

## ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ПЕЛОИДОВ

### **Н.П. Аввакумова**

д.б.н., профессор, зав. кафедрой общей, бионеорганической и биоорганической химии,  
Самарский государственный медицинский университет

### **П.Г. Мизина**

д.фарм.н., профессор, зам. директора по научной работе,  
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

### **М.А. Кривопалова**

к.х.н., доцент, Самарский государственный медицинский университет

### **А.В. Жданова**

к.фарм.н., доцент, Самарский государственный медицинский университет  
E-mail: avzhdanova@mail.ru

### **Е.Е. Катунина**

к.б.н., доцент, Самарский государственный медицинский университет

### **М.Н. Глубокова**

к.фарм.н., доцент, Самарский государственный медицинский университет

Исследована противовоспалительная активность гуминовых кислот пелоидов. Показано, что выделенная из низкоминерализованных иловых сульфидных грязей индивидуальная субстанция гуминовых кислот обладает противовоспалительным действием в условиях экспериментального каррагенинового отека лапки крысы.

**Ключевые слова:** гуминовые кислоты, каррагениновое воспаление, биологическая активность.

**Для цитирования:** Аввакумова Н.П., Мизина П.Г., Кривопалова М.А., Жданова А.В., Катунина Е.Е., Глубокова М.Н. Противовоспалительная активность гуминовых кислот пелоидов. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018;21(6):33-37. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-06-06>

В составе комплексной терапии широко применяется лечение природными факторами, в том числе пелоидотерапия, как во внекурортных, так и в курортных условиях. Лечение нативными грязями рекомендуется в период ремиссии и имеет ряд противопоказаний, среди которых острая стадия воспалительного процесса. Возможность осложнений обусловлена высокой нагрузкой на организм сочетанного воздействия пелоидов: теплового, физического, химического. Представляет интерес исследование химического воздействия выделенной из пелоидов индивидуальной субстанции.

В ряде исследований [1–3] показано, что гуминовые вещества различного генеза (торфяные, сапропелевые, пелоидные) обладают широким спектром биологической активности и используются в различных областях ветеринарии. Гуминовые вещества нетоксичны, не обладают тератогенными, эмбриотоксическими и канцерогенными свойствами, не вызывают аллергических реакций. Терапия природными соединениями показывает положительный эффект, который дает основание для разработок новых отечественных препаратов

на основе гумусовых кислот низкоминерализованных иловых сульфидных грязей. Гуминовые кислоты, являясь наиболее активной и преобладающей частью гуминовых веществ пелоидов, представляют собой сложную макромолекулярную композицию кислотной природы, включающую ароматический сегмент, содержащий в боковых заместителях функциональные группы, среди которых превалируют карбонильные фрагменты карбоксильного, хиноидного, сложноэфирного, амидного типа, а также спиртовые гидроксилы. Из трех фракций гумусовых кислот (гуминовые, гиматомелановые, фульвовые) биологическое действие в подавляющем числе публикаций [4–6] определено для гуминовых кислот, которые повышают общую резистентность организма, обладают антиоксидантными, противовоспалительными, противовирусными, антибактериальными, противогрибковыми, мембранотропными, гепатопротективными свойствами, способностью усиливать активность обменных процессов.

Ц е л ь р а б о т ы – исследование противовоспалительной активности гуминовых кислот

(ГК) пелоидов в модели острого каррагенинового воспаления.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил препарат на основе гуминовых кислот низкоминерализованных иловых сульфидных грязей, выделенный по авторской методике [7]. Сухой образец ГК растворяли в минимальном объеме 0,01 моль/дм<sup>3</sup> раствора калия гидроксида с выдерживанием на водяной бане при температуре 40–60 °С в течение 3–4 ч. Темноокрашенный раствор пропускали через бумажный фильтр и доводили до нейтральной среды 0,01 моль/дм<sup>3</sup> раствором хлороводородной кислоты. Элюент доводили дистиллированной водой до определенного объема для получения 0,10%-ного раствора, который после стерилизации использовали для внутримышечных инъекций лабораторным животным.

