



Биологическая активность гуминовых веществ

Куликова Н.А.

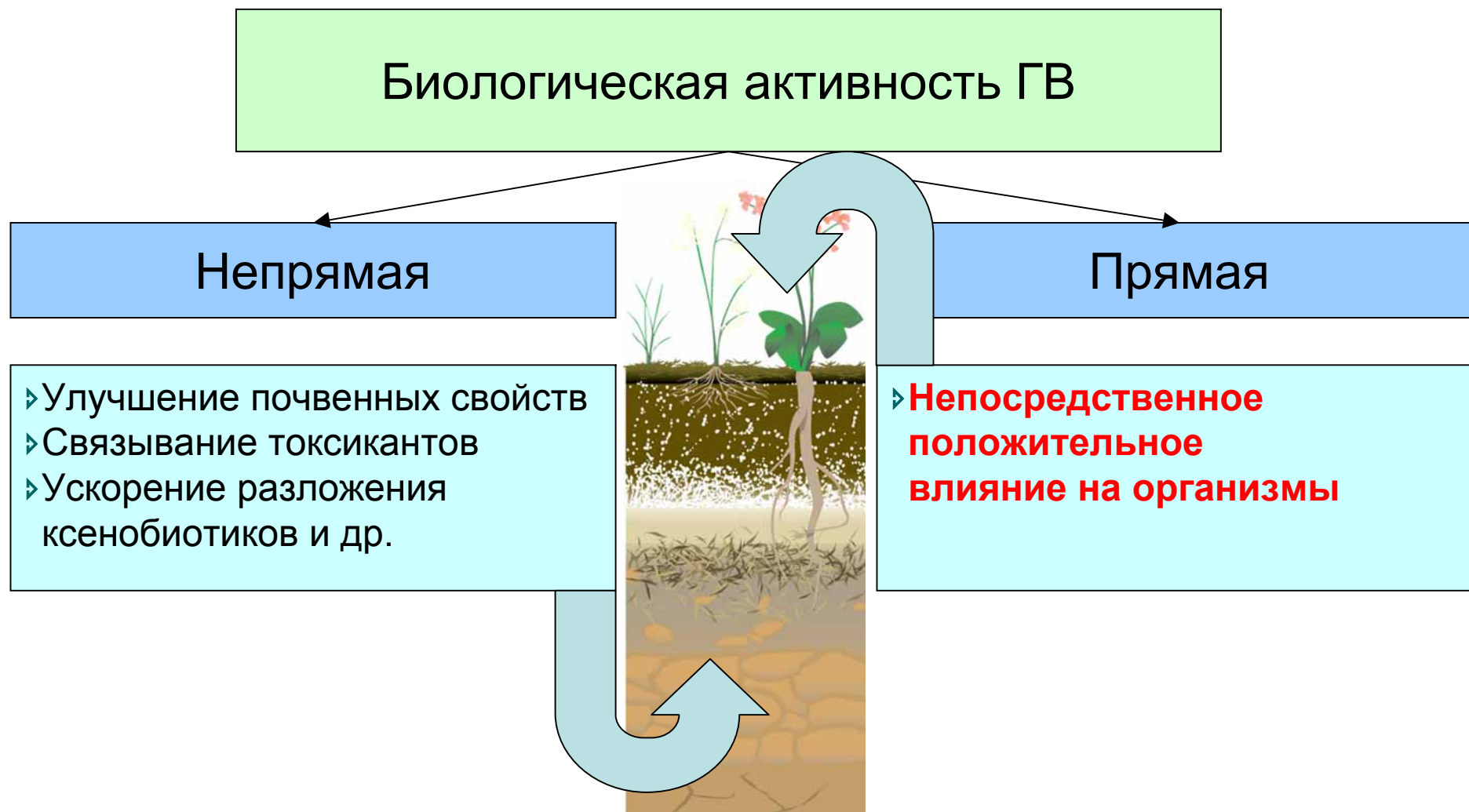
д.б.н, с.н.с, ф-т почвоведения МГУ
имени М.В. Ломоносова



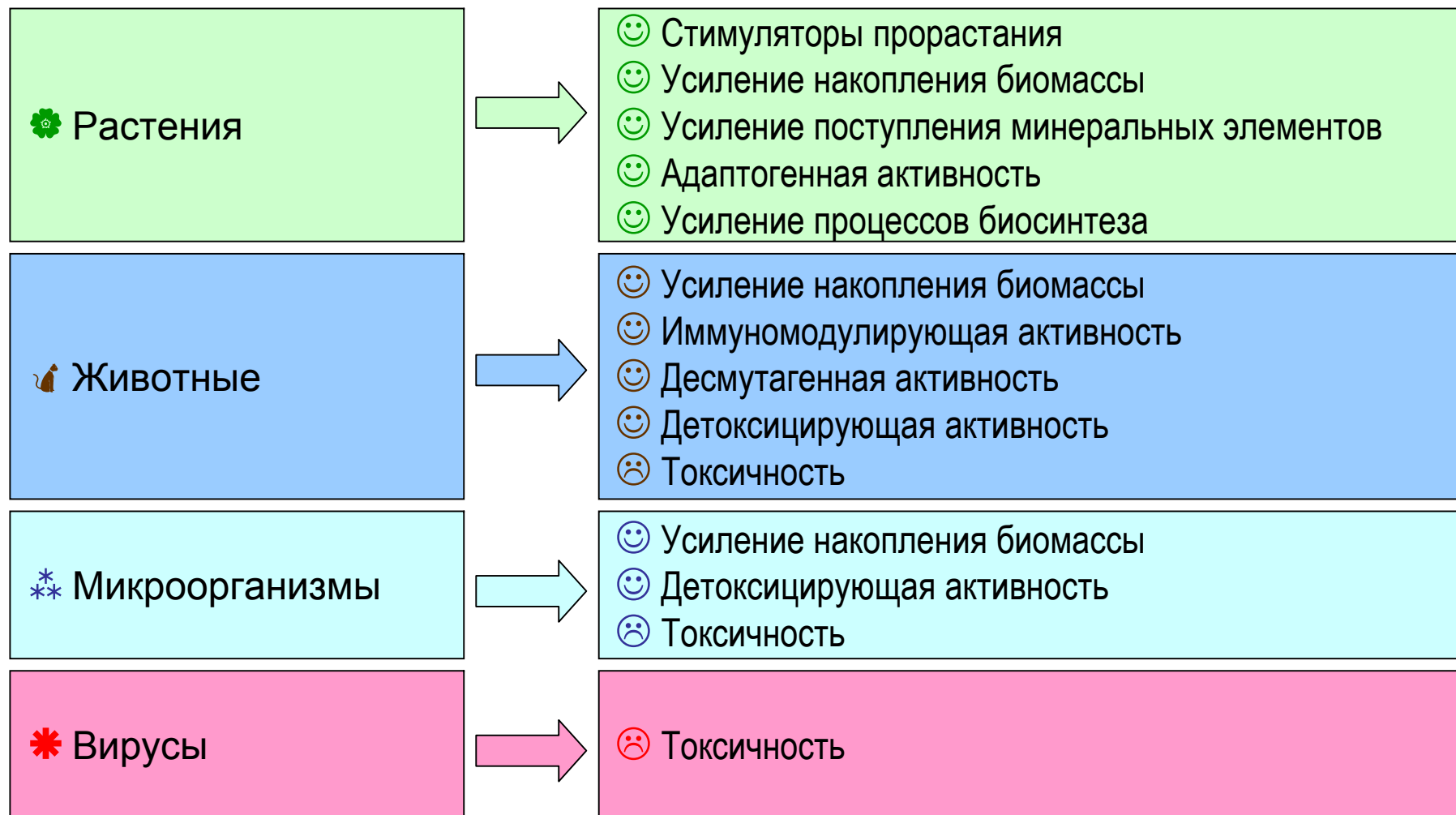
Содержание

- Основные составляющие биологической активности ГВ
- Использование ГВ в качестве биологических агентов
- Гипотезы о природе биологической активности ГВ
- Использование меченных тритием ГВ
- Токсичность ГВ
- Направления дальнейших исследований

Биологическая активность ГВ: основные составляющие

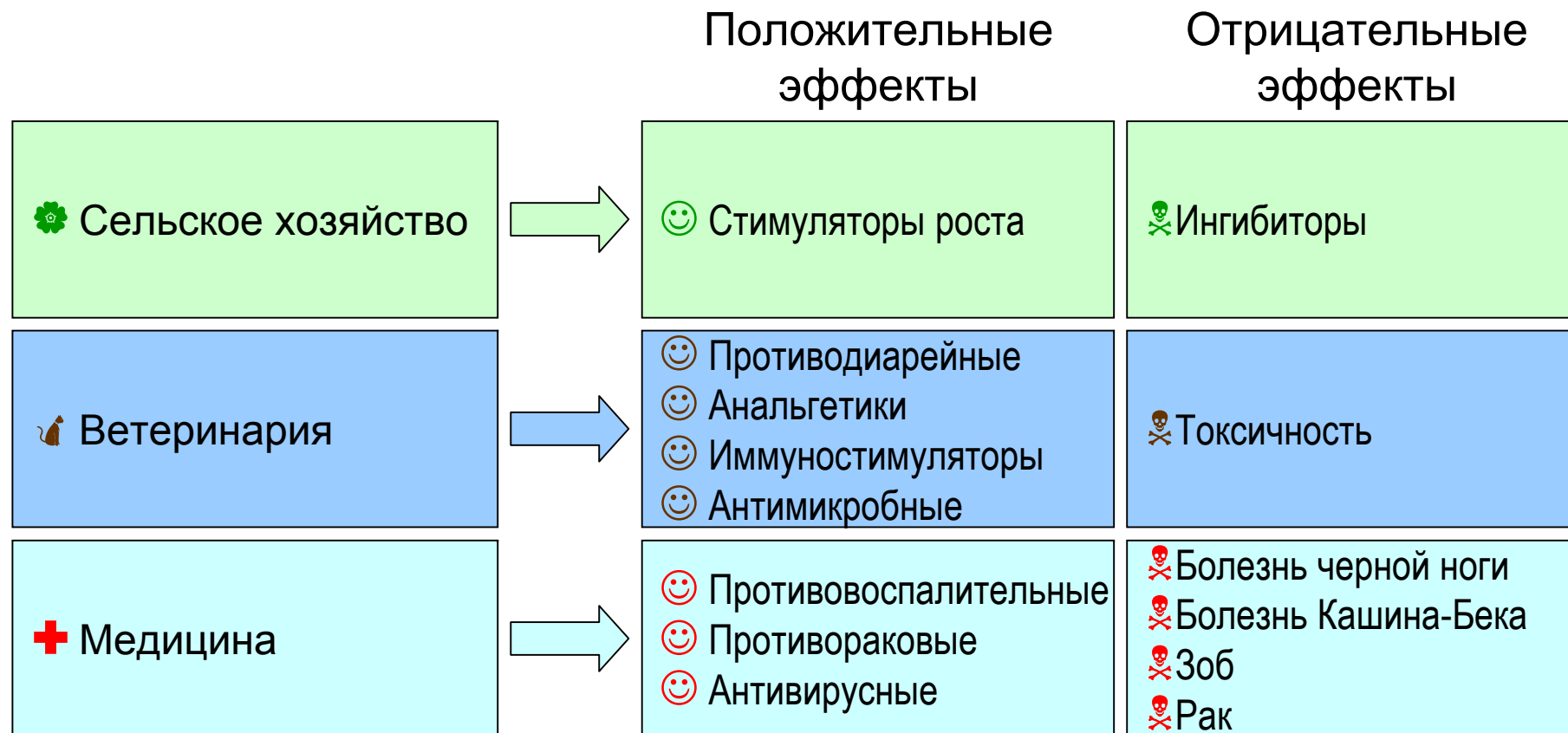


Биологическая активность ГВ: прямое действие



* ГВ обладают бимодальной активностью

ГВ как биологические агенты



Биологическая активность ГВ: определяющие свойства

- Полифункциональность:
-COOH, CAr-OH, >C=O, -CH_n
- Поверхностная активность
- Окислительно-восстановительные свойства
- **Большие молекулярные массы**

