

О. Я. Іванишин<sup>1</sup>, О. С. Яремкевич<sup>1</sup>, І. В. Семенюк<sup>2</sup>, О. В. Карпенко<sup>1,2</sup>, Н. Я. Монька, В. І. Лубенець<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Національний університет “Львівська політехніка”,

кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

<sup>2</sup>Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л. Литвиненка НАН України

yaremkevych.os@gmail.com

## АНТИОКСИДАНТНИЙ ВПЛИВ ГУМІНОВИХ КИСЛОТ НА ГЕПАТОЦИТИ ЩУРА

<https://doi.org/10.23939/ctas2021.02.064>

Отримано гумінові кислоти з різних природних джерел (з біогумусу, з чорнозему Тернопільської області, з торфів районів Великого Любіня, Дрогобича та Республіки Білорусь). Методами титриметричного аналізу визначено кількісний склад функціональних груп отриманих гумінових кислот, які мають кислі властивості. За даними термогравіметричного аналізу розраховано значення коефіцієнтів, що показують співвідношення їх аліфатичної частини до циклічної. Встановлено, що всі отримані гумінові кислоти виявляють антиоксидантні властивості: спостерігається зниження вмісту тіобарбітурат-активних продуктів і карбонільних груп протеїнів у гепатоцитах печінки щура. Утворення продуктів вільнорадикального пошкодження ліпідних компонентів та протеїнів найкраще інгібували 1%-ві розчини гуматів з біогумусу та гумінових кислот з торфу. Це свідчить про їхні перспективи для розроблення засобів відновлення фізіологічних функцій біологічних об'єктів за патологічних станів в умовах вільно-радикального стресу.

**Ключові слова:** гумінові кислоти, антиоксидантні властивості, тіобарбітуратактивні продукти, окисна модифікація білка.

### Вступ

Гумінові речовини (ГР) – це особлива група органічних сполук, походження яких пов'язане з процесами біохімічного розкладання та перетворення рослинних залишків (листя, коріння, гілки, стебла), а також залишків тварин та мікроорганізмів. Вони утворюються і нагромаджуються в ґрунтах та до їх складу входять гумінові кислоти (ГК), фульвокислоти (ФК), солі цих кислот – гумати і фульвати, а також гуміни – стійкі до розкладання сполуки ГК і ФК з ґрунтовими мінералами [1].

За хімічною структурою гумінові кислоти – це високомолекулярні гідрооксикарбоніві ароматичні кислоти (часто містять також карбонільні й метоксильні групи), які утворюють солі – гумати. Припускається, що в гумінових кислотах бурого вугілля основою структури є система із двох-трьох ароматичних ядер, що включають гетероцикли, які містять кисень, азот і сірку, а гумусові кислоти вивіреного кам'яного вугілля мають

більш конденсовану структуру й менше бічних ланцюгів [2].

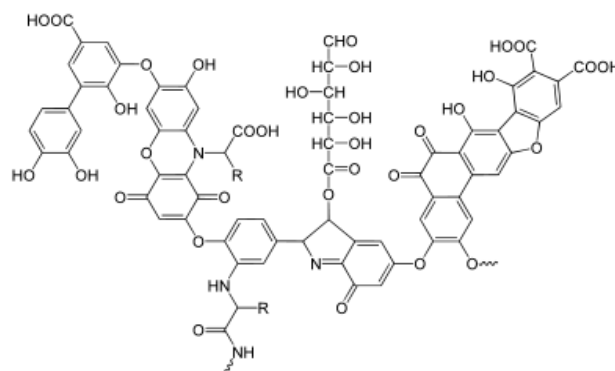


Рис. 1. Структурна формула гумінових кислот

Властивості ГК змінюються в широких межах. Їхня молекулярна маса у водних розчинах коливається від 1000 до 1400, а кількість функціональних груп перебуває в таких межах: карбоксильні – до 4, гідроксильні – до 4, карбоніли – 1, етерні групи – до 2, подвійні зв'язки – 1 [3].

Гумінові речовини за розчинністю у воді та етанолі діляться на фульвокислоти, гумінові кислоти, гематомеланові та гумусові кислоти. ФК і ГК розчиняються у воді, гематомеланові кислоти – в етанолі, а гумусові – нерозчинні у воді і в етанолі [4].