Действие препарата оценивали по значениям показателей периферической крови в модели острого каррагенинового воспаления на беспородных белых крысах массой 180–200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Каррагенин-индуцированное воспаление лапы крыс воспроизводили согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [8]. Было сформировано четыре группы по 20 животных: 1-я группа (контрольная) – крысы получали внутримышечно физиологический раствор объемом 0,2 см<sup>3</sup>; 2-я группы (опытная) – крысам вводили 0,10%-ный раствор препарата ГК в дозе 0,2 см<sup>3</sup>; 3-я группа (сравнения) – животным субплантарно вводили 0,1 см<sup>3</sup> 1,0%-ного раствора каррагенина в правую заднюю лапу; 4-я группа (опытная) – животные однократно получали 0,2 см<sup>3</sup> 1,0%-ного раствора каррагенина после превентивного внутримышечного введения 0,2 см<sup>3</sup> 0,10%-ного водного раствора ГК.

Кровь для анализа забирали после декапитации через 3 ч после инъекций и определяли содержание общего пула лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, концентрацию гемоглобина, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), количество нейтрофильных гранулоцитов, лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов и базофилов, а также уровень С-реактивного белка (СРБ) и циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), содержание фибронектина, провоспалительных цитокинов: интерлейкина 1-β (ИЛ-1β) и фактора некроза опухоли α (ФНО-α) в сыворотке крови, оценивали уровень спонтанной и стимулированной люминол-зависимой хемилюминесценции лейкоцитов.

Оценку содержания ЦИК проводили с помощью тест-наборов (НПО «Реакомплекс», Россия) методом нефелометрии различной растворимости мономеров иммуноглобулинов в составе иммунных комплексов при наличии в среде полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000). Результаты оценивали с помощью анализатора иммуноферментных реакций АИФР-01 Униплан ТМ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При введении животным 2-й группы препарата гуминовых кислот содержание лейкоцитов в крови, СОЭ, количество палочкоядерных нейтрофильных гранулоцитов не изменялось по сравнению с показателями у интактных животных (таблица). Это свидетельствует об индифферентности ГК к основным параметрам организма. При этом следует отметить увеличение содержания миелопероксидазы на 23%, фиброметина – на 19%, сегментоядерных нейтрофилов – на 32% и некоторое уменьшение показателя СОЭ на 13%, палочкоядерных нейтрофилов – на 36%. По-видимому, данные изменения доказывают усиление функциональной активности моноцитарно-макрофагальной системы при действии гуминовых кислот и снижение выраженности реакции животных на болевой стресс, вызванный внутримышечными инъекциями.

Оценка изменений характеристик периферической крови крыс (таблица) показала, что через 3 ч после моделирования острого воспаления содержание лейкоцитов в крови по сравнению с контрольными значениями увеличилось на 55%, СОЭ – в 2,4 раза, наблюдалась регистрация СРБ в сыворотке крови. Одновременно значительно увеличилось содержание нейтрофильных гранулоцитов, как палочкоядерных, так и сегментоядерных форм, на 102 и 58% соответственно. Пул лимфоцитов снижался при каррагениновом воспалении на 17%. Полученные результаты позволяют констатировать развитие острого воспалительного процесса у экспериментальных животных. Уровень миелопероксидазы, определяющий бактерицидную активность клеток, во 2-й группе животных повысился относительно контроля на 12%. Более чем в 3 раза увеличился уровень спонтанной хемилюминесценции фагоцитов (таблица), характеризующий окислительный метаболизм клеток. Увеличение содержания ИЛ-1β у крыс группы сравнения составило 54%, концентрации ФНО-α – 12%. Количество ЦИК выросло незначительно и составило 8,5%. Эти данные указывают на активацию моноцитарно-макрофагальной системы животных после введения каррагенина.

