

## Торф и продукты его переработки

УДК 631.41:631.417

### ГУМИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ТОРФА – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА С АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПРОТЕКТОРНЫХ СРЕДСТВ

© *К.А. Братишко<sup>1,2</sup>, М.В. Зыкова<sup>1\*</sup>, В.В. Иванов<sup>1</sup>, Е.Е. Буйко<sup>1,2</sup>, Л.А. Дрыгунова<sup>1</sup>, И.В. Перминова<sup>3</sup>, М.В. Белоусов<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Сибирский государственный медицинский университет, Московский тракт, 2, Томск, 634050 (Россия), e-mail: gmv2@rambler.ru*

<sup>2</sup> *Национальный исследовательский Томский политехнический университет, пр. Ленина, 30, Томск, 634050 (Россия)*

<sup>3</sup> *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 (Россия)*

Проведено исследование антиоксидантной активности (АОА) гуминовых кислот (ГК), выделенных натрий гидроксидом и натрий пирофосфатом из девяти разных по ботаническому составу, степени разложения и зольности видов торфа Томской области. Все исследуемые образцы ГК проявили АОА. По результатам четырех методов исследования установлено, что ГК высокоэффективны в процессе ингибирования свободного катион-радикала АВТС<sup>•+</sup>, супероксид-анион-радикала О<sub>2</sub><sup>•-</sup>, гидроксильного радикала НО<sup>•</sup>, способны связывать Fe<sup>2+</sup> в широком диапазоне концентраций. Активность ГК в разных тестах была неодинаковой, большей АОА в модельной реакции ингибирования супероксид-анион-радикала О<sub>2</sub><sup>•-</sup> обладали ГК, выделенные натрий гидроксидом, по сравнению с ГК, выделенными натрий пирофосфатом, в пределах одного вида торфа. При исследовании железосвязывающей активности наблюдалась обратная зависимость. В модельных реакциях с ингибированием свободного катион-радикала АВТС<sup>•+</sup> и гидроксильного радикала НО<sup>•</sup> отмечен сопоставимый уровень активности между образцами ГК, выделенными разными растворами. Подобное неравномерное распределение уровня активности различных образцов ГК объясняется неодинаковыми химическими параметрами их строения, зависящими от их происхождения и способа выделения. На основании использования в качестве препаратов сравнения таких классических АОА с установленным механизмом действия, как водорастворимый аналог токоферола – препарат «Тролокс», водорастворимый антиоксидант – аскорбиновая кислота, классический хелатор – этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), маннитол – классическая ловушка гидроксильного радикала, можно сделать заключение, что исследуемые ГК являются эффективными антиоксидантами, относящимися к группам доноров протонов и комплексообразователей.

*Ключевые слова:* антиоксиданты, свободные радикалы, гуминовые кислоты, торф, колориметрия, доноры протонов, комплексообразователи.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 20-65-47052).*

#### Введение

В литературе имеется достаточно большое количество сведений об использовании гуминовых веществ (ГВ) и, в частности, их доминирующей фракции – гуминовых кислот (ГК) в традиционной и народной

---

*Братишко Кристина Александровна* – аспирант, ассистент кафедры химии, e-mail: kt-1295@mail.ru

*Зыкова Мария Владимировна* – доктор фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой химии, профессор кафедры фармацевтического анализа, e-mail: gmv2@rambler.ru

*Иванов Владимир Владимирович* – кандидат биологических наук, руководитель центра доклинических исследований, e-mail: ivanovvv1953@gmail.com

*Окончание на С. 288.*

медицине в качестве иммуномодуляторов, биогенных стимуляторов, адаптогенов, гепатопротекторов, противовоспалительных, противоопухолевых средств, детоксикантов и др. [1–3]. Несмотря на это, все многочисленные фармакологические эффекты ГК, исходя из специфики их действия, можно объединить в несколько обширных групп, ключевая роль в которых отводится антиоксидантным и антирадикальным свойствам.

\* Автор, с которым следует вести переписку.

Антиоксидантная активность (АОА) – чрезвычайно важное свойство ГК, поскольку оно обеспечивает механизмы следующих фармакологических эффектов: антигипоксическое, цитопротекторное, мембрано-протекторное, нейропротекторное, гематопротекторное, кардиопротекторное, гепатопротекторное, нефропротекторное, гипогликемическое, противоопухолевое действие.

Функциональные группировки в структуре ГК типа фенольных и хиноидных фрагментов способны выступать донорами протонов [4], а также ловушками свободных радикалов за счет их высокого парамагнетизма [4], катализаторами диспропорционирования супероксид-анион-радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ) [5], гидроксильного радикала [5, 6].

В процессе клеточного дыхания в живых системах происходит образование побочных продуктов – свободных радикалов. В определенных условиях системы поддержания окислительно-восстановительного баланса в организме могут оказаться недостаточно эффективными, в результате чего происходит экспоненциальный рост концентраций активных форм кислорода (АФК), таких как супероксид-анион-радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ), гидроксильный радикал ( $HO^{\bullet}$ ) и др. В результате чего свободно-радикальные процессы протекают более интенсивно, чем в норме, и возникает состояние окислительного стресса. Окислительный стресс выполняет роль триггера целого ряда неспецифических реакций, результатом которых является каскад разнонаправленных метаболических процессов, приводящих к разрушению мембран клеток, инактивации ферментов и гормонов, окислению нуклеиновых кислот с последующим нарушением клеточного цикла и, в конечном итоге, к гибели клетки [7].

Исследование АОА ГВ относительно различных АФК описывается в работе [6], где авторы характеризуют их как вещества с относительно невысокой АОА к супероксид-анион-радикалу (около 20%) и, наоборот, с высокой АОА к гидроксильному радикалу (порядка 50%). На *in vitro* моделях ферментативной и неферментативной антиоксидантных систем митохондрий печени и некоторых культурах раковых клеток авторы данной статьи отметили снижение активности фермента супероксиддисмутазы и снижение содержания глутатиона при добавлении в суспензию митохондрий ГК, при этом активность других ферментов (глутатионпероксидазы и глутатион-редуктазы) не изменялась. В работе [3] также описывается способность ГВ повышать активность антиоксидантных ферментов за счет их акцепторных свойств по отношению к свободным радикалам.

Защитное антиоксидантное действие ГВ при ДОУМГ-интоксикации крыс (*in vivo*) в работе [8] установлено по показателям нормализации состояния системы ПОЛ-АОЗ при остром асептическом воспалении. В работе [9] отмечено подавление перекисного окисления липидов в митохондриях из плаценты человека под действием ГК торфа, авторы наблюдали уменьшение выраженности липопероксидации и снижение уровня малонового диальдегида, при этом эффекты не уступали препарату сравнения – витамину Е. Установлено [10], что ГК способны препятствовать генерации АФК и ПОЛ.

