

УДК 575.224.6: 631.417.2: 575.224.4

АНТИКЛАСТОГЕННА АКТИВНІСТЬ ГУМАТУ НАТРИЮ ПРИ МУТАГЕНЕЗІ, ІНДУКОВАНОМУ АГЕНТОМ γ -ТИПУ В КУЛЬТУРІ ЛІМФОЦІТІВ ЛЮДИНИ

В. М. Шкарупа

ДУ "Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України", м. Київ

Ключові слова: прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз, діоксидин, антимутагенез, гумат натрію.

Одним із найважливіших наслідків впливу хронічного опромінення в малих дозах та дії багатьох хімічних мутагенів на клітинному рівні є порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу. Інтенсифікація вільнорадикальних реакцій є одним з головних чинників пошкодження мембрани, ферментів та геному клітин. Розробка засобів захисту генетичного апарату, здатних нейтралізувати або зменшувати прооксидантні ефекти залишається актуальною в умовах зростаючого генотоксичного навантаження довкілля [1].

Активний пошук антимутагенів серед інгібіторів вільно-радикальних процесів дозволив виявити цілий ряд природних і синтетичних антиоксидантів, здатних модифікувати індукований мутагенез. Серед них широко відомі тіолові сполуки та поліаміни, фенольні сполуки, речовини з вітамінною активністю та близькі до них за будовою, цілий ряд фармакологічних препаратів та ін. [1–5]. Разом з тим, постали деякі питання щодо практичного застосування цих речовин у медицині. Так, 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 [2]. Тривале застосування синтетичних екзогенних інгібіторів вільно-радикальних реакцій може призводити до зменшення пулу ендогенних антиоксидантів. За певних умов, антиоксиданти здатні проявляти й мутагенні ефекти. Зокрема, внаслідок зсуву рівноваги редокс-систем у прооксидантному напрямі при тривалому оксидативному стресі. Накопичений досвід свідчить, що антимутагенні ефекти вітамінів проявляються переважно на фоні відповідних гіпо- та авітамінозів, а застосування фармакологічних за-

собів для захисту геному ускладнюється неможливістю їх призначення широким контингентам населення [1, 3].

Тому в дослідженнях з антимутагенезу особливу увагу привертають біологічно активні речовини природного походження — адаптогени, які здатні підвищувати резистентність організму до несприятливих факторів середовища [6]. Гумінові речовини (гумати), фізологічно активною формою яких є солі гумінових кислот, є добре відомими адаптогенами. 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. Їх висока фізіологічна активність, широкий спектр застосування в медицині і біології свідчать про поліфункціональність механізмів реалізації адаптогенних властивостей [7–10].

Метою роботи було дослідити вплив фізіологічно активної форми гумінових кислот — гумату натрію на кластогенез, індукований прооксидантним мутагеном γ -типу діоксидином в культурі лімфоцитів людини.

Методи дослідження. Антикластогенні властивості гумату натрію (“АгроХімпак”, Україна) досліджували в соматичних клітинах людини за допомогою тест-системи культури лімфоцитів периферичної крові. В якості індикатора оксидантного стресу використовували діоксидин (“Фармакон”, РФ). Показано, що мутагенні ефекти діоксидину опосередковані утворенням H_2O_2 і продуктами його вільно-радикального розкладу, перш за все гідроксильним радикалом [11]. Крім того, механізм репарації пошкоджень ДНК, індукованих γ -опроміненням та діоксидином подібний, тому останній відносять до групи агентів γ -типу [12]. Тому діоксидин можна використовувати в якості моделі оксидантного стресу, індукованого іонізуючим опроміненням та хімічними мутагенами.

Для тест-системи використовували периферичну (венозну) кров умовно здорового донора, яку культивували загальноприйнятим напівмікрометодом D.A. Hungerford [13]. Діоксидин (0,1 мкг/мл) та гумат натрію (50 мкг/мл) вносили в культуральну суміш (разом та роздільно) на 48 годину від початку культивування, в пізній постсинтетичній G₂ стадії першого мітотичного циклу. Препарати метафазних хромосом фарбували барвником Гімза (Sigma, USA) для проведення традиційного цитогенетичного аналізу рівномірно забарвлених хромосом. Розраховували частоту aberrantних метафаз (%). Статистичний аналіз проводили у відповідності з критерієм Фішера при порівнянні часток aberrantних метафаз в контрольній і експериментальних вибірках [14].