**Таблица. Экспериментальные значения показателей периферической крови крыс**

Показатель	1-я группа (контрольная)	2-я группа (опытная)	3-я группа (сравнения)	4-я группа (опытная)
Лейкоциты, кл. $\times 10^9/\text{л}$	13,2 $\pm$ 1,2	9,1 $\pm$ 0,6	20,5 $\pm$ 0,6	8,8 $\pm$ 1,0
Эритроциты, кл. $\times 10^9/\text{л}$	5,9 $\pm$ 0,6	5,1 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,1	4,9 $\pm$ 0,2
Тромбоциты, кл. $\times 10^9/\text{л}$	432,3 $\pm$ 27,4	445,5 $\pm$ 31,8	438,6 $\pm$ 24,5	445,5 $\pm$ 31,2
Гемоглобин, г/л	121,4 $\pm$ 9,6	125,4 $\pm$ 4,4	102,4 $\pm$ 8,6	110,6 $\pm$ 6,1
СОЭ, мм/ч	4,5 $\pm$ 0,5	3,9 $\pm$ 0,3	10,9 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,3
СРБ	Отриц.	Отриц.	++	Отриц.
Лимфоциты, %	65,3 $\pm$ 7,3	65,6 $\pm$ 6,0	54,4 $\pm$ 4,8	69,6 $\pm$ 3,8
Нейтрофилы, %, в т.ч.:	30,4 $\pm$ 3,1	30,7 $\pm$ 2,8	42,5 $\pm$ 2,3	28,1 $\pm$ 1,1
палочкоядерные	4,2 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,04	8,5 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 0,3
сегментоядерные	22,7 $\pm$ 2,1	29,9 $\pm$ 2,1	35,8 $\pm$ 2,7	22,4 $\pm$ 2,2
Моноциты, %	1,5 $\pm$ 0,03	1,6 $\pm$ 0,02	2,2 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,2
Эозинофилы, %	1,2 $\pm$ 0,11	1,4 $\pm$ 0,10	1,9 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,1
Базофилы, %	0,15 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,02
Миелопероксидаза, %	48,7 $\pm$ 4,0	59,9 $\pm$ 2,6	54,5 $\pm$ 1,4	59,9 $\pm$ 5,0
Хемилюминесценция лейкоцитов				
Спонтанная, мВ/с	0,112 $\pm$ 0,01	0,145 $\pm$ 0,01	0,520 $\pm$ 0,03	0,238 $\pm$ 0,01
Стимулированная, мВ/с	0,395 $\pm$ 0,02	0,524 $\pm$ 0,05	0,535 $\pm$ 0,02	0,360 $\pm$ 0,03
Индекс стимуляции	2,2 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,01	1,5 $\pm$ 0,02
ИЛ-1 $\beta$ , пкг/мл	28,2 $\pm$ 1,2	26,6 $\pm$ 1,5	43,3 $\pm$ 2,0	26,3 $\pm$ 1,4
ФНО- $\alpha$ , пкг/мл	36,4 $\pm$ 2,1	35,4 $\pm$ 1,3	40,7 $\pm$ 2,4	39,9 $\pm$ 3,2
Фибронектин, мкг/мл	213,9 $\pm$ 18,4	253,7 $\pm$ 9,5	231,9 $\pm$ 22,2	254,9 $\pm$ 17,7

Введение гуминовых кислот одновременно с каррагенином нивелирует изменения показателей периферической крови (таблица) и приводит к менее выраженному лейкоцитозу крови, который наблюдается при каррагениновом отёке в 3-й группе животных. Количество лейкоцитов в опытной группе крыс уменьшилось на 57%, СОЭ – на 68%, нейтрофильных гранулоцитов – на 34% по отношению к группе сравнения. Превентивное

введение гуминовых кислот показало отсутствие в сыворотке С-реактивного белка, а также уменьшение значений спонтанной и стимулированной хемилюминесценции лейкоцитов на 54 и 33% соответственно. Уровень ИЛ-1 $\beta$  при лечении препаратом понизился на 39%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что гуминовые кислоты полностью предотвращали увеличение содержания лейкоцитов в периферической крови.

Превентивное введение гуминовых кислот нивелирует изменения показателей периферической крови животных опытной группы и приводит к менее выраженному лейкоцитозу, который наблюдается при каррагениновом отёке в 3-й группе крыс. Количество лейкоцитов в 4-й группе уменьшилось на 57%, СОЭ – на 68%, нейтрофильных гранулоцитов – на 34% по отношению к группе сравнения. Лечение препаратом гуминовых кислот показало отсутствие в сыворотке СРБ, а также достоверное уменьшение значений спонтанной и стимулированной хемилюминесценции лейкоцитов на 54 и 33% соответственно. Уровень ИЛ-1 $\beta$  при лечении препаратом понизился на 39%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что инъекции раствором гуминовых кислот препятствуют увеличению содержания лейкоцитов в периферической крови.

