Биомедицинская химия, 2018 том 64, вып. 5, с. 429-432.

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ ПЕЛОИДОВ И ИХ КОМПОНЕНТОВ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ

Н.П. Аввакумова[1], Ф.Х. Камилов[2], А.В. Жданова[1]*, И.А. Меньшикова[2], Ю.В. Жернов[3], М.А. Кривопалова[1], М.Н. Глубокова[1], Е.Е. Катунина[1]

[1]Самарский государственный медицинский университет,
443099, Самара, ул. Чапаевская, 89; эл. почта: avzhdanova@mail.ru
[2]Башкирский государственный медицинский университет,
450008, Республика Башкортостан, Уфа, ул. Ленина, 3
[3]Институт иммунологии, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Исследовали влияние отдельных компонентов гумусовых кислот пелоидов на процессы свободнорадикального окисления в модели окислительного стресса, вызванного у белых беспородных крыс половозрелого возраста действием полихлорированных бифенилов. Биологическую активность пелоидопрепаратов определяли по изменению общей антиоксидантной активности, активности супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы на третьи и десятые сутки эксперимента. Изменение активности ферментов под действием пелоидопрепаратов подтвердило, что состояние окислительного стресса поддается коррекции уже на третьи сутки эксперимента. На десятые сутки гуминовые кислоты не только восстанавливают физиологическую норму редокс-буферных систем, но и повышают активность антиоксидантных ферментов.

Ключевые слова: гумусовые кислоты; полихлорированные бифенилы; антиоксидантная активность

DOI: 10.18097/PBMC20186405429

ВВЕДЕНИЕ

Свободнорадикальное окисление является важным звеном патогенеза многих хронических заболеваний, таких как сахарный диабет, гепатиты различной природы, патологии сердечно-сосудистой системы, онкопатологии, а также аутоиммунные и аллергические реакции [1, 2]. Развитие окислительного стресса сопровождается реакцией пероксидации липидов с образованием липидпероксидных радикалов ($LOO^{\bullet}$). Перекисное окисление липидов представляет собой “порочный круг”, при котором происходит постоянное образование аллильных липидных радикалов $L^{\bullet}$ и активных форм кислорода. Выраженность процесса окисления липидов зависит не только от активности свободных радикалов, но и от функционирования антиоксидантной защиты, контролируемой ферментами, среди которых важную роль играют супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидаза (ГПО) [3]. Вероятность нарушения окислительно-восстановительного гомеостаза организма в настоящее время возрастает, что связано с процессами урбанизации и, следовательно, увеличением содержания экотоксикантов в окружающей среде [4].

Одним из химических факторов, способствующих запуску процессов образования активных форм кислорода в организме, являются полихлорированные бифенилы (ПХБ), которые в силу низкой гидрофильности и высокой солюбилизации в неполярных органических растворителях относят к группе абсолютных экотоксикантов. Из-за высокой липофильности и хорошей адсорбции из желудочно-кишечного тракта основным источником поступления бифенилов в организм является алиментарный путь. В связи с тем, что токсикант длительно персистирует в организме (расчётный период полувыведения из организма человека составляет 7,1 года) [5], актуальным является поиск природных биологически активных соединений антиоксидантного действия, способных нивелировать негативное действие ПХБ на окислительно-восстановительный гомеостаз организма.

Перспективными с этой точки зрения являются гуминовые вещества пелоидов, которые обеспечивают реализацию терапевтического эффекта на субклеточном и молекулярном уровне [6]. Гуминовые вещества – это совокупность биотермодинамически устойчивых соединений, образующихся в процессе разложения и биотрансформации растительных и животных остатков, не имеющих аналогов в живых организмах. Они характеризуются тёмной окраской, полидисперсностью, высокими значениями молекулярных масс [7].

Наибольший интерес представляют подвижные компоненты гуминовых веществ кислотной природы – гумусовые кислоты (ГсК), в составе которых принято выделять фульвовые (ФК), гиматомелановые (ГМК) и гуминовые кислоты (ГК) [8]. Структура ГсК в настоящее время представляется как стохастический макромолекулярный комплекс, состоящий из каркасной части ароматического характера азот- и кислородсодержащих гетероциклов и боковых углеводородных фрагментов, включающих углеводные, карбоксильные, гидроксильные, алкоксильные и сложноэфирные группы [8].

