysis of the effects of sodium lignohumate 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. Lignohumate investigated the effect of sodium (100 mg/l) on cytogenetic effects γ -irradiation (^{137}Cs) at doses of 5, 10 and 20 Gy.

✉ Шкарупа Владимир Николаевич, e-mail: shkarupa_vlad@bigmir.net

Results. Polyfunctionality lignohumate sodium antimutagen as provided by the presence not only antioxidant properties, but other antimutagenic mechanisms. Thus Lignohumate sodium exhibits radioprotective properties of the therapeutic. Stimulation of repair processes influenced lignohumate depends on the radiation dose. It is most effective at a dose of 5 Gy. Upon irradiation at doses of 10 Gy and 20 predominate, other mechanisms, including stimulation of apoptosis and repopulation. 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 multiple mechanisms for implementing antimutagenic properties lignohumate sodium γ -irradiation-induced mutagenesis in *Allium*-test.

Key words: antimutagenesis, lignohumate sodium, γ -irradiation, *Allium*-test therapeutic radioprotector.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2014. Вип. 19. С. 490-508.

ВСТУПЛЕНИЕ

В настоящее время в научной литературе имеется большое количество сведений о биологической активности гуминовых веществ (ГВ) и применении препаратов на их основе в медицине [1–7]. ГВ – это комплекс природных полимерных соединений, продуктов процессов гумификации, которые содержатся в почве, торфах, бурых углях, сапропелях и др. Основной компонент ГВ – гуминовые кислоты, физиологически активной формой которых являются их соли (гуматы). Особенностью ГВ является насыщенность их молекул самыми разнообразными функциональными группами: карбоксильными, фенольными и спиртовыми гидроксильными, хиноидными группировками, метоксилами, амино- и амидогруппами [3]. Подобные структурные особенности ГВ позволяют им участвовать в разнообразных окислительно-восстановительных реакциях, в фермент-субстратных взаимодействиях, влиять на осмотическое давление, образовывать комплексные соединения хелатного типа, что в конечном итоге и обеспечивает ГВ широчайший спектр биологической активности [3, 5].

Чрезвычайно интенсивные исследования ГВ в последнее десятилетие свидетельствуют о потенциале значительного расширения существующего на сегодняшний день фармакологического спектра их применения. Помимо стимуляции процессов роста, мембранотропной активности, усиления энергетической обеспеченности клеточных процессов, активации синтеза белка, ГВ являются эффективными адсорбентами тяжелых металлов, радионуклидов, ПАВ, пестицидов. В научной литературе описана их антиоксидантная, иммуностимулирующая, противовоспалительная, антивирусная и противоопухолевая активность [3–9]. Показано, что под влиянием ГВ изменяется профиль экспрессии более 30 генов, процессы метилирования ДНК [10, 11].

Несмотря на длительную историю изучения ГВ, в связи с чрезвычайной сложностью гетерополимерной

INTRODUCTION

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 healthcare [1–7]. HS – is a complex of natural polymer compounds, products of humification processes, which are contained in the soil, peat, brown coal, sapropel and others. The main component of the HS is a 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 [3]. These structural features of HS allow them to participate in a wide variety of redox reactions, an entire range of enzyme-substrate interactions, affect the osmotic pressure, to form complex compounds of a 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. The scientific literature describes their antioxidant, immunostimulatory, anti-inflammatory, antiviral and antitumor activity [3–9]. It is shown, that under the influence of HS varies expression profile of more than 30 genes, DNA methylation processes [10, 11].

Despite a long history of studying HS, due to the extreme complexity of the heteropolymer

структури гуминових кислот пока не представляється можливим виділити в їх макромолекулах определенні дескриптори, обумовлюючі фізіологічну активність. Разнообразие их биологических эффектов нельзя свести к единому механизму. Подтверждением этому является полифункциональность препаратов из ГВ. Соответственно, механизм действия таких продуктов может не сводиться к одной функции, но быть комплексным, а эффект определяется некоей равнодействующей. Возможен вариант, когда действует только комплекс в целом и невозможно выделить его отдельные компоненты, каждый из которых сам по себе оказывается неэффективным [1, 3, 5].

При этом существует проблема стандартизации препаратов из гуминовых веществ. Их получение зависит от особенностей технологического процесса, вида сырья, содержания микроэлементов, зольности, окисленности гуматов и иных характеристик [3, 5]. В последнее время внимание исследователей привлекает изучение биологической активности не только природных ГВ, но их синтетических аналогов, в частности лигногуматов [9, 12]. Лигногуматы – промышленные гуминовые препараты, производящиеся на основе технологии окислительно-гидролитической деструкции промышленных лигносульфонатов.

Выявлены антимутагенные свойства ГВ по отношению к ряду химических мутагенов, при этом данные относительно антимутагенных / мутагенных свойств ГВ противоречивы, несмотря на их низкую токсичность [11, 13]. Исследования особенностей модификации ГВ цитогенетических эффектов облучения остаются малоизученными. Учитывая существующие данные о сильном радиопротекторном влиянии ГВ на выживаемость облученных животных [14], целью нашей работы было провести комплексный цитогенетический анализ эффектов лигногумата натрия при индуцированном γ -облучением мутагенезе в *Allium*-тесте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве тест-системы использовали клетки апикальной меристемы проростков семян *Allium cepa* L. Гамма-облучение (^{137}Cs) семян (возраст 9 месяцев) проводили с помощью установки IBL 437C (Франция) в дозах: 5, 10, 20 Гр (мощность дозы 2,46 Гр/мин). Семена вносили в экспериментальные растворы на протяжении 30 ± 15 мин после облучения и проращивали при температуре 25°C 72 часа. Использовали лигногумат натрия (марка А, НПО РЭТ, Санкт-Петербург, Российская Федерация) в концентрации 100 мг/л, в

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 variant is only valid when the complex is in general, impossible to distinguish individual components, each of which in itself is ineffective [1, 3, 5].

In this case, there is the problem of standardization of products of humic substances. Their preparation is dependent on the characteristics of the process, the type of raw material, the trace element content, ash content, humates oxidations and other characteristics [3, 5]. More recently researchers pay attention to studying the biological activity of not only natural HS, but their synthetic analogues, in particular lignohumate [9, 12]. Lignohumate – industrial humic preparations, producing using technology based on oxidation-hydrolytic degradation of industrial lignosulfonate.

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 [11, 13]. Studies of the modification of HS cytogenetic effects of radiation are still poorly understood. Taking into account the existing data about the strong radioprotective effect of HS on the survival of irradiated animals [14], the objective of this study was to conduct a comprehensive analysis of cytogenetic effects of lignohumate sodium by γ -irradiation-induced mutagenesis in *Allium*-test.

MATERIALS AND METHODS

As a test system using cell apical meristem seedlings *Allium cepa* L.; γ -irradiation (^{137}Cs) seeds (age 9 months) 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. of sodium lignohumate (grade A, NGOs RET, Saint-Petersburg, Russia) at a concentration of 100 mg/l were used, in the control - distilled water. In the molecular

контроле – дистиллированная вода. В молекулярно-массовом распределении органических веществ в сухом образце лигногуматов марки А преобладает средне-молекулярная фракция (34 тыс. а.е.м.) – 70 % от суммы фракций. Низкомолекулярная (19 тыс. а.е.м.) и высокомолекулярная (более 50 тыс. а.е.м.) фракции составляют ~ 10 и 20 % соответственно. При этом лигногуматы являются относительно низкомолекулярными препаратами по сравнению с промышленными гуминовыми препаратами из углей, для которых характерно наличие одной фракции с гораздо большими значениями молекулярной массы (60–70 тыс. а.е.м.). Вероятно, в состав низкомолекулярной фракции входят вещества кислоторастворимой фракции [12].

Цитогенетический анализ клеток корневой меристемы проводили в первом митотическом цикле ана-телофазным методом на временных препаратах, окрашенных ацетоорсеином. Для оценки влияния лигногумата натрия анализировали комплекс цитогенетических критериев: частота aberrантных ана-телофаз (ЧАА) и aberrаций, поврежденность aberrантной клетки (ПАК – количество aberrаций на aberrантную клетку), частота мультиaberrантных клеток (МАК), спектр aberrаций, соотношение “мостов” и фрагментов (как показатель интенсивности репарации), распределение aberrаций по клеткам, митотический индекс, распределение клеток по фазам митоза. К aberrантным относили ана-телофазы с фрагментами и “мостами”, как показателями кластогенного эффекта. Отдельно учитывали aberrации хроматидного и хромосомного типов.

Эффективность антимуутагенного действия лигногумата натрия оценивали по показателю: редуционный фактор (РФ), который характеризует степень ингибирования индуцированного мутагенеза под влиянием модификатора. РФ рассчитывали по критериям ЧАА (РФ₁) и частоты aberrаций (РФ₂):

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

где М - ЧАА или частота aberrаций (для РФ₁ и РФ₂ соответственно) индуцированных мутагеном (γ-облучением); АМ + М – ЧАА или частота aberrаций (для РФ₁ и РФ₂ соответственно) при комбинированном действии мутагена и модификатора. Статистическую обработку результатов экспериментальных данных проводили согласно общепринятым методикам, достоверность отличий оценивали с помощью точного двухстороннего критерия Фишера [15].

weight distribution of organic substance in the dry sample Lignohumate grade А is predominant medium-molecular fraction (34 thousand. Amu) – 70 % of the fractions. Low molecular weight (19 thousand. Amu) and a high molecular weight (greater than 50 thousand. Amu) fractions were ~ 10 % and 20 % respectively. Thus lignohumates are relatively low molecular weight preparations, compared with industrial humic preparations of coals, which are characterized by the presence of a fraction of a much larger molecular weights (60–70 thousand. Amu). Probably, the low molecular weight fraction contain substances of acid-soluble fraction [12].

