

Н.Ю. Воробьева^{1,2}, Т.А. Астрелина¹, Е.И. Яшкина^{1,2}, А.К. Чигасова³,
А.А. Осипов², Д.Ю. Усупжанова¹, И.В. Кобзева¹, Ю.Б. Сучкова¹, В.А. Брунчуков¹,
А.А. Расторгуева¹, Ю.А. Федотов^{1,2}, А.С. Самойлов¹, А.Н. Осипов^{1,2}

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ГУМИНО-ФУЛЬВОВЫХ КИСЛОТ НА КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ВЫХОД ОСТАТОЧНЫХ ФОКУСОВ γ H2AX И ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ В ОБЛУЧЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

¹ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

² Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

³ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

Контактное лицо: Наталья Юрьевна Воробьева, e-mail: nuv.rad@mail.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Оценка влияния препарата гумино-фульвовых кислот на количественный выход остаточных фокусов белка-маркера репарации двуниевых разрывов (ДР) ДНК – фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX) и пролиферативную активность в культуре мезенхимальных стромальных клеток (МСК) человека, через 24, 48 и 72 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозах 2, 4 и 10 Гр.

Материал и методы: Через 24 ч после инкубации МСК с препаратом гумино-фульвовых кислот («Гуминовый комплекс», ООО «Система-БиоТехнологии», Россия) в разведении 1/1000 проводили облучение клеток на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (напряжение 200 кВ, ток пучка 2×5 мА, фильтр алюминиевый 1,5 мм, мощность дозы 0,85 Гр/мин). Для количественной оценки остаточных фокусов γ H2AX и доли пролиферирующих клеток использовали иммуноцитохимическое окрашивание с использованием антител к γ H2AX и Ki67 (белок-маркер клеточной пролиферации), соответственно. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft). Для оценки значимости различий выборки использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты: Проведенные исследования показали, что на используемой клеточной модели и в вышеописанных условиях эксперимента препарат гумино-фульвовых кислот не влияет на эффективность репарации радиационно-индуцированных ДР ДНК, однако существенно снижает пролиферативную активность как облученных, так и не облученных МСК. Целесообразно провести детальные исследования молекулярно-клеточных механизмов антипролиферативного эффекта гуминовых и фульвовых кислот.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, рентгеновское излучение, γ H2AX, остаточные фокусы, двуниевые разрывы ДНК, пролиферация клеток, гуминовые кислоты, фульвовые кислоты

Для цитирования: Воробьева Н.Ю., Астрелина Т.А., Яшкина Е.И., Чигасова А.К., Осипов А.А., Усупжанова Д.Ю., Кобзева И.В., Сучкова Ю.Б., Брунчуков В.А., Расторгуева А.А., Федотов Ю.А., Самойлов А.С., Осипов А.Н. Влияние препарата гумино-фульвовых кислот на количественный выход остаточных фокусов γ H2AX и пролиферативную активность в облученных мезенхимальных стромальных клетках человека // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2023. Т. 68. № 2. С. 11–15. DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-2-11-15

N.Yu. Vorobyeva^{1,2}, T.A. Astrelina¹, E.I. Yashkina^{1,2}, A.K. Chigasova³, A.A. Osipov², D.Yu. Usupzhanova¹,
I.V. Kobzeva¹, Yu.B. Suchkova¹, V.A. Brunchukov¹, A.A. Rastorgueva¹, Yu.A. Fedotov^{1,2}, A.S. Samoilov¹, A.N. Osipov^{1,2}

Effect of a Humic-Fulvic Acid Preparation on the Quantitative Yield of Residual γ H2AX Foci and Proliferative Activity in Irradiated Human Mesenchymal Stromal Cells

¹ A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

² N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Moscow, Russia

³ Institute of Biochemical Physics, Moscow, Russia

Contact person: N.Yu. Vorobyeva, e-mail: nuv.rad@mail.ru

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the influence of a humic-fulvic acid substance on the quantitative yield of residual foci of the DNA double-strand break (DSB) repair protein-marker - phosphorylated histone H2AX (γ H2AX) and proliferation activity in a culture of human mesenchymal stromal cells (MSCs) 24, 48, and 72 h after exposure to X-ray radiation at doses of 2, 4 and 10 Gy.