С позиций современной фармации, актуальным является применение специфических органических веществ, выделенных из низкоминерализованных

* - адресат для переписки

иловых сульфидных грязей. Низкая минерализация пелоидов способствует высокому накоплению в них гуминовых веществ, содержание которых достигает 9%. Анаэробные условия формирования, отрицательные значения редокс-потенциала грязевого раствора, длительный период биологической активности отражаются на структуре и химических свойствах гумусовых кислот пелоидов. В литературе имеются данные исследования ОАО гуминовых веществ пелоидов в условиях *in vitro* [9], что позволяет рассматривать их как перспективные субстанции для использования в качестве антиоксидантов.

Целью данного исследования было изучение влияния отдельных компонентов гумусовых кислот пелоидов на процессы свободнорадикального окисления, вызванные действием полихлорированных бифенилов.

МЕТОДИКА

Моделирование процесса свободнорадикального окисления осуществлялось путём однократного внутрижелудочного введения белым беспородным крысам-самцам половозрелого возраста массой 180-200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария, отечественной смеси ПХБ торговой марки "Совол", содержащей 26% тетра-, 64,6% пента- и 9% гексахлорбифенилов, в оливковом масле в дозе 600 мг/кг (0,1 LD_{50}) [10]. Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отраженных в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (виварiев).

Было сформировано шесть групп по 10 животных в каждой. Контролем (группа 1) служили здоровые животные, которым вводили 0,2 мл изотонического раствора натрия хлорида. Животным группы сравнения (группа 2) вводили "Совол" и изотонический раствор натрия хлорида. Введение пелоидопрепаратов с лечебной целью (группы 3-6) начинали с первого дня эксперимента. Животным ежедневно внутрибрюшинно вводили 0,2 мл 0,1% растворы фульвовых (группа 3), гиматомелановых (группа 4), гуминовых (группа 5) и гумусовых (группа 6) кислот.

Параметры окислительно-восстановительных процессов наблюдали на 3 и 10 сутки. Животных забивали под эфирным наркозом путём декапитации, используя в дальнейших исследованиях плазму крови. Общую антиоксидантную активность (ОАА) в плазме крови определяли с использованием системы, содержащей липопротеины, полученные из куриного желтка путём гомогенизации и разведения в фосфатном буфере (pH 7,45) по методике, описанной Клебановым и соавт. [11]. В системе, не содержащей (контроль) и содержащей (опыт) плазму крови, инициировали перекисное окисление липидов путём добавления 1 мл 0,05 М сульфата железа (II). Интенсивность процессов пероксидации измеряли на хемилюминометре ХЛ–003 (Россия). Общую антиоксидантную активность оценивали путём вычисления процента торможения пероксидации по формуле:

$$\text{ОАА} = \frac{(\text{Светосумма ХЛ}_{\text{контр.}} - \text{Светосумма ХЛ}_{\text{оп.}})\times 100}{\text{СветосуммаХЛ}_{\text{контр.}}}$$

Активность каталазы оценивали по методу описанному Королюк и соавт. [12]. Реакцию инициировали добавлением 0,1 мл разведённых в дистиллированной воде (1:5000) отмытых эритроцитов в присутствии фосфатного буфера (pH 7,45) к 2 мл 0,03% раствора пероксида водорода. Процесс останавливали через 10 мин прибавлением 1 мл 4% раствора аммония молибдата и 0,5 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробирок центрифугировали при 3000 об/мин. в течение 10 мин (центрифуга лабораторная ЦЛМН-Р-10-01, "Элекон", Россия). Интенсивность развившейся окраски супернатанта измеряли спектрофотометически при длине волны 410 нм. В качестве контроля использовали образец, в который вместо пероксида водорода вносили 2 мл фосфатного буфера.

Активность СОД оценивали с помощью реактивов набора RANSOD фирмы "Randox Labor Ltd." (Великобритания), следуя рекомендациям производителя.

Активность ГПО определяли с помощью набора RANDOX Glutathione Peroxidase (Великобритания), следуя рекомендациям производителя.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Statistica 6,0 ("Stat Soft", США). Для каждой выборки рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение. Сравнение результатов проводили с использованием непараметрического метода Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

О снижении антирадикальной защиты у животных под действием бифенилов свидетельствуют результаты определения активности основных ферментов и общей антиоксидантной активности (ОАА) плазмы крови, которая, в основном, характеризует неферментативное звено антиокислительной защиты. На третьи сутки под действием "Совола" значение ОАА (табл. 1) статистически достоверно снижалось почти в 4 раза относительно контроля. Активность СОД, каталазы и ГПО уменьшилась на 32,7% ($p<0,05$), 35,3% ($p<0,001$) и 40,9% ($p<0,001$) соответственно. Взаимодействие окислительных метаболитов "Совола" с глутатионом, а также длительная интенсификация свободнорадикальных процессов, по всей вероятности, отражается на состоянии физиологической редокс-буферной защиты плазмы, ингибируя функционирование тиолзависимых ферментативных систем.