Cytogenetic analysis of root meristem cells was carried out in the first mitotic cycle, using anatelophase method on temporary preparations stained atsetoorseinom. To evaluate the effect of sodium lignohumate were analyzed complex cytotgenetic criteria: frequency of aberrant anatelophases (FAA) and aberrations, damage aberrant cells (PAC – the number of aberrations per aberrant cell), frequency of multiaberrant cells (FMC), the spectrum of aberrations, the ratio of “bridges” and fragments (as an indicator of the intensity of repair), distribution of aberrations in cells, mitotic index, the distribution of cells in phases of mitosis. To aberrant were attributed ana-telophase with fragments and “bridges” as indicators of clastogenic effect. Separately were accounted aberrations of chromatid and chromosome types.

Efficiency of antimutagenic action of lignohumate sodium was estimated on an index: 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):

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

where М - FAA or aberration frequency (for RF₁ and RF₂ respectively) induced by mutagen (γ-irradiation); АМ + М - FAA or aberration frequency (for RF₁ and RF₂, 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 [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения влияния лигногумата натрия на уровень повреждений хромосом, индуцированных γ -облучением в клетках *Allium cepa L.* представлены таблице 1.

Частота aberrantных клеток и aberrаций хромосом при действии гуминового препарата на необлученные семена не отличалась от контроля, что свидетельствует об отсутствии мутагенного эффекта препарата в использованной концентрации. При проращивании облученных семян в растворе лигногумата натрия проявляется антимутагенный эффект последнего – ЧАА, индуцированных γ -облучением, снижалась на ~ 40–58 %. Следует отметить, что в данном случае препарат проявляет активность в случае применения после облучения, т. е. является терапевтическим радиопротектором. Это свойство лигногумата натрия представляется нам особо значимым для теоретического обоснования разработки фармакологических препаратов защиты генетического аппарата на основе ГВ.

Полифенольная структура гуматов позволяет предполагать у них наличие антиоксидантных свойств, которые были многократно освещены в литературе [1, 3, 5, 8, 9, 16]. Наиболее эффективно снижение частоты aberrаций хромосом при применении антиоксидантов до облучения, поскольку радиационно-индуцированные АФК являются реакционно активными и короткоживущими. Однако существуют данные о

RESULTS AND DISCUSSION

The results of studying the effect of the level of sodium lignohumate chromosome damage, induced by γ -irradiation in *Allium cepa L.* cells are presented Table 1.

The frequency of aberrant cells and chromosomal aberrations by the action of humic preparation for non-irradiated seeds do not differ from the control, indicating the absence of the mutagenic effect of the preparation in used concentration. When irradiated seeds were germinated in a solution of sodium lignohumate, was shown its antimutagenic effect – FAA, induced γ -irradiation, was reduced by ~ 40–58 %. It should be noted, that in this case the preparation is active in case of application after irradiation, i.e. is a therapeutic radioprotectors. This property of lignohumate sodium seems to us particularly significant for the theoretical study of development of pharmacological preparations to protect the genetic system based on HS.

Polyphenolic structure of humates suggests presence of antioxidant properties, that have been repeatedly described in the literature [1, 3, 5, 8, 9, 16]. 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 is evidence of the gene-protective

Таблица 1

Цитогенетические показатели в клетках меристемы проростков облученных семян *Allium cepa L.* при действии лигногумата натрия

Table 1

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

Доза γ -облучения, Гр	Концентрация лигногумата Na, мг/л	ЧАА, % M±m	РФ ₁ , %	Аберраций / 100 клеток M±m	РФ ₂ , %	ПАК
γ -irradiation dose, Gy	Sodium lignohumate concentrtrtion, mg/l	FAA, % M±m	RF ₁ , %	Aberrations per 100 cells M±m	RF ₂ , %	PAC
0	0	2,00 ± 0,51	–	2,00 ± 0,51	–	1,00
0	100	2,01 ± 0,55	–	2,32 ± 0,59	–	1,15
5	0	5,80 ± 0,81	–	6,88 ± 0,88	–	1,19
10	0	9,64 ± 1,10	–	15,43 ± 1,34	–	1,60
20	0	20,15 ± 1,42	–	27,61 ± 1,58	–	1,37
5	100	3,50 ± 0,56*	39,66	4,79 ± 0,42**	30,38	1,37
10	100	4,77 ± 0,72*	50,52	7,83 ± 0,91*	49,26	1,64
20	100	8,51 ± 0,89*	57,77	12,16 ± 1,04*	52,26	1,43

Примечания. * – p < 0,05 по сравнению с вариантом только облучение; ** – p = 0,05, по сравнению с вариантом только облучение.
Note. * – p < 0.05, as compared to a variant only irradiation, ** – p = 0.05, as compared to a variant only irradiation.

генопротекторной роли антиоксидантов при их применении после облучения. Одним из объяснений этого может быть то, что действие радиации приводит к нарушению прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза, а действие антиоксидантов в постлучевой период способствует его стабилизации. Вместе с тем, имеются данные и об увеличении концентрации АФК при действии ГВ (цит. по [1]). Противоречивость данных об антиоксидантных/прооксидантных свойствах ГВ обусловлена не только малоизученными особенностями концентрационных зависимостей. Несмотря на то, что при использованной нами концентрации лигногумата, по данным литературы, не наблюдается активация ПОЛ, необходимо также учитывать регуляторную роль низких концентраций АФК, которые могут индуцироваться при действии ГВ. Некоторые исследователи отмечают, что генерация O_2^- под влиянием ГВ происходит путем регулирования системы ксантин/ксантин-оксидазы, что важно, с учетом ключевой роли, которую играет эта система в реализации защитных механизмов при биотических стрессах и абиотических стрессах, вызванных тяжелыми металлами. В этой связи привлекают внимание данные о том, что при действии гуматов в диапазоне концентраций 20–80 мг/л наблюдается незначительное увеличение концентрации АФК в корневой меристеме риса на фоне отсутствия активации процессов ПОЛ. Поскольку указанные эффекты и в ряде других работ сопровождались стимуляцией ростовых процессов, их авторы высказывают предположение, что АФК, возникающие под влиянием ГВ, могут действовать в качестве промежуточного агента, играя регуляторную роль, приводя к стимуляции митоза и дифференциации клеток (цит. по [1]).

По данным А. В. Бузлама [9] введение лигногумата облученным животным обеспечивает не только снижение содержания продуктов ПОЛ, но и компенсаторное уменьшение избыточной активации ферментативного звена антиоксидантной защиты. Влияние препарата на антирадикальную и антиокислительную активность гидро- и липофильных фракций тканей характеризуется перераспределением липофильных антиоксидантов из печени в кровь и ткани, а гидрофильных, наоборот, из тканей в печень. Таким образом, влияние гуматов на прооксидантно-антиоксидантный гомеостаз не исчерпывается перехватом АФК, а имеет более сложный, системный характер, когда происходит активация различных внутриклеточных регуляторных путей, а их выбор клеткой может зависеть от концентрации ГВ. Учитывая антимуtagenный эффект лигногумата при

role of antioxidants, when applied after irradiation. One of the explanations for this may be, that the effect of radiation leads to disruption of prooxidant-antioxidant homeostasis, and the effect of antioxidants in the post-radiation period contributed to its stabilization. However, available the data about the increase of ROS concentration at HS action [cit. 1]. Conflicting evidence about the antioxidant / prooxidant properties of HS is due not only poorly understood features of the concentration dependences. Despite the fact that, when we used lignohumate concentrations, according to the literature, there is no activation of lipid peroxidation, must also be consider, the regulatory role of low concentrations of ROS, which can be induced by the action of HS. Some researchers have noted, that the generation of O_2^- under the influence of HS, occurs through the regulation of xanthine / xanthine oxidase, which is important, taking into account a key role, played by this system in the implementation of protective mechanisms under biotic and abiotic stresses, caused by heavy metals. In this regard, attention is attracted to the data, that by the action of humates in the concentration range of 20–80 mg/l, there is a slight increase in the concentration of ROS in the root meristem of rice with the absence of activation of lipid peroxidation processes. Since these effects in a number of other works were accompanied by stimulation of growth processes, the authors suggest that ROS, that occur under the influence of HS, can act as an intermediate agent, playing a regulatory role, leading to stimulation of mitosis and cell differentiation [cit. 1].

According to A. V. Buzlama [9], injection of lignohumate to irradiated animals not only provides reduction of lipid peroxidation products, but also a compensatory reduction in excessive activation of the enzymatic antioxidant defense level. Effect 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. 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. Taking into account the antimutagenic

применении после облучения, наличие подобных, более сложных, механизмов влияния на прооксидантно-антиоксидантный гомеостаз можно предположить и в наших экспериментах.

Мы не исключаем и других механизмов цитогенетической радиопротекторной активности лигноумата натрия. В связи с этим следует отметить ряд закономерностей, выявленных в наших экспериментах. Прежде всего, это более сильный антимуtagenный эффект при большей дозе облучения. По критерию ЧАА (показатель $РФ_1$) наблюдается дозовая зависимость этого эффекта. По критерию частота aberrаций (показатель $РФ_2$) антимуtagenный эффект лигноумата при облучении в дозах 20 и 10 Гр остается на одинаковом уровне: $РФ_2 = 52,66\%$ и $49,26\%$ соответственно, достоверно превышая этот показатель при облучении в дозе 5 Гр: $РФ_2 = 30,38\%$ (см. табл. 1). Одним из факторов, определяющих эффективность антимуtagена является частота индуцированных мутагеном aberrаций. Как правило, при повышении уровня индуцированного мутагенеза эффективность большинства антимуtagенов снижается. Так, при частоте индуцированных γ -облучением aberrаций на семенах *Crepis capilaris*, равной $4,62\%$, антимуtagenный эффект парааминобензойной кислоты (ПАБК) составлял $50,6\%$. При повышении уровня индуцированных aberrаций до $13,33\%$ антимуtagenный эффект ПАБК снижался до $30,8\%$, при частоте aberrаций $31,97\%$ ПАБК теряла способность восстанавливать повреждения хромосом (цит. по [17]). Возможно, выявленные закономерности, в определенной степени, обусловлены проявлением элиситорных свойств гуминовых веществ, активацией механизмов неспецифической резистентности к повреждающим факторам [18, 19]. Исследователи неоднократно подчеркивали именно адаптогенные и антистрессовые свойства ГВ, когда их физиологическая активность проявляется сильнее не в условиях нормы, а в условиях биотических и абиотических стрессов [16, 18, 19].