Material and methods: Through 24 hours after incubation of MSCs with a substance of humic-fulvic acids (Humic Complex, ООО Система-БиоТехнологии, Russia) at a dilution of 1/1000. Cells were irradiated on an X-ray biological device RUB RUST-M1 at a voltage of 200 kV, beam current 2×5 mA, aluminum filter 1.5 mm, absorbed dose rate 0.85 Gy/min. Immunocytochemical staining was used to quantify the residual γ H2AX foci and the percentage of proliferating cells using antibodies to γ H2AX and Ki-67 (a marker protein for cell proliferation), respectively. Statistical analysis of the obtained data was carried out using the statistical software package Statistica 8.0 (StatSoft). To assess the significance of differences between samples, Student's t-test was used.

Results and conclusion: The conducted studies showed that on the cell model used and under the above experimental conditions, the humic-fulvic acid substance does not affect the efficiency of repair of radiation-induced DNA DSBs, however, it significantly reduces the proli-

tion activity of both irradiated and non-irradiated MSCs. It is advisable to conduct detailed studies of the molecular and cellular mechanisms of the antiproliferative effect of humic and fulvic acids.

Keywords: *mesenchymal stromal cells, X-ray radiation, γ H2AX, residual foci, DNA double-strand breaks, cell proliferation, humic acids, fulvic acids*

For citation: Vorobyeva NYu, Astrelina TA, Yashkina EI, Chigasova AK, Osipov AA, Usupzhanova DYu, Kobzeva IV, Suchkova YuB, Brunchukov VA, Rastorgueva AA, Fedotov YuA, Samoilov AS, Osipov AN. Effect of a Humic-Fulvic Acid Preparation on the Quantitative Yield of Residual γ H2AX Foci and Proliferative Activity in Irradiated Human Mesenchymal Stromal Cells. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2023;68(2):11–15. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-2-11-15

Введение

Природные гуминовые кислоты являются высокомолекулярными соединениями, содержащими ароматические фрагменты. При этом преобладающими заместителями, определяющими их химическое поведение, являются кислородсодержащие, прежде всего, карбоксильные и фенолгидроксильные функциональные группы с присутствием карбонильных, метоксильных, аминогрупп и др. [1]. Фульвовая кислота, также относящаяся к гуминовым веществам, отличается от гуминовых кислот более светлой окраской, меньшим содержанием углерода, большим содержанием кислородсодержащих функциональных групп, большей степенью окисленности и гидрофильности [2, 3]. Показано, что гуминовые кислоты и фульвовые кислоты обладают антивирусной, антибактериальной, иммуномодулирующей и антиоксидантной активностью, проявляют противовоспалительный, противоаллергический, обменно-трофический эффекты, обладают детоксикационными, антипролиферативными и противоопухолевыми свойствами [3–5]. В настоящее время, во многих странах мира, в том числе и Российской Федерации, производят биологически активные добавки (БАД), содержащие комплексы гуминовых и фульвовых кислот [3]. Применение БАД практически не контролируется, при этом принимающие их люди могут подвергаться воздействию ионизирующего излучения в малых (диагностические процедуры) и даже больших дозах (лучевая терапия). Однако на сегодняшний день влияние гуминовых и фульвовых кислот на радиобиологические эффекты мало изучены, поэтому такие исследования являются актуальными.

Цель исследования – оценка влияния препарата гумино-фульвовых кислот на количественный выход остаточных фокусов белка-маркера репарации двунитевых разрывов (ДР) ДНК – фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX) и пролиферативную активность в культуре мезенхимальных стромальных клеток (МСК) человека через 24, 48 и 72 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозах 2, 4 и 10 Гр.