Изменение активности ферментов под действием пелоидопрепаратов подтвердило, что состояние окислительного стресса поддается коррекции уже на третьи сутки эксперимента. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что ФК (группа 3)

Таблица 1. Изменение показателей антиоксидантных ферментов в модели окислительного стресса (3-и сутки)

Группа животных	ОАА, % ингиб.	СОД, Ед/мл*	Каталаза, Ед/мл*	ГПО, Ед/мл*
1	47,48±2,15	57,01±0,2	2,13±0,02	787,18±18,9
2	12,75±5,03 p<0,05	38,40±0,28 p<0,05	1,38±0,02 p<0,001	465,53±2,16 p<0,001
3	21,11±5,79 p<0,05	38,72±0,77 p<0,002	1,83±0,05 p<0,02	630,79±2,33 p<0,01
4	49,24±3,80 p<0,05	58,61±0,20 p<0,02	2,13±0,09 p<0,02	818,13±3,03 p<0,02
5	47,19±3,66 p<0,05	55,73±1,61 p<0,02	2,00±0,02 p<0,02	630,42±2,42 p<0,01
6	32,54±4,71 p<0,02	47,65±0,75 p<0,002	1,46±0,13 p<0,02	562,04±1,8 p<0,01

Примечание. Здесь и в таблице 2 данные предствлены в виде средней величины ± ошибка средней. В каждой группе было по 10 крыс * - количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин в 1 мл сыворотки крови.

Таблица 2. Изменение показателей антиоксидантных ферментов в модели окислительного стресса (10-е сутки)

Группа животных	ОАА, %ингиб.	СОД, Ед/мл*	Каталаза, Ед/мл*	ГПО, Ед/мл*
1	48,09±0,30	59,24±0,03	2,28±0,03	783,3±49,22
2	40,98±0,55 p<0,02	48,95±0,28 p<0,05	1,79±0,30 p<0,05	562,76±5,65 p<0,05
3	50,98±0,55 p<0,02	49,47±0,17 p<0,02	1,86±0,11 p<0,02	553,67±2,24 p<0,01
4	73,25±0,06 p<0,05	60,03±0,03 p<0,02	2,70±0,17 p<0,02	760,87±8,71 p<0,01
5	70,56±1,24 p<0,02	61,18±0,10 p<0,02	2,00±0,05 p<0,02	710,05±4,79 p<0,04
6	59,5±0,02 p<0,05	52,10±0,04 p<0,02	1,99±0,07 p<0,01	564,75±4,21 p<0,05

увеличивали значение ОАА более чем в 1,7 раза (p<0,05), а ГК (группа 5) приводят данный показатель к физиологической норме. ГМК (группа 4) увеличивают значение антиоксидантной активности в 4 раза по отношению к группе сравнения. При этом наблюдается превышение физиологической нормы ОАА на 4%. Влияние ГсК (группа 6) на указанный показатель отражает суммарное действие всех компонентов и повышает значение ОАА в 2,6 раза относительно 2-й группы животных.

Активность СОД на третьи сутки лечения под действием ФК не претерпела изменений, в то время как препарат ГсК увеличил её на 24% (p<0,002), а ГК и ГМК – в 1,5 раза по сравнению с группой животных, которые не получали лечение, и достигло 98% от нормативных значений.

Изучение влияния пелоидопрепаратов на каталазную активность на третьи сутки после острой интоксикации показало, что фракции ФК и ГсК лишь проявляют тенденцию к коррекции значений ферментативных показателей, в то время как ГК восстанавливают активность каталазы по отношению к группе сравнения на 44,9%, и приближают их к значениям физиологической нормы. Препарат на основе ГМК увеличил каталазную активность на 51%, достигнув значений группы контроля.

ГПО служит катализатором реакции восстановления перекисных липидов, увеличивая скорость процесса. ГК увеличивают активность ГПО на 21% по отношению ко второй группе. Под действием ФК и ГК активность фермента увеличивается приблизительно на 35%, достигая 80% от физиологической нормы. Максимальным антиоксидантным действием обладают ГМК, под влиянием которых активность фермента повышается на 76% по отношению ко 2-й группе животных, превышая нормативные значения.

