

Библиографический список

1. Смольянинов И.И. Почвообразующее воздействие сосны и березы на различных почвах / И.И. Смольянинов //

Труды Первой Сибирской конференции почвоведов. Красноярск, 1962. С. 65-80.

2. Зонн С.В. Влияние леса на почвы / С.В. Зонн. М.: АН СССР, 1954. 138 с.



УДК 662.733:636.08.51

**Л.И. Инишева,
Р.Т. Тухватулин,
М.В. Гостищева**

МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ТОРФОВ И САПРОПЕЛЕЙ

Введение

Исследование природных биологически активных соединений и разработка на их основе высокоэффективных лекарственных средств остается актуальной проблемой на современном этапе. Особый интерес представляют торф и сапрпель, их можно рассматривать как дешевую и практически неограниченную сырьевую базу для производства различных видов продукции для ветеринарии. Основными биологически активными веществами торфа и сапрпеля являются гуминовые кислоты (ГК), их выход достигает 50% на органическую массу [2]. Экспериментальные исследования последних лет подтвердили терапевтическую ценность ГК торфа и сапрпеля в качестве адаптогенов, обладающих противоопухолевыми, антиоксидантными, антитоксическими, радиопротекторными, антимуtagenными и другими свойствами [4, 5, 8, 10, 11, 13 и др.]. Однако выявление наиболее качественной сырьевой базы для производства ветеринарных препаратов на основе гуминовых кислот торфов и сапрпелей требует тестирования их биологической активности на физиологических процессах, происходящих в живой клетке, которое до настоящего времени отсутствует. Ранее проведенные исследования показали, что процесс обратимой агрегации эритроцитов (ОАЭ) может быть таким перспективным физиологическим тестом при производстве ветеринарных препаратов [7, 9, 12].

Целью работы явилось исследование биологической активности ГК торфов и сапрпелей разного генезиса с помощью процесса обратимой агрегации эритроцитов.

Объекты и методы исследования

Для исследований были отобраны образцы торфа: низинный древесно-травяной (месторождение Клюквенное, Томский район), переходный осоковый (месторождение Васюганское, Бакcharский район), органический сапрпель (озеро Карасёвое, Колпашевский район). Все месторождения располагаются на территории Томской области. Гуминовые кислоты экстрагировали щелочной и пирофосфатной вытяжками. В качестве контроля использовались фармакопейные препараты: трентал (пентоксифиллин) и реополиглюкин (декстран) [3]. Для щелочных и пирофосфатных вытяжек ГК контролем служили, соответственно, 0,1 н раствор NaOH и 0,1 М раствор $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Для трентала и реополиглюкина – вода. Исследование влияния ГК на показатели ОАЭ осуществляли в микрокувете вибрационным способом [6]. Определение влияния ГК на показатели ОАЭ проводилось по следующей схеме: в исследуемую пробу крови, обработанную антикоагулянтom добавляли раствор ГК в соотношении 9:1, перемешивали, помещали в герметичную камеру и воздействовали механическими колебаниями заданной частоты и амплитудой, создаваемыми пьезоэлементом. Степень дезагрегации контролировалась в процессе перемешивания с помощью фотометрии и микроскопирования. Изменение оптической плотности исследуемой пробы крови, связанные с ОАЭ, преобразовывали в электрический сигнал фотоэлементом, увеличивали усилителем и регистрировали на бумажную ленту самописцем. Определяли показатели ОАЭ, характеризующие: U_0 – минимальную механиче-

скую прочность агрегатов эритроцитов (B); Ud – максимальную механическую прочность агрегатов эритроцитов (B); τ – полупериод спонтанной агрегации эритроцитов (τ) и A – амплитуду фотометрического сигнала, характеризующую количество эритроцитов, участвующих в процессе обратимой агрегации эритроцитов (мм). На основании измеренных значений показателей ОАЭ расчетным путем определяли индекс агрегации – $I = Ud / \tau$, характеризующий соотношение агрегационных и дезагрегационных процессов и интегральный коэффициент агрегации – $K = U_0 Ud A / \tau$. Об особенностях ГК судили по величине рассчитанных показателей ОАЭ (чем больше процент отличия значений K и I ГК от значений K и I контроля, тем больше биологическая активность ГК). Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ «Statistica for Windows 6.0».