Как видно из табл. 1, антимуtagenный эффект лигноумата сильнее проявляется по критерию ЧАА, чем по критерию частота aberrаций: $РФ_1 > РФ_2$ (в варианте с облучением 10 Гр эти показатели достоверно не отличаются). При действии лигноумата, на фоне уменьшения ЧАА и частоты aberrаций, наблюдается тенденция увеличения поврежденности aberrантной клетки – 1,19 и 1,37; 1,60 и 1,64; 1,37 и 1,43 в вариантах: облучение и облучение + лигноумат, при дозах 5 Гр, 10 Гр и 20 Гр соответственно (см. табл. 1). Т. е. наблюдается предпочтительное уменьшение клеток с меньшим числом

effect of lignohumate, when applied after irradiation, the presence of such, more complex mechanisms of influence on prooxidant-antioxidant homeostasis can be assumed in our experiments.

We do not exclude other mechanisms of cytogenetic radioprotective activity of lignohumate sodium. In this connection it should be noted a number of patterns, identified in our experiments. First of all, it's a stronger antimutagenic effect at a higher dose of radiation. On the criterion of the FAA (index RF_1) was observed dose dependence of this effect. On the criterion of aberrations frequency (index RF_2) antimutagenic effect of lignohumate by irradiation at doses of 20 Gy and 10 Gy remains at the same level: $RF_2 = 52.66\%$ and 49.26% , respectively, significantly exceeding this index by irradiation at a dose of 5 Gy: $RF_2 = 30.38\%$ (see Table 1). One of the factors, determining the efficiency of antimutagen, is the frequency of aberrations, induced by mutagens. As a general rule, with an increase in the level of induced mutagenesis, efficiency of most antimutagens is reduced. For example, at a aberrations frequency, induced by γ -irradiation, on the seeds *Crepis capilaris*, equal to 4.62% , antimutagenic effect of para-aminobenzoic acid (PABA) was 50.6% . At higher levels of induced aberrations to 13.33% , antimutagenic effect of PABA decreased to 30.8% , by the frequency of aberrations 31.97% PABA lost the ability to repair chromosomal damage [cit. 17]. 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 [18, 19]. 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 [16, 18, 19].

As can be seen from Table 1, antimutagenic effect of lignohumate 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 lignohumate, on a background of reduction the FAA and the frequency of aberrations, there is a tendency to increase the damage of aberrant cells – 1.19 and 1.37; 1.60 and 1.64; 1.37 and 1.43 in variants: exposure and exposure + Lignohumate, at doses of 5 Gy, 10 Gy and 20 Gy, respectively (see Table 1). I.e., was observed

аберацій, по сравнению с более поврежденными клетками. Рассматривая возможные механизмы, можно предположить, что при действии препарата происходит более эффективная репарация повреждений в клетках с одной аберацией (в результате чего, при цитогенетическом анализе, они “переходят” в класс клеток без абераций) при менее эффективной репарации в клетках с большим числом повреждений. Это косвенно подтверждается анализом поклеточного распределения абераций. На рисунке 1 представлено соотношение аберрантных клеток с различным числом абераций, выявленных в эксперименте.

В вариантах эксперимента: облучение + лигногумат, доля клеток с 1 аберацией среди аберрантных клеток меньше, чем в вариантах только с облучением (кроме варианта с облучением в дозе 10 Гр). При облучении 20 Гр, действие лигногумата характеризует преобладание доли клеток с 2 аберациями, а при облучении 10 Гр – клеток с 3 аберациями, при сравнении долей таких клеток в вариантах только с облучением (см. рис.1).

Анализ спектра абераций также выявил ряд закономерностей. Основные типы хромосомных перестроек, наблюдаемых в эксперименте и спектр абераций представлены на рисунках 2–3 и в таблице 2.

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 the preparation is more effective in the repair of damaged cells with one aberration (with the result that, by cytogenetic analysis, they “pass” in the class of cells without aberrations), with less efficient repair in cells with a large number of injuries. 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: irradiation + lignohumate, proportion of cells with 1 aberration among aberrant cells is lower vs. in variants with only irradiation (except the variant with 10 Gy irradiation). At an irradiation of 20 Gy, the effect of sodium lignohumate characterizes the prevalence of cells with 2 aberrations, and by the irradiation of 10 Gy – cells with 3 aberrations, when comparing percentage of such cells under only the irradiation (see Fig. 1).

Analysis of the aberrations spectrum also revealed a number of patterns. The main types of chromosomal rearrangements, observed in the experiment, and the spectrum of aberrations are shown in Figures 2–3 and in Table 2.

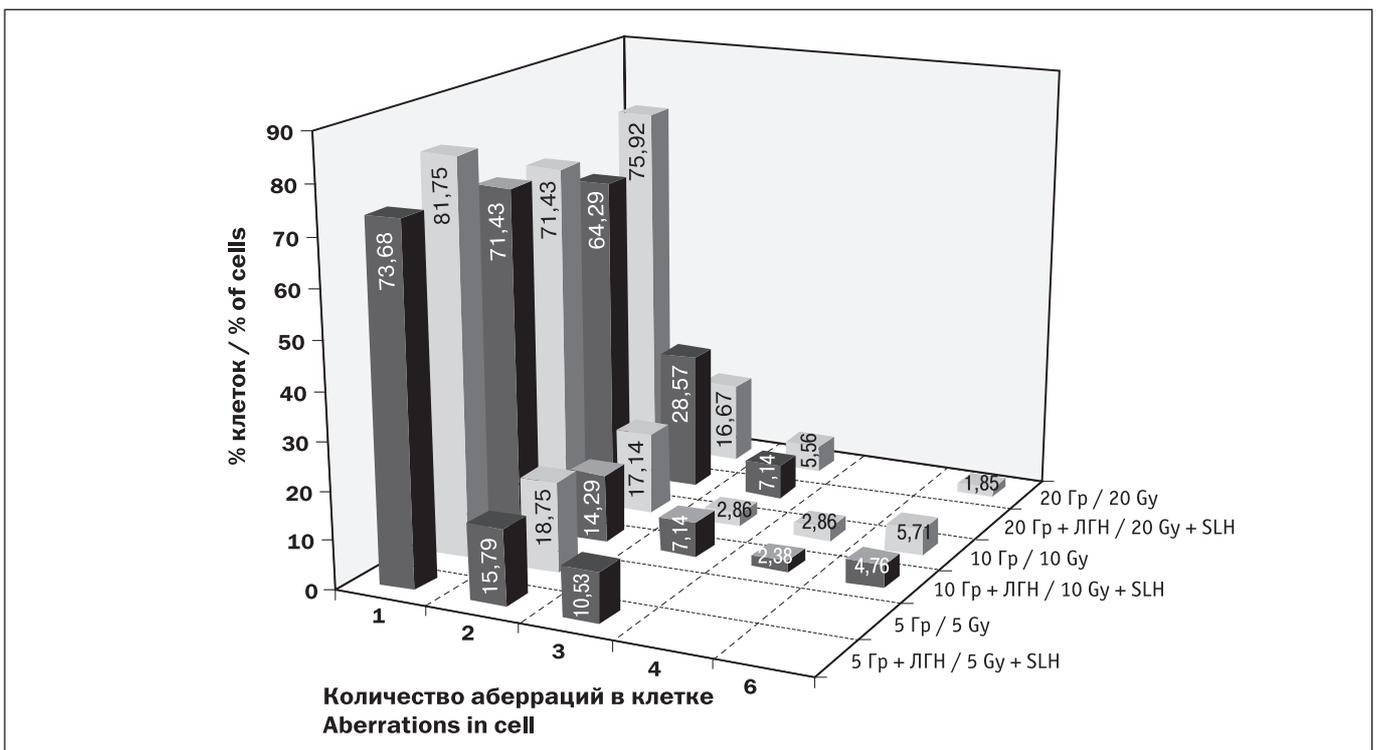


Рисунок 1. Соотношение клеток с разным числом абераций, % от всех аберрантных клеток

Figure 1. The ratio of cells with different numbers of aberrations, % of all aberrant cells

