

## ГУМИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА – ФАКТОР ЗАЩИТЫ БИОСИСТЕМ ОТ ЭКОТОКСИКАНТОВ

© 2009 Н.П. Аввакумова

Самарский государственный медицинский университет

Изучена зависимость протекторных свойств в ряду гуминовых веществ низкоминерализованных иловых сульфидных грязей от их структурно-функциональных свойств. Установлено, что гумусовые кислоты выполняют уникальную функцию по поддержанию постоянства состава на макро и микроуровнях. Установлено, что гумусовые кислоты сохраняют экологическое равновесие в микро- и макробиосистемах.

Ключевые слова: гуминовые вещества, сульфидные грязи, экологическое равновесие

В последние годы исследователей различных областей науки все больше привлекают гуминовые вещества в связи с тем, что они, являясь природными соединениями, обладают широким биологическим спектром действия. Гумификация, как сложное биохимическое постмортальное изменение растительных и животных организмов, предохраняющее органические вещества от полной минерализации, является планетарным процессом. Гуминовые вещества присутствуют во всех природных средах планеты: воде, почве, горных породах, иловых отложениях, образуя жизненный фон человечества [1]. С ростом мирового производства увеличивается количество химических веществ, мигрирующих через атмосферу и гидросферу планеты, а в связи с этим все большее значение приобретает протекторная биосферная функция гуминовых веществ, которые практически необратимо поглощают многие токсиканты антропогенного происхождения, детоксицируя почвы, растения [2] и животные организмы [3]. В настоящее время доказано участие гуминовых веществ в детоксикации пестицидов, тяжелых металлов, радионуклидов [4, 5].

**Цель исследования:** изучить зависимость протекторных свойств в ряду гуминовых веществ низкоминерализованных иловых сульфидных грязей от их структурно-функциональных свойств.

---

*Аввакумова Надежда Петровна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой общей, биоорганической и биоорганической химии. E-mail: navvak@yandex.ru*

**Результаты исследования.** Изучение гуминовых веществ пелоидов озер санатория «Сергиевские минеральные воды» выявило практически одинаковое их содержание по сезонам года и месторождениям, которое составляет 83,78% - 89,07% от общего органического вещества. Содержание гуминовых веществ находится в обратной зависимости от минерализации грязевого раствора. Исследуемые пелоиды характеризуются значительной степенью биогетотрансформации, высоким содержанием гуминовых кислот ( $C_{ГК}/C_{ФК} > 2,0$ ), высокой подвижностью ( $C_{ГК-мина} < 20\%$ ).

Гуминовые кислоты и гумин проявляют себя своеобразным буфером в виде малодоступных устойчивых специфических органических веществ, поддерживающих стационарное состояние открытой термодинамической системы: неспецифические органические вещества ↔ фульвокислоты ↔ гиматомелановые кислоты ↔ гуминовые кислоты ↔ гумин. Степень смещения равновесия в этой сложной системе есть функция активности микрофлоры, климатических и гидрогеохимических условий.

В рамках полученных данных можно предположить, что распределение компонентов гуминовых веществ является итоговым показателем жизнедеятельности системы микроорганизмов, в которой продукт метаболизма одних представителей биоты служит источником пластического и энергетического материала для других. При этом наиболее подвижные группы гуминовых веществ – гиматомелановые и фульвокислоты – отличаются устойчивым количественным

постоянством и служат критерием жизнеспособности данной системы. Количество гумина находится в обратной зависимости от составляющих гумусовых кислот. Этот устойчивый малоактивный материал можно рассматривать как систему конечных продуктов биогосинтеза, формой депонирования специфических органических веществ.

Многопрофильность функциональных групп обуславливает активное участие гуминовых веществ в глобальных биогеохимических процессах при современной экологической напряженности. Нами установлена высокая комплексообразовательная способность гуминовых веществ пелоидов, возрастающая в ряду: фульвокислоты, гиматомелановые, гуминовые кислоты. Определена высокая корреляция между токсичностью металла и степенью его иммобилизации гумусовыми кислотами. Экспериментально установлено, что гидрофильные фракции гумусовых кислот обуславливают миграцию катионов, а гидрофобные компоненты способствуют связыванию металлов. Устойчивость образующихся соединений определяется содержанием азот- и кислородсодержащих функциональных групп, выраженностью системы сопряжения, величинами молекулярных масс, характером конфигурации и конформации макромолекул. Совокупность перечисленных факторов определяет приближенное подчинение известным законам химии комплексных и высокомолекулярных соединений. При этом ярко выражена корреляция между степенью биотичности ионов и их способностью к миграции в составе гумусовых кислот. Возникает уникальная картина природной избирательности ионов-биогенов и экотоксикантов. Особый интерес вызывает не только способность гуминовых веществ удалять из организма различные экотоксиканты, но и возможность вводить в организм необходимые металлы-биогены в легкодоступной комплексной форме, что позволяет рассматривать их в качестве биологически активной добавки к пище и лекарственных препаратов. Отсутствие в организме специфических ферментов, разлагающих гумусовые кислоты, делает их устойчивыми, способными к пролонгированному действию.