Как отмечалось ранее, многие протекторные фармакологические эффекты ГК обусловлены их антиоксидантным и антирадикальным действием, как например, гепатопротекторное действие ГК, которое доказано многими исследованиями на различных моделях патологий. Гуминовые кислоты, благодаря своим антиоксидантным и антирадикальным свойствам, влияют на процессы биосинтеза белка в гепатоцитах, на биосинтез и метаболизм полиаминов и формирующих структуры рибосом [2], выступают в качестве индукторов ферментов

микросомальной монооксигеназной системы гепатоцитов семейства цитохрома P<sub>450</sub> (подсемейства СYP1A) [11], отмечено влияние антирадикального механизма в проявлении детоксикационной и гепатопротекторной активности ГК на модели интоксикации окисленной олеиновой кислотой и мезоксалилмочевинной [11]. На модели токсического СС1<sub>4</sub>-гепатита [12] доказано снижение активности печеночных трансаминаз под действием ГК при одновременном сохранении активности церулоплазмينا и предотвращении гипопроотеинемии. В работе [13] также отмечено снижение повреждающего действия СС1<sub>4</sub> на функционально-метаболические и морфологические показатели печени крыс, проявляемое

---

Буйко Евгений Евгеньевич – аспирант, ассистент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, лаборант центра доклинических исследований,  
e-mail: buykoevgen@yandex.ru

Дрыгунова Лариса Александровна – кандидат химических наук, доцент кафедры фармацевтического анализа, доцент кафедры химии,  
e-mail: l\_drygunova@mail.ru

Перминова Ирина Васильевна – главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории природных гуминовых систем,  
e-mail: iperminova@gmail.com

Белосов Михаил Валерьевич – доктор фармацевтических наук, заведующий кафедрой фармацевтического анализа,  
e-mail: mvb63@mail.ru

в снижении интенсивности процессов липопероксидации и разрушения мембран гепатоцитов, препятствии формирования фиброзных изменений в печени, уменьшении выраженности цитолитического синдрома, улучшении экскреторной функции печени. Аналогично, на модели ЛПС-индуцированной гепатотоксичности доказан высокий гепатопротекторный эффект [14] за счет снижения уровня аланинаминотрансферазы и гипергликемии. Гуминовые кислоты в эксперименте способны повышать активность орнитиндекарбоксилазы, уровень спермидина, РНК и ДНК в гепатоцитах [15]. Роль АОА ГВ в проявлении ими гепатопротекторного действия установлена [16] на модели интоксикации полихлорированными бифенилами.

На модели фокальной церебральной ишемии головного мозга крыс [17] нейропротекторный эффект при введении ГК обусловлен их АОА. С данными свойствами ГК связаны, по мнению ряда исследователей, и другие цитопротективные эффекты, например, нефропротекторные [18] при повреждении реперфузии почек у крыс, мембранопротекторные [19] в тест-системах клеточного уровня (мембранах эритроцитов).

Со способностью ГК подавлять продукцию активных форм кислорода также связывают их кардиопротекторное действие. Так, в работе [20] высокое гемато- и кардиопротекторное действие при железо-индуцированной гематотоксичности и кардиотоксичности отмечено за счет высокой их АО и антирадикальной активности. Гуминовые кислоты оказывают защитное действие при ишемии и реперфузии миокарда и блокируют образование кислородных радикалов при повреждении тканей благодаря их АОА, в работе [21] описаны кардиоваскулярные эффекты ГК на модели изолированного перфузированного по методу Лангендорфа сердца крысы.

Высокие антигипоксические эффекты ГК также доказаны на моделях нормобарической гиперкапнической гипоксии и гистотоксической тканевой гипоксии [22]. В работах [23, 24] отмечается способность ГК блокировать процессы разобщения окислительного фосфорилирования в митохондриях печени и головного мозга лабораторных животных, нормализовать активность сукцинат- и НАД-зависимых процессов энергопродукции, обусловленные предотвращением свободнорадикального повреждения клеток и органелл в условиях гипоксии [24], высокой АОА, способностью ГК регулировать процессы окислительного фосфорилирования, связанного с влиянием на активность НАД-зависимых процессов [23].

Ранее нами [25] было проведено исследование АОА методами колориметрии со стабильным радикалом дифенилпикрилгидразилом (ДФПГ), катодной вольтамперометрии и ЭПР-спектроскопии 18 образцов гуминовых кислот (ГК), выделенных двумя экстрагентами (натрий гидроксидом и натрий пиррофосфатом) из девяти репрезентативных видов торфа Томской области различных по ботаническому составу, степени разложения и зольности. Нами было установлено, что все 18 образцов ГК проявляют АОА в различной степени. Методами катодной вольтамперометрии и колориметрии с ДФПГ установлено, что механизм АОА обусловлен наличием легкоподвижных атомов водорода фенольных групп, нейтрализующих свободные радикалы, а также способностью хиноидных группировок в структуре ГК инициировать процесс электровосстановления кислорода. Еще одним механизмом АОА ГК, по результатам ЭПР-спектроскопии, является их способность выступать в качестве ловушек свободных радикалов.

На сегодняшний день установлено семь наиболее опасных высокорекционноспособных кислородных частиц [26]: пероксидные радикалы ( $ROO\cdot$ ), гидроксильные радикалы ( $HO\cdot$ ), супероксид-анион-радикал ( $O_2^-\cdot$ ), синглетный кислород ( $^1O_2$ ), перекись водорода ( $H_2O_2$ ), оксид азота ( $NO\cdot$ ) и пероксинитрит ( $OONO\cdot$ ). В ходе длительной эволюции клетки организма выработали эндогенную систему обезвреживания данных АФК за счет эндогенных ферментов (тиолов, тиоредоксина, убихинона, мочевой кислоты), антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталазы, глутатионпероксидазы) и белковых молекул (церулоплазмина, ферритина, трансферрина) [27]. Но, несмотря на это, гидроксильные радикалы ( $HO\cdot$ ) и супероксид-анион-радикалы ( $O_2^-\cdot$ ) все же остаются наиболее опасными кислородными радикалами для организма человека, поскольку способны обходить эндогенные системы антиоксидантной защиты организма. При взаимодействии железа в виде двухвалентного иона с  $H_2O_2$  в ходе реакции Фентона в окислительно-восстановительном цикле образуются гидроксильные радикалы ( $HO\cdot$ ) – одни из наиболее опасных АФК, которые вызывают окислительное повреждение ДНК, белков и мембранных липидов [28] вследствие их чрезвычайно высокой реакционной способности, короткого срока жизни, а также по причине того, что в клетках не выработаны ферменты для обезвреживания именно данного вида АФК [29]. Супероксид-анион-радикал также способен обходить эндогенные системы антиоксидантной защиты путем инактивации некоторых специфических ферментов, защищающих организм от окислительного повреждения, в частности, глутатионпероксидазы, каталазы и других [30].

Таким образом, целью настоящего исследования является изучение АОА ГК торфа различного происхождения и способа выделения как перспективных протекторных БАВ с использованием нетрадиционных для гуминовых соединений колориметрических методик оценки АОА (АВТS-тест, взаимодействие с супероксид-анион-радикалом, исследование железосвязывающей (хелатирующей) активности, взаимодействие с гидроксильным радикалом), поскольку поиск природных молекул, способных ингибировать такие опасные для клеток кислородные радикалы, как гидроксильные радикалы ( $\text{HO}\cdot$ ) и супероксид-анион-радикалы ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), является на сегодняшний день важной и актуальной задачей.

### *Экспериментальная часть*

Экстракцию ГК из торфа проводили двумя растворителями: натрий гидроксидом (далее, как ГК $_{\text{И}}$ ) и натрий пирофосфатом (далее – как ГК $_{\text{П}}$ ) способом, описанным ранее [31]. Всего в исследовании задействовано 18 образцов ГК, выделенных из девяти репрезентативных видов торфа с крупных торфяных месторождений Томской области – олиготрофного болота Бакчарского болотного массива юго-восточных отрогов Васюганского болота в междуречье Икса и Бакчар (образцы 1–4, 6, 7, 9) и эвтрофных болот «Клюквенное» и «Таган» (образцы 5 и 8, соответственно). Характеристика торфов, количественное содержание ГК в торфе, а также описание структурных параметров молекул ГК по результатам физико-химического анализа представлены нами ранее в работе [25], также в этой работе приведены данные исследования АОА ГК методами колориметрии с ДФПГ, катодной вольтамперометрии и ЭПР-спектроскопии, описаны возможные механизмы их АО действия.

Для исследования АОА ГК использовали нетрадиционные для гуминовых соединений колориметрические тесты: АВТS-тест, взаимодействие с супероксид-анион-радикалом, железосвязывающая (хелатирующая) активность, отношение к гидроксильному радикалу. Все эксперименты были проведены в трех повторностях.