Введение пелоидопрепарата нормализует содержание нейтрофильных гранулоцитов, не влияет на содержание эритроцитов, тромбоцитов, гемоглобина, моноцитов, эозинофилов и базофилов в крови животных с острым каррагениновым отёком и предотвращает резкое увеличение уровней хемилюминесценции лейкоцитов. При использовании раствора ГК содержание ИЛ-1 $\beta$  находится на уровне контрольных значений. Таким образом, применение препарата на основе ГК приводит показатели периферической крови к физиологической норме.

## ВЫВОДЫ

1. Характер изменения иммунологических показателей крови при лечении каррагенинового воспаления гуминовыми кислотами позволяет заключить, что их противовоспалительный эффект обусловлен воздействием на функционально-метаболическую активность нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов, что объясняется способностью гуминовых кислот обратимо ингибировать избыточную продукцию ИЛ-1 $\beta$  гиперактивированными макрофагами, нивелировать усиленный выход нейтрофильных гранулоцитов в кровь, уменьшать потребление кислорода активированными фагоцитами с последующим снижением генерации кислород-

ных радикалов, что, в конечном счете, приводит к уменьшению выраженности воспалительной реакции.

2. Результаты, полученные при проведении системного многофакторного анализа по 19 количественным показателям, которые характеризуют изменение клеточного состава крови и функциональной активности моноцитарно-макрофагальной системы, показали, что введение препарата при развитии воспаления значительно изменяет степень отклонения интегральных показателей функционального состояния системы крови от контрольных значений.
3. Таким образом, результаты исследования противовоспалительной активности субстанции гуминовых кислот свидетельствуют об эффективности их применения в период острой фазы каррагенинового воспаления.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Полуянова И.Е.* Биологическая активность гуминовых веществ, получаемых из торфа, и возможности их использования в лечебной практике // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. 2017. № 4. С. 114–122.
2. *Аввакумова Н.П.* Биохимические аспекты терапевтической эффективности гумусовых кислот лечебных грязей. Самара: ГП Перспектива. 2002. 124 с.
3. *Чуков С.Н.* Структурно-функциональные параметры органического вещества почв в условиях антропогенного воздействия. СПб: СПбГУ. 2001. 216 с.
4. *Орлов Д.С.* Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации // Химия почв. М.: МГУ. 1992. 325 с.
5. *Chilot G., Gilot O., Race J.* Exploring the high-mass components of humic acid by laser desorption ionization mass spectrometry // Rapid Commun. Mass spectrometry. 2008. № 10. P. 1528–1532.
6. *Аввакумова Н.П., Кривопалова М.А., Жданова А.В., Глубокова М.Н., Фомин И.В., Катунина Е.Е.* Природа защитного действия гуминовых веществ различного генеза // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2012. Т. 14. №1(8). С. 2104–2107.
7. Патент № 2480224 (РФ). Способ получения биологически активной субстанции гуминовых кислот из низкоминерализованных иловых сульфидных грязей. / *Н.П. Аввакумова, М.А. Кривопалова, И.В. Фомин.*
8. *Хабриев Р.У.* Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. *Р.У. Хабриева.* Изд. 2-е, перераб. и доп. М.: Медицина. 2005. 832 с.

Поступила 20 мая 2018 г.

## ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF HUMIC ACIDS OF PELOIDS

© Authors, 2018

**N.P. Avvakumova**

Dr.Sc. (Biol.), Professor, Head of Department, Samara State Medical University

**P.G. Mizina**

Dr.Sc. (Pharm.), Professor, Deputy Director,

All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

**M.A. Krivopalova**

Ph.D. (Chem.), Associate Professor, Samara State Medical University

**A.V. Zhdanova**

Ph.D. (Pharm.), Associate Professor, Samara State Medical University

E-mail: avzhdanova@mail.ru

**E.E. Katunina**

Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Samara State Medical University

**M.N. Glubokova**

Ph.D. (Pharm.), Associate Professor, Samara State Medical University

This work is dedicated to the research of the anti-inflammatory activity of humic acids of peloids within the model of acute carrageenin inflammation. The object of the study is a drug based on humic acids, isolated from low-mineralized silt mud.