Выбор МСК в качестве объекта исследований был обусловлен их довольно хорошей изученностью и широким использованием для радиобиологических экспериментов [6–8].

Материал и методы

Культура клеток и условия культивирования

МСК кожи человека были получены из криобанка Центра биомедицинских и аддитивных технологий ФМБЦ им А.И. Бурназяна ФМБА России. Клетки высевали на покровные стекла 18×18 мм в чашках Петри ($d=35$ мм) по 3×10^4 клеток/стекло, культивировали на полной среде MesenCult с супплементом (StemCell, США) с добавлением L-глутамина (Stem Cell, Канада) и через 24 ч вносили препарат гумино-фульвовых кислот (“Гуминовый комплекс”, ООО “Система-Био-Технологии”, Россия) в конечном разведении 1/1000 в культуральной среде. Предварительные эксперимен-

ты показали, что при этом разведении жизнеспособность клеток сохраняется. Группой контроля были МСК, культивируемые в полной культуральной среде MesenCult с супплементом (StemCell, США) с добавлением L-глутамина (Stem Cell, Канада) без добавления препарата. Исследование было одобрено на секции Ученого совета (Выписка № 114Д от 12.05.2022) и на заседании локального биоэтического комитета (Выписка №28-2022 от 11.05.2022) ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

Облучение

Через 24 ч после инкубации клеток с препаратом гумино-фульвовых кислот проводили облучение на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (напряжение 200 кВ, ток пучка 2×5 мА, фильтр алюминиевый 1,5 мм, мощность дозы 0,85 Гр/мин). Поглощенные дозы составляли 2, 4 и 10 Гр. Погрешность отпускаемой дозы не превышала 15 %.

Иммуноцитохимический анализ

Через 24, 48 и 72 ч после облучения клетки фиксировали параформальдегидом (4%-ный раствор в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4) в течение 15 мин при комнатной температуре, затем дважды промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7,4) и пермеабилizировали 0,3 % тритон-X100 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 2 % бычьего сывороточного альбумина для блокирования неспецифического связывания. При проведении иммуноцитохимического окрашивания слайды инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с первичными антителами к белкам γ H2AX (разведение 1:500, клон S139 [EP854(2) Y], Abcam, Великобритания), и Ki-67 (разведение 1:200, клон Ki - S5, Millipore, США) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина). Затем дважды промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7,4) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч с вторичными антителами, IgG (H+L), конъюгированными с флуорохромами (антитела козы к белкам мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Abcam, Великобритания), в разведении 1:1200 и антитела козы к белкам кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 555 (Abcam, Великобритания) в разведении 1:1200 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина. Для окраски ДНК и предотвращения фотоблещивания использовали содержащую DAPI заключающую среду ProLong Gold (Thermo Fisher Scientific, США). Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенный видеокамерой высокого разрешения ProgRes MFcool (Neoptik AG, Германия) с использованием наборов светофильтров UV-2E/C (340–380 нм возбуждение и 435–485 нм эмиссия) B-2E/C (465–495 нм возбуждение и 515–555 нм эмиссия) и Y-2E/C (540–580 нм возбуждение и 600–660 нм эмиссия). Анализировали не менее 200 клеток на точку. Для подсчета количества фокусов γ H2AX использовали про-

грамму DARFI (<http://github.com/varnivey/darfi>). Долю Ki67+ клеток подсчитывали вручную.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft). Для оценки значимости различий выборок использовали t-критерий Стьюдента. Результаты исследований представлены как среднее арифметическое результатов трех независимых экспериментов ± стандартная ошибка среднего ($M \pm m$).