Взаимодействие ГК со стабильным свободным катион-радикалом АВТS (диаммониевая соль 2,2'-азино-ди-(3-этилбензтиазолинсульфоновой кислоты) оценивали по снижению его содержания в реакционной среде в присутствии различных концентраций ГК. Катион-радикал АВТS $^{+\cdot}$  формировали в растворе действием калий пероксодисульфата [32]. Навески АВТS массой (11±0.1) мг и калий пероксодисульфата массой (20±0.1) мг растворяли в 0.9 мл и 1 мл воды очищенной, соответственно. Для получения стокового раствора 900 мкл раствора АВТS смешивали со 100 мкл раствора калий пероксодисульфата. Для приготовления рабочего раствора стоковый раствор катион-радикала АВТS $^{+\cdot}$  разводили в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4) до достижения оптической плотности 0.70±0.02 при 734 нм и длине оптического пути 1 см. Рабочий раствор катион-радикала АВТS $^{+\cdot}$  хранению не подлежит. Контрольная проба общим объемом 0.5 мл содержала 50 мкл воды очищенной и 450 мкл раствора катион-радикала АВТS $^{+\cdot}$ . В опытные пробы к рабочему раствору катион-радикала АВТS $^{+\cdot}$  добавляли 50 мкл растворов исследуемых образцов ГК для получения конечных концентраций 12.5; 25; 37.5; 50 мкг/мл. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ 2000 при длине волны 734 нм против раствора сравнения, содержащего 50 мкл раствора ГК в соответствующих концентрациях и 450 мкл воды очищенной. Антиоксидантную активность оценивали по показателю  $\text{IC}_{50}$  – концентрации ГК, при которой концентрация катион-радикала АВТS $^{+\cdot}$  в данной модельной системе снижалась в 2 раза. В качестве положительного контроля использовали водорастворимый аналог токоферола – препарат «Тролокс» (Acros Organics, Slovakia).

Взаимодействие ГК с супероксид-анион-радикалом ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) исследовали прямым методом по измерению концентрации  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Для создания постоянного уровня  $\text{O}_2^{\cdot-}$  использовали ферментативную систему генерации  $\text{O}_2^{\cdot-}$  [33], где электроны с НАДН+Н $^+$  через феназинметасульфат (ФМС) переносятся на молекулярный кислород с образованием супероксида, который восстанавливает нитросиний тетразолий (НСТ) до формазана, имеющего максимум поглощения при 560 нм [34]. Эффективность ингибирования реакции  $\text{O}_2^{\cdot-}$ -зависимого восстановления НСТ оценивали по способности ГК блокировать эту реакцию. Инкубационная смесь общим объемом 1 мл содержала 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – КОН буфер (рН 7.4), 6 мМ ФМС, 75 мМ НАДН, 50 мМ НСТ. Исследуемые образцы ГК вносили в модельную систему в виде водного раствора в конечных концентрациях: 2.5, 5, 10, 50 и 100 мкг/мл. Контрольная проба содержала в тех же объемных долях воду очищенную. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре СФ2000 при длине волны 560 нм. Способность ГК подавлять реакцию  $\text{O}_2^{\cdot-}$ -зависимого восстановления НСТ оценивали по величине эффективности ингибирования данной реакции (в %). Антиоксидантную активность оценивали по показателю  $\text{IC}_{50}$

– концентрация исследуемого образца ГК, при которой скорость реакции восстановления НСТ уменьшается в 2 раза. Положительным контролем служил водорастворимый антиоксидант – аскорбиновая кислота (Sigma Aldrich, USA).

Специфическую железосвязывающую (хелатирующую) активность определяли по реакции с комплексом феррозин- $\text{Fe}^{2+}$  [34]. Данный метод позволил оценить способность образцов ГК связывать ионы  $\text{Fe}^{2+}$ , тем самым подавляя инициацию перекисного окисления липидов (ПОЛ) и реакции разветвления свободно-радикального процесса окисления липидов. Феррозин (мононатриевая соль 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-п,п'-дисульфоновой кислоты) образует комплекс фиолетового цвета с ионами  $\text{Fe}^{2+}$ . Хелатирующие агенты препятствуют образованию комплекса феррозин- $\text{Fe}^{2+}$ , в результате чего интенсивность окраски раствора уменьшается. Модельная система объемом 1 мл содержала 0.15 М NaCl, 50 мкМ  $\text{Fe}^{2+}$ , 300 мкМ феррозина. Опытные пробы содержали образцы ГК в конечных концентрациях: 12.5, 25, 50, 75, 100 мкг/мл, 50 мкМ  $\text{Fe}^{2+}$ , 0.15 М NaCl, 300 мкМ раствора феррозина. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ2000 при длине волны 562 нм против раствора сравнения, содержащего образцы ГК в соответствующих конечных концентрациях. Железосвязывающую активность оценивали по показателю  $\text{IC}_{50}$  – концентрация исследуемых образцов ГК, при которой интенсивность окраски комплекса феррозин- $\text{Fe}^{2+}$  в модельной системе снижалась в 2 раза. В качестве эталона был использован классический хелатор – этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (Sigma Aldrich, USA).

Гидроксильный радикал ( $\text{HO}\cdot$ ) – очень мощный окислитель, который реагирует почти со всеми биомолекулами, находящимися в живых клетках [35]. Генерацию  $\text{HO}\cdot$  осуществляли в реакции Хабера – Вейса в присутствии дезоксирибозы. Под влиянием  $\text{HO}\cdot$  происходила деграция дезоксирибозы до малонового диальдегида (МДА). Последний определяли по реакции взаимодействия с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), которая при высокой температуре и кислом рН протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса с максимумом поглощения при длине волны 532 нм [34]. В связи с наличием высокой хелатирующей активности образцов ГК, необходимо учитывать возможность связывания  $\text{Fe}^{3+}$  с молекулами ГК, что может привести к снижению концентрации гидроксильного радикала. Известно, что ЭДТА связывает ионы  $\text{Fe}^{3+}$  в комплекс, который способен генерировать  $\text{HO}\cdot$  [34], поэтому способность ГК связывать  $\text{HO}\cdot$  была изучена в модельной системе с ЭДТА и без ЭДТА. Пробы содержали 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – КОН буфера (рН 7.4), 0.1 мМ аскорбиновой кислоты, 2.8 мМ дезоксирибозы, 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 0.1 мМ  $\text{FeCl}_3$  или 0.1 мМ  $\text{FeCl}_3$  и 1 мМ ЭДТА, предварительно смешанные в равных объемах. В опытные пробы добавляли растворы образцов ГК в конечных концентрациях: 0.5, 1, 1.5, 2 мкг/мл. Контрольную и опытные пробы инкубировали 1 ч при 37 °С, после чего к 0.5 мл реакционной среды добавляли 1 мл 0.5% ТБК и 1 мл 10% ТХУ, помещали в кипящую водяную баню на 15 мин, охлаждали, центрифугировали и измеряли оптическую плотность надосадка на спектрофотометре СФ2000 при длине волны 532 нм. На основании кривой зависимости «доза – эффект» рассчитывали концентрацию образца ГК, при которой наблюдалось 50% ингибирование образования МДА из дезоксирибозы под действием  $\text{HO}\cdot$ . В качестве эталона был использован маннитол (Acros Organics, China) – классическая ловушка гидроксильного радикала.

Статистическая обработка данных производилась путем расчета среднего ( $M$ ) и стандартного отклонения ( $M \pm m$ ) с использованием программного обеспечения SPSS 17.0 (IBM, США).