Гумінові речовини є нетоксичними, в організмі швидко метаболізуються та проявляють низку біологічних властивостей. Найбільше досліджень присвячено імунотропним властивостям ГК та їх впливу на підвищення загальної резистентності організму [5, 6]. Посилення загального регуляторного механізму імунного гомеостазу здійснюється під впливом нейрогуморальних-гуморальних перебудов в організмі, що супроводжується відновленням ауторегуляції імунної відповіді з тенденцією до нормалізації порушеної кооперації лімфоїдних клітин [7]. Також гумінові кислоти підвищують загальну резистентність організму за рахунок збільшення рівня адренергічного забезпечення органів імунної системи – через посилення синтезу біогенних амінів (гістаміну, катехоламінів) [8]. За думкою інших дослідників, вплив ГК на неспецифічну резистентність пов'язаний із підвищенням лізоцимної, бактерицидної здатності і нейтрофільної активності крові [9].

Відомі протизапальні властивості гумінових кислот, так, очищений натрій гумат здатний пригнічувати запалення, спричинене гістаміном, серотоніном, брадикініном, простагландином, а також ексудативну і проліферативну фази запалення, що можна порівняти з ефектом еталонного протизапального препарату ортофену [10].

Експериментально доведено здатність гумінових речовин підвищувати ефективність окиснювального фосфорилування та інгібувальну дію на протеолітичні ферменти, які зумовлюють пошкодження стінок судин і шкіри [11, 12], інтерферогенний ефект [13] та антибактеріальну активність [14]. Є дані про активувальний вплив гумінових кислот на метаболізм гормонів, вони активують стероїдогенез у наднирниках і фетоплацентарному комплексі, володіють гонадотропною і тиреотропною дією, стимулюють адаптаційні реакції організму [15, 16].

Антиоксидантні властивості гумінових кислот заслуговують особливої уваги, оскільки їх дія зумовлена низкою структурних особливостей

[15–17]. Доведено, що макромолекули гумінових кислот, які мають у своєму складі фенольні групи, здатні діяти як антиоксиданти. Вони є донорами електронів для вільних радикалів, до того ж останні перетворюються на нейтральні молекули, обриваючи ланцюг вільнорадикальних реакцій, знижуючи кількість продуктів ПОЛ в організмі та запобігаючи деструктуризації клітинних мембран [6].

**Метою** роботи було дослідження впливу гумінових речовин з різних природних джерел (з біогумусу, з чорнозему Тернопільської області, з торфів районів Великого Любіня, Дрогобича та Республіки Білорусь) на процеси пероксидного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків у тканинах печінки щура в умовах ініціювання вільно-радикального окиснення *in vitro*.

#### **Матеріали та методи досліджень**

**Об'єктами** досліджень були гумінові речовини: калій гумати, отримані з біогумусу, що є продуктом переробки (ферментації) органічних відходів технологічними каліфорнійськими хробаками *Eisenia foetida* (ТУ У 13649334022-99) (1 % і 0,55 % розчини) і з чорнозему Тернопільської області (0,55 % розчини), та гумінові кислоти за концентрації 1 %, отримані з чорнозему Тернопільської області (1), з торфу району Великий Любінь (2), з біогумусу за ТУ У 13649334022-99 (3), з торфу району Дрогобича (4), з торфу Республіки Білорусь (5), з промислового препарату калій гумату (Китай) (6).

**Одержання екстрактів гумінових речовин.** Гумінові речовини отримували методом лужної екстракції за методикою, розробленою у Відділенні фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л. Литвиненка НАН України.

Екстракцію ГК проводили 1%-вим розчином калію гідроксиду за постійного перемішування впродовж 30 хв за 50 °С. Твердий залишок відділяли на центрифuzі ULAB (Німеччина) за 5000 об/хв. Одержаний розчин підкислювали 5%-вим розчином хлоридної кислоти до рН < 2. Гумінові кислоти, що випадали в осад, відділяли центрифугуванням (5000 об/хв), очищення ГК проводили шляхом розчинення одержаного осаду в 0,1 М розчині натрій гідроксиду і повторного осадження 0,1 М розчином хлоридної кислоти. Одержаний пов-