Результаты и обсуждение

На основании ранее проведенных работ и собственных предварительных экспериментов по влиянию ГК (0,5- и 0,0001%-ной концентраций) на ОАЭ были получены обнадеживающие результаты, которые показали, что эффект влияния на показатели ОАЭ как в отношении различных вытяжек, так и разных концентраций имеется [1, 4, 10, 11 и др.]. Поэтому в процессе проведения дальнейших экспериментов были составлены серии опытов для решения следующих задач: 1 – определить влияние экспозиции нахождения ГК в крови *in vitro* на показатели ОАЭ; 2 – изучить влияние разных концентраций ГК на показатели ОАЭ.

В первой серии опытов были взяты растворы пирофосфатной и щелочной вытяжек ГК. Экспозиции от момента перемешивания раствора ГК с кровью до момента измерения составляли 10, 20 и 30 минут. Из результатов, приведенных на рисунке 1, следует, что максимальное изменение регистрируемых показателей имеет место при 10 минутной экспозиции.

Во второй серии опытов было установлено, что максимальное изменение регистрируемых показателей имеет место при действии в течение 10 мин. пирофосфатной и щелочной вытяжек ГК 0,1-, 0,01- и 0,001%-ной концентраций. По сравнению с контролем действие ГК щелочной вытяжки древесно-травяного торфа и сапропеля вызывает достоверное увеличение

прочности агрегатов эритроцитов (Ud) для 0,001%-ного раствора в 1,6 и 2,1 раза, для 0,01%-ного – в 1,3 и 1,5 раза и для 0,1%-ного – в 1,7 и 2,2 раза соответственно. Отмечается также уменьшение полупериода спонтанной агрегации эритроцитов (τ) и амплитуды фотометрического сигнала (A), отражающих количество участвующих в агрегации эритроцитов, соответственно, для древесно-травяного вида торфа: в 1,3 и 1,1 раза – для 0,001%-ного раствора ГК, в 1,1 и 1,2 раза – для 0,01%-ного раствора и для 0,1%-ного раствора – в 1,4 и 1,1 раза. Для щелочных ГК сапропеля наблюдается достоверное уменьшение только полупериода спонтанной агрегации (τ) в 1,6 раза для 0,001%-ного и 0,1%-ного растворов, в 1,3 – для 0,01%-ного раствора. Уменьшение амплитуды фотометрического сигнала (A) в 1,3 раза характерно только для 0,01%-ного раствора ГК сапропеля. Для 0,001- и 0,1%-ного растворов этот показатель достоверно увеличивается в 1,2 и 1,1 раза соответственно. Этот факт свидетельствует о разном характере воздействия ГК древесно-травяного вида торфа и сапропеля.

Значения коэффициента агрегации (K) и индекса агрегации (I) увеличились для 0,001%-ного раствора: древесно-травяного торфа – в 2,08 и 2,1 раза, сапропеля – в 3,6 и 3,2 раза соответственно; для 0,01%-ного раствора: древесно-травяного торфа – в 1,1 и 1,4 раза, сапропеля – в 1,2 и 1,9 раза; для 0,1%-ного раствора: древесно-травяного торфа – в 2,3 и 2,3 раза; сапропеля – в 4,0 и 3,5 раза соответственно. Для ГК щелочной вытяжки осокового торфа наблюдается аналогичный характер действия на ОАЭ, отличающийся не столь выраженными изменениями регистрируемых показателей ОАЭ.

Полученные результаты свидетельствуют о влиянии разных концентраций ГК на показатели ОАЭ (рис. 2). Так, ГК торфов и сапропеля в 1,1-4,0 раза увеличивают интенсивность агрегации эритроцитов; эффективность влияния ГК растворов 0,001- и 0,1%-ной концентраций достигает 88-240% (по коэффициенту агрегации) и на 50-98% (по индексу агрегации) выше, чем эффективность 0,01%-ной концентрации ГК торфа.

Рассмотрим влияние пирофосфатной вытяжки ГК на показатели ОАЭ по сравнению с щелочной (рис. 2). Из двух видов торфа и сапропеля для 0,001%-ных рас-

творов ГК в сравнении с контролем наблюдается уменьшение прочности агрегатов эритроцитов (Ud), полупериода спонтанной агрегации эритроцитов (τ) и количества участвующих в агрегации эритроцитов (A), в результате чего коэффициент агрегации (K) и индекс агрегации (I) уменьшились в среднем в 1,3-3,0 раза. Это свидетельствует о способности ГК в 1,3-3,0 раза активнее ослаблять агрегацию эритроцитов по сравнению с тренталом и реополиглюкином (в наших опытах вызывали агрегацию эритроцитов, соответственно, в 1,05 и 1,7 раза). Гуминовые кислоты 0,01- и 0,1%-ной концентраций незначительно усиливают агрегацию эритроцитов. В сравнении с аналогичными концентрациями щелочной вытяжки ГК торфов наблюдаются различия, проявляющиеся в разнонаправленном характере воздействия ГК на показатели ОАЭ.