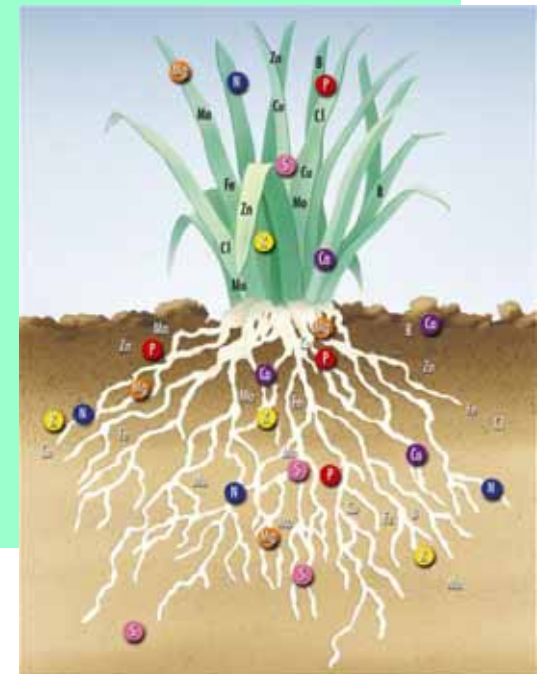
Биологическая активность ГВ: гипотезы на основе строения

- Источник питательных веществ
- Гормоноподобная активность
- Усиление поступления питательных элементов
- ГВ как модификаторы ферментов
- Антиоксидантная активность
- ГВ как редокс соединения

8/64

Биологическая активность ГВ: источник питательных веществ

- Углерод
- Азот
- Минеральные элементы

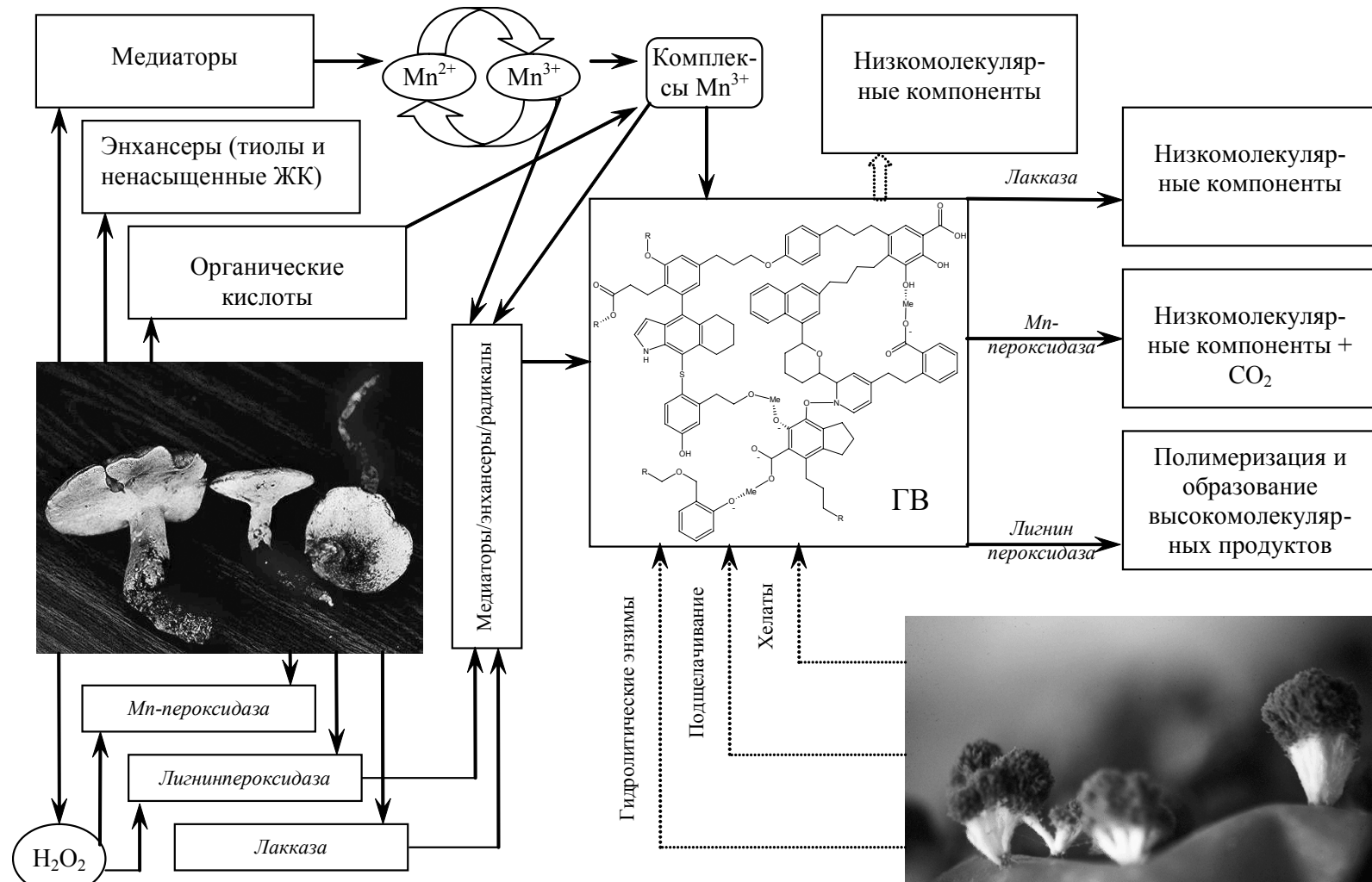


Биологическая активность ГВ: источник С и N

- Микоризные грибы (роды *Psilocybe*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes* и др.)
- Патогенные грибы (роды *Trichoderma* sp., *Fusarium* и др.)
- Бактерии (*Alcaligenes eutrophus*, *A. faecalis*, *Bacillus brevis*, *B. cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Xanthomonas campestris*)



Биологическая активность ГВ: внеклеточное разложение ГВ

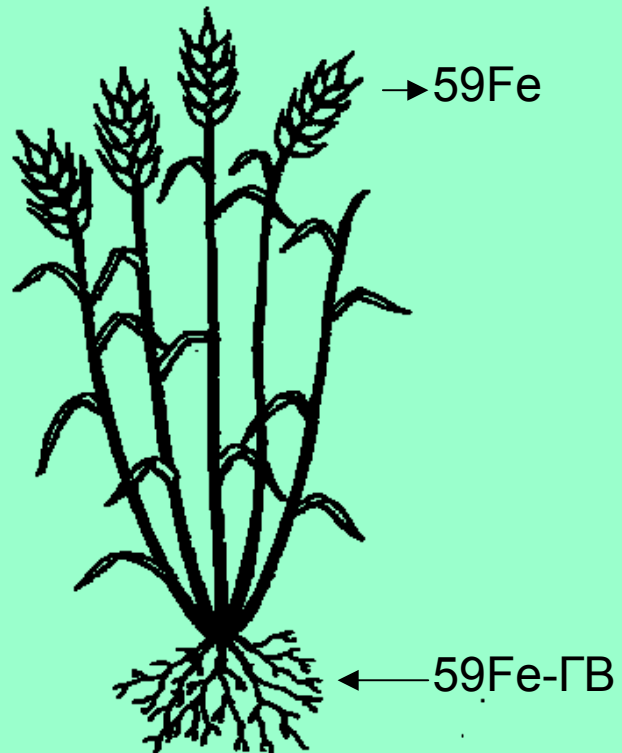


Kulikova et al., Mitigating activity of humic substances: direct influence on biota
In: Use of humic..., NATO Science Series: IV: Earth and Environmental Sciences, Vol. 52, 285-310.

11/64

Биологическая активность ГВ: минеральные элементы

▶ Железо



Фокин, 1975



Соркина, 2010

ГВ как питательные вещества: основные особенности

- В условиях недостатка питательных элементов использование ГВ происходит более интенсивно
- Разложение ГВ микроорганизмами может включать как процессы, катализируемые энзимами, так и неэнзиматические реакции
- В условиях долговременных экспериментов может происходить не только биodeградация ГВ, но и их синтез *de novo*

ГВ как питательные вещества: направления исследований

- Использование ГВ как источников С и N не микроорганизмами
- Включение ГВ в конкретные циклы основных процессов
- Совместное поступление ГВ с минеральными элементами



Биологическая активность ГВ: гормоноподобная активность

➤ Самая ранняя гипотеза

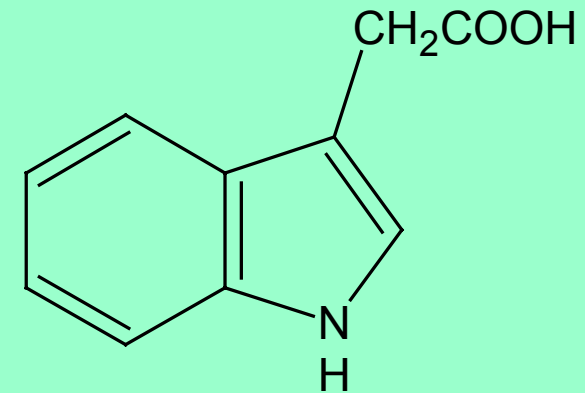
- Bottomley, 1917
- Hillitzer, 1932

➤ Подтверждается:

- Увеличением активности ИУК оксидазы
- Связыванием с ИУК рецепторами

➤ Не подтверждается:

- Низкой активностью ГВ
- Содержанием полиаминов в ГВ



15/64

Гормоноподобная активность ГВ: основные особенности

- Наблюдается высокое сходство с действием гормонов на клеточном уровне
- Эффективность ГВ снижается при переходе от клеточного к организменному уровню

16/64

Гормоноподобная активность ГВ: направления исследований

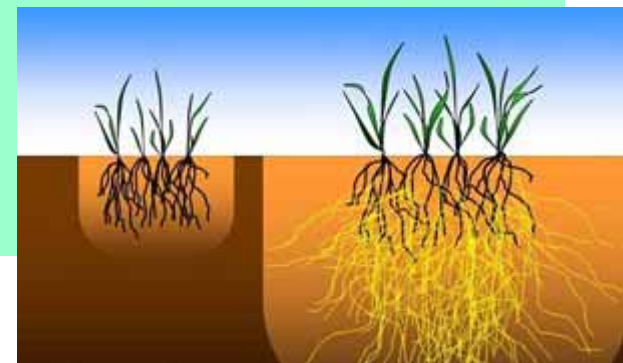
- Сравнительный анализ действия растительных гормонов и ГВ на организменном уровне
 - протеомика
 - метаболомика