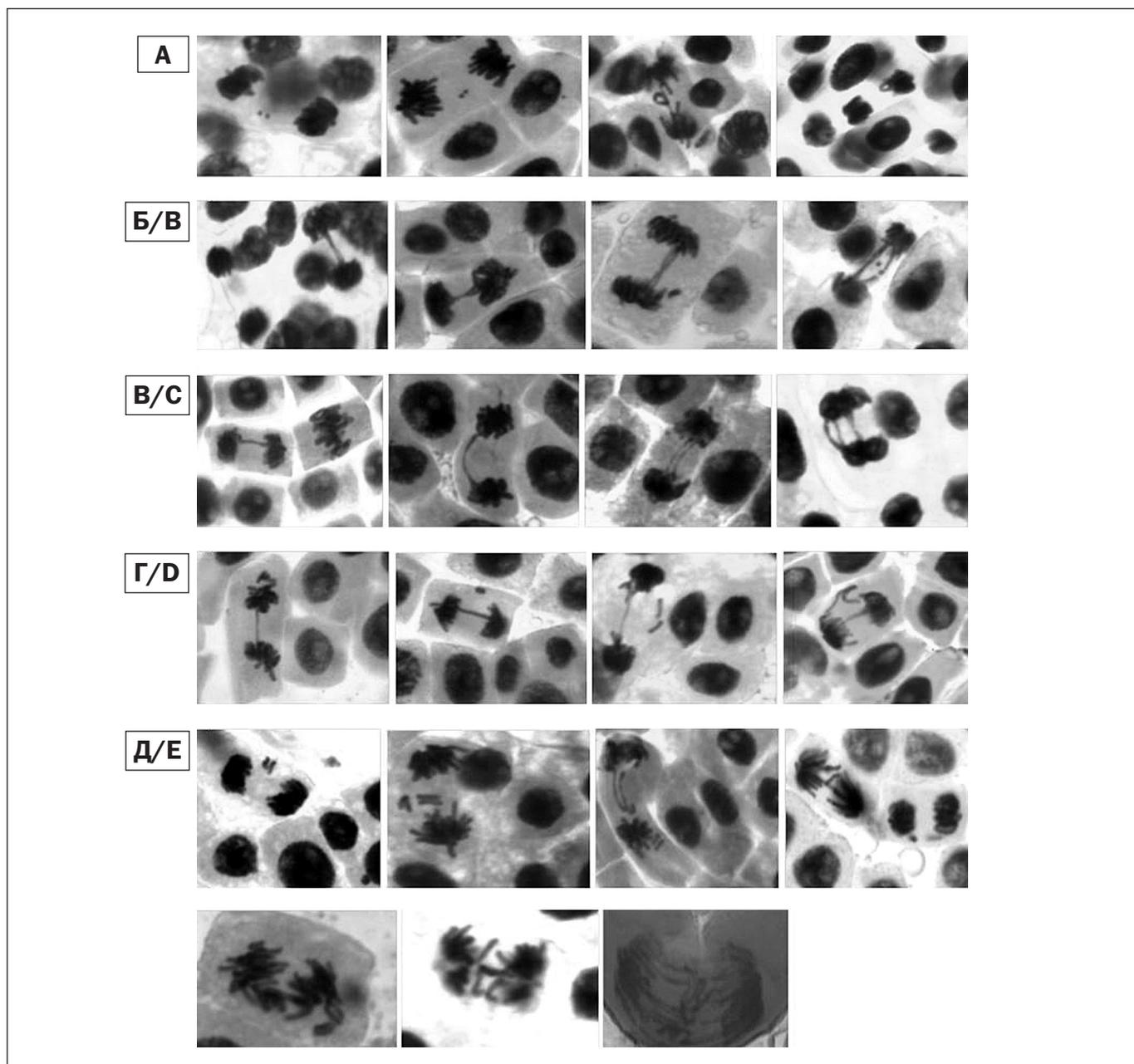


Рисунок 2. Типи хромосомних перестроек, наблюдаемых в эксперименте, $\times 400$, ацетоорсеин: А) парные фрагменты и кольцевые хромосомы; Б) хромосомные “мосты” и фрагменты; В) хроматидные “мосты”; Г) хроматидные “мосты” и фрагменты; Д) клетки с множественными повреждениями хромосом

Figure 2. Types of chromosomal rearrangements, observed in the experiment, $\times 400$, atsetoorsein: А) paired fragments and ring chromosomes; В) chromosomal “bridges” and fragments; С) chromatid “bridges”; Д) chromatid “bridges” and fragments; Е) cells with multiple damages of chromosomes

Привлекает внимание неодинаковая эффективность препарата по отношению к снижению частоты aberrаций хроматидного и хромосомного типов. Так, при облучении в дозе 5 Гр, снижение частоты aberrаций под действием лигногумата происходило только за счёт aberrаций хромосомного типа (см. рис. 3А). Поэтому достоверность отличий от контроля по критерию частота всех типов aberrаций находится на грани допустимого уровня значимости: $p = 0,05$ (см. табл. 1). При меньшем количестве исследо-

Different efficiency of preparation attracts attention in relation to the reduction of frequency of chromatid and chromosomal types aberrations. Thus, the irradiation of 5 Gy, reducing the frequency of aberrations under the influence of lignohumate, only due to chromosomal aberrations (see Fig. 3A). Therefore, the reliability of the differences from control by the criterion of frequency of all types of aberrations is on the verge of an acceptable level of significance: $p = 0.05$ (see Tab. 1). With a smaller

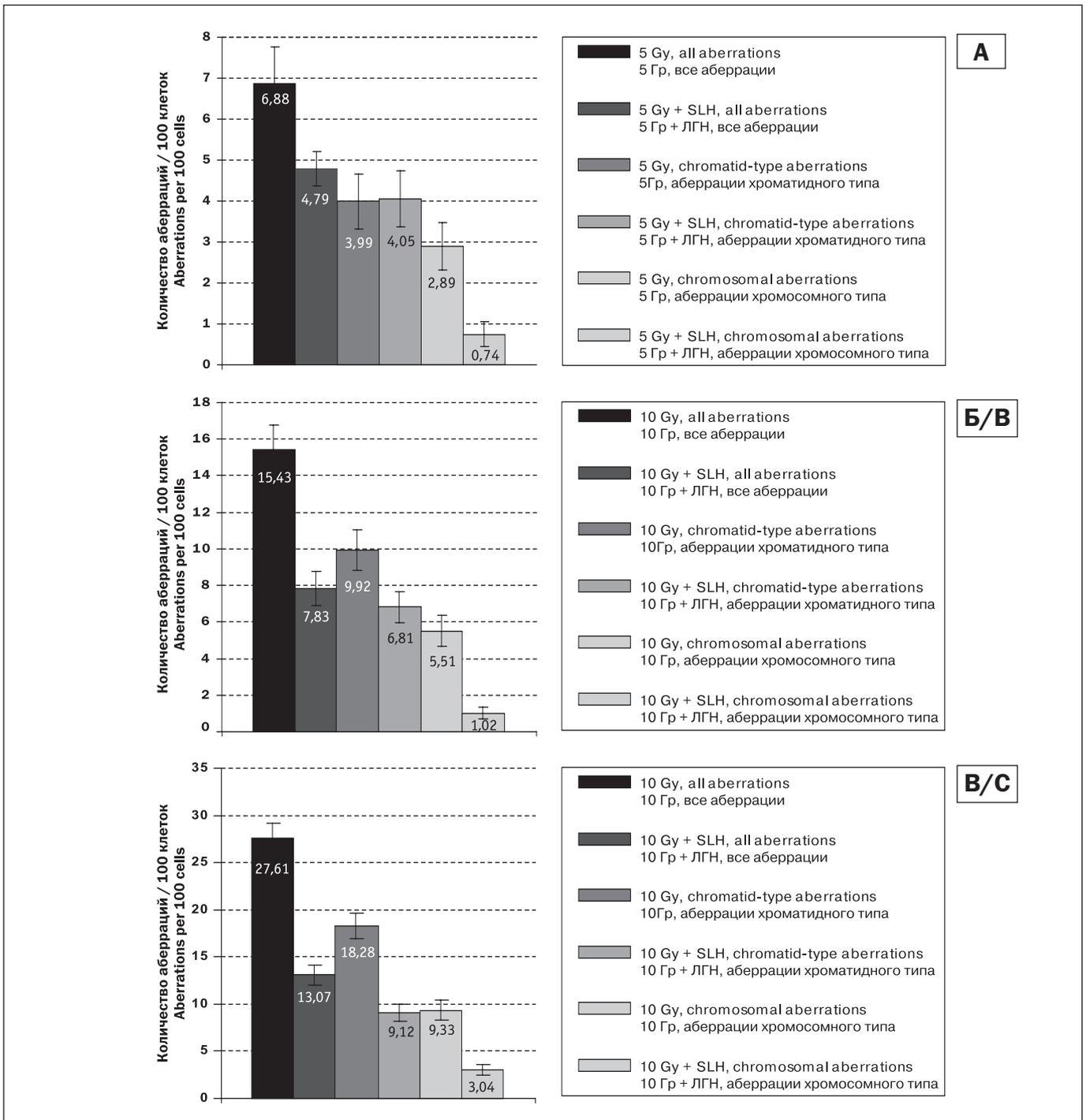


Рисунок 3. Сотношение aberrаций хроматидного и хромосомного типов в клетках корневой меристемы проростков семян *Allium cepa L.*, облученных в дозах 5 Гр (А), 10 Гр (Б), 20 Гр (В) при действии лигногумата натрия (ЛГН)

Figure 3. The ratio of aberrations of the chromatid and chromosome types in the root meristem cells of seedlings *Allium cepa L.*, irradiated at a dose of 5 Gy (A), 10 Gy (B), 20 Gy (C) under the action of sodium lig-nohumate (SLH).