Результати та їх обговорення. Результати цитогенетичного аналізу представлени на рис. 1. Частота аберантних метафаз в контролі становила $3,29 \pm 0,98\%$. При додаванні гумату натрію в концентрації 50 мкг/мл на G₂ стадії мітотичного циклу частота аберантних метафаз становила $1,60 \pm 0,60\%$.Хоча рівень аберантних клітин був при цьому майже в два рази меншим, порівняно з контролем, вірогідність відмінностей мала недостатній рівень статистичної значущості ($p > 0,05$). Дія діоксидину в концентрації 0,1 мкг/мл на G₂ стадії мітотичного циклу призводила до збільшення частоти аберантних метафаз, яка становила $12,5 \pm 4,13\%$. При цьому спостерігається значне інгібування мітотичної активності стимульованих ФГА лімфоцитів, що і обумовило значно меншу кількість метафаз в аналізі (порівняно з контролем і варіантом з гуматом натрію) та, відповідно, досить велику стандартну похибку.

За умов сумісної інкубації діоксидину та гумату натрію частота аберантних метафаз зменшувалась в 4,72 рази і становила $2,65 \pm 1,17\%$. При цьому вона вірогідно не відрізнялась від контролю. Слід зазначити, що за умов сумісної інкубації діоксидину з гуматом натрію не відбувалось такого значного інгібування мітотичної активності, яке спостерігали при роздільній дії діоксидину. Таким чином, гумат натрію, при концентрації 50 мкг/мл, проявляє сильний антимутагенний ефект щодо хромосомних пошкоджень, обумовлених оксидативним стресом, індукованим діоксидином. Це може свідчити про можливість наявності антиоксидантних властивостей у гуматі натрію, або його здатності нейтралізувати ефекти оксидативного стресу на хромосомному рівні.

Порівнюючи отримані результати з даними літератури слід зазначити наступне. В дослідженнях на рослинному об'єкті *Allium cepa L.* було показано антимутагенні властивості гумату натрію щодо цитогенетичних ефектів, індукованих діоксидином при сумісній інкубації

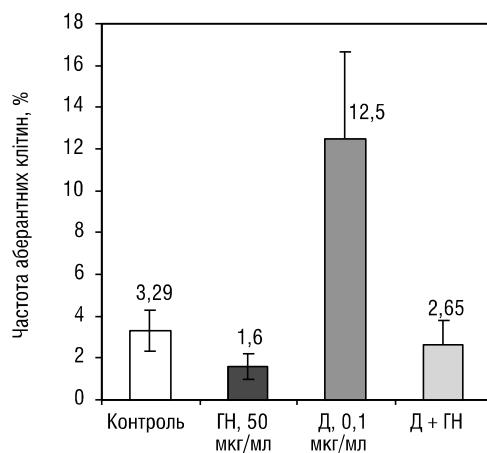


Рис. 1. Антикластогенний ефект гумату натрію (ГН), щодо дії діоксидину (Д) в культурі лімфоцитів людини

мутагену і модифікатора впродовж всього мітотичного циклу [15]. Гумат натрію не повністю інгібував кластогенні ефекти діоксидину, знижуючи частоту аберантних клітин, індукованих мутагеном, на 56,33%. Слід за-значити, що рівень індукованого мутагенезу в цьому дослідженні був в 2 разивищим ($22,21 \pm 1,22\%$ аберантних клітин). Однією з причин виявлених відмінностей могло б бути те, що для багатьох антимутагенів притаманне зменшення ефективності при збільшенні рівня мутагенного навантаження. Проте, в іншому дослідженні на *Allium cepa L.*, при рівні індукованого рентгенівським опроміненням мутагенезу в $9,05 \pm 0,87\%$ аберантних клітин, антимутагенна ефективність гумату натрію складала 51,27% [16]. Не виключено, що виявлені розбіжності можуть бути обумовлені, в тому числі, і відмінностями в трансмембрannому транспорту мутагену та гумату між рослинними клітинами та лімфоцитами.

