

DOI 10.37000/abbsl.2025.115.01

УДК 615.277:636.087.7:547.992

Михайло Брошков,

доктор ветеринарних наук, професор, професор кафедри фізіології,
патофізіології та біохімії

Одеський державний аграрний університет, м. Одеса, Україна

ORCID ID: 0000-0002-9917-7257

email:mr_m_m@ukr.net

Михайло Станков,

аспірант

Одеський державний аграрний університет, м. Одеса, Україна

ORCID ID: 0009-0002-3817-6266

email: putini.old@gmail.com

КАНЦЕРОГЕННА АКТИВНІСТЬ КОРМОВОЇ ДОБАВКИ НА ОСНОВІ ГУМІНОВИХ РЕЧОВИН ЗА БАГАТОРАЗОВОГО ПЕРОРАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ

Анотація

Гумінові кислоти мають поліаніонний характер і зв'язують іони різними механізмами: як хімічними, так і фізичними. У порівнянні з неорганічними адсорбентами (цеолітами) їх адсорбційна здатність у сім-десять разів вища. Через неоднорідну природу гумінових речовин токсикологічна оцінка однієї конкретної речовини вважалася недостатньою для екстраполяції на групу в цілому, хоча були докладені зусилля з ідентифікації відповідної модельної речовини. Метою досліджень було встановлення канцерогенного ефекту за перорального введення розчину гумату натрію (кормової добавки «Гумівет») з використанням мікроядерного тесту. Для приготування оральної форми в якості сировини використовували буре вугілля з Черкаського родовища (Україна) з наступними характеристиками: вологість – 24,36%, зольність – 24,1%, органічна речовина – 51,5%. Прогнозування канцерогенного ефекту за перорального введення кормової добавки «Гумівет» проводили з використанням мікроядерного тесту (методу оцінки генотоксичності за виявленням мікроядер в клітинах кісткового мозку ссавців). В якості експериментальної моделі були взяті самці і самки білих нелінійних мишей масою тіла 24,0-27,0 г. У першій серії експерименту кормова добавка «Гумівет» (розчин для перорального застосування) у дозах 0,80 та 4,0 мл/кг маси тіла вводили внутрішньошлунково за допомогою зонда одноразово тільки мишам-самцям (n=6) з фіксацією клітинного матеріалу через 24 год після введення. У другій серії випробувану кормову добавку аналогічно вводили самцям і самкам мишей (n=6) щодня протягом 5 діб. Фіксацію клітинного матеріалу здійснювали через 24 год після останнього введення. Для проведення експерименту за принципом аналогів було також сформовано дві контрольні групи (позитивний та негативний контроль) – 6 мишей у кожній. За одноразового введення кормової добавки «Гумівет» з розрахунку 0,8 мл на кг живої ваги не встановлено змін цитогенетичної активності, про що свідчить відсутність суттєвого збільшення поліхроматофільних еритроцитів. Отриманий позитивний результат свідчить, що речовина індукує хромосомні

пошкодження та/або порушення мітотичного апарату клітин у експериментальних тварин. Частка поліхроматофільних еритроцитів від всіх еритроцитів в нормі не повинна перевищувати 0,2%. Аналіз цитогенетичного впливу кормової добавки «Гумівет» за перорального введення протягом п'яти днів показав, що у мишей з групи позитивного контролю, що отримували циклофосфамід в дозі 20 мг/кг маси тіла, частка поліхроматофільних еритроцитів становила (0,667-0,683) %.

Ключові слова: гумінові кислоти, канцерогенність, цитогенетична активність, лабораторні миші.