### **Обсуждение результатов**

Механизм реакции антиоксидантов с катион-радикалом  $\text{ABTS}\cdot^+$  заключается в отдаче атома водорода и переносе электрона, что приводит к обесцвечиванию раствора в модельной системе [32]. Полученные результаты представлены в таблице в виде показателя  $\text{IC}_{50}$  и свидетельствуют о том, что образцы ГК в модельной системе в конечных концентрациях 12.5, 25, 37.5 и 50 мкг/мл в разной степени ингибировали катион-радикал  $\text{ABTS}\cdot^+$ . Таким образом, экспериментально установлено, что все 18 исследуемых образцов ГК обладают выраженной способностью снижать концентрацию катион-радикала  $\text{ABTS}\cdot^+$  в модельной системе, о чем свидетельствует снижение оптической плотности раствора. Можно отметить, что более высокая способность ингибировать катион-радикал  $\text{ABTS}\cdot^+$  отмечена для ГК, выделенных натрий гидроксидом, в пределах одного вида торфа. В частности, данная тенденция отмечена для четырех из девяти образцов торфа (по показателю  $\text{IC}_{50}$ , мкг/мл):  $\text{ГКш-3}=10.6$  мкг/мл и  $\text{ГКн-3}=19.8$  мкг/мл;  $\text{ГКш-6}=12.0$  мкг/мл и  $\text{ГКн-6}=22.7$  мкг/мл;  $\text{ГКш-8}=14.9$  мкг/мл и  $\text{ГКн-8}=17.9$  мкг/мл;  $\text{ГКш-5}=19.7$  мкг/мл и  $\text{ГКн-5}=27.8$  мкг/мл. Для двух образцов торфа значимых отличий между ГК, выделенными разными способами, не выявлены:  $\text{ГКш-7}=13.9$  мкг/мл и  $\text{ГКн-}$

7=14.6 мкг/мл; ГКу-4=21.1 мкг/мл и ГKn-4=21.1 мкг/мл. Для трех образцов торфа наблюдалась обратная зависимость – более активными были образцы ГК, выделенные натрий пирогосфатом: ГKn-2=14.2 мкг/мл и ГКу-2=25.8 мкг/мл; ГKn-9=15.0 мкг/мл и ГКу-9=17.3 мкг/мл; ГKn-1=23.5 мкг/мл и ГКу-1=28.5 мкг/мл. Для положительного контроля препарата «Тролокс» показатель IC<sub>50</sub> составил 3.5±0.1 мкг/мл, для наиболее активных образцов ГКу-3 и ГКу-6 составил 10.6±0.6 и 12.0±0.9 мкг/мл соответственно, и чуть ниже еще для трех образцов ГKn-2, ГКу-7 и ГKn-7 – 14.2±1.3; 13.9±0.5 и 14.6±0.9 мкг/мл, соответственно. Наибольшая активность отмечена для ГК, полученных из двух низинных видов торфа-травяного (ГК-7) и травяно-мохового (ГК-6), и двух верховых – магелланикум (ГК-3) и сосново-пушицевого (ГК-2) видов торфа. Таким образом, значения эффективных концентрации наиболее активных образцов находятся в одном порядке с референтным антиоксидантом – препаратом «Тролокс», что свидетельствует о высокой способности этих образцов ингибировать модельный свободный катион-радикал ABTS<sup>•+</sup>.

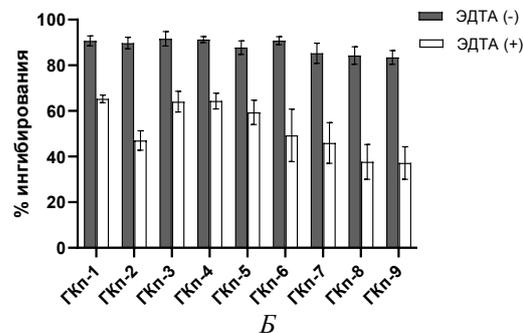
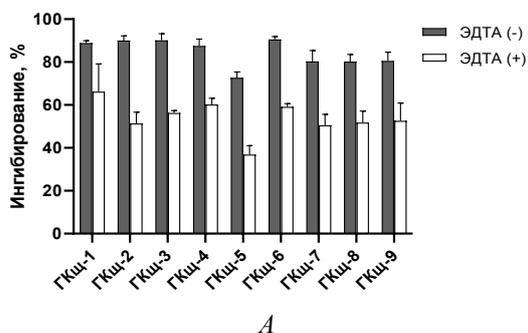
Результаты определения антиоксидантной активности ГК по отношению к супероксид-анион-радикалу (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) в реакции восстановления НСТ до формазана (табл.) имеют схожую картину с предыдущим исследованием. Отмечено, что в пределах одного и того же вида торфа ГКу в сравнении с ГKn, обладают большей активностью уже для семи видов торфа из девяти (по показателю IC<sub>50</sub>, мкг/мл): ГКу-2=5.5 мкг/мл и ГKn-2=9.4 мкг/мл; ГКу-3=8.7 мкг/мл и ГKn-3=12.4 мкг/мл; ГКу-7=8.9 мкг/мл и ГKn-7=19.37 мкг/мл; ГКу-6=10.22 мкг/мл и ГKn-6=17.48 мкг/мл; ГКу-1=11.3 мкг/мл и ГKn-1=13.3 мкг/мл; ГКу-8=11.5 мкг/мл и ГKn-8=13.6 мкг/мл; ГКу-5=18.8 мкг/мл и ГKn-5=21.8 мкг/мл. И только для двух образцов торфа наблюдалась обратная зависимость – более активными были образцы ГК, выделенные натрий пирогосфатом: ГKn-9=9.3 мкг/мл и ГКу-9=40.1 мкг/мл; ГKn-4=9.9 мкг/мл и ГКу-4=24.1 мкг/мл. Наибольшая активность отмечена для ГК, полученных из трех низинных видов торфа-травяного (ГК-7), травяно-мохового (ГК-6) и древесно-травяного (ГК-8), и трех верховых – сосново-пушицевого (ГК-2), магелланикум (ГК-3) и сфагново-мочажинного (ГК-1) видов торфа. При этом можно отметить, что для 10 из 18 образцов ГК (ГКу-2, ГКу-3, ГКу-7, ГKn-9, ГKn-2, ГKn-4, ГКу-6, ГКу-1, ГКу-8, ГKn-3) отмечена АОА (5.5–12.4 мкг/мл), превосходящая значения препарата сравнения – аскорбиновой кислоты (13.2 мкг/мл), и для двух образцов: ГKn-1 и ГKn-8 отмечены достаточно близкие с аскорбиновой кислотой значения АОА (13.3–13.6 мкг/мл). Таким образом, все исследуемые образцы обладают высокой АОА по отношению к супероксид-анион-радикалу (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), и в большинстве своем превосходящей АОА референтного антиоксиданта – аскорбиновой кислоты.

Результаты исследования антиоксидантной активности ГК на моделях ингибирования ABTS<sup>•+</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> и железосвязывающей (хелатирующей) активности (n=3)

Вид торфа	IC <sub>50</sub> (мкг/мл)			
	Шифр ГК	ABTS <sup>•+</sup>	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Связывание ионов Fe <sup>2+</sup>
Верховой, сфагново-мочажинный М-20-70	ГКу-1	28.5±1.7	11.3±1.2	33.2±1.5
	ГKn-1	23.5±1.6	13.3±1.4	65.5±2.6
Верховой, сосново-пушицевый ВР-10-50	ГКу-2	25.8±1.6	5.5±0.4	>100
	ГKn-2	14.2±1.3	9.4±0.7	73.9±1.3
Верховой, магелланикум 100–120	ГКу-3	10.6±0.6	8.7±0.8	57.6±1.4
	ГKn-3	19.8±0.7	12.4±0.8	32.4±1.2
Верховой, фускум 20–70 см	ГКу-4	21.1±0.7	24.1±1.8	52.4±0.3
	ГKn-4	21.1±0.9	9.9±1.2	50.9±4.9
Низинный, древесно-травяной 10–50 см	ГКу-5	19.7±0.2	18.8±1.3	40.3±4.7
	ГKn-5	27.8±2.1	21.8±1.9	96.4±3.8
Низинный, травяно-моховый 200–250	ГКу-6	12.0±0.9	10.22±0.9	51.5±2.0
	ГKn-6	22.7±0.6	17.48±1.1	>100
Низинный, травяной 230–270	ГКу-7	13.9±0.5	8.9±0.8	78.3±3.7
	ГKn-7	14.6±0.9	19.37±2.3	50.8±0.5
Низинный, древесно-травяной 50–100 см	ГКу-8	14.9±0.4	11.5±1.4	66.1±0.9
	ГKn-8	17.9±0.4	13.6±0.9	64.0±1.4
Переходный, осоковый 150–200	ГКу-9	17.3±1.2	40.1±3.5	26.9±0.3
	ГKn-9	15.0±0.9	9.3±0.7	60.6±2.6
Тролокс		3.5±0.1	–	–
Аскорбиновая кислота		–	13.2±0.8	–
ЭДТА		–	–	9.5±0.5

