

Розробка нових підходів якісної та кількісної оцінки антимутагенних властивостей гумінових речовин

Розроблено схему оцінки генопротекторних властивостей гумінових речовин з використанням комплексу якісних та кількісних цитогенетичних критеріїв в Allim-тесті. В якості модельних мутагенів пропонується використовувати іонізуюче опромінення та хімічні агенти з різною ефективністю та механізмами цитогенетичної дії: діоксидин, тіофосфамід, мітоміцин С. Розроблено спосіб оцінки антимутагенної ефективності за інтегральним показником – коефіцієнтом антимутагенної ефективності. Проведено комплексний аналіз антимутагенних властивостей гумату натрію. Показано наявність біоантимутагенних та десмутагенних властивостей гумату натрію.

Developed scheme of assessment gene-protective properties of humic substances using complex qualitative and quantitative cytogenetic criteria in Allim-test. As model mutagens are invited to use ionizing radiation and chemical agents with different efficiency and mechanisms of cytogenetic action: dioxidine, tiofosfamid, mitomycin C. Developed the method of assessment of antimutagenic efficiency of the integral indicator - ratio antimutagene efficiency. A comprehensive analysis of antimutagenic properties of sodium humate. It is shown that the bioantimutagenic and desmutagenic properties of sodium humate.

Висока фізіологічна активність гумінових речовин обумовила зацікавленість в дослідженні їх антимутагенних властивостей, з'ясуванні механізмів дії, оцінці перспектив створення фармакологічних генопротекторних препаратів на основі гуматів [1-2]. Проте, такі дослідження на сьогодні мають несистемний характер, а отримані результати іноді суперечливі [2-4]. Метою роботи було розробити схему комплексної оцінки антимутагенних властивостей гуматів.

Запропонована нами модель включає використання в якості модельних мутагенів іонізуючого опромінення та хімічних мутагенів: діоксидину, тіофосфаміду, мітоміцину С. Діоксидин є прооксидантним агентом, а репарація індукованих ним пошкоджень ДНК відбувається за механізмами, аналогічними репарації пошкоджень, індукованих γ -опроміненням. Механізм дії тіофосфаміду обумовлений алкілюванням гуанілових залишків ДНК. Для мітоміцину С, на відміну від тіофосфаміду, характерним є утворення зшивок ДНК-ДНК за рахунок алкілювання гуанілових залишків в комплементарних ланцюгах ДНК. Нами також було проведено математичний аналіз залежності доза-ефект для вказаних агентів та визначено коефіцієнти їх мутагенної ефективності (див. табл.3). Таким чином використання запропонованої схеми модельних мутагенів дозволяє охопити широкий спектр механізмів і ефективності генотоксичної дії та більш адекватно оцінити механізми антимутагенної дії гуматів.

В дослідженнях з антимутагенезу може мати місце невідповідність величин антимутагенного ефекту при використанні різних концентрацій мутагенів. Тому актуальною є розробка інтегральних показників оцінки ефективності антимутагенів, які б дозволяли більш адекватно оцінювати і порівнювати ефективність антимутагенів. Враховуючи нелінійний характер залежності доза – ефект для більшості мутагенів, при кількісній оцінці ефективності модифікаторів мутагенезу пропонується використовувати відповідні функції залежності. В табл. 1 наведена розроблена нами схема оцінки ефективності модифікаторів мутагенезу в *Allium*-тесті. Спочатку визначається функція залежності доза-ефект для

модельного мутагену. В такому випадку ефективність модифікатора мутагенезу буде визначатись величиною коефіцієнту f (при $f < 1$). Величина f визначає *лінійний показник ефективності* модифікатора, чим менше її значення, тим ефективніший антимуаген. Перевага такого підходу щодо оцінки ефективності антимуагенезу полягає як в його незалежності від дози мутагену, так і в більш точній оцінці антимуагенних властивостей не по одній ізольованій дозі мутагену, а по кривій доза–мутагенний ефект. Особливою перевагою є можливість кількісно порівнювати ефективність різних антимуагенів та їх ефективність щодо різних мутагенів (причому як в одній, так і декількох тест-системах).

Таблиця 1. Схема оцінки ефективності модифікаторів мутагенезу

Мутагени	Функція залежності доза-мутагенний ефект (по критерію частота аберантних клітин)	Функція залежності доза-мутагенний ефект при дії модифікатора (по критерію частота аберантних клітин)
мітоміцин С, тіофосфамід	$\rho = 1 - e^{-(\alpha + K_1 C)^2}$ (S-подібна крива)	$\rho = 1 - e^{-(\alpha + fK_1 C)^2}$
діоксидин	$\rho = 1 - e^{-(\alpha + KC)}$ (експонента)	$\rho = 1 - e^{-(\alpha + fKC)}$

Примітки:

ρ – частка аберантних клітин.

