

УДК 615.838.7:612.014.462:612.015.1
©Коллектив авторов

ПАРАМАГНИТНЫЕ СПЕКТРЫ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГУМИНОВЫХ ПЕЛОИДОПРЕПАРАТОВ

Н.П. Аввакумова, А.И. Агапов, Ф.Н. Гильмиярова

Самарский государственный медицинский университет;
эл. почта: anuttax@yandex.ru

В целях дальнейшей разработки теории и практики грязелечения и способов повышения его эффективности выполнены исследования парамагнитных спектров пелоидопрепаратов на основе специфических органических веществ грязей и их биологической активности. Приведены результаты модельных опытов по изучению влияния препаратов в ряду фульвокислоты, гиматомелановые, гуминовые кислоты на ферментативную активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и малатдегидрогеназы (МДГ). Обсуждена зависимость изменения активности в указанном ряду от физико-химических свойств его представителей.

Ключевые слова: пелоидопрепараты, гуминовые вещества, ЭПР-спектры, ферментативная активность.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время грязелечение рассматривают как сочетанное воздействие на организм физических (тепло, гидростатическое давление) и химических факторов (минеральные компоненты, неспецифические и специфические органические вещества). Известно, что грязевые процедуры оказывают на организм разностороннее воздействие: положительно влияют на трофику тканей, синтез белков, нейрофизиологический статус [1], стимулируют функции иммунной системы [2]. Доказаны их антимикробный и антивирусный [3] эффекты, противоопухолевое действие [4]. Однако теоретические исследования действия отдельных наиболее терапевтически активных компонентов грязей проводятся недостаточно, сведения об их роли в том или ином проявлении лечебного эффекта носят противоречивый характер. Для решения этих проблем учеными предпринимаются попытки выделения из лечебных грязей биологически активных фракций и создания на их основе пелоидопрепаратов, которые, не уступая в терапевтической активности, позволили бы уменьшить количество противопоказаний [5], сделать лечение дозированным, повысить возможности комбинированного применения как с лекарственными препаратами, так и с физическими факторами. Применение грязей в виде препаратов во многих случаях становится более адекватным раздражителем по сравнению с традиционным грязелечением [6].

В настоящее время сформировались два основных пути получения пелоидопрепаратов. Физический способ сводится к выделению активных компонентов путем отжима, отгона, высушивания лечебных грязей. Достоинством этих препаратов можно считать сохранение основных компонентов лечебных грязей. Недостатками их являются возможность побочных реакций из-за

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕЛОИДОПРЕПАРАТОВ

многокомпонентности состава, сложность стандартизации, опасность сохранения в них нежелательных примесей как результата антропогенного воздействия на лечебные грязи. От этих недостатков свободны препараты, полученные экстрагированием с помощью различных растворителей определенных фракций лечебных грязей. Таким способом получен ряд пелоидопрепаратов на основе неспецифических веществ пелоидов [7, 8]. Однако, компоненты лечебных грязей, входящие в состав этих препаратов, представляют лишь небольшую часть биологически активных веществ пелоидов и частично решают задачу их более рационального использования. Органическое вещество пелоидов на 60-80% представлено гуминовыми соединениями, поэтому препараты на их основе представляют особый интерес, но они единичны [9]. Результаты специального изучения механизма действия гуминовых веществ (ГВ) освещены лишь в отдельных работах [10]. Интересным представляется исследование влияния ГВ на ферментативные реакции организма. В литературе встречаются прямо противоречивые сведения об изменении ферментативной активности под действием гуминовых препаратов [11, 12].

МЕТОДИКА. По методике [13-15] нами из низкоминерализованных иловых сульфидных грязей Поволжского региона (курорт "Сергиевские минеральные воды") получен ряд гуминовых пелоидопрепаратов: фульвокислоты (ФК), гиматомелановые кислоты (ГМК), гуминовые кислоты (ГК) и суммарный препарат (СП), состав, структура и физико-химические свойства которых ранее охарактеризованы элементным составом, кривыми молекулярно-массового распределения, порогами коагуляции, УФ-, ИК-спектрами [16]. Наличие парамагнитных центров (ПМЦ) в пелоидопрепаратах определяли на спектрофотометре EPR E-104. Для анализа использовали воздушно - сухие образцы препаратов с известной зольностью, в кварцевых кюветах. В процессе измерения ПМЦ чувствительность прибора изменялась, что учитывалось при расчетах. Определение относительного содержания ПМЦ проводили по формуле:

$$J = K \times \frac{1}{h} \times \frac{1}{a h},$$

где J - относительная интенсивность сигнала, K - коэффициент усиления, l - высота пика, (мм), h - высота образца в кювете, (см), a - навеска исследуемого вещества, (мг).