На основании проведенных опытов можно констатировать, что ГК различных

торфов и сапропеля различаются между собой по активности влияния на показатели ОАЭ. Так, влияние ГК щелочной вытяжки из древесно-травяного торфа на ОАЭ в 1,1-1,5 раза выше влияния ГК щелочной вытяжки осокового торфа, и в 1,1-2,0 раза ниже влияния ГК сапропеля. Влияние ГК пирофосфатной вытяжки на ОАЭ имеет противоположную закономерность: ГК осокового торфа выше в 1,1-1,7 раза, чем ГК древесно-травяного торфа и сапропеля.

Выявлены различия в действиях исследуемых вытяжек на ОАЭ. Так, пирофосфатная вытяжка ГК обладает способностью снижать агрегацию красных клеток крови, а щелочная, наоборот, увеличивать (в сравнении с препаратами тренталом и реополиглюкином). Причем явно прослеживается разнонаправленный механизм действия одних и тех же концентраций вытяжек, имеющих между собой также и количественные различия.

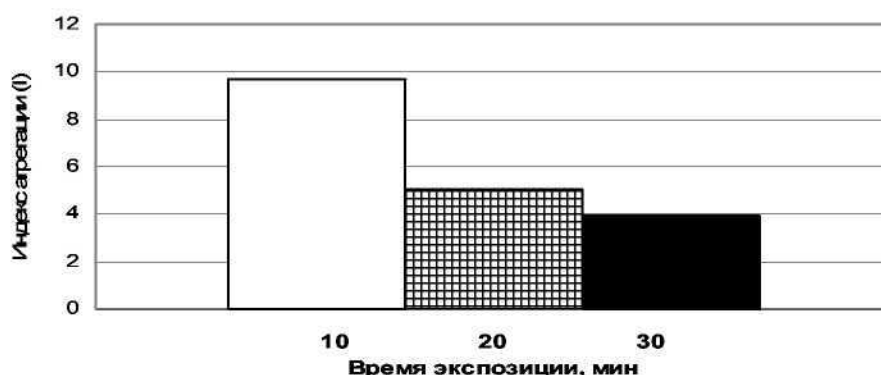
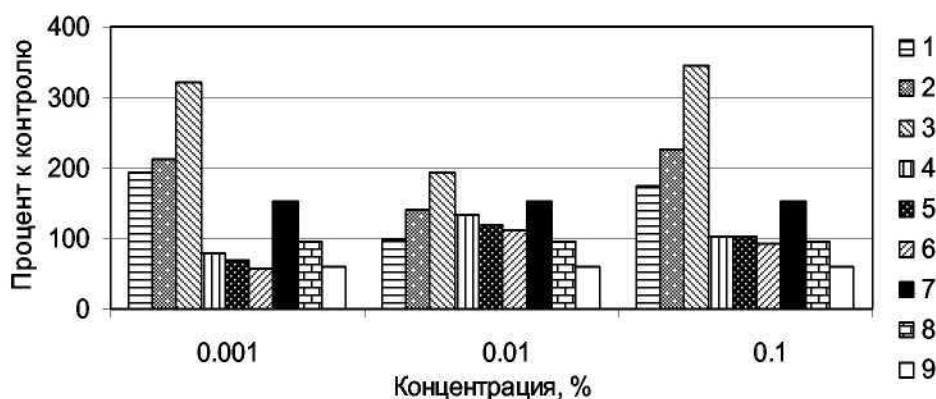


Рис. 1. Влияние экспозиции на ОАЭ (на примере 0,01%-ного раствора щелочной вытяжки ГК низинного древесно-травяного торфа)



Значения статистически значимы: 1 – ГК щелочной вытяжки переходного осокового торфа; 2 – ГК щелочной вытяжки низинного древесно-травяного торфа; 3 – ГК щелочной вытяжки сапропеля, 4 – ГК пирофосфатной вытяжки переходного осокового торфа; 5 – ГК пирофосфатной вытяжки низинного древесно-травяного торфа; 6 – пирофосфатной вытяжки сапропеля; 7 – викасол; 8 – трентал; 9 – реополиглюкин

Рис. 2. Влияние различных вытяжек гуминовых кислот торфов и сапропеля на индекс агрегации эритроцитов

Выводы

1. Проведенные эксперименты показали четко выраженную зависимость концентрации ГК на показатели обратимой агрегации эритроцитов.