Результаты и обсуждение

При оценке радиобиологических эффектов особое внимание уделяется анализу репарации критических повреждений ДНК, таких как ДР. Количественный выход ДР на единицу дозы невелик (~20–40 ДР/клетка/Гр), однако именно ДР является одним из основных триггеров, запускающим процессы отклика клеток на облучение. Репарация ДНК от этих повреждений происходит преимущественно (до 80 %) путем негомологичного воссоединения концов с нередким образованием микроделеций и цитогенетических нарушений, что, в конечном счете, может привести к онкотранформации, инициировать ги-

бель клетки по различным механизмам (апоптоз, аутофагия и т.д.) [9] или вызвать потерю способности клеток к делению (сенесценция) [10]. Одним из наиболее чувствительных и информативных методов оценки ДР является иммуоцитохимический анализ фокусов белков репарации ДНК [11]. Под фокусами белков репарации ДНК подразумевают динамические микроструктуры, состоящие из сотен и тысяч копий белков, участвующих (или ассоциированных) в процессах репарации ДНК. Наиболее часто исследуются фокусы белка-маркера ДР ДНК – фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX) [12–14]. Для оценки эффективности репарации ДР ДНК в настоящей работе анализировали количественный выход остаточных (регистрируемых не менее чем через 24 ч после облучения) фокусов белка-маркера репарации ДР ДНК – фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX). Полагают, что остаточные фокусы γ H2AX представляют из себя сайты репарации сложных, потенциально летальных ДР ДНК [15–17].

Было показано, что воздействие рентгеновского излучения приводит к дозозависимому образованию остаточных фокусов γ H2AX через 24 ч после облучения (рис. 1). С увеличением времени пострадиационной

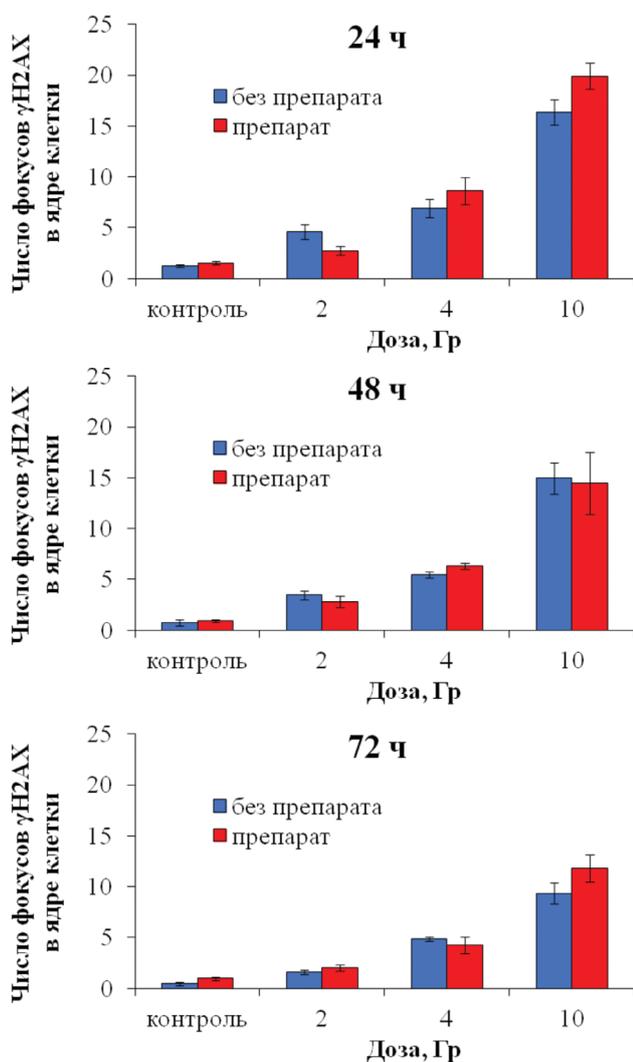


Рис. 1. Изменение количества фокусов γ H2AX в МСК, инкубированных с препаратом гумино-фульвовых кислот и без него, через 24, 48 и 72 ч после облучения. Результаты представлены как $M \pm m$

Fig. 1. Change in the number of γ H2AX foci in MSCs incubated with and without humic-fulvic acids, 24, 48, and 72 h after irradiation. Results are presented as $M \pm m$