Для исследования участия гуминовых веществ в ферментативных процессах на молекулярном уровне получали гомогенат ткани мышц, для чего использовали белых беспородных крыс-самцов массой 250-300 г, содержащихся в обычном режиме и рационе питания. После декапитации крыс, необходимую ткань измельчали и гомогенизировали растиранием со стеклянной пудрой в течение 20 минут при температуре 5°C, затем заливали бидистиллированной водой в соотношении 1: 10 и центрифугировали при той же температуре в течение 15 минут со скоростью 3000 об/мин. Надосадочную жидкость использовали для определения ферментативной активности. Концентрацию белка определяли биуретовым методом. Пелоидопрепараты применяли в виде 0,5%-ных растворов с pH 7,36.

Об активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и малатдегидрогеназы (МДГ) судили по убыли NADH, которую регистрировали спектрофотометрически при 340 нм. Реакционная смесь для определения активности ЛДГ содержала: фосфатный буфер, pH 7,36, 1 mM пируват, 0,4 mM NADH. Реакционная смесь для определения активности МДГ содержала: глицил-глициновый буфер, pH 7,36, 2 mM оксалоацетат, 0,4 mM NADH. Результаты проведенных экспериментов обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. По результатам ранее выполненных исследований можно сделать вывод, что гуминовые вещества (ГВ) содержат

алифатические и ароматические фрагменты, проявляют как электронодонорные, так и электроноакцепторные свойства.

Из полученных ЭПР-спектров (табл.1) следует, что для всех препаратов ГВ характерно наличие парамагнитных центров со значением q -фактора, равного 2,00, что свидетельствует о наличии в молекулах ГВ свободных радикалов, обусловленных сильно делокализованным электронным облаком. ГВ, являясь полифункциональными соединениями, содержащими как электронодонорные, так и электроноакцепторные заместители, способны к образованию комплексов с переносом заряда, что приводит к появлению двух неспаренных электронов. В своих исследованиях мы не ставили целью определить истинную концентрацию парамагнитных центров в препаратах, так как отсутствие надежного стандарта для объектов подобного типа приводит к значительным ошибкам [17]. Мы ограничились сравнительной характеристикой ПМЦ в пелоидопрепаратах (табл.1). Из сравнений величины q -фактора свободного электрона следует, что минимальное число свободных радикалов содержат молекулы ФК, в то время как концентрация их в ГМК превышает в 15 раз и достигает максимального значения в ГК, где их концентрация по сравнению с ФК возрастает в 26 раз. Концентрация свободных радикалов в СП принимает промежуточное значение и определяется в основном содержанием ГК. Наличие "узких" сигналов ЭПР свидетельствует, что ГК являются полимерами с хорошо развитой системой сопряженных связей. Проведенные эксперименты подтверждают прямую зависимость интенсивности сигнала свободного электрона от величины системы сопряжения (табл.1). Кроме одиночных сигналов на спектрах ГМК, ГК и СП обнаружена тонкая структура, характер которой позволяет предположительно объяснить ее возникновение за счет семихионных ион-радикалов, отличающихся от спектра бензосемихинона. На наш взгляд, это связано с наличием поликонденсированных фрагментов, приводящих к образованию комплексов с переносом заряда, что оказывает влияние на характер тонкой структуры. Полученные экспериментальные данные указывают на возрастание ароматичности в ряду: ФК, ГМК, ГК. Такой же ряд мы получили, располагая препараты по возрастанию величины сигнала свободного электрона.

Влияние ГВ на активность МДГ в гомогенате мышц представлена на рис. 1. Препарат ФК имеет тенденцию к уменьшению скорости реакции; ГМК замедляет изучаемую реакцию после инкубации в течение 1 и 5 минут на 17,6%, а к 20-й минуте скорость реакции уменьшается почти на 24% ($p < 0,05$). Максимальный эффект воздействия наблюдается под влиянием ГК, что приводит к уменьшению скорости реакции на 22% ($p < 0,04$) по истечении 5 минут инкубации, оставаясь в дальнейшем на этом же уровне. Действие СП отражает его внутренний состав, представленный суммой всех ГВ. Он достоверно понижает ($p < 0,001$) скорость ферментативной

Таблица 1. Взаимосвязь биологической активности и химической структуры гуминовых веществ низкоминерализованных пелоидов.