При исследовании специфической железосвязывающей (хелатирующей) активности в реакции ГК с комплексом феррозин-Fe<sup>2+</sup> (табл.) наблюдалась противоположная с предыдущими двумя исследованиями закономерность. Так, отмечено, что в пределах одного и того же вида торфа ГКп в сравнении с ГКц обладают большей хелатирующей активностью в большинстве случаев, в частности, для пяти видов торфа из девяти (по показателю IC<sub>50</sub>, мкг/мл): ГКп-3=32.4 мкг/мл и ГКц-3=57.6 мкг/мл; ГКп-7=50.8 мкг/мл и ГКц-7=78.3 мкг/мл; ГКп-4=50.9 мкг/мл и ГКц-4=52.4 мкг/мл; ГКп-8=64.0 мкг/мл и ГКц-8=66.1 мкг/мл; ГКп-2=73.9 мкг/мл и ГКц-2>100 мкг/мл. Для остальных четырех образцов торфа наблюдалась обратная зависимость – более активными были образцы ГК, выделенные натрий гидроксидом: ГКц-9=26.9 мкг/мл и ГКп-9=60.6 мкг/мл; ГКц-1=33.2 мкг/мл и ГКп-1=65.5 мкг/мл; ГКц-5=40.3 мкг/мл и ГКп-5=96.4 мкг/мл; ГКц-6=51.5 мкг/мл и ГКп-6>100 мкг/мл. Для положительного контроля, классического хелатора ионов Fe<sup>2+</sup>, ЭДТА показатель IC<sub>50</sub> составил 9.5±0.5 мкг/мл, для наиболее активных образцов ГКц-9, ГКп-3 и ГКц-1 составил 26.9±0.3; 32.4±1.2 и 33.2±1.5 мкг/мл, соответственно. Наибольшая активность отмечена для ГК, полученных из одного переходного осокового (ГК-9) и двух верховых-магелланикум (ГК-3) и сфагново-мочажинного (ГК-1) видов торфа, которые в предыдущих исследованиях, наоборот, показывали достаточно низкую активность. Таким образом, все исследуемые образцы обладают способностью связывать Fe<sup>2+</sup> в широком диапазоне концентраций (12.5–100 мкг/мл).

Результаты исследования АОА образцов ГК на модели ингибирования гидроксильного радикала (с добавлением ЭДТА и без ЭДТА) показали (рис.), что в концентрации 2 мг/мл все образцы ГК без добавления ЭДТА имеют показатель ингибирования выше 70% (74.05-91.61%). Данная активность, скорее всего, обусловлена не только способностью ГК ингибировать радикал HO•, но и способностью ГК связывать ионы железа, что было показано в предыдущем эксперименте. Поэтому было проведено параллельное исследование ингибирования гидроксильного радикала с добавлением ЭДТА, чтобы нивелировать хелатирующую активность ГК. Установлено, что при добавлении в модельную систему ЭДТА ингибирование было менее выражено для всех образцов (рис.). Поскольку ЭДТА является более сильным комплексоном, то связывает ионы железа с образованием комплекса, способного генерировать радикалы HO•. В этом случае ингибирование образования МДА обусловлено преимущественно способностью образцов ГК нейтрализовать гидроксильные радикалы. Можно отметить, что более высокая АОА по отношению к радикалу HO• отмечена для ГК, выделенных натрий гидроксидом, в пределах одного вида торфа. В частности, данная тенденция отмечена для четырех из девяти образцов торфа (по показателю ингибирования в %): ГКц-2=71.41% и ГКп-2=47.05%; ГКц-6=12.0 мкг/мл и ГКп-6=49.32%; ГКц-8=65.3% и ГКп-8=58.04 мкг/мл; ГКц-9=53.93% и ГКп-9=38.25%. Для двух образцов торфа значимых отличий между ГК, выделенными разными способами, не выявлены: ГКц-1=66.23% и ГКп-1=65.28%; ГКц-7=45.11% и ГКп-7=46.44%. Для трех образцов торфа наблюдалась обратная зависимость – более активными были образцы ГК, выделенные натрий пирофосфатом: ГКп-3=64.08% и ГКц-3=56.31%; ГКп-4=65.35% и ГКц-4=60.19%; ГКп-5=64.54% и ГКц-5=48.46%. Для положительного контроля маннитола при концентрации 2 мг/мл показатель ингибирования составил 100%. Наибольшая активность отмечена для ГК, полученных из трех верховых – сосново-пушицевого (ГК-2), сфагново-мочажинного (ГК-1) и фускум (ГК-4), и двух низинных древесно-травяных (ГК-5 и ГК-8) видов торфа. Таким образом, результаты исследования ингибирующей активности ГК в реакции образования МДА из дезоксирибозы показали, что все исследуемые ГК обладают АО активностью относительно гидроксильного радикала во всем диапазоне концентраций (0.5–2.0 мг/мл), сопоставимой с препаратом сравнения маннитолом.



Результаты исследования антиоксидантной активности образцов ГКц (А) и ГКп (Б) в конечной концентрации 2 мг/мл на модели ингибирования гидроксильного радикала (с добавлением ЭДТА и без ЭДТА), выраженные в % ингибирования (n = 3)

Таким образом, высокая АОА всех исследуемых ГК показана с использованием четырех различных, нетрадиционных для гуминовых соединений колориметрических методик оценки АОА – АВТS-теста, взаимодействия с супероксид-анион-радикалом, исследования железосвязывающей (хелатирующей) активности и взаимодействия с гидроксильным радикалом.

### **Заключение**

Проведено исследование АОА 18 образцов ГК из 9 разных видов торфа Томской области, в зависимости от их происхождения и способа выделения, колориметрическими методами анализа. Все исследуемые образцы ГК (как ГК<sub>И</sub>, так и ГК<sub>Л</sub>) проявили высокую АОА по результатам четырех методов исследования: в реакциях с АВТS, с супероксид-анион-радикалом и с гидроксильным радикалом, обладают железосвязывающей (хелатирующей) активностью. Показано, что все ГК высокоэффективны в процессе ингибирования свободного катион-радикала АВТS<sup>•+</sup>, супероксид-анион-радикала O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, гидроксильного радикала НО<sup>•</sup>, способны связывать Fe<sup>2+</sup> в широком диапазоне концентраций. Установлено, что активность ГК в разных тестах неодинаковая. Так, большей АОА в модельной реакции ингибирования супероксид-анион-радикала O<sub>2</sub><sup>•-</sup> обладали ГК, выделенные натрий гидроксидом, по сравнению с ГК, выделенными натрий пирофосфатом, в пределах одного вида торфа. При исследовании железосвязывающей активности наблюдалась обратная зависимость, т.е. ГК<sub>Л</sub> обладали большей хелатирующей способностью, чем ГК<sub>И</sub>. В модельных реакциях с ингибированием свободного катион-радикала АВТS<sup>•+</sup> и гидроксильного радикала отмечен сопоставимый уровень активности между образцами ГК, выделенными разными растворами. Подобное неравномерное распределение уровня активности различных образцов ГК объясняется неодинаковыми химическими параметрами их строения, зависящими от их происхождения и способа выделения. Ранее нами было проведено исследование физико-химических параметров строения данных ГК [4], где было отмечено, что ГК, выделенные натрий пирофосфатом, отличаются от ГК, выделенных натрий гидроксидом, большим содержанием ароматических структур и кислородсодержащих функциональных групп в их молекулах. В зависимости от происхождения торфа отмечено, что ГК из низинных видов торфа являются более ароматичными структурами и содержат больше фенольных, спиртовых и простых эфирных групп, углеводных остатков. В большинстве случаев более высокая АОА характерна для ГК из двух низинных (травяного и травяно-мохового) и верховых видов торфа, что ранее нами уже отмечалось в предыдущем исследовании АОА ГК методами ЭПР-спектроскопии, колориметрии с ДФПГ и катодной вольтамперометрии [25]. В этом же исследовании нами были сделаны выводы о возможных механизмах АО активности. Так, методами колориметрии с ДФПГ и катодной вольтамперометрии установлено, что ГК по механизму АОА являются донорами протона, а методом ЭПР-спектроскопии установлена природа парамагнетизма ГК, аналогичная свободному радикалу семихинонного типа, так как в структуре всех ГК отмечена высокая концентрация парамагнитных центров, поэтому вторым возможным механизмом АОА ГК является их способность выступать в роли ловушек свободных радикалов [25].