2. Разработан новый способ определения биологической активности гуминовых кислот («Способ определения биологической активности гуминовых кислот торфа», патент Российской Федерации № 2300103.), который может применяться в медицине и ветеринарии. Согласно данному способу щелочную или пирофосфатную вытяжку гуминовых кислот добавляют в пробу крови в соотношении 6-10:1, затем проводят фотометрическое определение оптической плотности смеси крови с гуминовыми кислотами при воздействии механическими колебаниями в звуковом диапазоне частот от 20 Гц и амплитудой от 0,1 до 1,0 мкм, создаваемыми пьезоэлементом. По изменению оптической плотности исследуемой пробы определяют показатели ОАЭ, на основании которых рассчитывают индекс агрегации $I = Ud/\tau$ и интегральный коэффициент агрегации $K = U_0 \cdot Ud \cdot A/\tau$ и оценивают биологическую активность ГК по величине рассчитанного индекса агрегации I и интегрального коэффициента агрегации K по сравнению с контролем. Технический результат: способ не предполагает сложных манипуляций в подготовке пробы, одно измерение занимает 7-10 минут, определение проводится в микрообъемах крови.

Библиографический список

1. Аввакумова Н.П. Состав и биологические свойства гуминовых кислот пеллоидов (фундаментальные и прикладные аспекты): автореф. дис. докт. биол. наук / Н.П. Аввакумова. М., 2003. 46 с.
 2. Горовая А.И. Гуминовые вещества / А.И. Горовая, Д.С. Орлов. Киев: Наукова Думка, 1995. 303 с.
 3. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. Харьков: Торсинг, 1998. Т. 2. 592 с.
 4. Наумова Г.В. Биологические аспекты препарата стимулирующего и фунгицидного действия на основе торфа / Г.В. Наумова, Л.В. Косоногова, Н.А. Жмакова, Т.Ф. Овчинникова // Химия твёрдого топлива. 1995. № 2. С. 82-88.
 5. Соловьёва В.П. Лекарственные препараты из торфа / В.П. Соловьёва, Е.П. Сотникова, В.И. Иванов // Органи-

ческое вещество торфа. Минск, 1995. С. 119.

6. Тухватулин Р.Т. Агрегация эритроцитов в крови, помещенной в макро- и микрокуветы / Р.Т. Тухватулин, В.А. Левтов, В.Н. Шуваева, Н.Х. Шадрина // Физиологический журнал. 1986. № 6. С. 775-784.

7. Фирсов Н.Н. Макро- и микрореология крови в норме и патологии: автореф. дис. докт. биол. наук / Н.Н. Фирсов. Купавна: НИИ по биологическим испытаниям химических соединений, 1983. 34 с.

8. Юдина Н.В. Оценка биологической активности гуминовых кислот торфов / Н.В. Юдина, С.И. Писарев, А.С. Саратиков // Химия твёрдого топлива. 1996. № 5. С. 31-34.

9. Dintenfass L. On changes in aggregation of red cells blood viscosity and plasma viscosity during normal cexitation / L. Dintenfass // Clin. Hemorheol. 1982. № 3. P. 175-188.

10. Klocking R. Comparison of the UV-B protective effect of natural peat humic acids and para-aminobenzoicacid (PABA) / R. Klocking, S. Kuhn, H.-P. Kluckling // 12th International Peat Congress "Wise use of Peatlands". Tampere, Finland, 2004. P. 421-425.

11. Saldan V.I. Study of Huminat on the Human RH Line Cells. 12th International Peat Congress. Tampere, Finland. 2004. Abstracts. V. 2. P. 1205-1208.

12. Schmid-Schonbein H. The Aachen clinical hemorheology test profile: A proposal for the documentation of hemorheological data in clinical medicine. / H. Schmid-Schonbein, P. Teitel // Biorheology. 1984. № 1. P. 49-62.

13. Simone C. Antimutagenic Activity of Homic Acids of Different Origin / C. Simone, A. Piccolo, A. Marco, C. Ambrosio // Proceedings of the 8th Meeting of the International Humic Substances Society. Wroclaw, Poland. 1997. P. 945-950.

14. Solovieva V.P., Sotnikova H.P., Lotosh T.D. (1996) Natural Adaptogens of Peat. 10th International Peat Congress, Bremen, Germany. 1996. Abstracts. V. 1. P. 137-140.

15. Stepchenko L.M. Influence of Natural Humic Preparations on the Stage of General Adaptation Syndrome. 12th International Peat Congress. Tampere, Finland, 2004. Abstracts. V. 2. P. 433-436.