торним центрифугуванням осад відфільтровували через паперовий фільтр, промивали дистильованою водою до від'ємної проби на хлорид-йони, очищений осад висушували за 40–50 °С до постійної маси. Досліджувані препарати – гумати калію отримували шляхом розчинення порошку ГК в 0,1 % розчині калію гідроксиду. Для одержання водного розчину ГК порошок ГК розчиняли в певній кількості дистильованої води і концентрували його до 1 %. Кількісний склад функціональних груп ГК, які мають кислий характер, визначали методами титриметричного аналізу (баритовий, кальцій-ацетатний). Термічний аналіз проводили на дериватографі Q-1500D системи “Паулік – Паулік-Ердей”, з'єднаному з персональним комп'ютером в інтервалі температур 20–1000 °С за вільного доступу повітря в піч. Швидкість підвищення температури становила 5 °С в хвилину. Маса зразків становила в середньому 80 мг, еталонною речовиною слугував алюмінію оксид.

Дослідження антиоксидантних властивостей гумінових речовин проводили на гепатоцитах печінки щура в умовах ініціювання вільнорадикального окиснення *in vitro* за маркерами оксидативного стресу – вмістом тіобарбітурат-активних (ТБК-активних) продуктів та додаткових карбонільних груп (КГ) у бічних ланцюгах амінокислот. Принцип методу ґрунтується на активуванні перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та окисної модифікації білків (ОМБ) іонами двовалентного заліза до рівня, що реєструється спектрофотометрично. Розморожені тканини печінки щура гомогенізували у калій-фосфатному буфері у співвідношенні маса:об'єм (1:10). Визначення обох показників оксидативного стресу здійснювали в одній пробі. Кількість білка у пробах визначали за методом Лоурі (Lowry, 1951). Контролем слугували відповідні екстрагенти. Експериментальні дані обробляли статистично із врахуванням середніх арифметичних величин  $M$  та стандартної похибки середнього арифметичного  $m$  у вигляді  $(M \pm m)$  при  $n = 5$ . Відмінності між експериментальними даними визначали за допомогою тесту Тьюкі однофакторного аналізу (ANOVA), де відмінності вважали достовірними за  $P < 0,05$  [17].

**Дослідження пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та окисної модифікації білків**

**(ОМБ) у гомогенаті печінки щура.** До 0,5 г розмороженої та подрібненої тканини печінки щура додавали 5 мл калій-фосфатного буферу. До 0,3 мл одержаного гомогенату додавали 0,3 мл досліджуваних екстрактів ГК, а у контроль – відповідні їхні розчинники. Для індукції ПОЛ додавали 0,3 мл 2,8 % розчину  $FeSO_4$  та через 10 хв 0,3 мл 4 % розчину  $H_2O_2$  й інкубували 2 год. Реакцію зупиняли за допомогою 1,2 мл 40 % трихлороцтової кислоти, яка одночасно осаджує білки, після чого проводили центрифугування протягом 10 хв за 5000 g. Визначення обох показників оксидативного стресу здійснювали в одній пробі – вміст ТБК-активних продуктів визначати в супернатанті, а КГ – в осаді за методикою В. І. Луцака [18].

**Визначення ТБК-активних продуктів.** У відібраних зразках реакцією МДА з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) визначали вміст ТБК-активних продуктів ПОЛ. За високої температури в кислому середовищі МДА реагує з ТБК, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс з максимумом поглинання  $\lambda = 532$  нм. До 2 мл супернатанту додавали 1,5 мл 0,8 % розчину ТБК в 0,1 М  $HCl$  (рН = 2,5) та інкубували на водяній бані за температури 95–100 С протягом 60 хв. Після охолодження додавали 3 мл бутанолу, центрифугували впродовж 10 хв за 5000 g. Вимірювання екстинкції проводили у верхньому бутаноловому шарі за  $\lambda = 532$  нм. Кількість білку у пробах визначали за методом Лоурі (Lowry, 1951). Обрахунок проводили за формулою:

$$[ТБКАП] = \frac{E \cdot V_1 \cdot V_2}{\varepsilon \cdot V \cdot C} \text{ мкмоль / мгбілка, } (1)$$

де  $E$  – екстинкція дослідної проби;  $\varepsilon$  – мілімолярний коефіцієнт екстинкції ( $\varepsilon = 156 \text{ см}^2/\mu\text{моль}$ );  $V_1$  – об'єм бутанолу, мл;  $V_2$  – об'єм проби, мл;  $V$  – об'єм супернатанту, мл;  $C$  – концентрація білка в супернатанті,  $\mu\text{моль}$ .