ванных клеток можно было бы сделать вывод о неэффективности препарата относительно цитогенетических эффектов облучения в этой дозе. Это объясняет меньший общий антимуtagenный эффект препарата (несмотря на существенное снижение частоты aberrаций хромосомного типа – на 74,40 %)

number of studied cells it could be concluded about the ineffectiveness of the preparation regarding to cytogenetic effects of exposure at this dose. This explains the lower total antimutagenic effect of preparation (although a substantial reduction in the frequency of chromosomal aberrations – to 74.40 %)

Таблиця 2

Спектр аберацій хромосом в клітках корневої меристеми проростков облучених насіння *Allium cepa* L. при дії лігногумату натрію (ЛГН)

Table 2

Spectrum of chromosomal aberrations in root meristem cells of seedlings irradiated seeds *Allium cepa* L. under the influence of sodium lignohumate (LGN)

γ-облучение, Гр γ-irradiation, Gy	Концентрація лігногумата натрію, мг/л Concentration of lignohumate sodium, mg / l	Хроматидні мосты, %, M±m Chromatid bridges %, M±m	Хромосомні мосты, %, M ± m Chromosomal bridges, % , M±m	Одиночні фрагменти, %, M ± m Single fragments, %, M±m	Парні фрагменти, %, M ± m Double fragments, %, M±m	Кольцеві хромосоми, %, M ± m Ring chromosomes, %, M ± m	МАК, %, M ± m FMC, %, M±m
0	0	1,33 ± 0,42	0,13 ± 0,13	0,53 ± 0,27	–	–	–
0	100	1,70 ± 0,51	0,15 ± 0,15	0,46 ± 0,27	–	–	–
5	0	2,90 ± 0,58	1,08 ± 0,36	1,09 ± 0,36	1,44 ± 0,39	1,45 ± 0,42	–
10	0	5,23 ± 0,82	0,83 ± 0,33	4,68 ± 0,78	4,13 ± 0,74	0,56 ± 0,27	0,55 ± 0,27
20	0	10,44 ± 1,08	3,73 ± 0,67	15,68 ± 1,28	6,34 ± 1,28	0,75 ± 0,30	0,37 ± 0,21
5	100	3,50 ± 0,56	0,19 ± 0,13	0,55 ± 0,22	0,55 ± 0,22	–	–
10	100	3,29 ± 0,60	0,45 ± 0,23	3,52 ± 0,62	0,90 ± 0,32	–	0,23 ± 0,15
20	100	4,26 ± 0,64	0,30 ± 0,17	4,86 ± 0,68	2,13 ± 0,46	0,61 ± 0,25	–

при облученні в дозі 5 Гр, по порівнянню з його дією при більших дозах облучення (10 і 20 Гр). При збільшенні рівня радіаційно-індуцированного мутагенеза лігногумат здатен достовірно знизити частоту аберацій обох типів, хоча зменшення частоти аберацій хромосомного типу залишається більш ефективним (див. рис. 3Б і 3В). Так, при облученні в дозі 10 Гр частота аберацій хроматидного типу під впливом лігногумата зменшується на 31,35 %, а аберацій хромосомного типу – на 81,49 %. При облученні в дозі 20 Гр частота хроматидних аберацій зменшується ще сильніше – на 50,11 %, а зменшення рівня аберацій хромосомного типу відбувається менш ефективно, ніж при облученні 10 Гр – на 67,42 %. Це свідчить про те, що збільшенням рівня радіаційно-індуцированного мутагенезу, під дією лігногумату діють різні механізми антимутагенезу, а рівень зменшення частоти аберацій того чи іншого типу залежить від різного вклада кожного з механізмів в результуючий ефект.

При більш детальному аналізі спектра аберацій, представленої в таблиці 2, видно, що відсутність впливу гумату натрію на рівень аберацій хроматидного типу при облученні в дозі 5 Гр стосується тільки хроматидних “мостів”, частота яких да-

with a radiation dose of 5 Gy, as compared to its effect at higher doses of irradiation (10 and 20 Gy). By increasing the level of radiation-induced mutagenesis Lignohumate is able to significantly reduce the frequency of both types of aberrations, while reducing the frequency of chromosomal aberrations is more effective (see. Fig. 3B and 3C). Thus, the irradiation of 10 Gy, reduced frequency of chromatid type aberrations, influenced by lignohumate, on 31.35 %, and chromosomal aberrations – on 81.49 %. Upon irradiation of 20 Gy, the frequency of chromatid aberrations is reduced even further – on 50.11 %, and a decrease in the level of chromosomal aberrations occur less effective, than by irradiation of 10 Gy – on 67.42 %. This suggests, that an increase in the level of radiation-induced mutagenesis, under the influence of lignohumate, 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.

At more detailed analysis of the spectrum of aberrations, presented in a table 2, evidently, that the absence of influence of sodium humate on the level of chromatid type aberrations by irradiation of 5 Gy applies only chromatid “bridges”, the frequency of

же збільшується, хоча відміння мають недостаточний рівень статистическої достовірності. Статистически значимі відміння не були виявлені і относительно змінення под дієюм лігногумата частоти одиночних фрагментів при облученні в дозі 10 Гр і кільцевих хромосом при облученні в дозі 20 Гр. В цілому ж слідуеть відмітити, що вплив лігногумата обуславлюєт зніження всіх типів аберацій, хоча в різній степені.

Как указывалось выше, анализ поклеточного распределения аберацій (см. рис. 1) показал, что действие препарата сильнее проявляется в отношении клеток с одной аберацией. В отношении клеток с 2 и 3 абераціями его действие значительно менее эффективно. В отношении МАК наблюдается несколько иная картина. При облучении в дозе 10 Гр препарат приводит к снижению частоты МАК на 58,18 %, а при облучении в дозе 20 Гр – к полной элиминации такого типа абераціонных клеток (см. табл. 2). Эти отличия свидетельствуют о наличии иного механизма антимуагенного действия лігногумата, нежели стимуляция репарации. Наиболее вероятным механизмом уменьшения частоты МАК при действии лігногумата может быть стимуляция апоптоза. О такой возможности свидетельствует ряд работ, в которых показано индуцирование гуматами стимуляции апоптоза [20, 21]. Даже если не исключать, что апоптотической гибели подвергаются клетки с 3 и 4 абераціями, результаты наших исследований показывают, что под влиянием лігногумата этот процесс приводит к преимущественной элиминации клеток именно с множественными повреждениями хромосом.

О некоторых механизмах реакции на облучение семян и модификации радиационно-индуцированных цитогенетических эффектов можно опосредованно судить при сравнении частоты всех “мостов” и доли хромосомных двойных “мостов”. “Мосты” образуются вследствие ассиметрической транслокации при слиянии образовавшихся центрических фрагментов. Такое слияние – процесс энергозависимый, как это было показано в работе Н. П. Дубинина и соавт. [22]. Поскольку образование “мостов” возрастало на фоне снижения ЧАА, авторы рассматривали “мосты” как показатель интенсивности репарации. Эта точка зрения согласуется также с результатами дальнейших исследований других авторов [23]. Абераціи хромосомного типа (“двойные мосты” и парные фрагменты) являются результатом нерепарированных повреждений хромосом состоявшихся в G₁ фазе, а появление хроматидных аберацій – реализацией пов-

which even increases, although differences have an insufficient level of statistical significance. Statistically significant differences were not detected regarding the frequency of single fragments under the influence of lignohumate after exposure to 10 Gy and frequency of ring chromosomes by irradiation of 20 Gy. In general, it should be noted, that the effect of lignohumate causes reduction of all types of aberrations, although to varying degrees.

As mentioned above, whole-cell analysis of the aberrations distribution (see Fig. 1) 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. With regard to the FMC is observed a somewhat different picture. At an irradiation of 10 Gy preparation leads to decrease in FMC at 58.18 %, and under irradiation of 20 Gy – to complete elimination of aberrant cells of this type (see Table 2). These differences indicate the presence of another mechanism of antimutagenic action of lignohumate, than stimulation of repair. The most probable mechanism of reducing the FMC by lignohumate impact can be stimulated apoptosis. This possibility was demonstrated by a number of works, that show the induction by humates the stimulation of apoptosis [20, 21]. Even if you do not exclude the possibility, that to apoptotic death are exposed cells with 3 and 4 aberrations, our results show, that under the influence of lignohumate this process leads to preferential elimination of cells with a multi-chromosome damage.

On some mechanisms of response to irradiation of seeds and modification of radiation-induced cytogenetic effects can be judged indirectly by comparing the frequencies of all the “bridges” and the proportion of chromosomal double “bridges”. “Bridges” are formed as a result of the asymmetric translocation by the fusion of formed centric fragments. This fusion – the energydependent process, as it was shown N. P. Dubinin et al. [22]. Since the formation of “bridges” increased due to lower FAA, the authors considered the “bridges” as an indicator of the intensity of repair. This view is consistent with the results of further studies of other authors [23]. Chromosomal aberrations (“double bridges” and paired fragments) are the result of damage to the nonrepaired chromosomes, held in G₁ phase, and the appearance of chromatid aberrations – the implementation of dam-

реждений в пострепликативный период. При анафазном методе не всегда удается отличить двойные фрагменты от одиночных, однако двойные “мосты” хромосомного типа достаточно четко отличаются от “мостов” хроматидного типа. По мнению ряда исследователей, это позволяет судить о том, в каком периоде интерфазы происходит повреждение хромосом и “двойные мосты” рассматриваются ими как косвенный показатель интенсивности дорепликативной репарации [23]. Результаты анализа различных вариантов соотношения “мосты” / фрагменты представлены в таблице 3. При наличии определенных закономерностей в других вариантах, наиболее показательным является соотношение все “мосты” / все фрагменты.

Так, в клетках проростков облученных семян наблюдается дозозависимое снижение частоты мостов, что указывает на снижение эффективности репарации, как одно из последствий облучения у *Allium cepa L.* При действии лигногумата на необлученные семена соотношение “мосты” / фрагменты увеличивается по сравнению с контролем, хотя это и не приводит к достоверному снижению уровня спонтанного мутагенеза. Рассматривая влияние лигногумата на цитогенетические эффекты облучения, наиболее эффективно изменение этого показателя при облучении в дозе 5 Гр, соотношение “мосты” / фрагменты при этом увеличивается с 1,00 до 3,36. При облучении в дозе 10 Гр увеличение соотношения “мосты” / фрагменты под влиянием препарата менее значительно – с 0,64 до 0,85. При облучении в дозе 20 Гр лигногумат не влияет на увеличение доли “мостов” -

age in post-replicative period. At anaphase method is not always possible to distinguish double fragments from single, but double “bridges” of chromosome type clearly enough different from the “bridges” of chromatid type. According to some researchers, it allows to judge whether, in what period of interphase occurs chromosome damage and “double bridges” are considered by them as an indirect indicator of the intensity of previous to replication repair [23]. Results of the analysis of different variants of the ratio “bridges” / fragments are presented in Table 3. If there are certain laws in other variants, the most significant is the ratio of all the “bridges” / all fragments.