17/64

Усиление поступления питательных веществ

- Данные противоречивы
- Наиболее ярко проявляется в условиях стресса



18/64

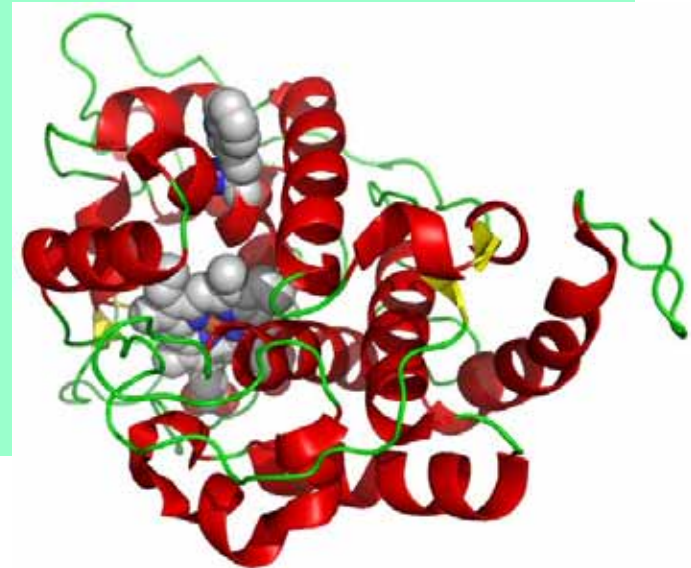
Усиление поглощения веществ: направления исследований

- Создание базы данных по эффектам и ее анализ
- Выявление зависимостей от условий



Биологическая активность ГВ: взаимодействие с энзимами

- Образование комплексов с энзимами
- Использование ГВ как субстратов



20/64

Взаимодействие ГВ с энзимами: основные особенности

- Изучено преимущественно взаимодействие с экстрацеллюлярными ферментами
- Влияние зависит от свойств ГВ

21/64

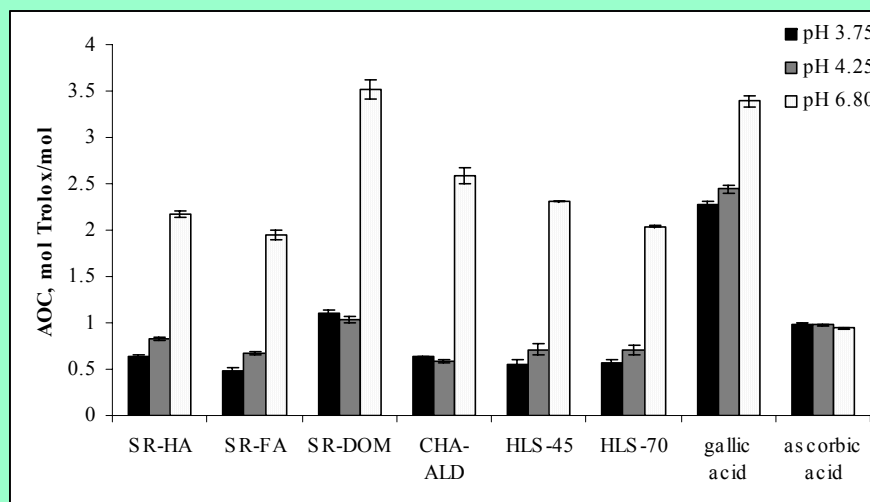
Взаимодействие ГВ с энзимами: направления исследований

- Создание базы данных по взаимодействию ГВ с энзимами и ее анализ



Биологическая активность ГВ: антиоксидантная активность

- Является доказанной при изучении на молекулярном уровне



- Нет данных по влиянию на клеточном и организменном уровне

23/64

Антиоксидантная активность ГВ: направления исследований

- Создание адекватных систем тестирования *in vivo*

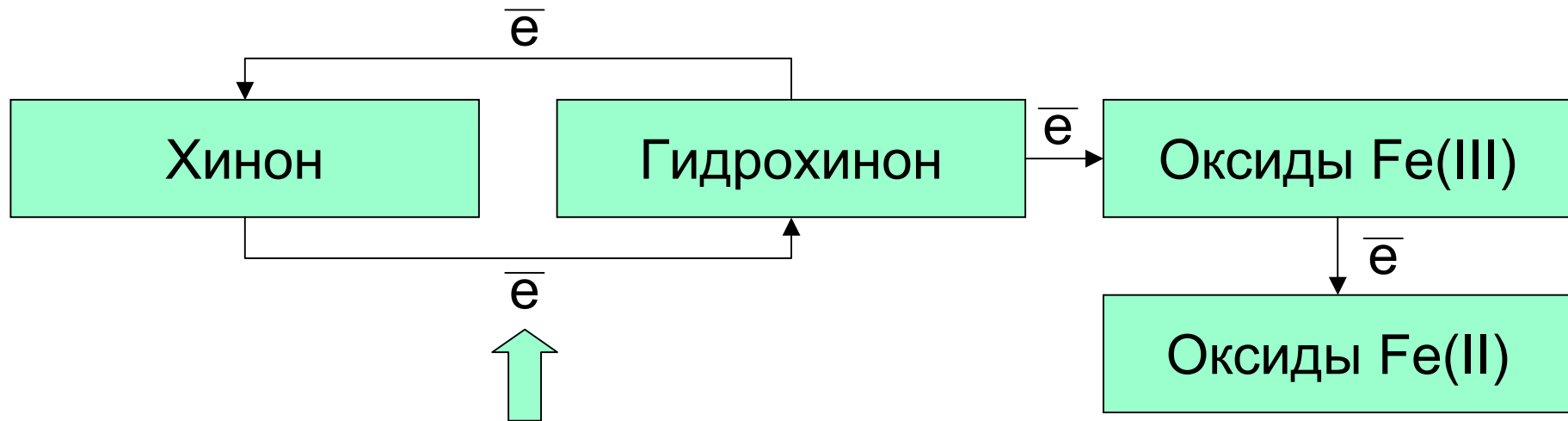


Биологическая активность ГВ: гумус как редокс соединения

- Железовосстанавливающие бактерии сем. *Geobacteraceae* (Lovely et al., 1986)
- Ферментирующие бактерии *Propionibacterium freudenreichii*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus cecorum* (Benz et al., 1998)
- Хлоропласты (Кулик, 1980)

25/64

ГВ как редокс соединения: *Geobacteraceae*

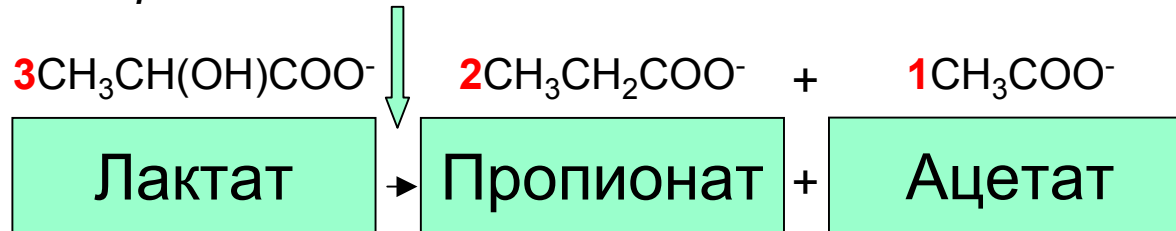


Lovley & Phillips. 1986. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:683–689.

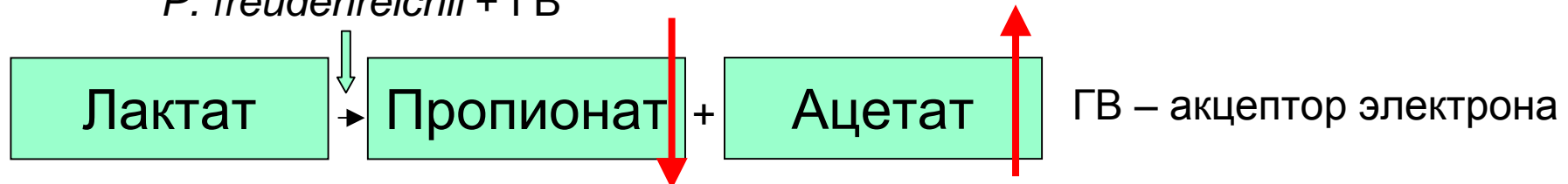
★ ГВ ускоряют перенос электрона к Fe(III)

ГВ как редокс соединения: ферментирующие бактерии

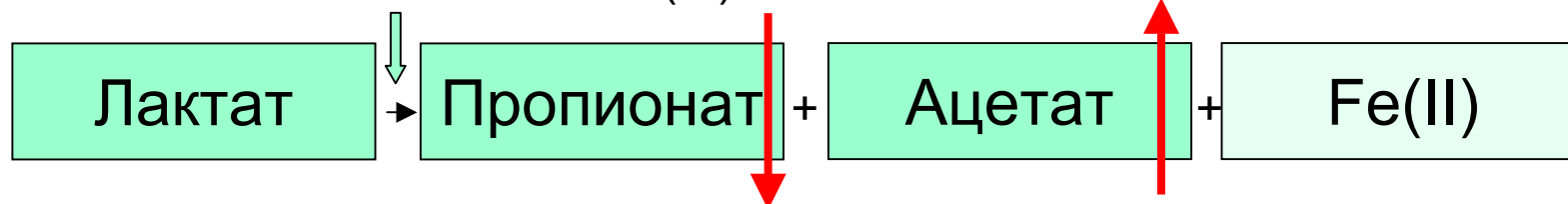
Propionibacterium freudenreichii



P. freudenreichii + ГВ



P. freudenreichii + ГВ + Fe(III)

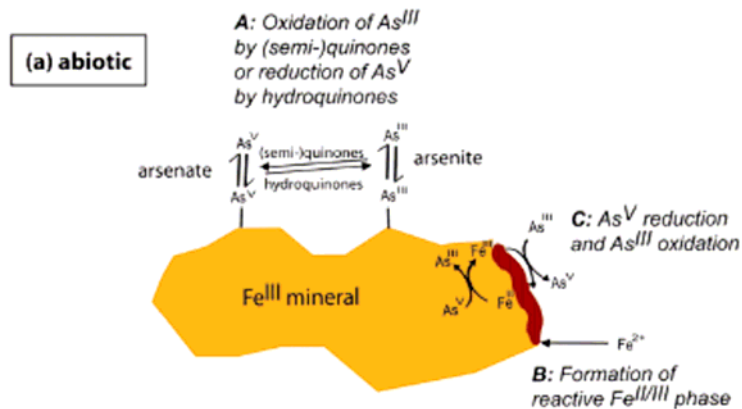


Benz et al., 1998. Humic Acid Reduction by...
Appl. Environ. Microbiol. 64:4507-4512.

★ ГВ выступают в качестве переносчика электрона

27/64

ГВ как редокс соединения: распространенность в природе



➤ Мышьяк

➤ Уран

➤ Толуол

➤ Азокрасители

➤ Полихлорированные ОВ

➤ Нитроароматические ОВ

Borch et al., 2010. Humic Acid Reduction by...
Appl. Environ. Microbiol. 64:4507-4512.

★ ГВ выступают в качестве переносчика электрона
для очень широкого круга соединений

Механизмы действия ГВ: ну что сказать???