Наименование пелоидопрепарата	Содержание углерода, моль % n = 6	Степень бензоидности, % n = 6	Кэффициент цветности E_4/E_6 n = 6	Содержание своб. радикалов, отн. ед.	Изменение биологической активности в мышцах, % n = 6	
					МДГ	ЛДГ
Фульво-кислоты	16,33±0,96	6,45±0,42	6,83±,70	0,19	10,50±0,63	17,05±1,5
Гимато-мелановые кислоты	35,33±1,87	19,33±0,84	3,48±0,17	2,84	19,40±0,89	19,14±0,78
Гуминовые кислоты	39,67±1,92	33,23±1,26	2,42±1,33	4,90	26,70±1,56	35,80±1,69
Суммарный препарат	24,00±1,26	20,67±1,11	2,49±0,14	3,35	21,12±1,36	24,31±1,16

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕЛОИДОПРЕПАРАТОВ

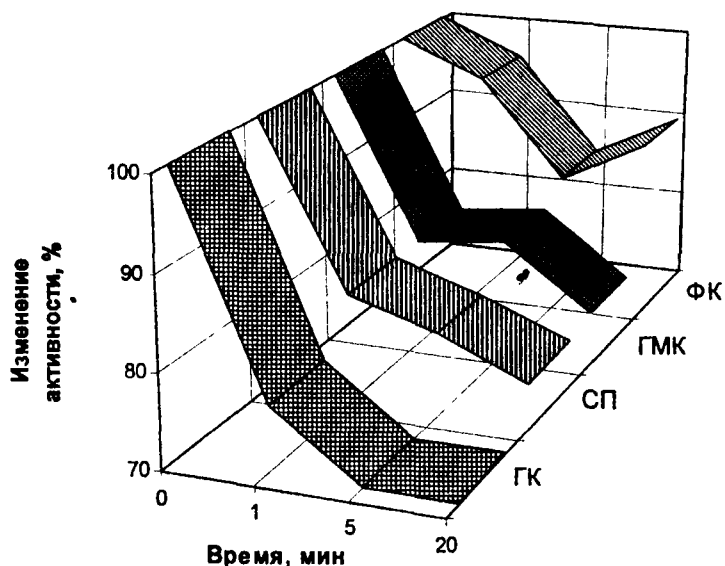


Рисунок 1.

Изменение ферментативной активности малатдегидрогеназы в мышцах при воздействии пелоидопрепаратов в условиях "in vitro".

реакции в среднем на 21%, достигая своего максимального значения через 20 минут, что свидетельствует о более медленном взаимодействии с ферментом, по-видимому, за счет более крупных макромолекул и наличия водородных связей между ними. Исследуемые препараты по возрастанию интенсивности воздействия на реакции, контролируемые МДГ, образуют ряд: ФК, ГМК, ГК.

Основываясь на значимости биохимических реакций, катализируемых ЛДГ, и отсутствии сведений об их изменении под влиянием ГВ в ряду ФК, ГМК, ГК, нами проведены эксперименты полифункциональной системы, позволяющие проследить характер взаимодействия на молекулярном уровне. Результаты исследований представлены на рис. 2, из которого следует, что все изучаемые пелоидопрепараты на основе ГВ тормозят активность ЛДГ и уменьшают скорость окисления NADH. Действие нарастает с увеличением срока инкубации. Изменение активности ЛДГ под влиянием ГМК несколько превышает влияние ФК, составляя в среднем 19%, при этом зависимость процесса от времени инкубации аналогична предыдущему. Максимально выражено влияние на активность ЛДГ у ГК. Здесь оно достигает 36,63% ($p < 0,001$). СП обладает несколько менее выраженным действием на скорость ЛДГ-реакции, тем не менее оно значительно. Из сравнительной характеристики биологической активности всех ГВ в зависимости от срока инкубации следует, что наибольшее влияние на исследуемую реакцию оказывают ГК, действие которых почти в 2 раза превосходит ФК и в 1,5 раза - ГМК. Изложенное свидетельствует, что ингибиторное влияние на активность ЛДГ возрастает в ряду ФК, ГМК, СП, ГК.

При изучении ферментативной активности под влиянием ГВ обращает на себя внимание нарастание воздействия во времени. Влияние препаратов возрастает с увеличением срока инкубации и достигает максимального значения у отдельных ГВ, в основном, к 5-й минуте, а в СП - к 20-й минуте. Отличие динамики воздействия СП от отдельных его составляющих, на наш взгляд, связано с существованием межмолекулярных связей между отдельными компонентами ГВ, затрудняющих взаимодействие с ферментами.