Результати порівняльного аналізу антимутагенної ефективності можуть вказувати також на те, що поряд з антиоксидантними ефектами можливий інший, зокрема десмутагенний. Ще донедавна вважали, що одним з основних механізмів генопротекторної активності гуматів є десмутагенний ефект — за рахунок зв'язування молекул мутагенів з макромолекулами гумінових речовин та подальшого виділення їх з організму [16, 17]. Антимутагенний ефект фармакологічного препарату гумізоль в культурі лімфоцитів людини щодо хромосомних пошкоджень, індукованих алкілюючим циклофосфамідом автори пояснюють інгібуючим впливом на систему метаболічної активації [18]. На відміну від циклофосфаміду, діоксидин є мутагеном прямої дії і не метаболізується в організмі. А зазначена вище радіопротекторна активність гумату натрію виключає наявність лише десмутагенного механізму захисної дії гумату натрію, та є опосередкованим підтвердженням антиоксидантної активності препарату. При дослідженні можливих механізмів антимутагенної дії гумату натрію слід також враховувати й виявленій стабілізуючий вплив препарату на процеси мітотичного поділу.

Таким чином, аналіз отриманих результатів, не виключаючи можливості десмутагенної компоненти, свідчить радше про поліфункціональність механізмів реалізації антимутагенної активності гумату натрію.

Висновок. Гумат натрію в концентрації 50 мкг/мл проявляє сильний антикластогенний ефект щодо дії прооксидантного агенту γ -типу діоксидину в культурі лімфоцитів людини, знижуючи рівень аберантних клітин, індукованих мутагеном до контрольного. Аналіз отриманих результатів вказує на можливу поліфункціональність механізмів реалізації антимутагенної активності гумату натрію.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дурнєв, А. Д. Фармакологические проблемы поиска и применения антимутагенов [Текст] / А. Д. Дурнєв, С. Б. Середенин // Вестн. РАМН. — 1993. — № 1. — С. 19–26.
2. Гродзинський, Д. М. Радіобіологія [Текст] / Д. М. Гродзинський. — К.: Либідь, 2001. — 448 с.
3. Барабой, В. А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии [Текст] / В. А. Барабой, Д. А. Сутковой. — К., 1997. — Т. 1. — 202 с.
4. Baer-Dubowska, W. Carcinogenic and anticarcinogenic food components [Text] / W. Baer-Dubowska, A. Bartoszek, D. Malejka-Giganti. — NY: Taylor & Francis Group, LLC, 2006. — 393 р.
5. Stasiuk, M. Biological activity of phenolic lipids [Text] / M. Stasiuk, A. Kozubek // Cell Mol. Life Sci. — 2010. — Vol. 67, N 6. — P. 841–860.
6. Барилляк, І. Р. Характеристика антимутагенного и иммунокорректирующего действия растительных препаратов с адаптогенными свойствами [Текст] // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: зб. наук. пр. — К.; Луганськ, 2000. — Вип. 4 (30). — С. 35–38.
7. Pena-Mendez, E. M. Humic substances — compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine [Text] / E. M. Pena-Mendez, J. Havel, J. Patočka // J. Appl. Biomed. — 2005. — N 3. — P. 13–24.
8. Klöcking, R. Medical aspects and applications of humic substances [Text] / R. Klöcking, B. Helbig // Biopolymers for medical and pharmaceutical applications. — 2005. — N 1. — P. 3–15.
9. Изучение антиангидренных свойств нового препарата бутафол [Текст] / Н. Т. Раихлин [и др.]. — Рос. биотерапевт. журн. — 2007. — Т. 6, № 1. — С. 49.
10. Дизайн адгезионных гуминовых полимеров и их самосборка в биосовместимые нанопокрытия [Текст] / И. В. Перминова [и др.] // Материалы междунар. конф. "Руснанотех-2009". — М., 2009. — С. 521–523.
11. Середенин, С. Б. Разработка фармакологических средств защиты генетических структур на основе изучения клеточных механизмов индукции мутаций [Текст] / С. Б. Середенин, А. Д. Дурнєв // Клеточные механизмы реализации фармакологического эффекта. — М., 1990. — С. 273–296.
12. Бакай, Т. С. Характер повреждений ДНК и их ликвидации при действии диоксицидина на бактерии [Текст] / Т. С. Бакай, Л. М. Фонштейн // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 1987. — № 4. — С. 35–39.
13. Hungerford, D. A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCL [Text] / D. A. Hungerford // Stain Techn. — 1965. — Vol. 10. — P. 333–338.
14. Атраментова, Л. А. Статистические методы в биологии [Текст] / Л. А. Атраментова, О. М. Утевская. — Горловка: Ліхтар, 2008. — 248 с.
15. Генопротекторний ефект гумату натрію за умов індукованого оксидантного стресу [Текст] / В. М. Шкарупа, І. Р. Барилляк, Л. В. Неумержицька, І. Д. Гуменюк // Цитогенетика і генетика. — 2010. — Т. 44, № 1. — С. 54–56.
16. Шкарупа, В. М. Вплив гумату натрію на цитогенетичні ефекти X-опромінення [Текст] / В. М. Шкарупа // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології: зб. наук. пр. — К.: ДІА, 2010. — Вип. 15. — С. 333–337.
17. Ferrara, G. Anticlastogenic, antitoxic and sorption effects of humic substances on the mutagen maleic hydrazide tested in leguminous plants [Text] / G. Ferrara, E. Loffredo, N. Senesi // Eur. J. Soil Sci. — 2004. — Vol. 55, N 3. — P. 449–458.
18. Use of *Saccharomyces cerevisiae* D7 to analysis of genotoxicity /antimutagenicity of