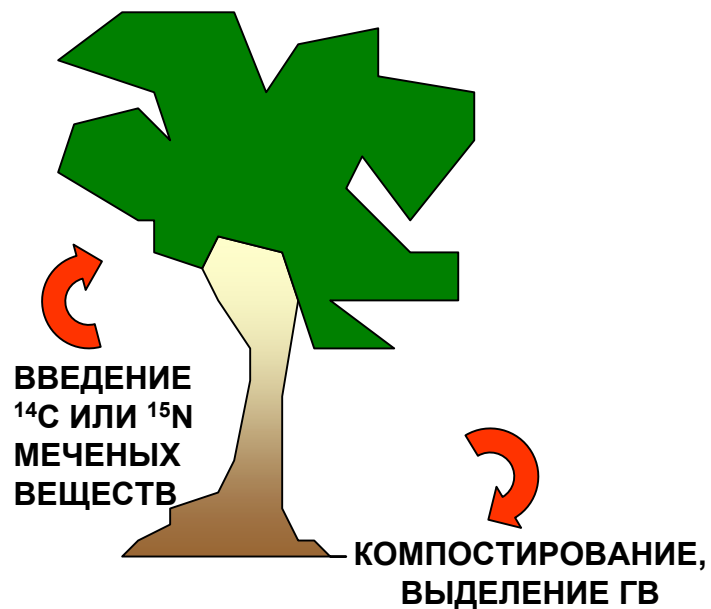
- ▶ Действие ГВ разнообразно
- ▶ Действие ГВ бимодально
- ▶ Эффективность действия снижается в ряду: органеллы > клетки > организм

Механизмы действия ГВ: пути решения

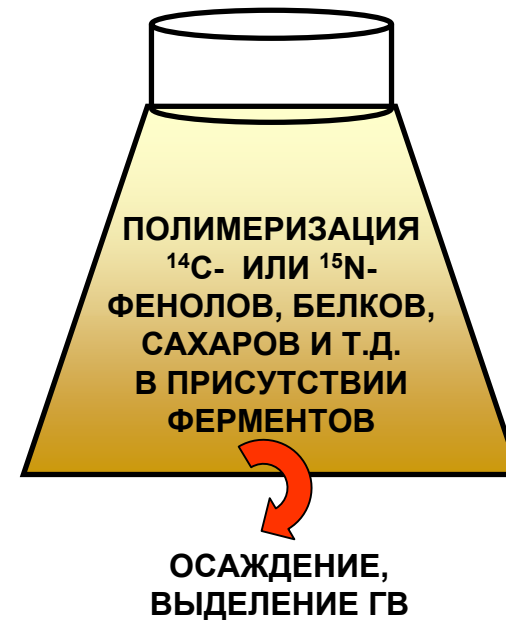
- Проблема поступления ГВ в организмы
 - Поступают ли вообще?
 - Если поступают, то как распределяются?
 - Если поступают, то какая фракция?
- Поиск новых путей исследования
 - Протеомика
 - Метабономика
 - Транскриптомика

Получение меченых аналогов ГВ

Выделение
из меченого
субстрата

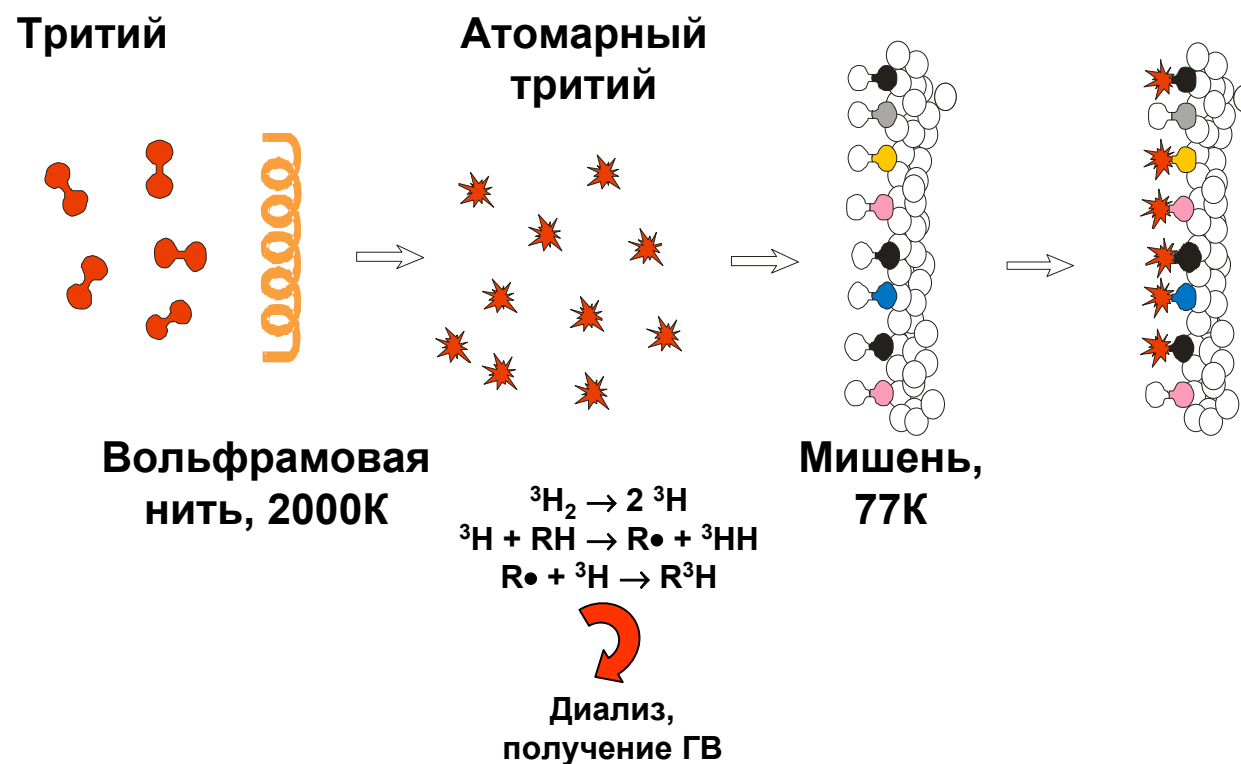


Синтез из
мономеров



^{14}C или ^{15}N аналоги гуминовых веществ

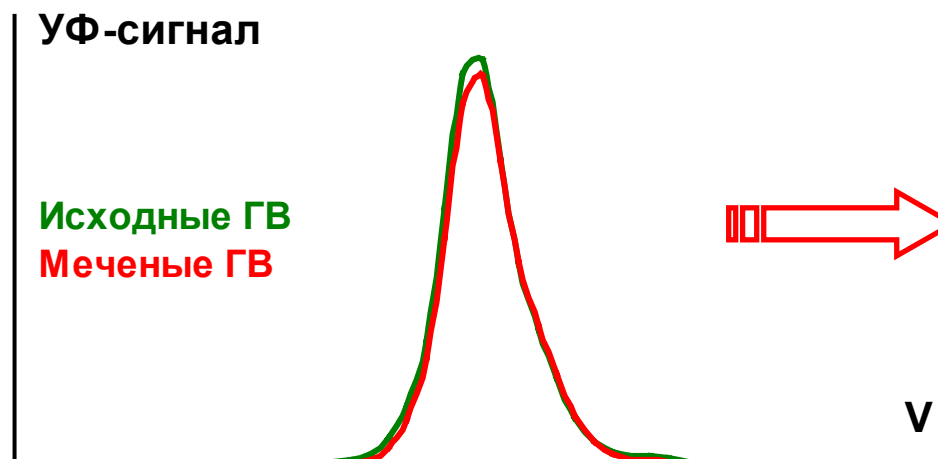
Получение меченных тритием ГВ



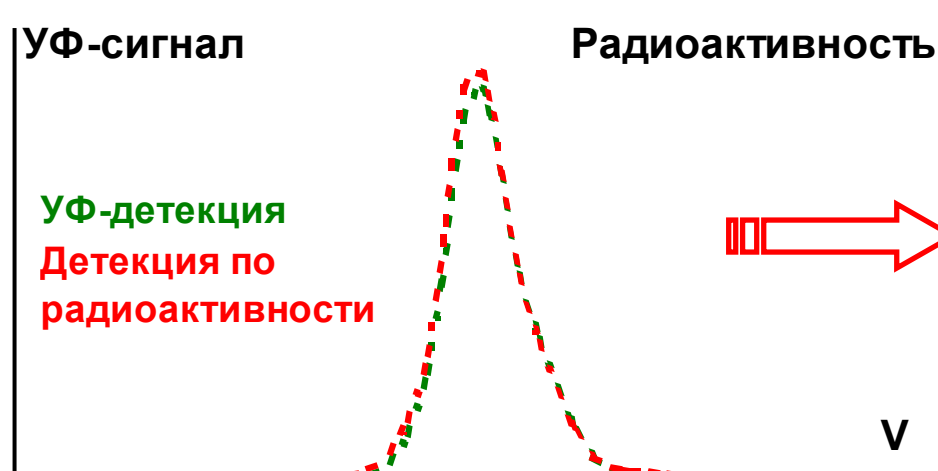
³H гуминовые вещества

Схема получения
тритированных препаратов
любезно предоставлена
Г.А. Бадуном

Гель-хроматография меченых ГВ



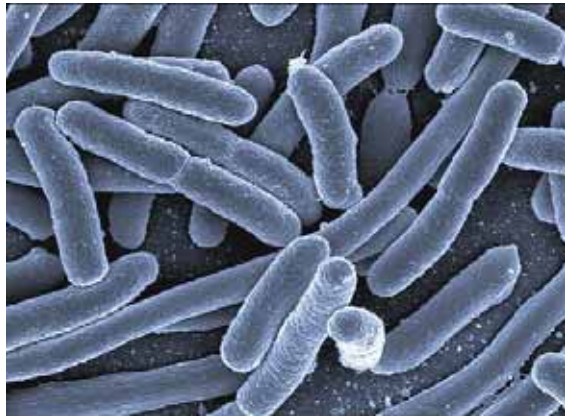
Меченые ГВ идентичны
исходным



Метка распределена
равномерно

Поступление ГВ в живые организмы

Кишечная палочка
Escherichia coli



Поглощение:
45-655 мг/кг
Поступление в клетки:
~10%

Базидиомицеты
Trametes maxima



Поглощение:
105-140 мг/кг
Поступление в клетки:
~10-40%


Пшеница мягкая
Triticum aestivum



Поглощение:
20-900 мг/кг
Поступление в клетки:
?%


★ Поглощение ГВ достоверно установлено


Распределение ГВ в живых организмах


 Растения


 Животные


 Микроорганизмы


 Накопление в
меристематических
тканях

 Распределение
внутри клетки
неизвестно

 ???

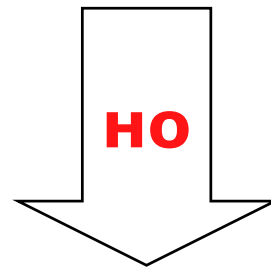
 Преимущественная
аккумуляция в
мембране

 Распределение
внутри клетки
неизвестно

 Данные о распределении малоинформативны

Гуминовые вещества – какая фракция поступает?