Вступ. Останнє десятиліття відзначилось значним розширенням застосування препаратів на основі гумінових кислот, особливо в рослинництві та тваринництві, де вони використовуються як фактори інтенсифікації. У медицині їх використовують для лікування різних захворювань, зокрема отруєнь важкими металами, захворювань шлунково-кишкового тракту, різних запальних та пухлинних захворювань [11].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Гумінові кислоти мають поліаніонний характер і зв'язують іони різними механізмами: як хімічними, так і фізичними. У порівнянні з неорганічними адсорбентами (цеолітами) їх адсорбційна здатність у сім-десять разів вища. Абсорбція гумінових кислот у шлунково-кишковому тракті тварин дуже низька, менша за 0,1%. Комісія з ветеринарних препаратів при ЄМЕА (Європейське агентство з оцінки лікарських засобів) [3] дозволила пероральне застосування препаратів на основі гумінових кислот для всіх, включаючи продуктивних тварин, вказавши діапазон від 0,05 до 0,07%. Важливим при використанні будь якої речовини є визначення її токсичності та канцерогенності зокрема [7]. Через неоднорідну природу гумінових речовин токсикологічна оцінка однієї конкретної речовини вважалася недостатньою для екстраполяції на групу в цілому, хоча були докладені зусилля з ідентифікації відповідної модельної речовини [2]. Проте деякі дослідження показали позитивні, чи сумнівні результати як у тестах на мутагенність, так і в тестах на загальну токсичність [8]. У світлі цієї суперечливої інформації для оцінки потенційних проблем, слід звернути увагу як на мінливість складу на місці видобутку сировини, так і на конкретні методи екстракції, які можуть призвести до відмінностей у токсичному потенціалі, а також на надійність протоколів випробувань [10]. Отже, для розробки якісної кормової добавки на основі речовин гумінової природи, необхідним є проведення досліджень для встановлення її канцерогенності.

Мета. Метою досліджень було встановлення канцерогенного ефекту за перорального введення розчину гумату натрія (кормова добавка «Гумівет») з використанням мікроядерного тесту.

Виклад основного матеріалу досліджень. Для приготування оральної форми в якості сировини використовували буре вугілля з Черкаського родовища (Україна) з наступними характеристиками: вологість – 24,36%, зольність – 24,1%, органічна речовина – 51,5%. Сировина очищалась від великих механічних включень, дробилась і розсіювалась на віброгрохоті до розміру частинок не більше 1 мм. Після подрібнення сировину розчиняли у воді

в співвідношенні 1 частина сировини та 3 частини води. При постійному перемішуванні в реакторі розчин розігрівали до 70°C після чого додавали Na_2CO_3 з розрахунку 1 частина луку до 5 частин сировини. Експозицію при цьому витримували до 1 години, після чого додавали 60% H_2O_2 у співвідношенні 1 до 2 до Na_2CO_3 з контролем процесу піноутворення. Після 40 хв експозиції готовий розчин центрифугували та додавали сорбат калію (E_2O_2) з розрахунку 2 г на 1 л готового розчину. Вміст гумінових кислот складав 4%, їх визначали методом визначення масової частки згідно ДСТУ 7083:2009 (Україна). Отже, в результаті нами був отриманий розчин гумата натрію (кормова добавка «Гумівет») з вмістом гумінових кислот 4%, густиною 1,06 см^3 та рН 8,5. Прогнозування канцерогенного ефекту за перорального введення кормової добавки «Гумівет» проводили з використанням мікроядерного тесту (методу оцінки генотоксичності за виявленням мікроядер в клітинах кісткового мозку ссавців). Тест проведений відповідно до рекомендацій [1]. В якості експериментальної моделі були взяті самці і самки білих нелінійних мишей масою тіла 24,0-27,0 г. Тварин утримували в стандартних умовах віварію за температури 19-20 °C та вологості 50-55%, штучним освітленням, вільним доступом до води та корму.

У першій серії експерименту кормова добавка «Гумівет» (розчин для перорального застосування) у дозах 0,80 та 4,0 мл/кг маси тіла (за абсолютною масою препарату) вводили внутрішньошлунково за допомогою зонда одноразово тільки мишам-самцям ($n=6$) з фіксацією клітинного матеріалу через 24 год після введення. У другій серії випробуваний кормову добавку аналогічно вводили самцям і самкам мишей ($n=6$) щодня протягом 5 діб. Фіксацію клітинного матеріалу здійснювали через 24 год після останнього введення. Для проведення експерименту за принципом аналогів було також сформовано дві контрольні групи (позитивний та негативний контроль) – 6 мишей у кожній. В якості позитивного контролю при одноразовому введенні (пероральному) використовували циклофосфамід в дозі 20 мг/кг маси тіла. Тваринам негативного контролю вводили воду.