С целью изучения природы гуминовых веществ нами получены инфракрасные спектры, анализ которых позволяет с достаточной определенностью выявить как общие

свойства всех представителей групп специфических органических веществ пелоидов, так и отличительные стороны. Все гуминовые вещества имеют однотипный спектр в области  $3600-600 \text{ см}^{-1}$ . Однако, несмотря на сходный характер ИК-спектров, четко просматриваются и закономерные различия. Фульвокислоты имеют максимальную интенсивность полос в области поглощения спиртовых гидроксильных и простых эфиров. Группа гиматомелановых кислот характеризуется наибольшей насыщенностью метильными группами. Интенсивность полосы поглощения  $1620-1600 \text{ см}^{-1}$ , характеризующая ароматическую структуру, возрастает в ряду: фульвокислоты, гиматомелановые кислоты, гуминовые кислоты.

При исследовании экотоксикантной природы гуминовых веществ важной является информация о кислотно-основных свойствах этих соединений. Значения рН начальной и конечной точек титрования для всех препаратов лежат в области около 10,8 и 3,2, что свидетельствует об однотипности функциональных групп в образцах. На кривых обратного титрования выделены две точки эквивалентности в слабощелочной среде, в то время как прямое титрование для всех гумусовых кислот обнаруживает только одну точку эквивалентности в интервале 5,2-6,5 для разных компонентов. Полученные результаты свидетельствуют о содержании во всех исследуемых соединениях карбоксильных и фенольных групп, а отличие определяется их количественными соотношениями и электронными влияниями других заместителей. Кислотные свойства наиболее выражены у фульвокислот, где они обусловлены преимущественно карбоксильными группами. Кислотность гуминовых кислот определяется содержанием как карбоксильных групп, так и фенольных гидроксильных, которые в сумме составляют 7,02 ммоль-экв/г препарата. Для гиматомелановых кислот характерно более низкое содержание функциональных групп кислотной природы, составляющее 5,54 ммоль-экв/г. Компоненты гуминовых веществ пелоидов по возрастанию кислотных свойств образуют ряд: гиматомелановые, гуминовые, фульвокислоты. Гистерезис, на наш взгляд, обусловлен конформационными изменениями молекул полиэлектролита. При высоких значениях рН молекулы имеют разрыхленную форму в результате электростатического

отталкивания неионизированных групп. В кислой среде присутствие ионов водорода понижает отрицательный заряд на полимере, возможно свертывание макромолекул, их конформация приближается к глобулярной, дополнительно стабилизированной за счет внутримолекулярных взаимодействий между функциональными группами. В результате этого часть групп блокируется во внутреннем объеме и становится неактивной. При прямом титровании добавление небольших порций титранта не восстанавливает вытянутую конформацию молекул полностью, поэтому количественно определяется меньшее число групп, способных к ионизации, чем при обратном титровании.

До настоящего времени нет однозначного решения вопроса о молекулярной структуре гуминовых веществ, поэтому важно изучение фракционного состава этих полидисперсных соединений. Гель-хроматографически установлена гетерогенность гуминовых веществ пелоидов по значениям молекулярных масс. В группах гуминовых и фульвокислот выделено две фракции, в гиматомелановых – три. В суммарном препарате обнаружены 5 фракций с различными молекулярными массами.

Результаты исследования гидрофильно-гидрофобных свойств пелоидопрепаратов свидетельствуют об однотипности фракционного состава. В гиматомелановых, гуминовых кислотах и в суммарном препарате выделено по 6 фракций; в фульвокислотах обнаружено 4 фракции, что подтверждает генетическую однотипность структуры всех гумусовых кислот, в то время как индивидуальность отдельных представителей заключается в варьировании входящих в них фракций. В ряду: фульвокислоты, гиматомелановые, гуминовые кислоты, - гидрофобность возрастает от 11,54% до 73,6%. Различающиеся по амфифильным свойствам представители гуминовых веществ выполняют в биосфере различную функциональную нагрузку: компоненты с преобладанием гидрофильных свойств обуславливают миграцию органических и минеральных веществ в биосубстратах, в то время как гидрофобные компоненты влияют на иммобилизацию различных соединений.

Исследование гуминовых веществ методом капиллярного электрофореза также подтверждает однотипность строения всех гумусовых кислот и позволяет отнести их к

полиэлектролитам с различной выраженностью заряженных фрагментов. Кислотные свойства наиболее выражены у фульвокислот. Следует отметить, что суммарный препарат проявляет себя как самостоятельный полиэлектролит, а не как сумма входящих в его состав компонентов, что свидетельствует о сложности строения макромолекул.