Полученные в настоящем исследовании результаты подтверждают ранее сделанные выводы о природе АОА ГК. На основании использования в качестве препаратов сравнения таких классических антиоксидантов с установленным механизмом действия [35], как водорастворимый аналог токоферола – препарат «Тролокс», водорастворимый антиоксидант – аскорбиновая кислота, классический хелатор – этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), маннитол – классическая ловушка гидроксильного радикала, можно сделать заключение, что исследуемые ГК являются эффективными антиоксидантами, относящимися к группам доноров протонов и комплексообразователей. Группу доноров протонов составляют вещества, имеющие легкоподвижный атом водорода и нейтрализующие свободные радикалы по реакции: АН + R<sup>•</sup> → А<sup>•</sup> + RН, где АН – это АО с подвижным атомом водорода, а R<sup>•</sup> – это радикальный инициатор, или промежуточный радикальный продукт свободно-радикального окисления (аскорбиновая кислота, фенолы, токоферолы, флавоноиды и др.). Комплексообразователи связывают катионы металлов, провоцирующие образование АФК и алтерацию биомолекул (ЭДТА и ее соли).

Таким образом, гуминовые кислоты торфа являются перспективными биологически активными веществами с антиоксидантной активностью для разработки лекарственных средств с протекторными свойствами.

**Список литературы**

1. Зыкова М.В., Логвинова Л.А., Белоусов М.В. Высокомолекулярные соединения гуминовой природы – перспективные биологически активные соединения // Традиционная медицина. 2018. Т. 53. №2. С. 27–38.
2. Бузлама А.В., Чернов Ю.Н. Анализ фармакологических свойств, механизмов действия и перспектив применения гуминовых веществ в медицине // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2010. Т. 73. №9. С. 43–48. DOI: 10.30906/0869-2092-2010-73-9-43-48.
3. Visser S.A. Effects of humic substances on higher animals and man; the possible use of humic compounds in medical treatments // International Humic Substances Society meeting. Sevilla, 1988. Pp. 89–135.
4. Zykova M.V., Schepetkin I.A., Belousov M.V., Krivoshechekov S.V., Logvinova L.A., Bratishko K.A., Yusubov M.S., Romanenko S.V., Quinn M.T. Physicochemical characterization and antioxidant activity of humic acids isolated from peat of various origins // Molecules. 2018. Vol. 23. N4. Pp. 753–768. DOI: 10.3390/molecules23040753.
5. Avvakumova N.P., Gerchikov A.Y., Khairullina V.R., Zhdanova A.V. Antioxidant properties of humic substances isolated from peloids // Pharm. Chem. J. 2011. Vol. 45. Pp. 192–193. DOI: 10.1007/s11094-011-0590-2.
6. Vaškova J., Veliká B., Pilátová M., Kron I., Vaško L. Effects of humic acid in vitro // In Vitro Cell. Dev. Biol. 2011. Vol. 47. N5-6. Pp. 378–382. DOI: 10.1007/s11626-011-9405-8.
7. Мартинович Г.Г., Черенкевич С.Н. Окислительно-восстановительные процессы в клетках. Минск, 2008. 159 с.
8. Бузлама В.С., Долгополов В.Н., Сафонов А.В., Бузлама С.В. Механизм действия препаратов гуминовых веществ // Сборник докладов конференции «Итоги и перспективы применения гуминовых препаратов в продуктивном животноводстве, коневодстве и птицеводстве». М., 2006. С. 24–35.
9. Piotrowska D., Dlugosz A., Witkiewicz K., Pajak J. The research on antioxidative properties of Tolpa Peat Preparation and its fractions // Acta Pol. Pharm. 2000. Vol. 57. Pp. 127–129.
10. Gau R.-J., Yang H.-L., Suen J.-L., Lu F.-J. Induction of oxidative stress by humic acid through increasing intracellular iron: a possible mechanism leading to atherothrombotic vascular disorder in blackfoot disease // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2001. Vol. 283. N4. Pp. 743–749. DOI: 10.1006/bbrc.2001.4832.
11. Бузлама А.В., Чернов Ю.Н., Дронова Ю.М., Астанина М.А. Изучение антиоксидантных свойств солей гуминовых кислот в экспериментальных исследованиях // Научные ведомости БелГУ. 2011. Т. 22. №17. С. 214–221.
12. Лотош Т.Д. Экспериментальные основы и перспективы использования препаратов гуминовых кислот из торфа в медицине и сельскохозяйственном производстве // Биологические науки. 1991. №10. С. 99–103.
13. Belousov M.V., Akhmedzhanov R.R., Zykova M.V., Gur'ev A.M., Yusubov M.S. Hepatoprotective properties of native humic acids isolated from lowland peat of Tomsk // Pharm. Chem. J. 2014. Vol. 48. N4. Pp. 249–252. DOI: 10.1007/s11094-014-1088-5.
14. Vetricka V., Vashishta A., Fuentes M., Baigorri R., Jose M.G.-M., Yvin J.-C. The relative abundance of oxygen alkyl-related groups in aliphatic domains is involved in the main pharmacological-pleiotropic effects of humic acids // J. Med. Food. 2013. Vol. 16. N7. Pp. 625–632. DOI: 10.1089/jmf.2012.0212.
15. Maslinski C., Fogel W.A., Andjowski W. The influence of Tolpa Peat Preparation on rat liver regeneration // Acta Pol. Pharm. 1995. Vol. 50. N4-5. Pp. 413–416.
16. Аввакумова Н.П., Жданова А.В., Глубокова М.Н., Жернов Ю.В. Влияние гуминовых веществ пеллоидов на процессы свободнорадикального окисления // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13. №1. С. 1960–1963.
17. Ozcan A., Sen H.M., Sehitoğlu I., Alacam H., Guven M., Aras A.B., Akman T., Silan C., Cosar M., Karaman H.I.O. Neuroprotective effect of humic acid on focal cerebral ischemia injury: an experimental study on rats // Inflammation. 2015. Vol. 38. N1. Pp. 32–39. DOI: 10.1007/s10753-014-0005-0.
18. Akbas A., Silan C., Gulpinar M.T., Sancak E.B., Ozkanlı S.S., Cakir D.U. Renoprotective effect of humic acid on renal ischemia-reperfusion injury: an experimental study in rats // Inflammation. 2015. Vol. 38. Pp. 2042–2048. DOI: 10.1007/s10753-015-0185-2.
19. Бузлама А.В. Изучение мембранотропной активности солей гуминовых кислот леонардита // Сборник статей Всероссийской науч.-практич. конф. с междунар. участием «От фундаментальных исследований к инновационным медицинским технологиям». СПб., 2010. С. 15–16.
20. Wollina U. The response of erythematous rosacea to ondasetron // Br. J. Dermatol. 1999. Vol. 140. Pp. 561–562. DOI: 10.1046/j.1365-2133.1999.02744.x.
21. Зыкова М.В., Белоусов М.В., Ласукова Т.В., Горбунов А.С., Логвинова Л.А., Дыгай А.М. Кардиоваскулярные эффекты высокомолекулярных соединений гуминовой природы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 163. №2. С. 167–170.
22. Belousov M.V., Akhmedzhanov R.R., Zykova M.V., Arbuzov A.N., Gur'ev A.M., Yusubov M.S. Antihypoxic activity of native humic acids of Tomsk lowland peat // Pharm. Chem. J. 2014. Vol. 48. Pp. 97–99. DOI: 10.1007/s11094-014-1056-0.
23. Бузлама А.В., Чернов Ю.Н., Сливкин А.И. Изучение гипогликемических и антидиабетических свойств гуматов различного происхождения в эксперименте // Вестник Воронежского государственного университета. 2010. №1. С. 140–145.
24. Belousov M.V., Akhmedzhanov R.R., Zykova M.V., Vasil'ev K. Yu., Yusubov M.S. Effect of native humic acids from Tomsk region lowland peat on mitochondrial oxidative phosphorylation under hypoxic conditions // Pharm. Chem. J. 2015. Vol. 49. N4. Pp. 250–253. DOI: 10.1007/s11094-015-1265-1.