The experiment was carried out on four groups, each consisting of 20 laboratory animals. In the first group, rats received an intramuscular physiological solution with a volume of 0.2 cm<sup>3</sup>. In the second group, rats were injected with a 0.10 % solution of the humic acid drug in a dose of 0.2 cm<sup>3</sup>. In the third group, 0.1 cm<sup>3</sup> of a 1.0% solution of carrageenin was subcutaneously injected in the right hind paw. In the fourth group, the animals received 0.2 cm<sup>3</sup> of a 1.0% solution of carrageenin one time after a preventive intramuscular injection of a 0.2 cm<sup>3</sup> 0.10% aqueous solution of humic acids. Blood for analysis was taken after decapitation 3 hours after injection and the blood composition was determined according to conventional methods.

The introduction of humic acids simultaneously with carrageenin neutralizes changes in the parameters of peripheral blood and leads to less pronounced leukocytosis, which is observed with carrageenin edema. The number of leukocytes in the fourth group of rats is reduced by 57%, ESR (Erythrocyte Sedimentation Rate) by 68%, neutrophilic granulocytes by 34% in relation to the third group. The preventive administration of humic acids showed a lack of C-reactive protein in the serum, as well as a decrease in the values of spontaneous and stimulated chemo-luminescence of leukocytes by 54% and 33%, respectively. Interleukin 1-β level decreased by 39% when treated with the drug.

The results of the analysis of the qualitative and quantitative composition of blood and its elemental elements according to 19 quantitative indices show that the administration of the drug reduces the number of neutrophilic granulocytes, inhibits the excessive formation of interleukin 1-β. The data of the leukocyte blood formula of animals of the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> groups indicate that the use of the drug in the development of inflammation significantly reduces the degree of deviation of the blood values from the control values.

Thus, the results of the study of the anti-inflammatory activity of humic acids show the effectiveness of their use during the acute phase of carrageenin inflammation. Humic acids of peloids are a promising natural substance for the creation of new products characterized by a high pharmacological effect with minimal side effects.

**Key words:** *humic acids, carrageenin inflammation, biological activity.*

**For citation:** Avvakumova N.P., Mizina P.G., Krivopalova M.A., Zhdanova A.V., Katunina E.E., Glubokova M.N. Anti-inflammatory activity of humic acids of peloids. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2018;21(6):33–37. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-06-06>

### REFERENCES

1. Poluyanova I.E. Biologicheskaya aktivnost' guminovykh veshchestv, poluchaemykh iz torfa, i vozmozhnosti ih ispol'zovaniya v lechebnoy praktike // Mezhdunarodnye obzory: klinicheskaya praktika i zdorov'e. 2017. № 4. S. 114–122.
2. Avvakumova N.P. Biohimicheskie aspekty terapevticheskoy ehffektivnosti gumusovykh kislot lechebnykh gryazej. Samara: GP Perspektiva. 2002. 124 s.
3. Chukov S.N. Strukturno-funkcional'nye parametry organicheskogo veshchestva pochv v usloviyah antropogennogo vozdeystviya. SPb: SPbGU. 2001. 216 s.
4. Orlov D.S. Gumusovye kisloty pochv i obshchaya teoriya gumifikatsii // Himiya pochv. M.: MGU. 1992. 325 s.
5. Chilot G., Gilot O., Race J. Exploring the high-mass components of humic acid by laser desorption ionization mass spectrometry // Rapid Commun. Mass spectrometry. 2008. № 10. P. 1528–1532.
6. Avvakumova N.P., Krivopalova M.A., Zhdanova A.V., Glubokova M.N., Fomin I.V., Katunina E.E. Priroda zashchitnogo deystviya guminovykh veshchestv razlichnogo geneza // Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk. 2012. T. 14. №1(8). S. 2104–2107.
7. Patent № 2480224 (RF). Sposob polucheniya biologicheskii aktivnoy substancii guminovykh kislot iz nizkomineralizovannykh ilovykh sul'fidnykh gryazej. / N.P. Avvakumova, M.A. Krivopalova, I.V. Fomin.
8. Habriev R.U. Rukovodstvo po ehksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv / Pod obshch. red. R.U. Habrieva. Izd. 2-e, pererab. i dop. M.: Medicina. 2005. 832 s.