Гуминовые вещества поступают
в живые организмы

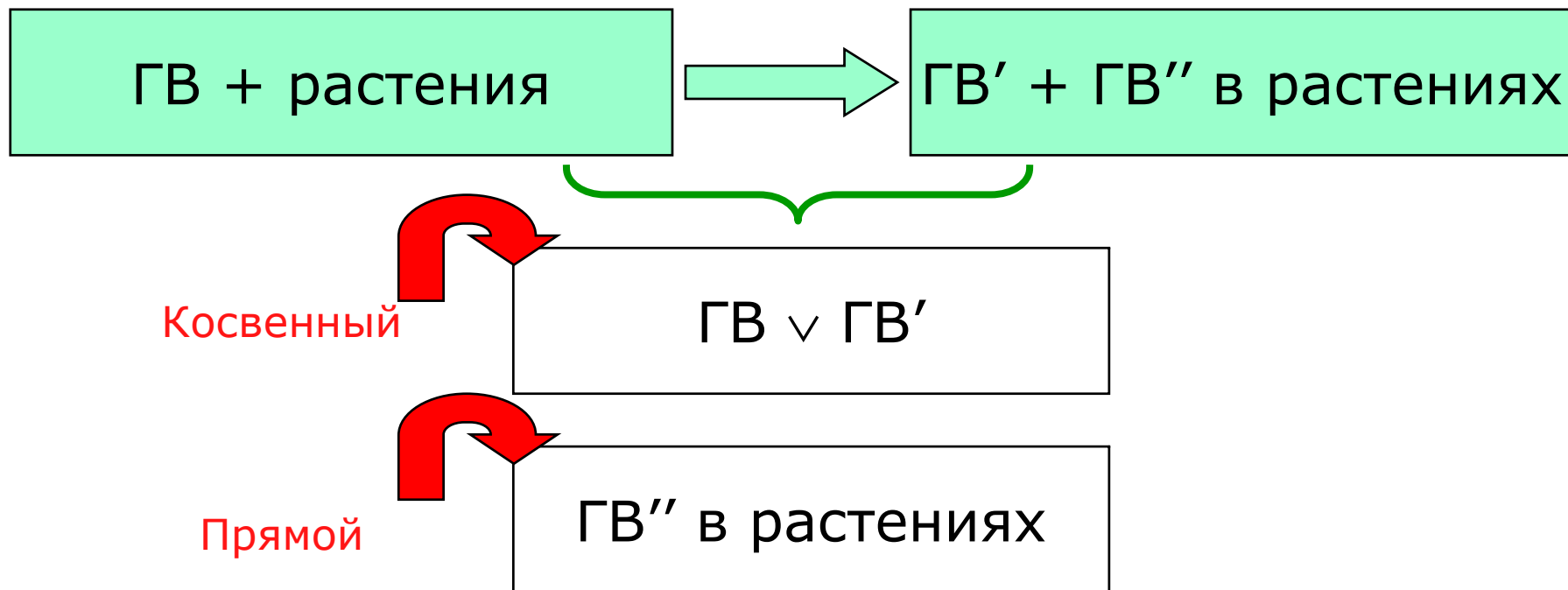


Что является действующим началом?

★ Необходимо определение «формы существования»
ГВ в живых организмах

36/64

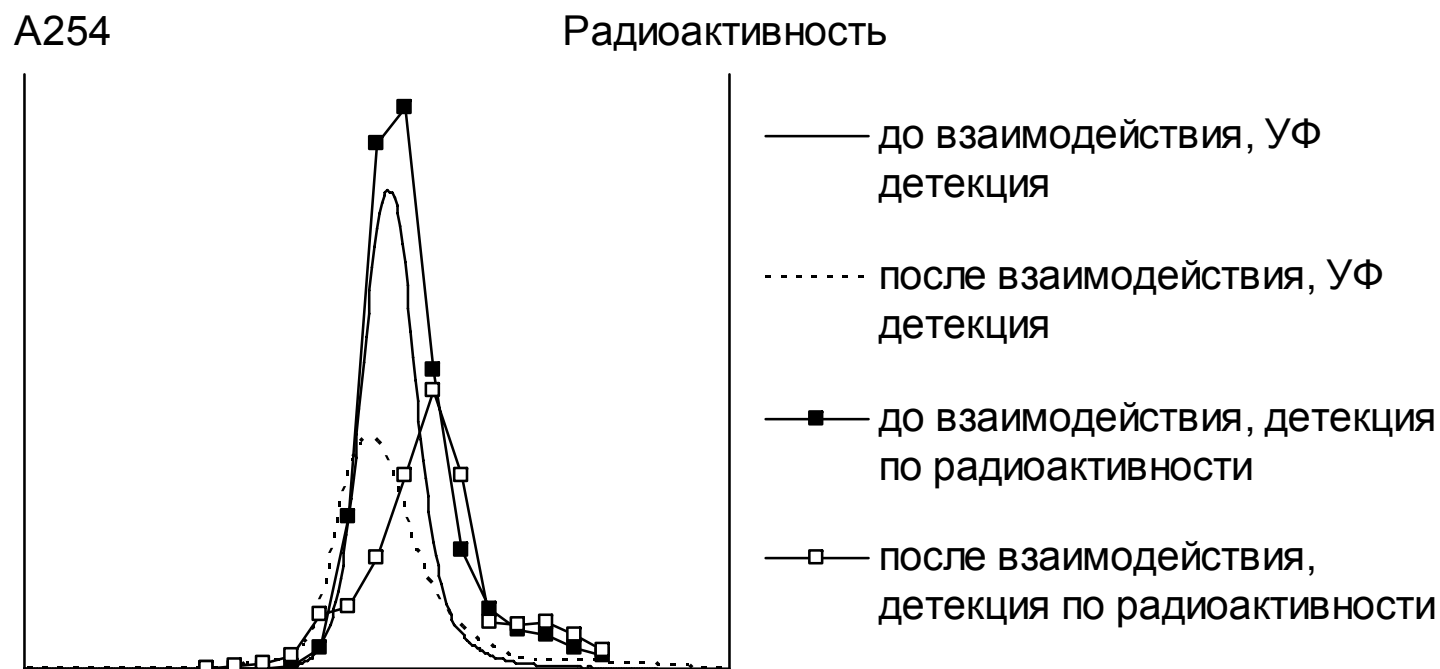
Основные подходы к изучению ГВ в растениях



- Слишком незначительное поглощение
- Возможная модификация в организме

★ Использование прямых методов предпочтительнее

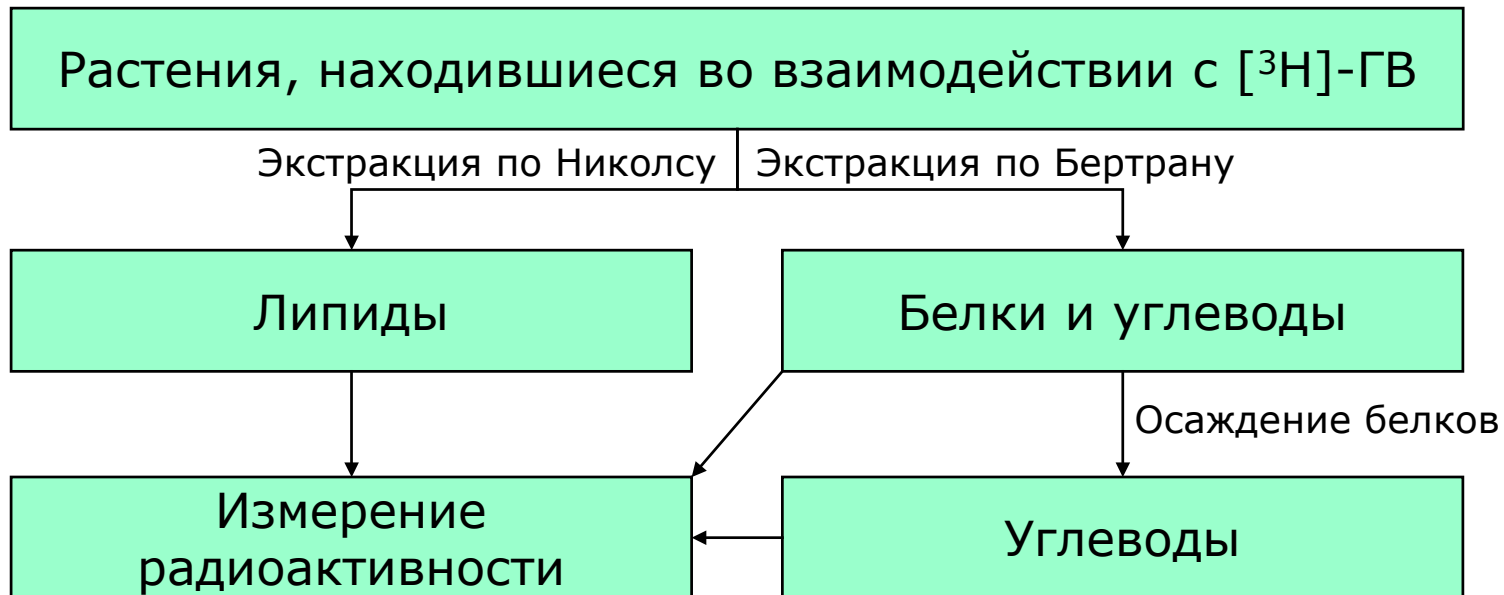
Гель-проникающая хроматография ГВ



M_w уменьшается в $1,06 \pm 0,03$ раза

★ ГПХ не позволяет дать однозначный ответ...

Распределение ГВ по основным соединениям



Распределение ГВ по различным фракциям

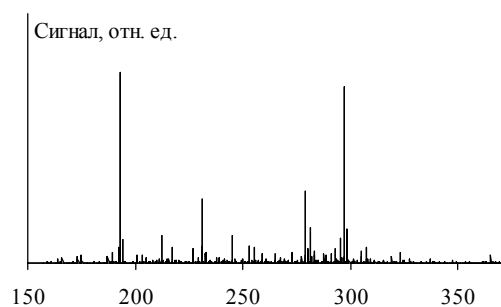
Липиды	Белки	Углеводы
10-90%	15-60%	2-13%

★ ГВ обнаруживаются везде, но преимущественная аккумуляция наблюдается в липидах

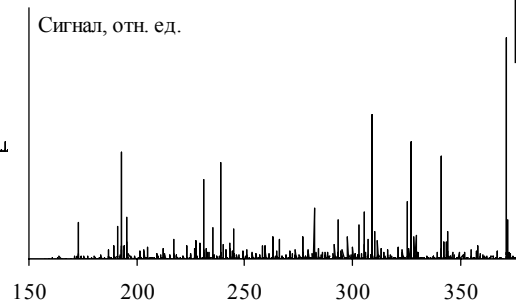
ГВ в растениях – МС ИЦР с Фурье преобразованием

Условия определения:

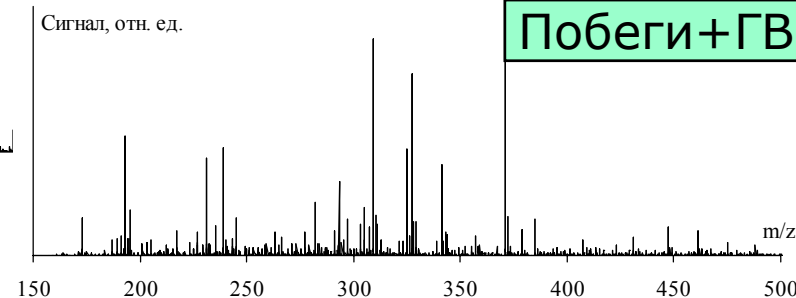
- Экстракция метанолом
- Ионизация электроспреем
- Магнитная ловушка 12 Тл
- Диапазон определяемых масс 15-2000 Да



ГВ



Побеги



Побеги+ГВ

Снижение
 $C_{18}H_{30}O_x?$

★ В растениях, взаимодействовавших с ГВ, никаких принципиально новых соединений не образуется

ГВ в растениях – МС ИЦР с Фурье преобразованием

Обработка спектров программой FIRAN

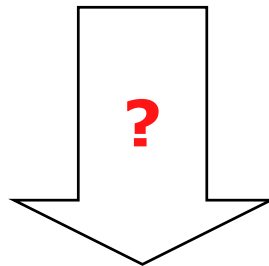
- ▶ Меченый ион содержит только один атом трития
- ▶ Для каждого меченого иона существует немеченый аналог, содержащий один атом ^{13}C вместо ^{12}C (данное предположение использовали для поиска заряда ионов путём расчёта разницы масс между двумя немечеными ионами)
- ▶ Для каждого меченого иона есть аналогичный немеченый ион, состоящий из ^{12}C , ^1H , ^{16}O и ^{14}N
- ▶ Меченый ион должен присутствовать в экстрактах растений, взаимодействовавших с $[^3\text{H}]$ -ГВ, но должен отсутствовать в растениях, взаимодействовавших с немечеными ГВ