25. Зыкова М.В., Логвинова Л.А., Кривошеков С.В., Воронова О.А., Ласукова Т.В., Братишко К.А., Жолобова Г.А., Голубина О.А., Передерина И.А., Дрыгунова Л.А., Тверякова Е.Н., Белоусов М.В. Антиоксидантная активность высокомолекулярных соединений гуминовой природы // Химия растительного сырья. 2018. №3. С. 239–250. DOI: 10.14258/jcprm.2018033925.
26. Gupta D. Methods for determination of antioxidant capacity: a review // Intern. J. of Pharmaceutical Sciences and Research. 2015. Vol. 6. N2. Pp. 546–566. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(2).546-66.
27. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах // Успехи современного естествознания. 2006. №7. С. 29–36.
28. Kajarabille N., Latunde-Dada G.O. Programmed Cell-Death by Ferroptosis: Antioxidants as Mitigators // Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20(19). P. 4968. DOI: 10.3390/ijms20194968.
29. Matros A., Peshev D., Peukert M., Mock H.P., Van den Ende W. Sugars as hydroxyl radical scavengers: proof-of-concept by studying the fate of sucralose in Arabidopsis // Plant J. 2015. Vol. 82(5). Pp. 822–839. DOI: 10.1111/tpj.12853. PMID: 25891826.
30. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. М.: Медицина, 1989. 368 с.
31. Патент № 2610446 (РФ). Средство на основе гуминовых кислот из торфа болот Томской области для повышения продукции оксида азота макрофагами *in vitro* и способ его получения / М.В. Зыкова, М.Г. Данилец, С.В. Кривошеков, Е.С. Трофимова, А.А. Лигачева, Е.Ю. Шерстобоев, М.В. Белоусов, М.С. Юсубов. – 13.02.2017.
32. Bentayeb K., Rubio C., Nerin C. Study of the antioxidant mechanisms of Trolox and eugenol with 2,2'-azobis(2-aminodipropyl) dihydrochloride using ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry // Analyst. 2012. Vol. 137. N2. Pp. 459–470. DOI: 10.1039/c1an15505a.
33. Schepetkin I., Potapov A., Khlebnikov A., Korotkova E., Lukina A., Malovichko G., Kirpotina L., Quinn M.T. Decomposition of reactive oxygen species by copper(II) bis(1-pyrazolyl)methane complexes // Journal of Biological Inorganic Chemistry Scientific Journal. 2006. Vol. 11. Pp. 499–513. DOI: 10.1007/s00775-006-0101-1.
34. Mahakunakorn P., Tohda M., Murakami Y., Matsumoto K., Watanabe H. Antioxidant and free radical-scavenging activity of Choto-san and its related constituents // Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2004. Vol. 27. N1. Pp. 38–46. DOI: 10.1248/bpb.27.38.
35. Trembl J., Šmejkal K. Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals // Comprehensive reviews in food science and food safety. 2016. Vol. 15. N4. Pp. 720–738. DOI: 10.1111/1541-4337.12204.

*Поступила в редакцию 3 ноября 2020 г.*

*После переработки 11 декабря 2020 г.*

*Принята к публикации 12 декабря 2020 г.*

**Для цитирования:** Братишко К.А., Зыкова М.В., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Дрыгунова Л.А., Перминова И.В., Белоусов М.В. Гуминовые кислоты торфа – перспективные биологически активные вещества с антиоксидантной активностью для разработки протекторных средств // Химия растительного сырья. 2021. №1. С. 287–298. DOI: 10.14258/jcprm.2021018784.

Bratishko K.A.<sup>1,2</sup>, Zykova M.V.<sup>1\*</sup>, Ivanov V.V.<sup>1</sup>, Buyko E.E.<sup>1,2</sup>, Drygunova L.A.<sup>1</sup>, Perminova I.V.<sup>3</sup>, Belousov M.V.<sup>1,2</sup> PEAT HUMIC ACIDS – PROSPECTIVE BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY FOR THE DEVELOPMENT OF PROTECTIVE AGENTS

<sup>1</sup> Siberian State Medical University, Moskovsky trakt, 2, Tomsk, 634050 (Russia), e-mail: gmv2@rambler.ru

<sup>2</sup> National Research Tomsk Polytechnic University, pr. Lenina, 30, Tomsk, 634050 (Russia)

<sup>3</sup> Moscow State University M.V. Lomonosov, Leninskie gory, 1, Moscow, 119991 (Russia)

A present study was carried out to investigate the antioxidant activity (AOA) of humic acids (HA) isolated by sodium hydroxide and sodium pyrophosphate from nine peat species of the Tomsk region different by botanical composition, degree of decomposition and ash content. All HA samples had shown the AOA in the study. As the results of four research methods, it was found that HAs are highly effective in inhibiting the free ABTS<sup>•+</sup> radical cation, superoxide anion radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, hydroxyl radical HO<sup>•</sup>, and are able to bind Fe<sup>2+</sup> in a wide range of concentrations. The activity of HAs in different tests was not equal between samples; HAs isolated by sodium hydroxide have had a higher AOA in inhibition of the superoxide anion-radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> in the model reaction compared to HAs isolated by sodium pyrophosphate within the same peat species. In the study of iron binding activity, an inverse relationship was observed. In the model reactions of the free ABTS<sup>•+</sup> radical cation and the hydroxyl radical HO<sup>•</sup> inhibition, a comparable level of activity was registered between the HA samples isolated by different solutions. Such an uneven distribution of the activity between various HA samples can be explained by the unequal chemical parameters of their structure, which depend on their origin and method of isolation. Using of such classical antioxidants with an established mechanism of action as comparison drugs, as a water-soluble analogue of tocopherol - "Trolox", a water-soluble antioxidant – ascorbic acid, a classic chelator – ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), a classic trap of a hydroxyl radical – mannitol, it is possible to conclude that the investigated HAs are effective antioxidants belonging to the groups of proton donors and complexing agents.