Методом дифференциально-термического анализа установлено наличие полисопряженного ароматического ядра и алифатических периферических цепочек различной степени выраженности у всех гумусовых кислот. Характер термограмм подтверждает существование межмолекулярных связей между отдельными группами гумусовых кислот, что повышает их термодинамическую устойчивость при совместном присутствии.

Характер ЭПР-спектров свидетельствует о наличии парамагнитных центров со значением g-фактора, равного 2,00 и обусловленного наличием свободных электронов во всех гуминовых веществах. Являясь полигетерофункциональными соединениями, они содержат как электронодонорные, так и электроноакцепторные заместители, за счет чего возможно перераспределение электронной плотности с образованием комплексов с переносом заряда, что и приводит к возникновению парамагнитных центров. Содержание их возрастает в ряду: фульвокислоты, гиматомелановые, гуминовые кислоты.

Коэффициенты самодиффузии гуминовых веществ пелоидов, установленные методом ядерно-магнитного резонанса с импульсным градиентом магнитного поля, несколько возрастают в ряду: гиматомелановые, гуминовые, фульвокислоты, хотя имеют близкие значения. Данный факт подтверждает близость, но не идентичность строения этих соединений. Все гумусовые кислоты ведут себя в водных растворах как гомогенные системы, в них не выделены компоненты, движущиеся с различными скоростями. Значения коэффициентов самодиффузии пелоидопрепаратов выше, чем чистой воды, и это позволяет прогнозировать лучшую проницаемость через биомембраны.

Изучение адсорбционных свойств гуминовых веществ характеризует их как высокоактивные природные сорбенты, в которых отсутствуют латеральные взаимодействия. Если адсорбционная способность гиматомелановых, фульвокислот и суммарного

препарата описывается уравнением Ленгьюра, то изотерма адсорбции воды на гуминовых кислотах согласуется с уравнением Генри, что можно объяснить значительным вкладом хемосорбционных процессов и наличием фуллереновых структур.

Изучение биологической активности фульвокислот, гиматомелановых, гуминовых кислот, суммарного препарата в широком диапазоне концентраций на модели острого каррагенинового воспаления выявило полимодальную зависимость действия всех препаратов от дозы. Сравнение противовоспалительной активности с влиянием 2,5% раствора диклофенака натрия показало более выраженное действие гуминовых пелоидо-препаратов.

Влияние фульвокислот, гиматомелановых, гуминовых кислот и суммарного препарата на динамику хронического воспаления изучали в экспериментальной модели адьювантного артрита. Полученные результаты свидетельствуют о сложном полимодальном воздействии всех пелоидопрепаратов гуминового ряда на различные стадии воспалительного процесса. Реакция организма на отдельные компоненты гумусовых кислот в исследуемых дозах неоднозначна, но все изученные соединения способствуют нормализации общего баланса окислительно-восстановительных процессов в организме. Динамика изменения гематологических и иммунологических показателей при введении гуминовых кислот животным с развившимся адьювантным полиартритом отражает снижение выраженности воспалительного процесса с аутоиммунным компонентом, при этом терапевтический эффект нарастал с увеличением курсовой дозы.

Изучение биологического действия препаратов гуминового ряда на молекулярном уровне *in vitro* проводилось в условиях полиферментных, полисубстратных систем на основе выяснения метаболической активности. Экспериментальная модель включала клеточные популяции печени и скелетных мышц крыс, индикаторами эффективности препаратов служила активность дегидрогеназ. Установлено, что на активность ферментов из ткани печени изученные препараты практически не оказывают влияния. Исключение составляют гуминовые кислоты, которые вызывают уменьшение активности малатдегидрогеназы на 18,7% ( $p < 0,05$ ).

При изучении ферментативных реакций в гомогенате мышечной ткани воздействие пелоидопрепаратов более значимо. Максимальный эффект воздействия наблюдается под влиянием гуминовых кислот, что приводит к уменьшению скорости реакции на 21,98% ( $p < 0,02$ ) через 1 минуту и почти на 29% ( $p < 0,04$ ) по истечении 5 минут инкубации, оставаясь в дальнейшем на этом уровне. Суммарный препарат достоверно ( $p < 0,01$ ) изменяет скорость ферментативной реакции, но эффект его действия менее выражен, чем у гуминовых кислот, и в среднем составляет 21,42%.

При исследовании реакций, контролируемых лактатдегидрогеназой в мышцах, выявлено, что фульвокислоты изменяют удельную активность фермента в среднем на 17,05%, причем действие нарастает с увеличением срока инкубации. Изменение активности фермента при взаимодействии гиматомелановых кислот несколько увеличивается, составляя в среднем 19,14%, при этом зависимость процесса от срока инкубации аналогична предыдущим. Максимально выражено влияние на активность лактатдегидрогеназы у гуминовых кислот. Здесь оно достигает 36,63% ( $p < 0,001$ ).