★ Результаты, получаемые методом МС ИЦР, напрямую зависят от способа обработки

ГВ в растениях – МС ИЦР с Фурье преобразованием

Обнаруженные соединения:

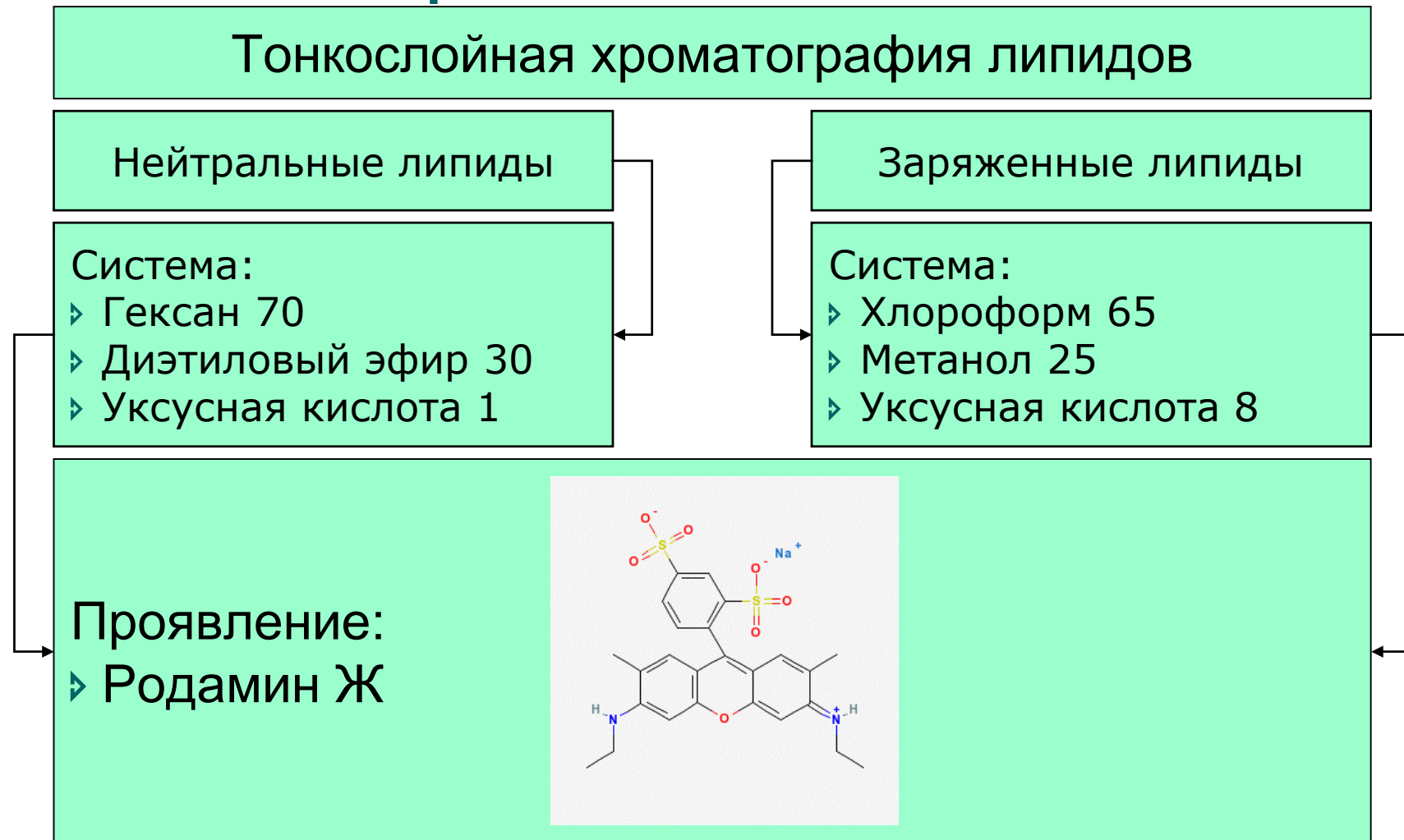
- ▶ $C_{18}H_{32}O_2$ – линолевая кислота?
- ▶ $C_{14}H_{24}O_2$ – продукт распада липидов?



Содержат ли ГВ эти соединения?
Являются ли эти соединения продуктами метаболизма?

*** Необходимо проведение дополнительных экспериментов**

ГВ в липидной фракции растений: ТСХ



Гуминовые вещества в липидной фракции растений

Тонкослойная хроматография липидов

Нейтральные липиды

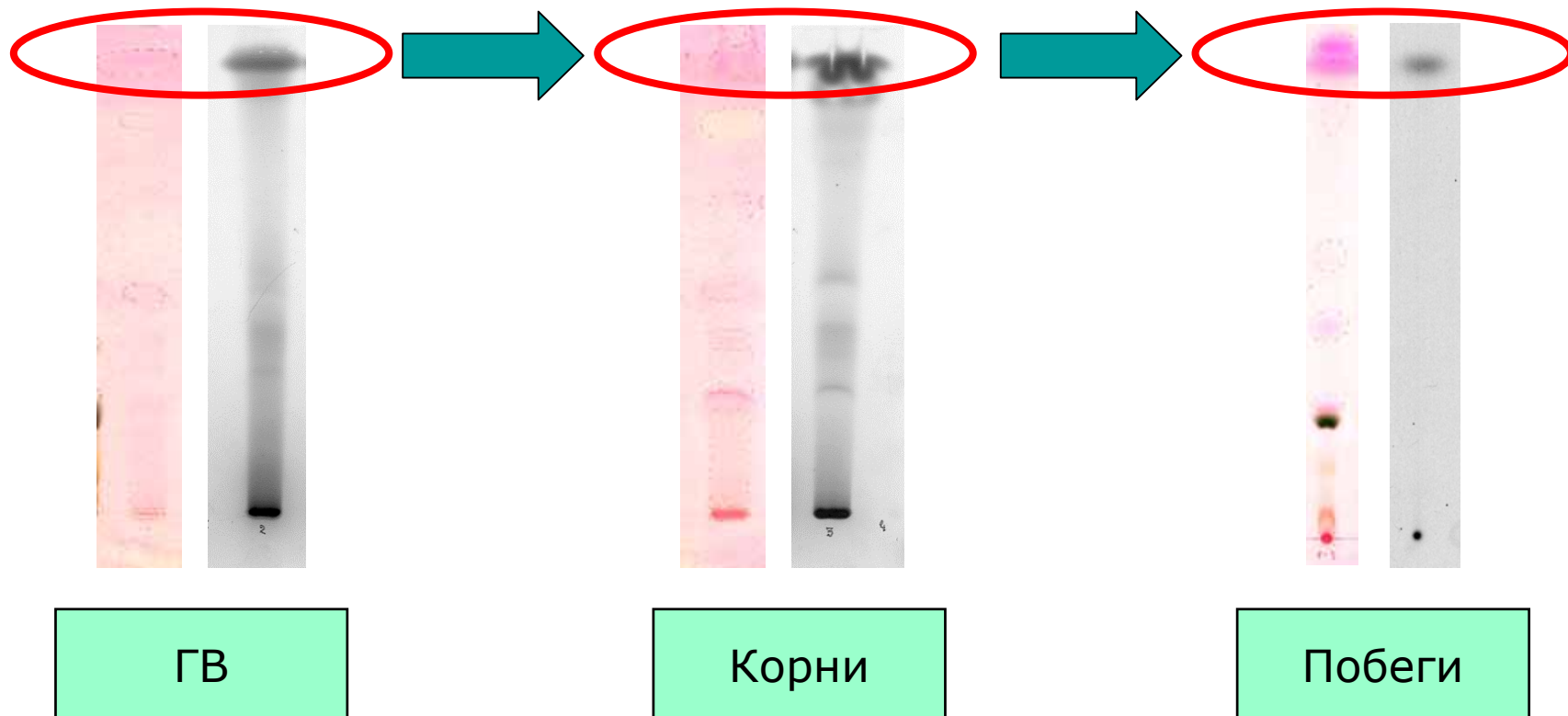
Заряженные липиды



★ ТСХ не позволяет дать однозначный ответ...

Гуминовые вещества в липидной фракции и растений

Тонкослойная хроматография нейтральных липидов

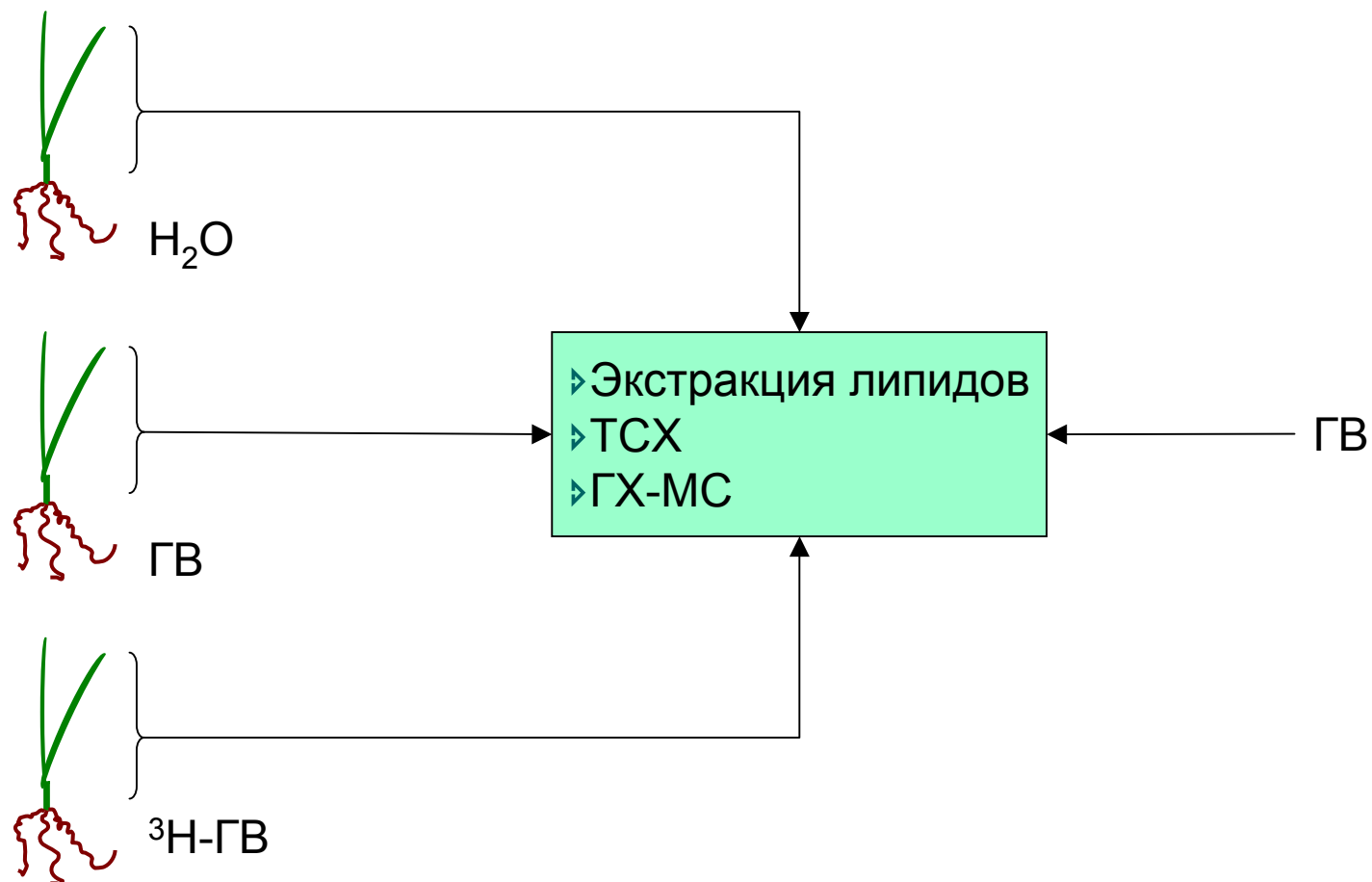


★ В ГВ содержится фракция, сходная по свойствам с пигментами и неполярными углеводородами