**Keywords:** antioxidants, free radicals, humic acids, peat, colorimetry, proton donors, complexing agents.

### References

- Zykova M.V., Logvinova L.A., Belousov M.V. *Traditsionnaya meditsina*, 2018, vol. 53, no. 2, pp. 27–38. (in Russ.).
- Buzlama A.V., Chernov Yu.N. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*, 2010, vol. 73, no. 9, pp. 43–48. DOI: 10.30906/0869-2092-2010-73-9-43-48. (in Russ.).
- Visser S.A. *International Humic Substances Society meeting*. Sevilla, 1988, pp. 89–135.
- Zykova M.V., Schepetkin I.A., Belousov M.V., Krivoshchekov S.V., Logvinova L.A., Bratishko K.A., Yusubov M.S., Romanenko S.V., Quinn M.T. *Molecules*, 2018, vol. 23, no. 4, pp. 753–768. DOI: 10.3390/molecules23040753.
- Avvakumova N.P., Gerchikov A.Y., Khairullina V.R., Zhdanova A.V. *Pharm. Chem. J.*, 2011, vol. 45, pp. 192–193. DOI: 10.1007/s11094-011-0590-2.
- Vaškova J., Veliká B., Pilátová M., Kron I., Vaško L. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 2011, vol. 47, no. 5-6, pp. 378–382. DOI: 10.1007/s11626-011-9405-8.
- Martinovich G.G., Cherenkevich S.N. *Okislitel'no-vosstanovitel'nyye protsessy v kletkakh*. [Redox processes in cells]. Minsk, 2008, 159 p. (in Russ.).
- Buzlama V.S., Dolgoplov V.N., Safonov A.V., Buzlama S.V. *Sbornik докладov konferentsii «Itogi i perspektivy primeneniya guminovykh preparatov v produk-tivnom zhivotnovodstve, konevodstve i ptitsevodstve»*. [Collection of reports of the conference "Results and prospects of the use of humic preparations in productive animal husbandry, horse breeding and poultry farming"]. Moscow, 2006, pp. 24–35. (in Russ.).
- Piotrowska D., Dlugosz A., Witkiewicz K., Pajak J. *Acta Pol. Pharm.*, 2000, vol. 57, pp. 127–129.
- Gau R.-J., Yang H.-L., Suen J.-L., Lu F.-J. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, vol. 283, no. 4, pp. 743–749. DOI: 10.1006/bbrc.2001.4832.
- Buzlama A.B., Chernov Yu.N., Dronova Yu.M., Astanina M.A. *Nauchnyye vedomosti BelGU*, 2011, vol. 22, no. 17, pp. 214–221. (in Russ.).
- Lotosh T.D. *Biologicheskiye nauki*, 1991, no. 10, pp. 99–103. (in Russ.).
- Belousov M.V., Akhmedzhanov R.R., Zykova M.V., Gur'ev A.M., Yusubov M.S. *Pharm. Chem. J.*, 2014, vol. 48, no. 4, pp. 249–252. DOI: 10.1007/s11094-014-1088-5.
- Vetvicka V., Vashishta A., Fuentes M., Baigorri R., Jose M.G.-M., Yvin J.-C. *J. Med. Food.*, 2013, vol. 16, no. 7, pp. 625–632. DOI: 10.1089/jmf.2012.0212.
- Maslinski C., Fogel W.A., Andjewski W. *Acta Pol. Pharm.*, 1995, vol. 50, no. 4-5, pp. 413–416.
- Avvakumova N.P., Zhdanova A.V., Glubokova M.N., Zhernov Yu.V. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*, 2011, vol. 13, no. 1, pp. 1960–1963. (in Russ.).
- Ozcan A., Sen H.M., Sehitoglu I., Alacam H., Guven M., Aras A.B., Akman T., Silan C., Cosar M., Karaman H.I.O. *Inflammation*, 2015, vol. 38, no. 1, pp. 32–39. DOI: 10.1007/s10753-014-0005-0.
- Akbas A., Silan C., Gulpinar M.T., Sancak E.B., Ozkanli S.S., Cakir D.U. *Inflammation*, 2015, vol. 38, pp. 2042–2048. DOI: 10.1007/s10753-015-0185-2.
- Buzlama A.B. *Sbornik statey Vserossiyskoy nauch.-praktich. konf. s mezhdunarodn. uchastiyem «Ot fundamental'nykh issledovaniy k inno-vatsionnym meditsinskim tekhnologiyam»*. [Collection of articles of the All-Russian scientific-practical. conf. from international participation "From fundamental research to innovative medical technologies"]. St.-Petersburg, 2010, pp. 15–16. (in Russ.).
- Wollina U. *Br. J. Dermatol.*, 1999, vol. 140, pp. 561–562. DOI: 10.1046/j.1365-2133.1999.02744.x.

\* Corresponding author.

21. Zykova M.V., Belousov M.V., Lasukova T.V., Gorbunov A.S., Logvinova L.A., Dygay A.M. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*, 2017, vol. 163, no. 2, pp. 167–170. (in Russ.).
22. Belousov M.V., Akhmedzhanov R.R., Zykova M.V., Arbuzov A.N., Gur'ev A.M., Yusubov M.S. *Pharm. Chem. J.*, 2014, vol. 48, pp. 97–99. DOI: 10.1007/s11094-014-1056-0.
23. Buzlama A.B., Chernov Yu.N., Slivkin A.I. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2010, no. 1, pp. 140–145. (in Russ.).
24. Belousov M.V., Akhmedzhanov R.R., Zykova M.V., Vasil'ev K.Yu., Yusubov M.S. *Pharm. Chem. J.*, 2015, vol. 49, no. 4, pp. 250–253. DOI: 10.1007/s11094-015-1265-1.
25. Zykova M.V., Logvinova L.A., Krivoshchekov S.V., Voronova O.A., Lasukova T.V., Bratishko K.A., Zholobova G.A., Golubina O.A., Perederina I.A., Drygunova L.A., Tveryakova Ye.N., Belousov M.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 3, pp. 239–250. DOI: 10.14258/jcprm.2018033925. (in Russ.).
26. Gupta D. *Intern. J. of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2015, vol. 6, no. 2, pp. 546–566. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(2).546-66.
27. Chesnokova N.P., Ponukalina Ye.V., Bizenkova M.N. *Uspekhi sovremennogo yestestvoznaniya*, 2006, no. 7, pp. 29–36. (in Russ.).
28. Kajarabille N., Latunde-Dada G.O. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20(19), p. 4968. DOI: 10.3390/ijms20194968.
29. Matros A., Peshev D., Peukert M., Mock H.P., Van den Ende W. *Plant J.*, 2015, vol. 82(5), pp. 822–839. DOI: 10.1111/tpj.12853. PMID: 25891826.
30. Bilenko M.V. *Ishemicheskiye i reperfuzionnyye povrezhdeniya organov*. [Ischemic and reperfusion injuries of organs]. Moscow, 1989, 368 p. (in Russ.).
31. Patent 2610446 (RU). 13.02.2017. (in Russ.).
32. Bentayeb K., Rubio C., Nerin C. *Analyst*, 2012, vol. 137, no. 2, pp. 459–470. DOI: 10.1039/c1an15505a.
33. Schepetkin I., Potapov A., Khlebnikov A., Korotkova E., Lukina A., Malovichko G., Kirpotina L., Quinn M.T. *Journal of Biological Inorganic Chemistry Scientific Journal*, 2006, vol. 11, pp. 499–513. DOI: 10.1007/s00775-006-0101-1.
34. Mahakunakorn P., Tohda M., Murakami Y., Matsumoto K., Watanabe H. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2004, vol. 27, no. 1, pp. 38–46. DOI: 10.1248/bpb.27.38.
35. Treml J., Šmejkal K. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2016, vol. 15, no. 4, pp. 720–738. DOI: 10.1111/1541-4337.12204.

Received November 3, 2020

Revised December 11, 2020

Accepted December 12, 2020

**For citing:** Bratishko K.A., Zykova M.V., Ivanov V.V., Buyko E.E., Drygunova L.A., Perminova I.V., Belousov M.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2021, no. 1, pp. 287–298. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2021018784.