Приготування цитогенетичних препаратів проводили згідно з методичними рекомендаціями [1]. Отримані препарати (два скла від кожної тварини) піддавали мікроскопічному цитогенетичному аналізу. Аналізували 2000 поліхроматофільних еритроцитів від кожної тварини, співвідношення нормо- і поліхроматофільних еритроцитів визначали при підрахунку 500 еритроцитів. Результати досліджень обробляли статистично з використанням пакету програм Microsoft Excel 2003 (for Windows XP), вірогідність отриманих результатів оцінювали за критерієм Ст'юдента. Критерієм позитивного результату було відтворене і/або залежне від дози значуще збільшення числа поліхроматофільних еритроцитів (ПХЕ) з мікроядрами принаймні в одній з груп порівняно з контролем. За одноразового введення кормової добавки «Гумівет» (табл. 1) з розрахунку 0,8 мл на кг живої ваги не встановлено змін цитогенетичної активності, про що свідчить відсутність суттєвого збільшення ПХЕ.

Таблиця 1

Результати оцінки цитогенетичної активності кормової добавки «Гумівет» за одноразового введення (розчин для перорального застосування) у тесті на індукцію мікроядер в клітинах кісткового мозку ссавців

Група (препарат, доза)	№ миші	Кількість ПХЕ з мікроядрами на 1000 ПХЕ		Частка ПХЕ від всіх еритроцитів, %
		На кожну мишу	На групу в цілому	
Перша серія експерименту (одноразове введення)				
Миші-самці, негативний контроль (вода)	1	1	1,17±0,20	0,117
	2	1		
	3	1		
	4	1		
	5	2		
	6	1		
Миші-самці, позитивний контроль (циклофосфамід в дозі 20 мг/кг маси тіла)	1	7	6,83±0,21	0,683
	2	7		
	3	7		
	4	7		
	5	7		
	6	6		
Миші-самці, «Гумівет» (розчин для перорального застосування), 0,80 мл/кг маси тіла	1	1	1,17±0,21	0,117
	2	1		
	3	2		
	4	1		
	5	1		
	6	1		
Миші-самці, «Гумівет» (розчин для перорального застосування), 4,0 мл/кг маси тіла	1	2	1,33±0,25	0,133
	2	1		
	3	1		
	4	1		
	5	2		
	6	1		
	2	2		
	3	1		
	4	2		
	5	1		
	6	1		

Отриманий позитивний результат свідчить, що речовина індукує хромосомні пошкодження та/або порушення мітотичного апарату клітин у експериментальних тварин. Частка ПХЕ від всіх еритроцитів в нормі не повинна перевищувати 0,2%.

У мишей з групи позитивного контролю, що отримували циклофосфамід в дозі 20 мг/кг маси тіла, частка ПХЕ становила (0,667-0,683) %.

У мишей обох статей, яким протягом 5 діб перорально вводили препарат у терапевтичній дозі (0,80 мл/кг маси тіла) та п'ятикратній (4,0 мл/кг маси тіла)

частка ПХЕ не мала вірогідних відхилень між собою та становила 0,117-0,150%, що входило в межу норми.

Аналіз цитогенетичного впливу кормової добавки «Гумівет» за перорального введення протягом п'яти днів (таблиця 2) показав, що у мишей з групи позитивного контролю, що отримували циклофосфамід в дозі 20 мг/кг маси тіла, частка ПХЕ становила 0,667-0,683 %. Також не встановлено жодних побічних ефектів та тератогенності у мишей, яким перорально вводили жирні кислоти в дозі 100 мг/кг маси тіла/день протягом 183 днів в іншому дослідженні [8].