Thus, in cells of seedlings irradiated seeds is observed a dose-dependent reduction in the frequency of bridges, which indicates decrease in the efficiency of repair, as a consequence of irradiation of *Allium cepa L.* At an action of lignohumate on the non-irradiated seeds, ratio bridges / fragments is increased compared with the control, although this does not lead to a significant decrease in the level of spontaneous mutagenesis. Considering the impact of lignohumate on cytogenetic effects of radiation, the most effective change in this indicator is during irradiation at a dose of 5 Gy, the ratio of “bridges” / fragments will be increased to 3.36 from 1.00. After irradiation with a dose of 10 Gy increased ratio of “bridges” / fragments under the influence of preparation is much less – from 0.64 to 0.85. After irradiation with a dose of 20 Gy, Lignohumate does not

Таблица 3
Соотношение “мосты”/фрагменты в различных вариантах эксперимента

Table 3
Ratio of “bridges” / fragments in different versions of the experiment

Показатель / parameter	Доза γ-облучения, Гр / γ-radiation dose, Gy								
	0	0	5	10	20	5	10	20	
Концентрация лигногумата натрия, мг/л Concentration lignohumate sodium, mg/l	0	100	0	0	0	100	100	100	
Все “мосты” / все фрагменты All bridges / all fragments	2,76	4,02	1,00	0,64	0,62	3,36	0,85	0,60	
Хромосомные “мосты” / фрагменты Chromosomal bridges / fragments	*	*	0,37	0,18	0,53	0,50	0,50	0,11	
Хроматидные “мосты” / фрагменты Chromatid bridges / fragments	2,51	3,70	2,66	1,12	0,67	6,36	0,93	0,88	
Хромосомные “мосты” (% от всех мостов) Chromosome bridges (% of all bridges)	8,90	8,11	27,14	13,70	26,32	5,15	12,03	6,58	

Примечания. * – аберрации хромосом представлены только “мостами”
Note. * – chromosome aberrations represented only a “bridge”.

соотношение 0,62 и 0,60 соответственно (см. табл. 3). Обсуждая возможные механизмы, можно предположить усиление энергетической обеспеченности процессов репарации под влиянием лигногумата. Однако реализация этого механизма зависит от дозы облучения. Наиболее эффективно она происходит при дозе облучения 5 Гр, при более высокой дозе 10 Гр, стимуляция репарации, хотя и имеет место, не является ведущим механизмом. При дальнейшем увеличении дозы облучения до 20 Гр влияние лигногумата на этот процесс неэффективно, вероятно вследствие явления “насыщения” ферментов репарации. Очевидно, при повышении уровня радиационно-индуцированного мутагенеза (при облучении в дозах 10 и 20 Гр) происходит “включение” и других антимутагенных механизмов, обусловленных действием препарата, которые вносят более значительный вклад в реализацию конечного генопротекторного эффекта, чем стимуляция процессов репарации.

Кроме соотношения “мостов” и фрагментов (как специфического показателя у ряда растительных объектов) хотелось бы указать и на другой параметр, практически не используемый при цитогенетическом анализе в исследованиях по модификации радиационных эффектов. Речь идёт о том, что наличие, помимо хромосомных aberrаций, значительного числа aberrаций хроматидного типа при облучении на G₀ или ранней G₁ стадии у *Allium cepa L.* связывают также с существованием потенциальных изменений хромосом, имеющих разную длительность жизни. Обычно радиация вызывает короткоживущие повреждения, которые реализуются в мутации в той фазе клеточного цикла, в которой облучается клетка. Возможность появления хроматидной мутации вследствие воздействия радиации на хромосому с одной эффективной нитью указывает на существование длительно живущих потенциальных изменений хромосом, которые “доживают” до S или G₂ фазы, где и реализуются в виде хроматидных мутаций. Учитывая вышесказанное, значительно меньшее снижение уровня aberrаций хроматидного типа, в сравнении с aberrациями хромосомного типа, выявленное в наших экспериментах (см. рис. 3), можно объяснить тем, что действие лигногумата не влияет или оказывается менее эффективным относительно стимуляции репарации длительно живущих потенциальных изменений хромосом, по сравнению с короткоживущими.

Результаты анализа влияния лигногумата на митотическую активность в клетках корневой меристемы *Allium cepa L.* представлены на рисунке 4.

affect the increase of “bridges” – the ratio of 0.62 and 0.60, respectively (see. Table. 3). Discussing possible mechanisms, can be assumed strengthening energy security of repair processes, influenced by lignohumate. However, the implementation of this mechanism depends on the dose. Most efficient if it is a radiation dose of 5 Gy, with a higher dose of 10 Gy, the stimulation of repair, although it has a place to be, is not the leading mechanism. With further increase in the radiation dose to 20 Gy lignohumates influence on this process is inefficient, probably due to the phenomenon of “saturation” of repair enzymes. Obviously, by the increase of radiation-induced mutagenesis (under irradiation at doses of 10 Gy and 20 Gy), there is “including” and other antimutagenic mechanisms, caused by the action of the preparation, which make a significant contribution to the implementation of the final gene-protective effect, more than stimulation of reparative processes.

Except correlation “bridges” and fragments (as a specific indicator of plants), it would be desirable to specify on other parameter, which is practically not used for cytogenetic analysis, in research on modification of radiation effects. We are talking about the fact that 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. Taking into account a much smaller decline in chromatid type aberrations in comparison with chromosomal aberrations, detected in our experiments (see. Fig. 3), it can be explained by the fact, that the impact of lignohumate does not affect or is less effective with respect to stimulation of repair of long term potential changes of chromosome, compared with short term.

The results of analysis of the impact lignohumate on the mitotic activity in the root meristem cells of *Allium cepa L.* are presented in Figure 4.

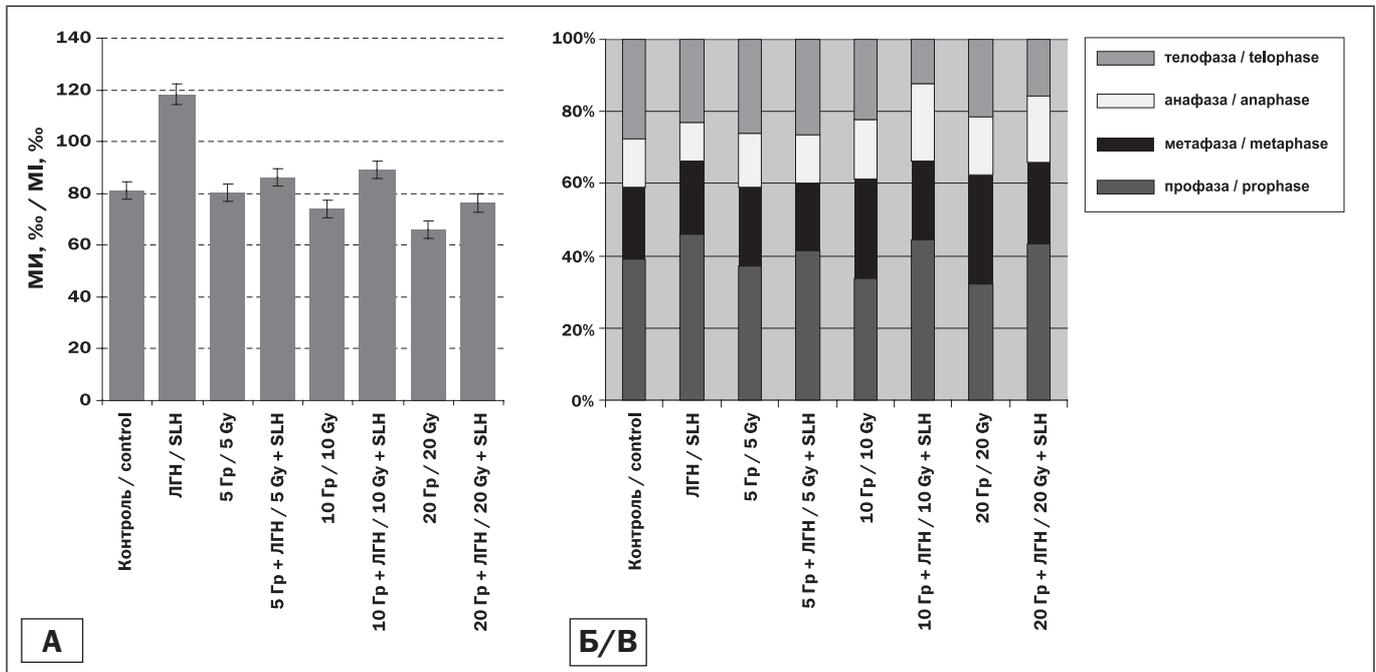


Рисунок 4. Влияние лигногумата натрия (ЛГН) на митотическую активность клеток корневой меристемы в проростках облученных семян *Allium cepa* L.: А) значения митотического индекса (МИ, %), Б) соотношение фаз митоза

Figure 4. Impact of sodium lignohumate (LGN) on the mitotic activity of the cells of the root meristem in seedlings irradiated seeds *Allium cepa* L.: А) the value of the mitotic index (MI, %), Б) the ratio of the phases of mitosis