C – доза (концентрація) мутагену.

K – коефіцієнт мутагенної ефективності.

α – коефіцієнт, що вказує на зв'язок з очікуваним спонтанним рівнем аберантних ана-телофаз.

f – коефіцієнт антимуагенної ефективності.

В табл. 2 наведено результати аналізу антимуагенних властивостей гумату натрію відповідно до розробленої методики.

Таблиця 2. Антимуагенні властивості гумату натрію

Варіант досліду	Частота аберантних клітин, %	Антимуагенний ефект (РФ ¹), %	$K_{\text{антимут}}^2$ (f)
Контроль	1,94±0,09	-	
Гумат натрію, 100 мг/л	2,18±0,40	-	
Х-опромінення, 10 Гр	9,05±0,87	-	
Х-опромінення + гумат натрію	4,41±0,67	51,27	
Діоксидин, 10 мг/л	12,30±1,05	-	
Діоксидин + гумат натрію	5,94±0,74	51,71	0,205
Тіофосфамід, 0,2 мг/л	9,14±1,75	-	
Тіофосфамід + гумат натрію	3,80±0,72	58,43	0,465
Мітоміцин С, 0,005 мг/л	10,40±1,15	-	
Мітоміцин С + гумат натрію	3,00±0,70	71,15	0,301

Примітки:

редукційний фактор (% зниження частоти аберантних клітин)

коефіцієнт антимуагенності

В табл. 3. наведено результати аналізу залежності антимуагенних властивостей гумату натрію від концентрації хімічних мутагенів. Відмічається зменшення захисного ефекту при збільшенні рівня індукованого мутагенезу. Хоча мутагенна ефективність модельних мутагенів істотно відрізняється (показник $K_{\text{мут}}$), відмінності в захисному ефекті гумату натрію щодо дії цих речовин виражені менше. При цьому коефіцієнти антимуагенної ефективності гумату натрію розраховані для різних концентрацій кожного мутагену були співставимі (їх середні значення наведені в табл. 2). Показано, що використання коефіцієнту антимуагенності, вирахованого для дії однієї концентрації мутагену дозволяє адекватно

розрахувати антимуtagenний ефект гумату натрію для дії інших концентрацій зазначених мутагенів в діапазоні кривих доза-ефект до виходу на «плато» ($\approx 40\%$ аберантних клітин для діоксидину та $\approx 80-90\%$ аберантних клітин для алкілувальних мутагенів).

Таблиця 3. Залежність антимуtagenних властивостей гумату натрію (100 мг/л) від рівня індукованого мутагенезу

Рівень індукованого мутагенезу, ЧАА ¹ , %	Діоксидин ($K_{\text{мут}}^2 = 0,049$) ЧАА, %	РФ ³ , %	Тіофосфамід ($K_{\text{мут}} = 0,232$) ЧАА, %	РФ, %	Мітоміцин С ($K_{\text{мут}} = 1,94$) ЧАА, %	РФ, %
≈ 10	12,30 \pm 1,05	51,71	9,14 \pm 1,75	58,43	10,40 \pm 1,15	71,15
≈ 15	-	-	14,13 \pm 1,40	46,21	15,29 \pm 1,41	68,59
≈ 20	23,94 \pm 1,21	52,55	21,33 \pm 1,30	39,30	21,92 \pm 1,08	62,45
≈ 30	29,55 \pm 1,55	39,36	-	-	-	-
$\approx 40-50$	39,73 \pm 2,03	25,95	47,36 \pm 2,17	40,98	38,60 \pm 1,99	55,21
$\approx 80-90$	-	-	91,11 \pm 1,29	17,01	78,21 \pm 3,09	13,23

Примітки:

1. частота аберантних ана-телофаз
2. коефіцієнт мутагенності
3. редукційний фактор

Література

1. Zhou, X. New progress in medical research of Bio-humic acid / X. Zhou [et al.] // Applied Mechanics and Materials. – 2012. – Vol.138-139. – P.1228-1233.
2. Klöcking R., Helbig B. Medical aspects and applications of humic substances / Biopolymers for medical and pharmaceutical applications. – Weinheim. – 2005. – №1. – P. 3-15.
3. Antimutagenic and/or genotoxic effects of processed humic acids as tested upon *S. cerevisiae* D7 / J. Kubešová, V. Turková, A. Mikulcová, J. Kučerík, I. Márová, Pekař M. // Environ. Chem. Lett. – 2011. Environ Chem Lett. – 2011, №9. – P.229–233.
4. Badaev S.A., Gichner T., Pospisil F., Veleminsky J. Humic acids inhibit the formation but not the mutagenicity of N-methyl-N-nitrosourea // Mutat Res. – 1989. – Vol. – P.9-13.