- processed humic acids [Text] / Kubešová J. [et al.] // 34th Annual conference on yeast, 10–12 May 2006, Smolenice; Slovensko. — Smolenice; Slovensko: Československá společnost mikrobiologická, 2006. — P. 85.
19. Севостьянова, Н. В. Антимутагенный эффект гумизоля в культурах Т-лимфоцитов крови, подвергнутых воздействию циклофосфана [Текст] / Н. В. Севостьянова // Вопр. курортологии и физиотерапии. — 1998. — № 4. — С. 46–47.

**АНТИКЛАСТОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ГУМАТА НАТРИЯ
ПРИ МУТАГЕНЕЗЕ, ІНДУЦИРОВАННОМ АГЕНТОМ γ -ТИПА
В КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА**

B. N. Шкарупа

ГУ “Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України”, Київ
Гумат натрія в концентрації 50 мкг/мл проявляє сильний антикластогенний ефект по отношению к прооксидантному агенту диоксидину, снижая уровень индуцированных мутагеном aberrантных метафаз с $12,5 \pm 4,13\%$ до контрольного уровня. Анализ полученных результатов указывает на возможную полифункциональность механизмов реализации antimutagenной активности гумата натрия.

Ключевые слова: прооксидантно-антиоксидантный гомеостаз, диоксидин, antimутагенез, гумат натрия.

**ANTICLASTOGENIC ACTIVITY OF SODIUM HUMATE
AT THE MUTAGENESIS INDUCED BY AGENT OF γ -TYPE
IN A CULTURE OF HUMAN LYMPHOCYTES**

V. M. Shkarupa

SI “National Research Centre for Radiation Medicine,
National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kyiv

Sodium humate at concentration of 50 mkg/ml has strong anticlastogenic effect in relation to prooxidant agent dioxidin, reducing a level induced by mutagen aberrant metaphases with $12.5 \pm 4.13\%$ up to a control level. The analysis of the received results specifies possible polyfunctionality of mechanisms of sodium humate antimutagenic activity realization.

Key words: prooxidant-antioxidant homeostasis, dioxidin, antimutagenesis, sodium humate.