Таблиця 2

Цитогенетична активність кормової добавки «Гумівет» у тесті на індукцію мікроядер в клітинах кісткового мозку ссавців за 5-ти денного введення

Група (препарат, доза)	№ миші	Кількість ПХЕ з мікроядрами на 1000 ПХЕ		Частка ПХЕ від всіх еритроцитів, %
		На кожну мишу	На групу в цілому	
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Миші-самці, негативний контроль (вода)	1	1	1,00±0,0	0,100
	2	1		
	3	1		
	4	1		
	5	1		
	6	1		
Миші-самці, позитивний контроль (циклофосфамід в дозі 20 мг/кг маси тіла)	1	6	6,67±0,25	0,667
	2	7		
	3	7		
	4	7		
	5	7		
	6	6		
Миші-самці, «Гумівет» (розчин для перорального застосування), 0,80 мл/кг маси тіла	1	1	1,17±0,21	0,117
	2	1		
	3	1		
	4	1		
	5	1		
	6	2		
Миші-самці, «Гумівет» (розчин для перорального застосування), 4,0 мл/кг маси тіла	1	2	1,33±0,25	0,133
	2	1		
	3	1		
	4	1		
	5	1		
	6	2		
Миші-самки, негативний контроль (вода)	1	0	1,00±0,31	0,100
	2	1		
	3	1		
	4	1		
	5	1		
	6	2		

Миші-самки, позитивний контроль (циклофосфамід у дозі 20 мг/кг маси тіла)	1	7	6,83±0,20	0,683
	2	7		
	3	7		
	4	7		
	5	7		
	6	6		
Миші-самки, «Гумівет» (розчин для перорального застосування), 0,80 мл/кг маси тіла	1	2	1,33±0,25	0,133
	2	1		
	3	2		
	4	1		
	5	1		
	6	1		
	1	2		
	2	2		
	3	1		
	4	2		
	5	1		
	6	1		

У мишей обох статей, яким протягом 5 діб перорально вводили препарат у терапевтичній дозі (0,80 мл/кг маси тіла) та п'ятикратній (4,0 мл/кг маси тіла) частка ПХЕ не мала вірогідних відхилень між собою та становила 0,117-0,150%, що входило в межу норми.

Антимутагенна/дисмутагенна активність гумінової кислоти леонардиту та ґрунтової гумінової кислоти вивчалася на культивованій лінії лімфобластоїдних клітин людини, обробленої мітоміцином як референтний мутаген, шляхом оцінки індукції мікроядер. Ці результати підтверджують антигенотоксичну дію гумінової кислоти у клітинах людини, аналогічну раніше, що спостерігалось у різних видів рослин [4]. Жодних ознак мутагенності не спостерігалось в тесті зворотних мутацій бактерій, або в дослідженні аномалій форми сперматозоїдів *in vivo*, тоді як генотоксичності не спостерігалось в мікроядерних тестах *in vivo* у мишей [2].

Висновки та перспективи подальших досліджень. Отже, кормова добавка «Гумівет» (розчин для перорального застосування, з 4% вмістом гумінової кислоти) за умов 5-добового перорального введення в дозах 0,80 і 4,0 мл/кг маси тіла не проявляє канцерогенної дії – під час мікроскопічних досліджень частка ПХЕ не мала вірогідних відхилень між собою та становила 0,117-0,150 %, що не виходить за межу норми у 0,2%.