Поскольку ГВ являются стимуляторами роста, вполне закономерно значительное увеличение МИ при действии лигногумата натрия по сравнению с контролем (см. рис. 4А). Действие ионизирующей радиации обычно сопровождается угнетением митотической активности. В нашем эксперименте наблюдается дозозависимое снижение МИ, однако статистически значимые отличия выявлены только при дозе 20 Гр. Достоверного увеличения МИ при действии лигногумата на семена, облученные в дозе 5 Гр не выявлено. При более высоких дозах облучения 10 и 20 Гр под влиянием препарата наблюдается статистически значимое увеличение МИ на 17,25 и 13,43 % соответственно (см. рис. 4А). С увеличением дозы облучения увеличивается значение метафазного индекса, что на фоне уменьшения МИ свидетельствует о задержке митоза на стадии метафазы при действии радиации. Последнее ассоциируется с патологиями митоза, связанными с повреждениями митотического аппарата. Действие лигногумата при облучении не приводит к стабилизации соотношения фаз митоза до уровня контрольных значений (см. рис. 4Б). При этом отмечается значительное увеличение профазного индекса, что связывают с преобладанием процессов ингибирования синтеза ДНК. Однако это было бы справедливым при уменьшении пролифератив-

Since HS are growth stimulants, quite appropriately is a significant increase in MI at impact of lignohumate sodium compared to the control (see. Fig. 4A). The effect of ionizing radiation is usually accompanied by inhibition of the mitotic activity. In our experiment we observed a dose-dependent decrease in MI, but statistically significant differences were detected only in a dose of 20 Gy. Significant increase in MI at impact of lignohumate on irradiated seeds in a dose of 5 Gy was not revealed. At higher doses of 10 Gy and 20 Gy under the impact of the preparation, a statistically significant increase in MI at 17.25 % and 13.43 %, respectively is observed (see. Fig. 4A). With increasing radiation dose the value of metaphase index increases, which on the background of reducing MI, indicates the delay of mitosis at metaphase by the impact of radiation. The latter is associated with abnormalities of mitosis, related with injuries of the mitotic apparatus. Impact of lignohumate during irradiation does not lead to stabilization of the ratio of mitosis phases to the level of control values (see. Fig. 4B). At the same time there is a significant increase in the prophase index, which is associated with a predominance of processes of inhibition of DNA synthesis. However,

ной активности. На фоне увеличения значений МИ это скорее свидетельствует об увеличении числа клеток вступающих митоз. Учитывая также уменьшение метафазного индекса при увеличении анафазного (кроме варианта с облучением 5 Гр) полученные данные приводят к предположению о стимуляции лигногуматом процессов репопуляции, когда после облучения происходит активация вступления в митоз неповреждённых клеток. При этом, под влиянием лигногумата происходит не только значительное накопление клеток на стадии профазы, но и ускорение прохождения стадии метафазы, в результате чего при цитогенетическом анализе мы можем наблюдать увеличение доли неповреждённых клеток на стадии ана- и телофазы. Репопуляционное восстановление как реакция организма на облучение детально исследовано на множестве модельных систем, вместе с тем, показана возможность стимуляции этого процесса антимутагенами [24].

Стимуляция репопуляции под влиянием лигногумата позволяет объяснить некоторые закономерности влияния препарата на соотношение различных типов aberrаций. При облучении в дозе 5 Гр достоверного увеличения МИ под влиянием лигногумата не наблюдается. При этом не происходит и уменьшения частоты aberrаций хроматидного типа. Стимуляция репопуляции лигногуматом при более высоких дозах приводит к снижению частоты aberrаций обоих типов. Если бы этот процесс был единственным антимутагенным механизмом, увеличение доли клеток без aberrаций приводило бы к пропорциональному снижению aberrаций хроматидного и хромосомного типов. Однако стимуляция репопуляции (снижение частоты aberrаций обоих типов) “плюс” стимуляция репарации (что проявляется в снижении частоты aberrаций преимущественно хромосомного типа) приводит в конечном итоге к наблюдаемому в эксперименте соотношению. Наиболее показательно это при действии лигногумата на семена, облученные в дозе 10 Гр. При действии препарата на семена, облученные в дозе 20 Гр, стимуляция репарации, как указывалось, значительно менее эффективна или неэффективна. Менее эффективно при этом и снижение частоты aberrаций хромосомного типа: на 67,42 %, по сравнению с 81,49 % при действии на семена, облученные в дозе 10 Гр. Поскольку частота aberrаций хроматидного типа под влиянием лигногумата при облучении в дозе 20 Гр снижается на 50,11 %, т. е. “почти” пропорционально снижению частоты aberrаций хромосомного типа, закономерно предположить, что в этом случае

it would be fair to a decrease in proliferative activity. With increasing values of MI is rather indicates an increase in the number of cells entering mitosis. Taking into account a decrease of metaphase index with an increase of anaphase index (except for the variant with 5 Gy irradiation), obtained data lead to the assumption about stimulation of Lignohumate repopulations processes, when after exposure occurs activation of entry into mitosis of intact cells. Thus, under the influence of lignohumate occurs not only a significant accumulation of cells at the prophase stage, but also the acceleration passage at metaphase, so that, by the cytogenetic analysis we can observe the increase in the proportion of intact cells at anaphase and telophase. Repopulation recovery as the response to irradiation was studied in detail on a variety of model systems, however, is also the possibility of stimulation of this process by anti-mutagenic [24].

Stimulation of repopulation, influenced by lignohumate, explains some regularities of preparation's impact on the ratio of different types of aberrations. After irradiation with a dose of 5 Gy significant increase in MI, influenced by lignohumate, is not observed. Thus, the reduce of the frequency of chromatid type aberrations does not occur. Stimulation of repopulation by Lignohumate at higher doses lead to a decrease in the frequency of both types of aberrations. If this process was the only antimutagenic mechanism, increase the proportion of cells without aberrations would lead to a proportional reduction in aberrations of the chromatid and chromosome types. However, stimulation of repopulation (reduction in the frequency of both types of aberrations) “plus” stimulation of repair (which manifests itself in reducing the frequency of aberrations mainly chromosome-type) ultimately leads to the experimentally observed ratio. The most significant is the impact of lignohumate on seeds irradiated with 10 Gy. Under the impact of the preparation on the seeds irradiated in a dose of 20 Gy, the stimulation of repair, as indicated, is much less effective or ineffective. Less effective in this reducing the frequency of chromosome aberrations type: 67.42 % compared with 81.49 % under the impact of the seed, irradiated at 10 Gy. Since the frequency of chromatid type aberrations, influenced by lignohumate at a dose irradiation of 20 Gy reduced by 50.11 %, i.e. “almost” in proportion to the reduction in the frequency of chromosomal aberrations, logical to assume, that

стимуляція репопуляції являється одним із ведучих антимуtagenних механізмів.

Суммує результати дослідження, необхідно вказати на те, що урахування комплексу цитогенетических критеріїв, використаних нами в роботі, дозволило значительно розширити інформативну значимість аналізу, по порівнянню з обычно використовуваними підходами. Подібний підхід може бути продуктивним в створенні методики комплексного цитогенетического аналізу в дослідженнях по антимутагенезу з використанням *Allium*-тесту. В зв'язі з цим слід відзначити додаткові критерії аналізу, які також можуть бути використані при застосуванні даного тесту. Розмова йде про статистичний аналіз точного розподілу аберацій хромосом і математичний аналіз дозових залежностей при дії мутагена і модифікатора (з використанням формальних і теоретических моделей). Ограничення об'єму публікації не дозволяють представити результати аналізу по цим критеріям в даній роботі, їх ми плануємо освітити в наступних публікаціях.

ВИВОДИ

Таким образом, показана множественность механизмов реализации генопротекторных свойств лигногумата натрия при гамма-облучении. Полифункциональность обеспечивается наличием не только антиоксидантных свойств, но и ряда других механизмов. Выявлена дифференциальная антимутагенная активность лигногумата по отношению к различным типам аберацій: наиболее эффективно уменьшение частоты маркеров радиационного мутагенеза – аберацій хромосомного типа, меньшая эффективность проявляется в отношении длительно живущих потенциальных изменений хромосом по сравнению с короткоживущими. Под влиянием лигногумата более эффективно репарация повреждений происходит в клетках с одной аберацией, при менее эффективной репарации в клетках с большим числом повреждений. Стимуляция процессов репарации под влиянием лигногумата зависит от дозы облучения. Наиболее эффективна она при дозе 5 Гр. При повышении дозы облучения до 10 Гр и 20 Гр этот процесс становится вторичным, поскольку “включаются” другие антимутагенные механизмы: стимуляция репопуляции и апоптоза, которые становятся преобладающими в реализации конечного генопротекторного эффекта.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barbara R. L. Humic substances and plant defense metabolism / R. L. Barbara, A.C. Garcia // Physiological mechanisms and adaptation strategies in

in this case the stimulation of repopulation is one of the leading antimutagenic mechanisms.

Summing up the results of the study, should be pointed out that, the inclusion of complex cytogenetic criteria used in our work, has greatly expanded the importance of informative analysis, compared with conventional approaches. Such an approach can be productive in the creation of a comprehensive cytogenetic analysis techniques in studies of anti-mutagenesis using the *Allium*-test. In this connection it should be noted additional criteria analysis, which can also be used in the practice of this test. We are talking about a statistical analysis of whole-cell distribution of chromosome aberrations and the mathematical analysis of the dose dependence by the impact of the mutagen and the modifier (using formal and theoretical models). Limitations of volume of publication does not allow us to submit the results of the analysis of these criteria in the present study, we plan to highlight them in the following publications.

CONCLUSIONS

Thus, revealed multiple mechanisms for implementing of gene-protective properties of lignohumate sodium by gamma-irradiation. Polyfunctionality is ensured by the presence of not only antioxidant properties, and a number of other mechanisms. Revealed differential antimutagenic activity of lignohumate 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, compared with short-lived. Under impact of lignohumate more effectively repair of damage takes place in cells with one aberration, at less efficient repair in cells with a large number of damage. Stimulation of repair processes influenced by lignohumate depends on the dose. It is most effective at a dose of 5 Gy. With increasing radiation dose up to 10 Gy and 20 Gy, this process becomes a minor, as “included” other anti-mutagenic mechanisms: stimulation of repopulation and apoptosis, which are prevalent in the implementation of the final gene-protective effect.