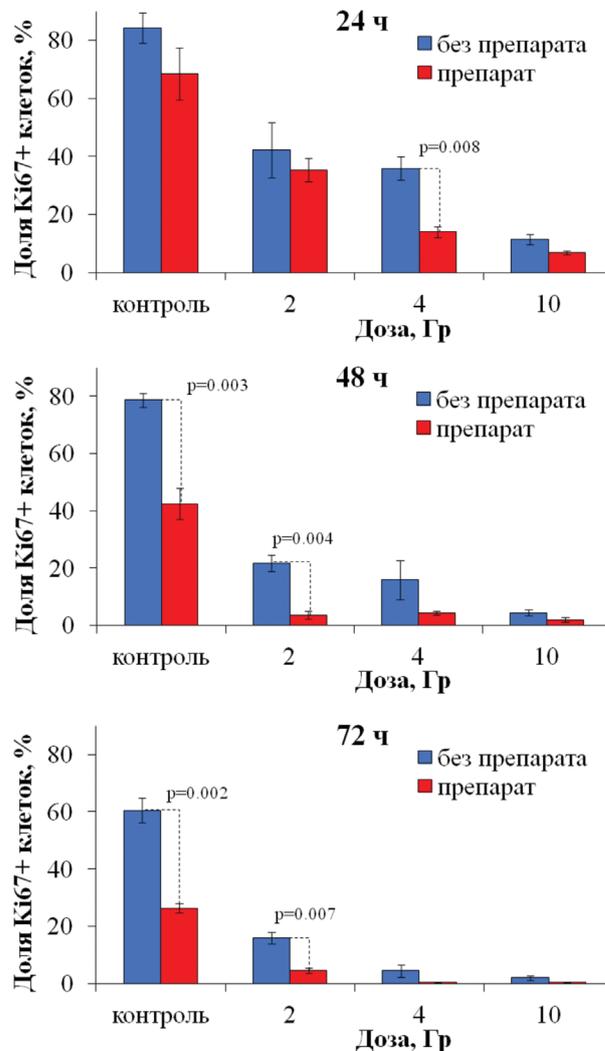


Рис. 2. Изменение доли пролиферирующих (Ki67+) МСК, инкубированных с препаратом гумино-фульвовых кислот и без, через 24, 48 и 72 ч после облучения. Результаты представлены как $M \pm m$

Fig. 2. Change in the proportion of proliferating (Ki67+) MSCs incubated with and without humic-fulvic acids, 24, 48, and 72 h after irradiation. Results are presented as $M \pm m$

инкубации до 48 и 72 ч количественный выход фокусов γ H2AX несколько снижается (рис. 1), что является следствием двух параллельно происходящих процессов: 1) гибель поврежденных клеток; 2) завершение репарации ДНК. Регрессионный анализ полученных результатов показал, что количественный выход остаточных фокусов γ H2AX в пересчете на поглощенную дозу соответствовал ~ 1,5; 1,4 и 0,9 фокуса/Гр/клетка, через 24, 48 и 72 ч соответственно. Инкубация клеток с препаратом гумино-фульвовых кислот не приводило к статистически значимому изменению количества остаточных радиационно-индуцированных фокусов γ H2AX в ядрах МСК по сравнению с клетками, инкубированными без препарата (рис. 1). То есть, при использованных экспериментальных условиях гумино-фульвовые кислоты не влияют на эффективность репарации ДР ДНК в облученных МСК.

Анализ изменений доли Ki-67 позитивных клеток (Ki-67+) в контроле показал, что с увеличением времени инкубации происходит уменьшение их количества вследствие роста клеточной популяции и контактного ингибирования пролиферации (рис. 2). Облучение клеток вызывает дозозависимое снижение пролиферативной активности (рис. 2) вследствие ареста клеточного цикла и потери способности к делению. Инкубация с препаратом гумино-фульвовых кислот приводила к снижению пролиферативной активности как необлученных (контроль) так и облученных клеток. Наиболее выраженные изменения

были обнаружены через 48 и 72 ч после облучения (рис. 2).