Список використаної літератури

1. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації. Київ: Авіцена. 2001. 527 с.
2. Aguilar F., Charrondiere U. R., Dusemund B. та ін. Chromium (III)-, iron (II)- and selenium-humic acid/fulvic acid chelate and supplemented humifulvate added for nutritional purposes to food supplements. *EFSA Journal*. 2009. № 1147. С. 1–36

3. Dai C. et al. A comprehensive toxicological assessment of fulvic acid. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM. 2020. 8899244. <https://doi.org/10.1155/2020/8899244>
4. European Medicines Agency. *Maximum residue limits (MRL) for veterinary medicines*. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory-overview/research-development-veterinary-medicines/maximum-residue-limits-mrl> (дата звернення: 21.07.2025)
5. Ferrara G., Loffredo E., Senesi N., Marcos R. Humic acids reduce the genotoxicity of mitomycin C in the human lymphoblastoid cell line TK6. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2006. T. 603, № 1. C. 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.11.009>
6. Murbach T. S. et al. A toxicological evaluation of a fulvic and humic acids preparation. *Toxicology Reports*. 2020. T. 7. C. 1242–1254. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.030>
7. National Research Council (US). *Committee on Risk Assessment of Hazardous Air Pollutants. Science and Judgment in Risk Assessment*. Washington (DC): National Academies Press (US). 1994. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK208246/>
8. Ribas G. et al. Genotoxicity of humic acid in cultured human lymphocytes and its interaction with the herbicides alachlor and maleic hydrazide. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1997. 29, № 3. C. 272–276
9. Sabi R., Vrey P., Van Rensburg C. Carbohydrate-derived Fulvic acid (CHD-FA) inhibits Carrageenan-induced inflammation and enhances wound healing: efficacy and toxicity study in rats. *Drug Development Research*. 2012. 73. <https://doi.org/10.1002/ddr.20445>
10. Timothy S. et al. A toxicological evaluation of a fulvic and humic acids preparation. *Toxicology Reports*. 2020. 7. P. 1242–1254. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.030>
11. Vašková J. et al. Therapeutic Efficiency of Humic Acids in Intoxications. *Life*. 2023. T. 13, № 4. C. 971. <https://doi.org/10.3390/life13040971>

Mykhailo Broshkov,

doctor of Veterinary Sciences, Professor, Professor of the Department of Physiology, Pathophysiology and Biochemistry

Odesa State Agrarian University, Odesa, Ukraine

ORCID ID: 0000-0002-9917-7257

email:mr_m_m@ukr.net

Mykhailo Stankov,

PhD student

Odesa State Agrarian University, Odesa, Ukraine

ORCID ID: 0009-0002-3817-6266

email: putini.old@gmail.com

CARCINOGENIC ACTIVITY OF A FEED ADDITIVE BASED ON HUMIC SUBSTANCES UPON REPEATED ORAL ADMINISTRATION

Abstract

Humic acids are polyanionic in nature and bind ions by various mechanisms, both chemical and physical. Compared to inorganic adsorbents (zeolites), their adsorption capacity is seven to ten times higher. Due to the heterogeneous nature of humic substances, the toxicological assessment of one specific substance was considered insufficient for extrapolation to the group as a whole, although efforts were made to identify an appropriate model substance. The aim of the research was to establish the carcinogenic effect for oral administration of sodium humate solution (feed additive

"Tymisem") using a micronucleus test. For the preparation of the oral form, brown coal from the Cherkasy deposit (Ukraine) with the following characteristics was used as raw material: humidity - 24.36%, ash content - 24.1%, organic matter - 51.5%. The prediction of the carcinogenic effect of oral administration of the feed additive "Tymisem" was carried out using the micronucleus test (a method for assessing genotoxicity by detecting micronuclei in mammalian bone marrow cells). Male and female white nonlinear mice with a body weight of 24.0-27.0 g were taken as an experimental model. In the first series of the experiment, the feed additive "Tymisem" (solution for oral administration) in doses of 0.80 and 4.0 ml/kg of body weight was administered intragastrically via a probe once only to male mice (n=6) with fixation of the cellular material 24 h after administration. In the second series, the tested feed additive was similarly administered to male and female mice (n=6) daily for 5 days. The fixation of the cellular material was carried out 24 h after the last administration. To conduct an experiment based on the principle of analogues, two control groups (positive and negative control) of 6 mice each were also formed. With a single administration of the feed additive "Tymisem" at the rate of 0.8 ml per kg of live weight, no changes in cytogenetic activity were detected, as evidenced by the absence of a significant increase in polychromatophilic erythrocytes. The positive obtained result indicates that the substance induces chromosomal damage and / or disruption of the mitotic apparatus of cells in experimental animals. The proportion of polychromatophilic erythrocytes from all erythrocytes should not normally exceed 0.2%. Analysis of the cytogenetic effect of the feed additive "Tymisem" with oral administration for five days showed that in mice from the positive control group (that received cyclophosphamide at a dose of 20 mg/kg of body weight) the proportion of polychromatophilic erythrocytes was (0.667-0.683)%.