На 10-е сутки лечения (табл. 2) значения ОАО лабораторных животных группы сравнения увеличились с 12,75% до 40,98%; это составляет более 85% от нормативных значений, и свидетельствует о значительном восстановлении окислительно-восстановительного баланса. Введение растворов ФК, ГсК, ГК и ГМК пелоидов вызвало рост значений ОАА на 24,4%, 45,2%, 72,2% и 79% соответственно, по отношению к группе сравнения. Следует отметить,

что ферментативная активность под действием ГК и ГМК повысилась практически в два раза по сравнению с контролем, что достоверно доказывает их выраженную антиоксидантную активность.

На десятые сутки наблюдения показатели ферментативной активности в группе сравнения достигли в среднем 80% от нормы, что свидетельствует о завершении острого периода интоксикации

Значения активности СОД, каталазы и ГПО у лабораторных животных, получавших в качестве лечения растворы ФК и ГсК, изменились незначительно, в то время как лечение раствором ГК привело к повышению показателей активности ферментов СОД на 25%, каталазы на 12% и ГПО на 26% по отношению к группе сравнения, практически приближая их к физиологической норме. Препарат на основе ГМК максимально ингибирует окислительные реакции и по отношению к животным 2-й группы повышает активность СОД, ГПО и каталазы на 53%, 51% и 35% соответственно на 10-е сутки (табл. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Свободнорадикальное окисление, вызванное действием полихлорированных бифенилов, поддаётся коррекции препаратами гуминового ряда, активируя антирадикальные резервы организма. Полученные результаты позволяют рассматривать гиматомелановые и гуминовые кислоты пелоидов как перспективные источники для получения эффективных отечественных антиоксидантных лекарственных препаратов с доступной сырьевой базой.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Funda S.P., Gurkan H.* (2008) Advances in Molecular Biology, **1**, 1-9.
2. *Sharma N.* (2014) Biology and Medicine, **6**, 30.
3. *Kaur P., Kalia M.P., Bansal P.* (2006) Mol. Cell Biochem., **291**, 55-61.
4. *Padmavathi M.* (2013) Res. J. Agricult. Forestry Sci., **1**(4), 10-17.
5. *Гайнуллина А.А., Каюмов Ф.А., Каюмова А.Ф., Фазлыахметова М.Я.* (2012) Медицинский вестник Башкортостана, **7**(1), 116-119.
6. *Zhernov Y.V., Kremb S., Helfer M., Brack-Werner R., Schindler M., Harir M., Mueller C., Hertkorn N., Schmitt-Kopplin P., Avvakumova N.P., Konstantinov A.I., Perminova I.V.* (2016) New J. Chem., **41**(1), 212-224.
7. *Nebbioso A., Piccollo A.* (2012) Analytical Acta, **720**, 77-90.
8. *Чуков С.Н.* (2001) Структурно-функциональные параметры органического вещества почв в условиях антропогенного воздействия. СПб.: СПбГУ, 216 с.
9. *Аввакумова Н.П., Герчиков А.Я., Хайруллина В.Р., Жданова А.В.* (2011) Хим.-фарм. журнал, **45**(3), 50-51.
10. *Жданова А.В. Аввакумова Н.П., Кривопалова М.А., Глубокова М.Н., Катунина Е.Е., Агапов А.И.* (2016) Успехи современного естествознания, **10**, 31-35.
11. *Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О., Комаров О.С., Владимиров Ю.А.* (1988) Лабораторное дело, №5, 59-62.
12. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарева В.Е.* (1988) Лабораторное дело. №1, 16-19.

Поступила: 07. 05. 2018.
Принята к печати: 26. 06. 2018.

THE INFLUENCE OF HUMUS ACIDS OF PELOIDS AND ITS COMPONENTS ON FREE RADICAL PROCESSES

N.P. Avvakumova[1], F.H. Kamilov[2], A.V. Zhdanova[1]*, I.A. Men'shikova[2], Yu.V. Zhernov[3], M.A. Krivopalova[1], M.N. Glubokova[1], E.E. Katunina[1]

[1]Samara State Medical University,
89 Chapayevskaya str., Samara, 443099 Russia; *e-mail: avzhdanova@mail.ru
[2]Bashkir State Medical University, Ufa, 450008 Russia
[3]Institute of Immunology, Moscow, 115478 Russia

The effect of individual components of humic substances of peloid on free radical oxidation processes has been investigated under conditions of oxidative stress induced in albino rats. Biological activity of peloids was determined using such parameters as the general antioxidant activity, activity superoxide dismutases, catalases and glutathione peroxidases on the third and tenth day of the experiment. Results indicate that the state of oxidative stress can be corrected on the third day of the experiment. Humic acids restore not only normal physiological redox systems, but also increase the activity of antioxidant enzymes on the 10th day.

Key words: humus acids; polychlorinated biphenyls; antioxidant activity