Влияние гуминовых веществ на структурно-функциональные показатели нативных и модифицированных клеток с различными функциями осуществлялось через систему крови в условиях *in vitro*. Воздействие осуществлялось пелоидопрепаратом на основе гуминовых кислот, проявивших наиболее выраженное влияние на ферментативную дегидрогеназную активность. Установлено, что если в обычных условиях гуминовые кислоты ведут себя относительно индифферентно к клеткам крови, то в экстремальных условиях они нивелируют повреждающее воздействие и способствуют поддержанию гомеостаза. Совокупность данных, полученных в экспериментах, свидетельствует о сложности изменений в системе крови, происходящих в условиях окислительного стресса и вмешательства пелоидопрепарата в этот процесс. Характер влияния гуминовых кислот на систему крови подтверждает их антиоксидантные свойства в качестве ловушек свободных радикалов, а также протекторное действие, направленное на поддержание нормального функционирования системы в целом.

Изучение действия гуминовых веществ на репродуктивную функцию проводилось на основе влияния гуминовых кислот на кинетические показатели спермоплазмы в норме и в условиях окислительного стресса. Совокупность сведений, полученных в результате проведенных экспериментов, свидетельствует об индифферентном отношении пелоидопрепарата к эякуляту в физиологических условиях. Не оказывая влияния на состояние биосистемы в норме, гуминовые кислоты способствуют восстановлению физиологических функций при их нарушении. Установлено, что характер ответа на моделированный окислительный стресс, вызванный пероксидом водорода, не однозначен со стороны отдельных образцов биоматериала, что свидетельствует о сложности и многофакторности физиологической реакции в экстремальных условиях. Гуминовые кислоты проявляют протекторное действие и защищают мужские гаметы от токсического действия пероксида водорода.

**Выводы:** на основе всей совокупности полученных экспериментальных данных можно утверждать, что гуминовые вещества пелоидов образуют генетический ряд биологически активных веществ, сходственных по структуре и свойствам. Это динамичные макромолекулярные системы нерегулярного строения, способные к внутреннему перераспределению электронной плотности по системе сопряженных связей. Гуминовые вещества выполняют уникальную функцию по поддержанию постоянства состава на макро- и микроуровнях. Они сохраняют экологическое равновесие в макросистемах,

связывая экотоксиканты различной природы и способствуя миграции и усвоению биоэлементов, поддерживают круговорот веществ в глобальном масштабе. Сложная динамичная система гуминовых веществ поддерживает внутренний гомеостаз биосистем на организменном, клеточном и субклеточном уровнях, способствуя восстановлению физиологических функций при патологических состояниях и в экстремальных ситуациях.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Орлов, Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М., Наука, 1993. – 325 с.
2. Спринчак, Д.В. К вопросу о детоксикации рапса гуминовыми препаратами / Д.В. Спринчак, Т.И. Бокова // Сб. матер. II Международной научно-практической конференции: Пища. Экология. Качество. – Новосибирск., 2002. – С. 351-352.
3. Бокова, Т.И. Влияние различных детоксикантов на остаточное содержание свинца в тканях цыплят / Т.И. Бокова, О.Г. Грачева // Сибирский экологический журнал. – 2000. - № 3. – С. 257-261.
4. Буряк, А.К. Определение приоритетных экотоксикантов органической и минеральной природы в пелоидах Самарского региона / А.К. Буряк, Н.П. Аввакумова // Сборник научных трудов «Гуминовые вещества в биосфере», М., Изд: МГУ, 2004. – С. 149-153.
5. Аввакумова, Н.П. Гуминовые кислоты как перспективная матрица для введения в организм металлов-биогенов / Н.П. Аввакумова, М.А. Кривопалова, И.В. Фомин // Материалы II Всероссийского съезда фармацевтических работников. – Сочи, 2005. – С. 90-92.

## HUMIN SUBSTANCES - THE FACTOR OF BIOSYSTEMS PROTECTION FROM ECOTOXICOGENIC SUBSTANCES

© 2009 N.P. Avvakumova  
Samara State Medical University

Dependence of protecting properties in a number humin substances from low-mineralised silt sulphidic muds from their structurally functional properties is studied. It is established, that humic acids carry out unique function on maintenance of a constancy of structure on macro- and microlevels. It is established, that humic acids keep ecological equilibrium in micro- and macrobiosystems.

Keywords: humin substances, sulphidic muds, ecological equilibrium

*Nadezhda Avvakumova, Doctor of Biology, Professor,  
Head of the Common, Bioinorganic and Bioorganic  
Chemistry Department. E-mail: navvak@yandex.ru*