Keywords: humic acids, carcinogenicity, cytogenetic activity, laboratory rats.

Reference

1. Stefanov, O. V. (2001). *Doklinichni doslidzhennia likars'kykh zasobiv: metodychni rekomendatsii* [Preclinical studies of medicinal products: methodological recommendations]. Kyiv: Avitsena. (In Ukrainian)
2. Aguilar, F., Charrondiere, U. R., Dusemund, B., Galtier, P., Gilbert, J., Gott, D. M., Grilli, S., Guertler, R., Kass, G.E.N., Koenig, J., Lambré, C., Larsen, J-C., Leblanc, J-C., Mortensen, A., Parent-Massin, D., Pratt, I., Rietjens, I.M.C.M., Stankovic, I., Tobback, P. ... Woutersen, R. A. (2009). Chromium (III)-, iron (II)- and selenium-humic acid/fulvic acid chelate and supplemented humifulvate added for nutritional purposes to food supplements. *EFSA Journal*, 1147, 1-36.
3. Dai, C., Xiao, X., Yuan, Y., Sharma, G., & Tang, S. (2020). A comprehensive toxicological assessment of fulvic acid. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 8899244. <https://doi.org/10.1155/2020/8899244>
4. European Medicines Agency. (2023). *Maximum residue limits (MRL) for veterinary medicines*. <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory-overview/research-development-veterinary-medicines/maximum-residue-limits-mrl>
5. Ferrara, G., Loffredo, E., Senesi, N., & Marcos, R. (2006). Humic acids reduce the genotoxicity of mitomycin C in the human lymphoblastoid cell line TK6. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 603(1), 27-32. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.10.014>
6. Murbach, T. S., Glavits, R., Endres, J. R., Clewell, A. E., Hirka, G., Vértesi, A., Béres, E., & Pasics Szakonyiné, I. (2020). A toxicological evaluation of a fulvic and humic acids preparation. *Toxicology Reports*, 7, 1242-1254. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.030>
7. National Research Council (US) Committee on Risk Assessment of Hazardous Air Pollutants (1994). *Science and judgment in risk assessment. Assessment of toxicity*. Washington, DC: National Academies Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK208246/>.

8. Ribas, G., Carbonell, E., Creus, A., Xamena, N., & Marcos, R. (1997). Genotoxicity of humic acid in cultured human lymphocytes and its interaction with the herbicides alachlor and maleic hydrazide. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 29(3), 272-276.
9. Sabi, R., Vrey, P., & Van Rensburg, C. (2012). Carbohydrate-derived fulvic acid (CHD-FA) inhibits carrageenan-induced inflammation and enhances wound healing: Efficacy and toxicity study in rats. *Drug Development Research*, 73. <https://doi.org/10.1002/ddr.20445>
10. Timothy, S. M., Glávits, R., Endres, J., Clewell, A., Hirka, G., Vértesi, A., Béres, E., Szakonyiné, I. (2020). A toxicological evaluation of a fulvic and humic acids preparation. *Toxicology Reports*, 7, P. 1242-1254. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.030>
11. Vasková, J., Stupak, M., Vidova Ugurbaş, M., Zatko, D., & Vasko, L. (2023). Therapeutic efficiency of humic acids in intoxications. *Life*, 13(4), 971. <https://doi.org/10.3390/life13040971>

Стаття надійшла до редакції 26 червня 2025 року.

Стаття пройшла рецензування 27 червня 2025 року.

Стаття опублікована 30 червня 2025 року.