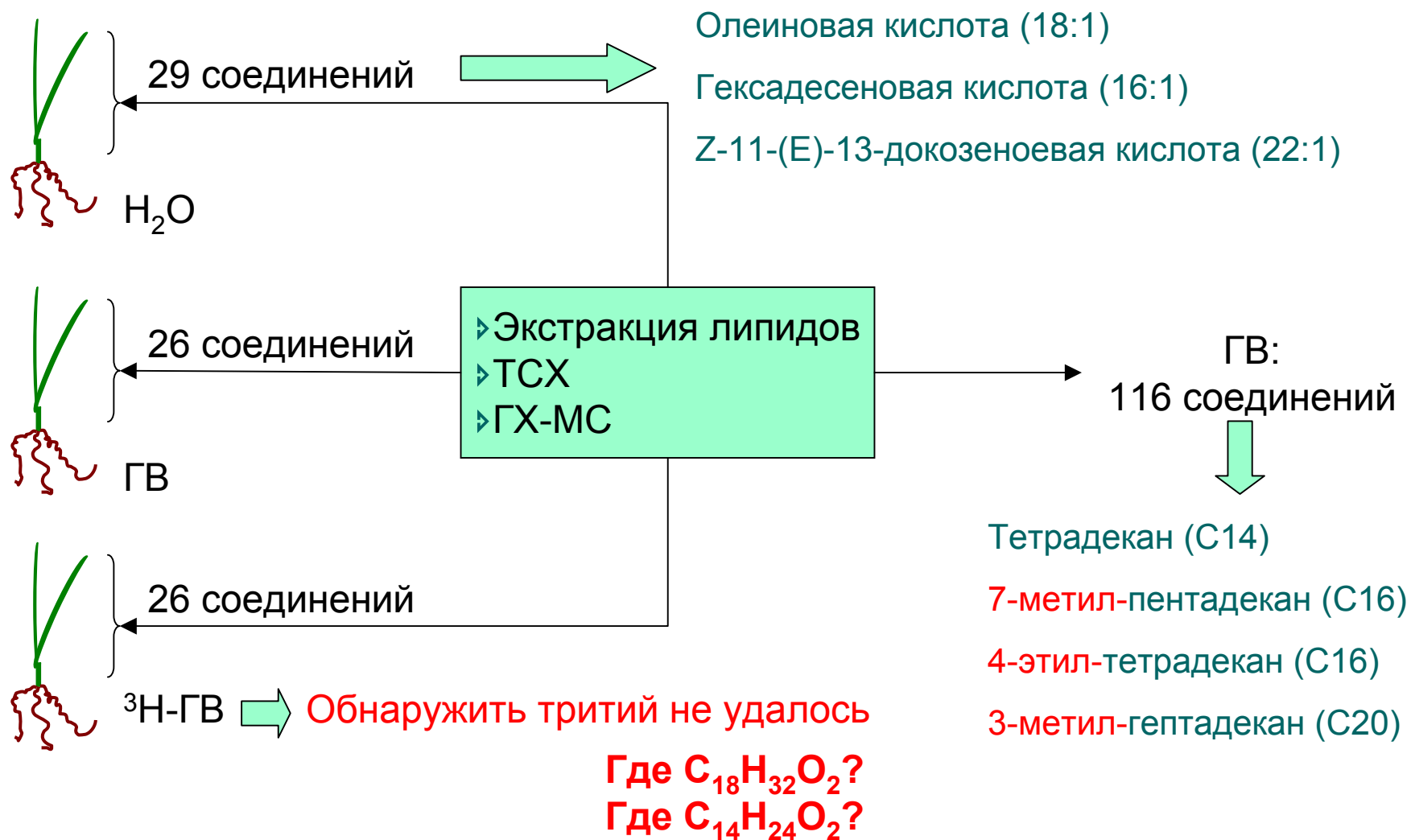
ГВ в растениях – ТСХ-ГХ МС

- ▶ Regasus 4D (LECO)
- ▶ Энергия ионизации 70 эВ
- ▶ Силиконовая колонка DB-5 (30 м)
- ▶ Температурный режим:
50°C (2 мин.) – 20°C/мин –
280°C (10 мин.)
- ▶ Сканируемые массы 29-450 Д

ГВ в растениях – ТСХ-ГХ-МС



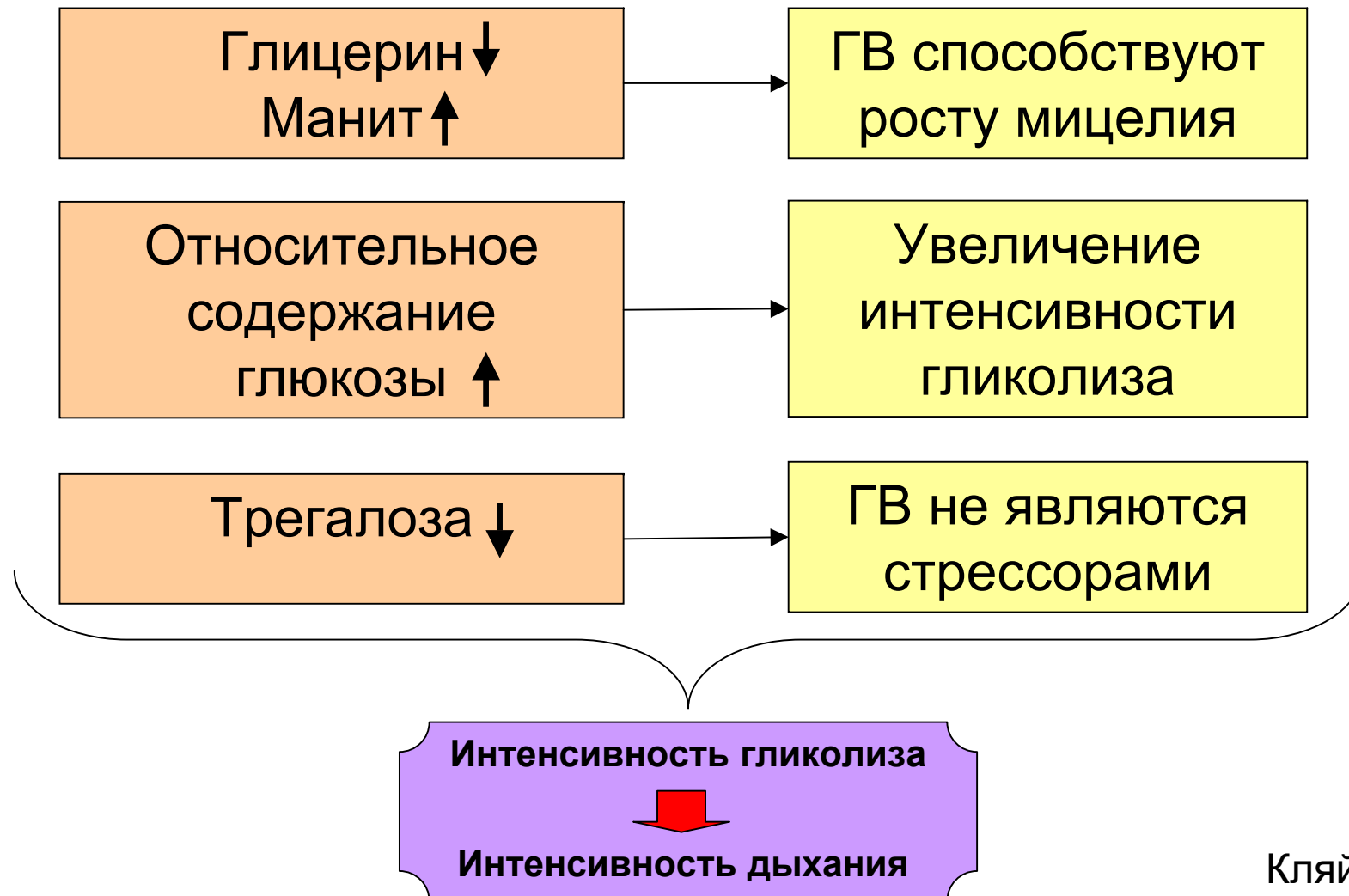
ГВ в растениях – ТСХ-ГХ-МС



★ Пока все непонятно

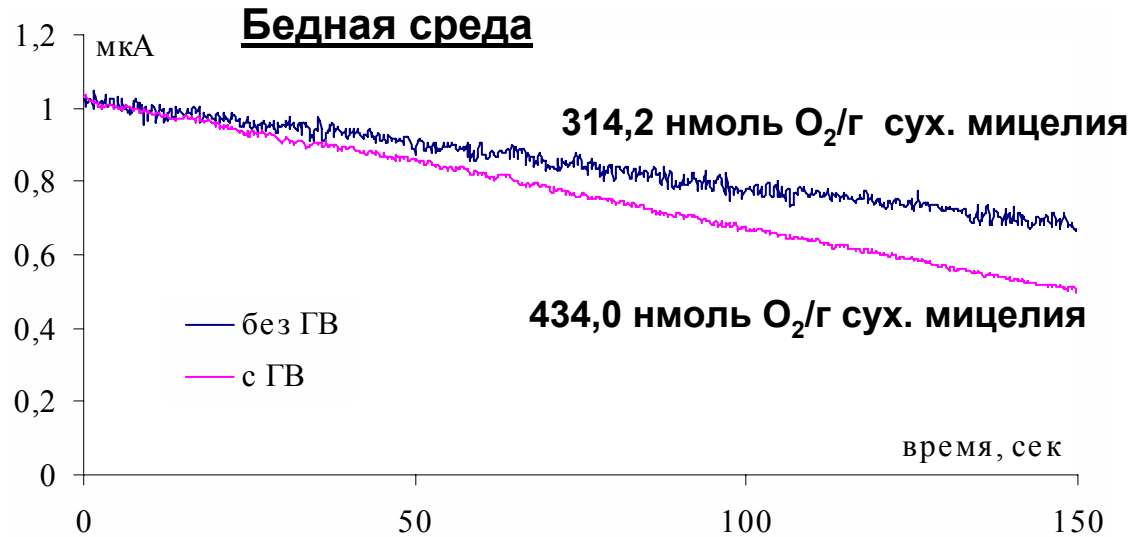
Оценка влияния ГВ с помощью метабономических подходов: грибы