Ранее было показано, что гуминовые и фульвовые кислоты приводят к G0/G1 аресту клеточного цикла в клетках гладкой мускулатуры крыс A7r5 [18] и меланомы человека A375 [19]. С другой стороны, было обнаружено, что воздействие гуминовых кислот на макрофаги мыши линии RAW264.7 вызывает G2/M арест клеточного цикла, ассоциированный со снижением уровней циклина A/B1, Cdc2 и Cdc25C [20].

Заключение

Проведенные исследования показали, что на используемой клеточной модели и в вышеописанных условиях эксперимента препарат гумино-фульвовых кислот не влияет на эффективность репарации радиационно-индуцированных ДР ДНК, однако существенно снижает пролиферативную активность как облученных, так и не облученных МСК. Целесообразно провести детальные исследования молекулярно-клеточных механизмов антипролиферативного эффекта гуминовых и фульвовых кислот.

Благодарности

Авторы выражают свою благодарность ООО «Система-БиоТехнологии» (Россия), любезно предоставившей препарат гумино-фульвовых кислот «Гуминовый комплекс» для проведения исследования.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Nardi S., Schiavon M., Francioso O. Chemical Structure and Biological Activity of Humic Substances Define Their Role as Plant Growth Promoters. *Molecules*. 2021;26:8. doi: 10.3390/molecules26082256.
- Klucakova M. Size and Charge Evaluation of Standard Humic and Fulvic Acids as Crucial Factors to Determine Their Environmental Behavior and Impact. *Front Chem*. 2018;6:235. doi: 10.3389/fchem.2018.00235.
- Benderskii N.S., Kudelina O.M., Gantsgorn E.V., Safronko A.V. Fulvic Acid: an Active Food Additive or Medication? *Kuban Scientific Medical Bulletin*. 2020;27;3:78-91. doi: 10.25207/1608-6228-2020-27-3-78-91.
- Buzlama A.V., Chernov Iu N. [Humic Substances: Pharmacological Properties, Mechanisms of Action, and Prospects for Use in Medicine]. *Eksp Klin Farmakol*. 2010;73;9:43-48.
- van Rensburg C.E. The Antiinflammatory Properties of Humic Substances: A Mini Review. *Phytother Res*. 2015;29;6:791-795. doi: 10.1002/ptr.5319.
- Pustovalova M., Astrelina T.A., Grekhova A., Vorobyeva N., Tsvetkova A., Blokhina T., et al. Residual γ H2AX Foci Induced by Low Dose X-Ray Radiation in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Do Not Cause Accelerated Senescence in the Progeny of Irradiated Cells. *Aging*. 2017;9;11:2397-2410. doi: 10.18632/aging.101327.
- Tsvetkova A., Ozerov I.V., Pustovalova M., Grekhova A., Eremin P., Vorobyeva N., et al. γ H2AX, 53BP1 and Rad51 Protein Foci Changes in Mesenchymal Stem Cells During Prolonged X-ray irradiation. *Oncotarget*. 2017;8;38:64317-64329. doi: 10.18632/oncotarget.19203.
- Ulyanenko S., Pustovalova M., Koryakin S., Beketov E., Ly-chagin A., Ulyanenko L., et al. Formation of γ H2AX and pATM Foci in Human Mesenchymal Stem Cells Exposed to Low Dose-Rate Gamma-Radiation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20;11:2645. doi: 10.3390/ijms20112645.
- Krenning L., van den Berg J., Medema R.H. Life or Death after a Break: What Determines the Choice? *Molecular cell*. 2019;76;2:346-358. doi: 10.1016/j.molcel.2019.08.023.
- Aliper A.M., Bozdaganyan M.E., Orekhov P.S., Zhavoronkov A., Osipov A.N. Replicative and Radiation-Induced Aging: a Comparison of Gene Expression Profiles. *Aging*. 2019;11;8:2378-2387. doi: 10.18632/aging.101921.
- Ulyanenko S., Pustovalova M., Koryakin S., Beketov E., Ly-chagin A., Ulyanenko L., et al. Formation of GammaH2AX and pATM Foci in Human Mesenchymal Stem Cells Exposed to Low Dose-Rate Gamma-Radiation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20;11:2645. doi: 10.3390/ijms20112645.
- Vorob'eva N.Y., Kochetkov O.A., Pustovalova M.V., Grekhova A.K., Blokhina T.M., Yashkina E.I., et al. Comparative Analysis of the Formation of gammaH2AX Foci in Human Mesenchymal Stem Cells Exposed to (3)H-Thymidine, Tritium Oxide, and X-Rays Irradiation. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2018;166;1:178-181. doi: 10.1007/s10517-018-4309-1.
- Grekhova A.K., Pustovalova M.V., Eremin P.S., Ozerov I.V., Maksimova O.A., Gordeev A.V., et al. Evaluation of the Contribution of Homologous Recombination in DNA Double-Strand Break Repair in Human Fibroblasts after Exposure to Low and Intermediate Doses of X-ray Radiation. *Biology Bulletin*. 2020;46;11:1496-1502. doi: 10.1134/s1062359019110037.
- Bushmanov A., Vorobyeva N., Molodtsova D., Osipov A.N. Utilization of DNA Double-Strand Breaks for Biodosimetry of Ionizing Radiation Exposure. *Environmental Advances*. 2022;8. doi: 10.1016/j.envadv.2022.100207.
- Banath J.P., Klokov D., MacPhail S.H., Banuelos C.A., Olive P.L. Residual GammaH2AX Foci as an Indication of Lethal DNA Lesions. *BMC Cancer*. 2010;10:4. doi: 10.1186/1471-2407-10-4.
- Vorobyeva N.Y., Babayan N.S., Grigoryan B.A., Sargsyan A.A., Khondkaryan L.G., Apresyan L.S., et al. Increased Yield of Residual γ H2AX Foci in p53-Deficient Human Lung Carcinoma Cells Exposed to Subpicosecond Beams of Accelerated Electrons. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2022;172;6:756-759. doi: 10.1007/s10517-022-05472-9.
- Babayan N.S., Guryev D.V., Vorobyeva N.Y., Grigoryan B.A., Tadevosyan G.L., Apresyan L.S., et al. Colony-Forming Ability and Residual Foci of DNA Repair Proteins in Human Lung Fibroblasts Irradiated with Subpicosecond Beams of Accelerated Electrons. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021;172;1:22-25. doi: 10.1007/s10517-021-05323-z.