**Визначення вмісту КГ білків.** Ступінь ОМБ визначали за кількістю утворених додаткових карбонільних груп у бічних ланцюгах амінокислот, вміст яких визначали в реакції з 2,4-динітрофенілгідразином (ДНФГ). Для визначення вмісту КГ білків до одержаних осадів, після центрифугування гомогенатів, додавали 1 мл 1%-вого розчину ДНФГ на 2М  $HCl$ . Суміш розтирали та інкубували 1 год за кімнатної температури,

після чого центрифугували 10 хв за 5000 g. Осад тричі промивали 1 мл суміші етанолу та етил-ацетату (1:1) і центрифугували в попередньому режимі. Промитий осад розчиняли протягом 45 хв у 3 мл 50 % розчині сечовини. Нерозчинений матеріал відділяли центрифугуванням у попередньому режимі. У супернатантах визначали вміст КГ білків на спектрофотометрі ULAB 108 UV з довжиною хвилі  $\lambda = 370$  нм (поглинанням світла 2,4-дифенілгідразонами). Обчислювали вміст КГ за формулою:

$$[КГ] = \frac{\Delta D \cdot V_{проби}}{E_{370}} \text{ нмоль / мгбілка}, \quad (2)$$

де  $\Delta D$  – значення різниці оптичних густин дослідної та контрольної проб ( $\Delta D = D_{досл.} - D_{контр.}$ );  $V_{проби}$  – об'єм проби (3 мл);  $E_{370}$  – коефіцієнт молярної екстинції ДНФГ ( $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ );  $C$  – концентрація загального білка, мг/мл.

### Результати досліджень та їх обговорення

Методом титриметричного аналізу отримано кількісні показники загальної кислотності ГК, які характеризують особливості гумінових речовин різного походження. Основою структури ГК є конденсовані системи, що містять аліциклічні й ароматичні кільця, бічні ланцюги і функціональні групи при ядрі і в бічних ланцюгах. Кислотні властивості обумовлені наявністю в їх структурі карбоксильних і гідроксильних груп, які переважно і визначають реакційну здатність цих природних органічних сполук. Отримані титриметричним методом аналізу результати вмісту кислотних груп у різних зразках ГК наведені в таблицях 1 і 2. За результатами табл. 2 найбільші значення загального вмісту кислотних груп у молекулах ГК виділені з китайського препарату (зразок 6) та з біогумусу (зразок 3).

Таблиця 1

#### Вміст кислотних груп у зразках ГК з різної сировини

№ зразка	Сировина для отримання ГК	Кислотність ГК (за кількістю кислотних груп в ГК), ммоль/г, (% мас.)		
		Карбоксильна	Гідроксильна	Загальна
1	Біогумус	5,5 (24,8 %)	2,5 (4,3 %)	8,0 (29,1 %)
2	Чорнозем	3,4 (15,3 %)	2,3 (3,9 %)	5,7 (19,2 %)

Таблиця 2

#### Вміст кислотних груп у зразках ГК, отриманих з різної сировини

№ зразка	Кислотність ГК (за кількістю кислотних груп в ГК), ммоль / г		
	Карбоксильна	Гідроксильна	Загальна
1	2,5	2,3	4,8
2	3,5	2,6	6,1
3	4,8	4,1	8,9
4	4,0	3,9	7,9
5	3,7	4,4	8,1
6	4,9	4,5	9,4

За допомогою термічного аналізу вивчено перетворення ГК, отриманих з різної сировини, в атмосфері повітря в інтервалі температур 20–1000 °С. Термічний аналіз є одним з важливих методів дослідження органічних сполук. На його основі визначають не тільки термічну стійкість сполук, але і отримують наочне уявлення про природу процесів, що перебігають у них під час нагрівання. Результати термічного аналізу зразків представлені в табл. 3.

За втратами маси зразків на третій стадії термолізу розрахований вміст карбоксильних і

гідроксильних груп у молекулах ГК, яке порівнюється з результатами, отриманими за даними титрування (табл. 3).

Загальний вміст кислотних груп у молекулах ГК, виділених з двох видів сировини, кількісно збігається зі значеннями отриманими титриметричним методом. Розраховані за даними термогравіметричного аналізу значення коефіцієнтів  $K$ , що показують співвідношення аліфатичної частини ГК до циклічної, становлять не більше ніж 0,51, що свідчить про ароматичні властивості досліджуваних сполук.