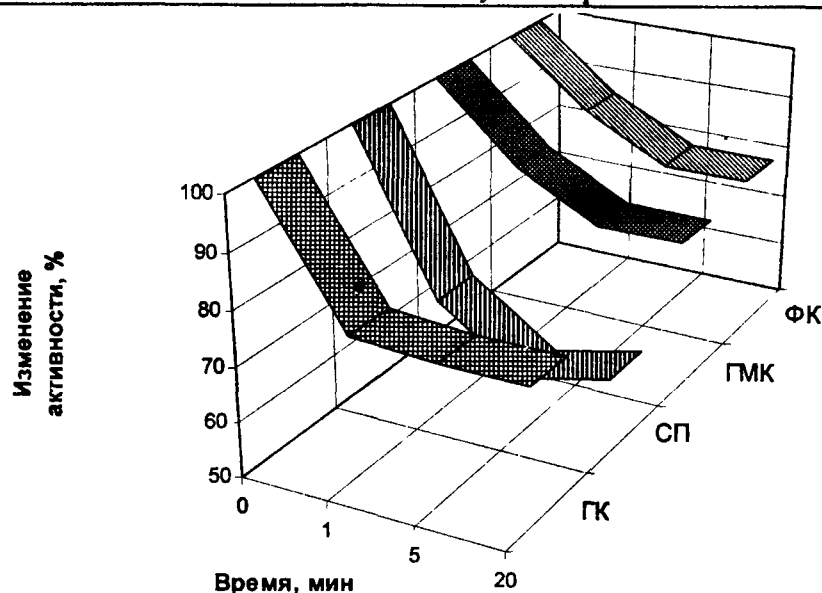


Рисунок 2

Изменение ферментативной активности лактатдегидрогеназы в мышцах при воздействии пелоидопрепаратов в условиях "in vitro".

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что выделенный ряд пелоидопрепаратов обладает биологической активностью, оказывая влияние на окислительно-восстановительные процессы, протекающие в тканях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kovarik R. (1988) Z. Phys. Med. Baln. Med. Klim., 17, 413-417.
2. Апредин Э.А. (1986) Эффективность комплексного лечения антибактериальными препаратами и пелоидопрепаратами у больных туберкулезом легких. Автореф.... канд. наук, Казань.
3. Дегтяренко В.И., Зеваков В.Ф., Дивого В.А., Лященко В.Ю. (1985) Пелоидотерапия распространенных заболеваний, Пятигорск, с.40-45.
4. Flayg W, Goeck C. (1989) Heillad.u. Kurort., 17, 413-417.
5. Самутин Н.М., Кривобоков М.Г. (1997) Вопр. курорт., физиотер. и леч. физкультуры, 1, 33-35.
6. Трапезникова Н.К., Орлова Л.П. (1988) Лечебное применение пелоидов и препаратов на их основе., Томск, с. 28-36.
7. Джабаров Н.К., Карелина О.А., Клопотова Н.Г. (1997) Вопр. курорт., физиотер. и леч. физкультуры, 2, 25-27.
8. Крылов О.А., Низкодубова С.В., Нечай Г.М., Федотов Д.С. (1990) Вопр. курорт., физиот. и леч. физкультуры, 3, 41-44.
9. Косьянова З.Ф. (1985) Химическая характеристика и биологическая активность гумусовых кислот некоторых лечебных грязей. Автореф. ... канд биол наук., М.
10. Аммосова Я.М., Балаганская Е.Д. (1991) Почвоведение, 7, 29-39.
11. Малахова О.Г., Дементьева Т.В. (1991) Тез. Докл. XI научно-техн. Конференции., Л., с.15-17.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕЛОИДОПРЕПАРАТОВ

12. *Хазиев Ф.Х., Гулько А.Е.* (1990) Почвоведение, **2**, 30-36.
13. *Агапов А.И., Аввакумова Н.П.* (1992) Способ получения препарата для физиотерапии патент № 2043107. Бюлл. изобр. № 25 от 10 сентября 1995.
14. *Агапов А.И., Аввакумова Н.П.* (1992) Способ получения экстракта биологически активных веществ для физиотерапии из иловых сульфидных грязей патент № 2028149. Бюлл. Изобр. № 4 от 09 февраля 1995.
15. *Гильмиярова Ф.Н., Агапов А.И., Аввакумова Н.П.* (1997) Способ получения препарата на основе гиматомелановых кислот низкоминерализованных иловых сульфидных грязей для физиотерапии патент № 2122414. Бюлл. Изобр. № 33 от 27 ноября 1998.
16. *Агапов А.И., Аввакумова Н.П., Баталова Е.К.* (1999) Вopr. курорт., физиотер. и леч. физкультуры., **2**, 33-35.
17. *Бабанин В.Ф. и др.* (1983) Почвоведение **7**, 3-9.

Поступила 05. 10. 00

PARAMAGNETIC SPECTRUMS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF HUMIC SERIES PELOID PREPARATIONS

N.P. Avvakumova, A.I. Agapov, F.N. Gilmiyova

Samara State Medical University, Samara, Russia;
e-mail: anuttax@yandex.ru

Peloid preparations may influence activity of some oxidoreductases (lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase). Their effects depend on physico-chemical properties of the compounds tested.

Key words: peloid preparations, humic substances, EPR-spectrums, enzymatic activity.