REFERENCES

1. Barbara RL, Garcia AC. Humic substances and plant defense metabolism. In: Ahmad P, Wani MR, editors. Physiological mecha-

- plants under changing environment / eds. P. Ahmad, M. R. Wani. – Vol. 1. – New York : Springer Science+Business Media, 2014. – P. 297–319.
2. A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture / M. T. Rose, A. F. Patti, K. R. Little [et al.] // *Advances in agronomy*. – 2014. – Vol. 124. – P. 37–90.
 3. 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.
 4. New progress in medical research of bio-humic acid / X. P. Zhou, Y. Ch. Zhang, Sh. W. Zhang [et al.] // *Applied mechanics and materials*. – 2012. – Vol. 138-139. – P. 1228–1233.
 5. Klocking R. Medical aspects and applications of humic substances / R. Klocking, B. Helbig // *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications* / eds. A. Steinbuchel, R. H. Marchessault. – Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & KGA. – 2005. – P. 3–16.
 6. Kornilaeva G. V. Humic substances as active anti-HIV components for microbicides / G. V. Kornilaeva, I. V. Perminova, E. V. Karamov // *Natural and synthetic polyfunctional compounds and nanomaterials in medicine and biomedical technologies : abstract book of the First International Conference on Humics-based Innovative Technologies, November 4-8, 2010, Moscow*. – Moscow : Lomonosov Moscow State University, 2010. – P. 27.
 7. Pant K. Sh. A humic matter panacea for cancer / K. Pant, B. Singh, N. Thakur // *Internat. J. Toxicol. Pharmacol. Res.* – 2012. – No. 2. – P. 17–25.
 8. 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.
 9. 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.
 10. Humic substances affect Arabidopsis physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development / S. Trevisan, A. Botton, S. Vaccaro [et al.] // *Environ. Exp. Bot.* – 2011. – Vol. 74. – P. 45–55.
 11. Protective role of humic acids against dicamba-induced genotoxicity and DNA methylation in *Phaseolus vulgaris* L. / G. Agar, M. S. Taspinar, M. Turan [et al.] // *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science*. – 2014. – Vol. 64, No. 2. – P. 141–148.
 12. Comparable evaluation of biological activity of new liquid and dry modifications of the humic product “Lignohumate” / R. B. Poloskin, O. A. Gladkov, O. A. Osipova, O. S. Yakimenko // *Functions of natural organic matter in changing environment* / eds. J. Xu, Y. He, J. Wu. – Vol. I. – Dordrecht : Springer Netherlands, 2013. – P. 1095–1110.
 13. Antimutagenic and / or genotoxic effects of processed humic acids as tested upon *S. cerevisiae* D7 / J. Kubsova, V. Turkova, A. Mikulcova [et al.] // *Environ. Chem. Lett.* – 2011. – Vol. 9, Iss. 2. – P. 229–233.
 14. Влияние гумата натрия на животных, облученных в летальных дозах / Г. Г. Пухова, Н. А. Дружина, Л. М. Степченко, Е. Е. Чеботарев // *Радиобиология*. – 1987. – Вып. 5. – С. 650–653.
 - nisms and adaptation strategies in plants under changing environment. vol. 1. New York: Springer Science+Business Media; 2014. p. 297-319.
 2. Rose MT, Patti AF, Little KR, Brown AL, Jackson WR, Cavagnaro TR. A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. *Advances in Agronomy*. 2014;124:37-89.
 3. 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.
 4. Zhou XP, Zhang YCh, Zhang ShW, Ban WJ, Yu WF, Zhang Zh. New progress in medical research of bio-humic acid. *Applied Mechanics and Materials*. 2012;138-139:1228-33.
 5. Klocking R, Helbig B. Medical aspects and applications of humic substances. In: Steinbuchel A, Marchessault RH, editors. *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & KGA; 2005. p. 3-16.
 6. Kornilaeva GV, Perminova IV, Karamov EV. Humic substances as active anti-HIV components for microbicides. In: *Natural and synthetic polyfunctional compounds and nanomaterials in medicine and biomedical technologies: Abstract book of the First International Conference on Humics-based Innovative Technologies; 2010 November 4-8; Moscow, RU*. Moscow: Lomonosov Moscow State University; 2010. p. 27.
 7. Pant KSh, Singh B, Thakur N. A humic matter panacea for cancer. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*. 2012;(2):17-25.
 8. 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.
 9. Buzlama AV. [Modulating effect on the intensity lignohumate peroxidation and activity of antioxidant defense components in experimental conditions]. *Fundamental'nye issledovaniia*. 2010;(9):36-40. Russian.
 10. Humic substances affect Arabidopsis physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development / S.Trevisan, A.Botton, S.Vaccaro [et al.] // *Environmental and Experimental Botany*. – 2011. – Vol. 74. – P. 45-55.
 11. Protective role of humic acids against dicamba-induced genotoxicity and DNA methylation in *Phaseolus vulgaris* L. / G. Agar, M. S. Taspinar, M. Turan [et al.] // *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science*. – 2014. – Vol. 64, № 2. – P. 141-148.
 12. Poloskin RB, Gladkov OA, Osipova OA, Yakimenko OS. Comparable Evaluation of Biological Activity of New Liquid and Dry Modifications of the Humic Product “Lignohumate”. In: Xu J, He Y, Wu J, editors. *Functions of Natural Organic Matter in Changing Environment*. Vol. I. Dordrecht: Springer Netherlands; 2013. p. 1095-110.
 13. Marova I, Kucerik J, Duronova K, Mikulcova A, Vlckova Z. Antimutagenic and/or genotoxic effects of processed humic acids

15. Атраментова Л. А. Статистические методы в биологии : учебник для студентов высших заведений / Л. А. Атраментова, О. М. Утевская. – Горловка : Ліхтар, 2008. – 248 с.
16. 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.] // *Ecol. Eng.* – 2012. – Vol. 47. – P. 203–208.
17. Семенов В. В. Количественные и качественные критерии оценки эффективности антимуагенов в эксперименте / В. В. Семенов, И. А. Студенцова // *Вестн. ПАМН.* – 1998. – № 3. – С. 16–20
18. Механизмы индукции резистентности растений к фитопатогенам гуминовыми веществами / С. Н. Удинцев, Т. И. Бурмирова, А. В. Заболотская, Т. П. Жиликова // *Вестн. Томского гос. ун-та. Биология.* – 2011. – № 4. – С. 100–107.
19. Куликова Н. А. Защитное действие гуминовых веществ по отношению к растениям в водной и почвенной средах в условиях абиотических стрессов : дисс. ... докт. биол. наук. 03.0016, 03.00.27 / Наталья Александровна Куликова. – Москва, 2008. – 302 с.
20. 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, Iss. 3. – P. 243–258.
21. 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, Iss. 15. – P. 1817–1831.
22. Дубинин Н. П. Специфическая модификация спектра структурных мутаций хромосом, возникающих при естественном мутировании / Н. П. Дубинин, С. В. Руднева, В. К. Щербakov // *Генетика.* – 1967. – № 9. – С. 35–39.
23. Лазаренко Л.М. Динамика хромосомной нестабильности батуна (*Allium fistulosum* L.): гамма-облучение семян разного срока хранения / Л. М. Лазаренко, В. Ф. Безруков // *Цитология и генетика.* – 2006. – № 4. – С.31–36.
24. Серебряный А. М. К механизму антимуагенеза у растений / А. М. Серебряный, Н. Н. Зоз, И. С. Морозова // *Генетика.* – 2005. – Т. 41, № 5. – С. 676–679.
- as tested upon *S. cerevisiae* D7. *Environmental Chemistry Letters.* 2011 Jun;9(2):229-33. DOI: 10.1007/s10311-009-0270-6.
14. Pukhova GG, Druzhyna NA, Stepchenko LM, Chebotarev EE. [Effect of sodium humate on animals irradiated with lethal doses]. *Radiobiologiya.* 1987;(5):650-3. Russian.
15. Atramentova LA, Utevskaja OM. [Statistical methods in biology]. *Gorlovka: Likhtar;* 2008. 248 p. Russian.
16. 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.
17. Semenov VV, Studencova IA. [Quantitative and qualitative criteria for evaluating the effectiveness of antimutagens experiment]. *Vestn Ross Akad Med Nauk.* 1998;(3):16-20. Russian.
18. Udincev SN, Burmistrova TI, Zabolotskaja AV, Zhiljakova TP. [Mechanisms of induction of humic substances of plant resistance to pathogens]. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya.* 2011;(4):100-7. Russian.
19. Kulikova NA. [Protective effect of humic substances to plants and soil in the aqueous media under conditions of abiotic stress]. [dissertation]. Moskva; 2008. 302 p. Russian.
20. Hseu YC, Lin E, Chen JY, 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 Jun;24(3):243-58. doi: 10.1002/tox.20426.
21. Yang HL, Hseu YC, Hseu YT, Lu FJ, Lin E, Lai JS. Humic acid induces apoptosis in human premyelocytic leukemia HL-60 cells. *Life Sci.* 2004 Aug 27;75(15):1817-31.
22. Dubinin NP, Rudneva SV, Shherbakov VK. [Specific structural modification of the spectrum of mutations of chromosomes, resulting in the natural mutated]. *Genetika.* 1967;(9):35-9. Russian.
23. Lazarenko LM, Bezrukov VF. [The dynamics of chromosomal instability onions (*Allium Fistulosum* L.): gamma irradiation of seeds of different storage periods]. *Tsitol Genet.* 2006;(4):31-6. Russian.
24. Serebrjanyj AM, Zoz NN, Morozova IS. [The mechanism for the anti-mutagenesis in plants]. *Genetika.* 2005;41(5):676-9. Russian.

Стаття надійшла до редакції 15.07.2014

Received: 15.07.2014