Влияние ГВ на содержание углеводов в цитозоле базидиомицетов



Оценка влияния ГВ с помощью метаболических подходов: грибы

Влияние ГВ на интенсивность дыхания базидиомицетов

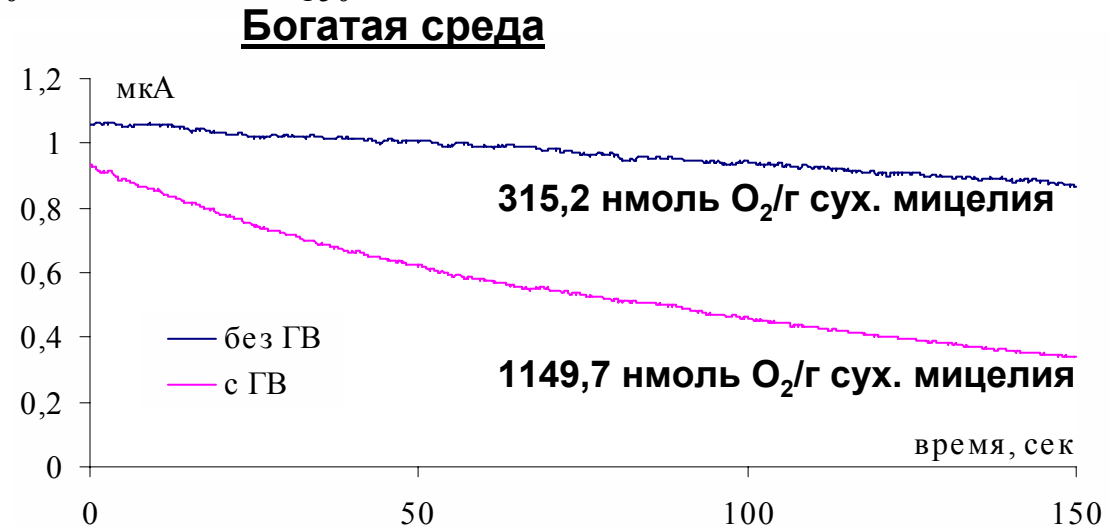


Бедная среда

Добавление ГВ:
активация дыхания в
1,5 раза

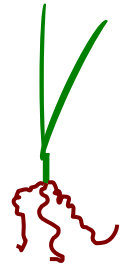
Богатая среда

Добавление ГВ:
активация дыхания в
3,6 раз



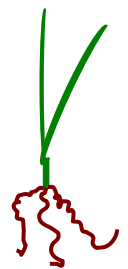
Оценка влияния ГВ с помощью метаболомических подходов: растения

Влияние ГВ на содержание углеводов в цитозоле проростков пшеницы



H₂O

▶ Экстракция сахаров
 ▶ Очистка
 ▶ ГЖХ



NaCl

	Углеводы, %	
	Без ГВ	С ГВ
	Норма	
Корни	0,22	0,22
Побеги	0,23	0,22
	NaCl стресс	
Корни	3,79	4,79
Побеги	1,09	0,92

▶ Глюкоза

▶ Сахароза

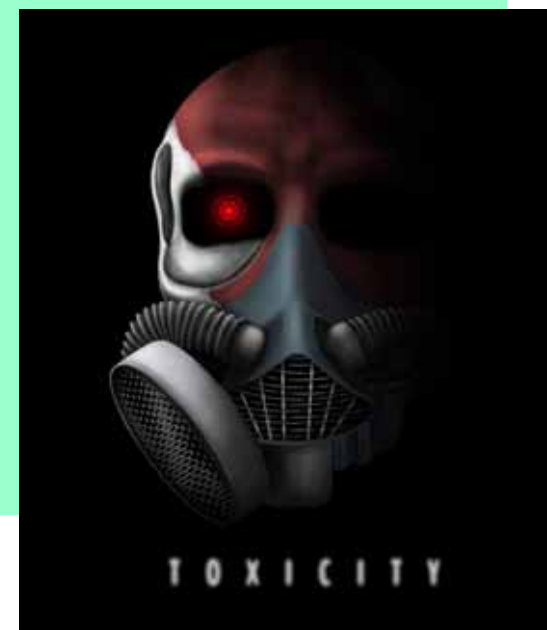
▶ Маннит

▶ Глюкоза

★ Метаболомический подход – очень перспективный

Токсичность ГВ

- Показана для представителей всех царств живых организмов



Антивирусная активность ГВ: мишени

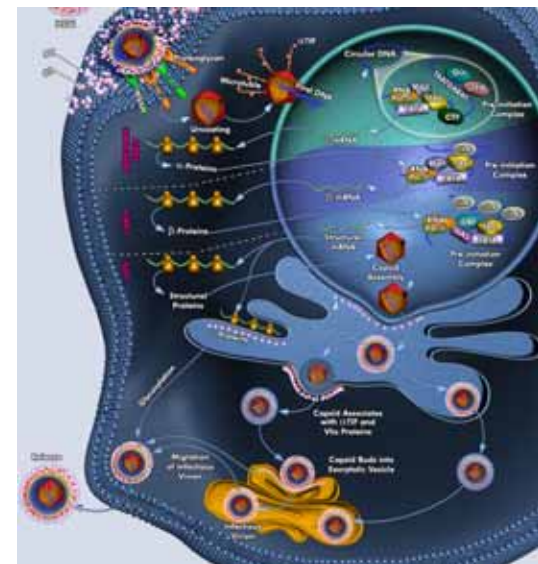
- Вирусы герпеса (HSV-1; HSV-2)
- Коксаки-вирусы
- Вирус папилломы человека
- Вирус СПИДа
- Вирусы гепатита
- Вирусы гриппа



53/64

Антивирусная активность ГВ: количественные данные

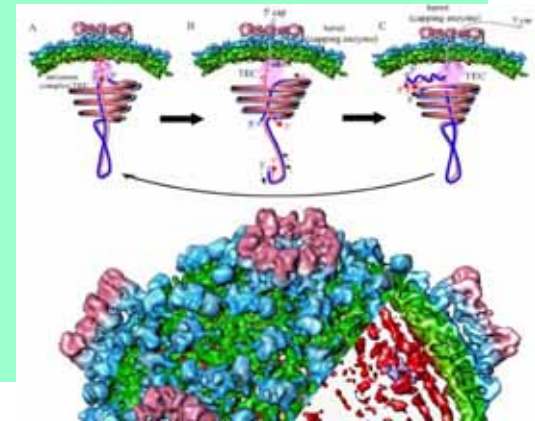
Вирус	IC50, мг/л	IC99, мг/л
HSV-1	4,5-23	36-79
HSV-2	11-17	31-77



Laub Developing Humates with Anti-HIV, HSV, HPV and Other Antiviral Activity,
Antiviral Agents Bulletin, 2000, 13

Антивирусная активность ГВ: механизмы

- Предотвращение прикрепления вирусов к клетке
- Блокировка транскрипции вирусов
- Предотвращение пост-транскрипционных процессов



Антимикробная активность ГВ : микроорганизмы

- ▶ Анаэробные (*Actinomyces bovis*, *Bacteroides fragilis*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus anaerobicus*, *P. productus*, *Propionibacterium acnes*, *Clostridium perfringens*, *C. difficile*, *C. septicum*)
- ▶ Аэробные (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*)
- ▶ Грибы (*Candida albicans*, *C. Glabrata*)

Антимикробная активность ГВ : количественные данные

Микроорганизм	Минимальная ингибирующая концентрация, мг/л		
	ГВ	ГК	ФК
Аэробные	300	300	150
Анаэробные	600	300	300
Грибы	600	>600	600

Токсичность ГВ для человека: заболевания

- ▶ Болезнь черной ноги
- ▶ Болезнь Кашина-Бека
- ▶ Нарушение функций щитовидной железы
- ▶ Рак

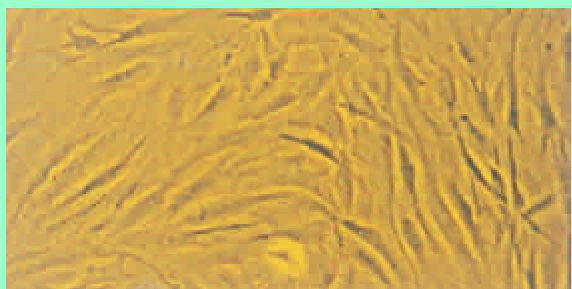
Токсичность ГВ для человека: количественные данные

Заболевание	Потребление
Болезнь черной ноги	400 мг/день

Токсичность ГВ для человека: механизмы

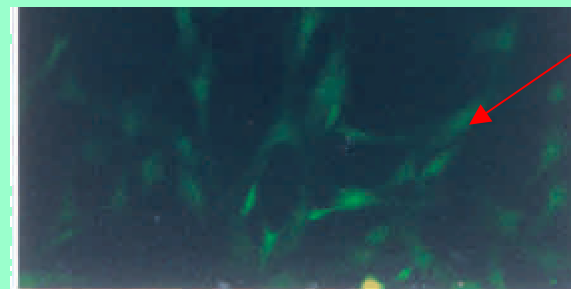
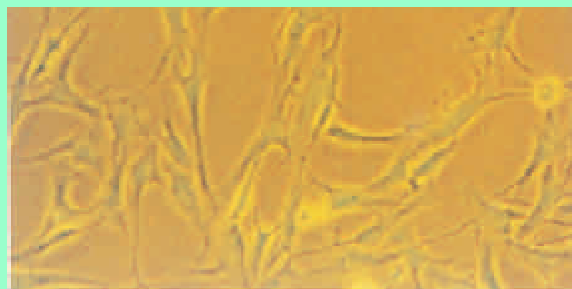
➤ Прооксидантная активность

Обработка клеток ацетатом дихлорфлуоресцина



Контроль

Дихлор-
флуоресцеин



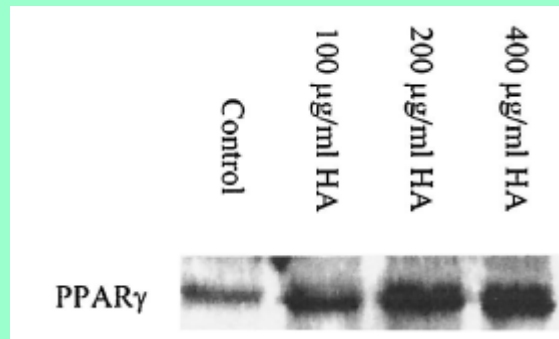
Aldrich, 100 мг/л

Предварительная обработка клеток витамином Е
снижает токсичность ГВ

Токсичность ГВ для человека: механизмы

➤ Фактор проатеросклероза

Обработка клеток линии HL-60 ГВ Aldrich, 24 ч



→ Усиление выработки клетками PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) – стимулирование поглощения глюкозы и жиров, дифференциация клеток

Увеличение экспрессии CD36 в 15 раз

→ Усиление поглощения ox-LDL (oxidized low density lipoprotein) – начальная стадия образования атеросклеротических бляшек

Huang et al., Humic Acid Induces the Expression of...,
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2003, 71, 429–436

★ ГВ могут выступать в качестве фактора проатеросклероза

Токсичность ГВ для человека: методологические проблемы

- Используется только Aldrich
- Схема «очистки» ГВ нетрадиционна и включает в себя многократную обработку концентрированными кислотами и щелочами
- Проблема учета мешающего действия ГВ при проведении аналитических процедур

Токсичность ГВ для человека: направления исследований

- Выбор, оптимизация и стандартизация методик
- Расширение выборки препаратов

63/64

Биологическая активность ГВ: что делать?

- Проведение систематизации существующих данных
- Стандартизация используемых методов
- Разработка новых подходов к изучению



64/64

- ▶ Спасибо
- ▶ За
- ▶ Терпение!