18. Hseu Y.C., Lin E., Chen J.Y., Liua Y.R., Huang C.Y., Lu F.J., et al. Humic Acid Induces G1 Phase Arrest and Apoptosis in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. *Environ Toxicol.* 2009;24;3:243-258. doi: 10.1002/tox.20426.
19. Salehi M., Piri H., Farasat A., Pakbin B., Gheibi N. Activation of Apoptosis and G0/G1 Cell Cycle Arrest Along with Inhibition of Melanogenesis by Humic Acid and Fulvic Acid: BAX/BCL-2 and Tyr Genes Expression and Evaluation of Nano-mechanical Properties in A375 Human Melanoma Cell Line. *Iran J. Basic Med. Sci.* 2022;25;4:489-496. doi: 10.22038/IJBMS.2022.60651.13444.
20. Yang H.L., Huang P.J., Chen S.C., Cho H.J., Kumar K.J., Lu F.J., et al. Induction of Macrophage Cell-Cycle Arrest and Apoptosis by Humic Acid. *Environ Mol. Mutagen.* 2014;55;9:741-750. doi: 10.1002/em.21897.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Анализ остаточных фокусов выполнен при поддержке РНФ (проект № 22-2400490).

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 20.11.2022. Принята к публикации: 25.01.2023.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The analysis of residual foci was carried out with the support of the RNF (project No. 22-2400490).

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 20.11.2022. Accepted for publication: 25.01.2023.