Результати термічного аналізу зразків ГК з різної сировини

Сировина	Стадія	Температурний інтервал, °С	Втрата маси, %	K*	R % TG/титр
Біогумус	I	20,0–117,8	8,6	29,9/59,1 = 0,51	27,4/29,1
	II	117,8–381,9	29,9		
	III	381,9–514,8	27,4		
	IV	514,8–1000	31,7		
Чорнозем	I	20,0–147,1	9,9	13,7/37,9 = 0,36	20,6/19,2
	II	147,1–319,2	13,7		
	III	319,2–407,6	20,6		
	IV	407,6–1000,0	17,3		

K\* – коефіцієнт і співвідношення аліфатичної циклічної структури, R – зміст карбоксильних і гідроксильних груп (у таблиці вказана величина, визначена за даними термогравіметричного аналізу і за даними титрування).

У результаті проведених досліджень ліпопероксидації та окисної модифікації білків (рис. 1, 2) встановлено, що за дії всіх досліджуваних ГК відбувається значне зниження вмісту ТБК-

активних продуктів та утворення карбонільних груп протеїнів порівняно з контролем. Це свідчить про високі антиоксидантні властивості отриманих ГК.

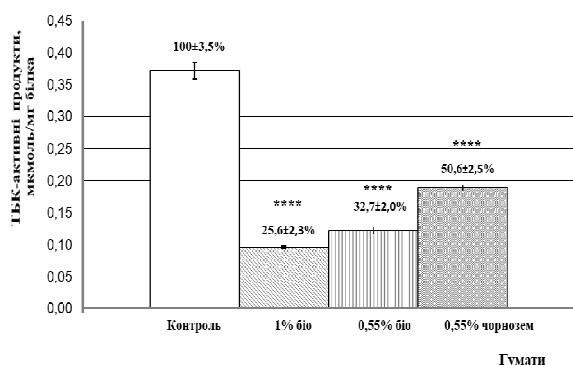


Рис. 1. Вміст ТБК-активних продуктів у гомогенаті печінки щура за дії гуматів (\*\*\*\*-  $p \leq 0,001$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ )

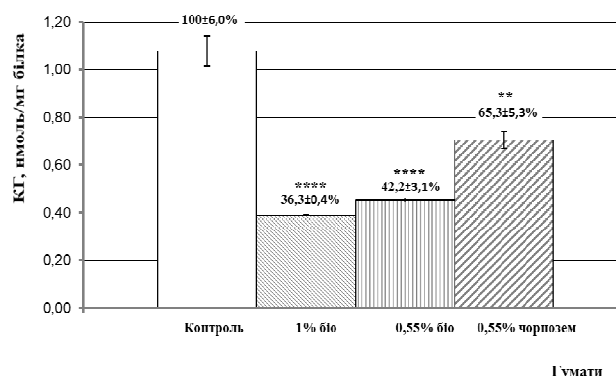


Рис. 2. Вміст карбонільних груп протеїнів у гомогенаті печінки щура за дії гуматів (\*\*-  $p \leq 0,01$ , \*\*\*\*-  $p \leq 0,001$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ )

Як видно з діаграми, найефективнішим серед досліджуваних гуматів щодо показників оксидативного стресу виявилися 1%-вий та 0,55 %-вий розчини ГК з біогумусу, оскільки за їхнього впливу спостерігається зниження вмісту ТБК-активних продуктів на 74,4 % та на 67,3 % відповідно, а вмісту КГ – на 63,7 % та на 57,8 % у порівнянні з контролем. Менш виражену, хоча й високу (порівняно з контролем) антиоксидантну активність проявив 0,55 %-вий розчин ГК з чорнозему, застосування якого сприяло зниженню вмісту ТБК-активних продуктів на 49,4 % та КГ – на 34,7 % відповідно.

Наступними об'єктами у дослідженні антиоксидантної активності речовин гумінової природи стали: 1 – ГК з чорнозему Тернопільської області, 2 – з торфу району В. Любінь, 3 – з біогумусу за ТУ У 13649334022-99, 4 – з торфу району Дрогобича, 5 – з торфу (Білорусь), 6 – з промислового препарату гумату калію (Китай).

За результатами отриманих даних (рис. 3, 4) встановлено, що за двома показниками оксидативного стресу серед речовин гумінової природи найкращим антиоксидантом виявився екстракт ГК з промислового препарату гумату калію з Китаю (зразок 6).

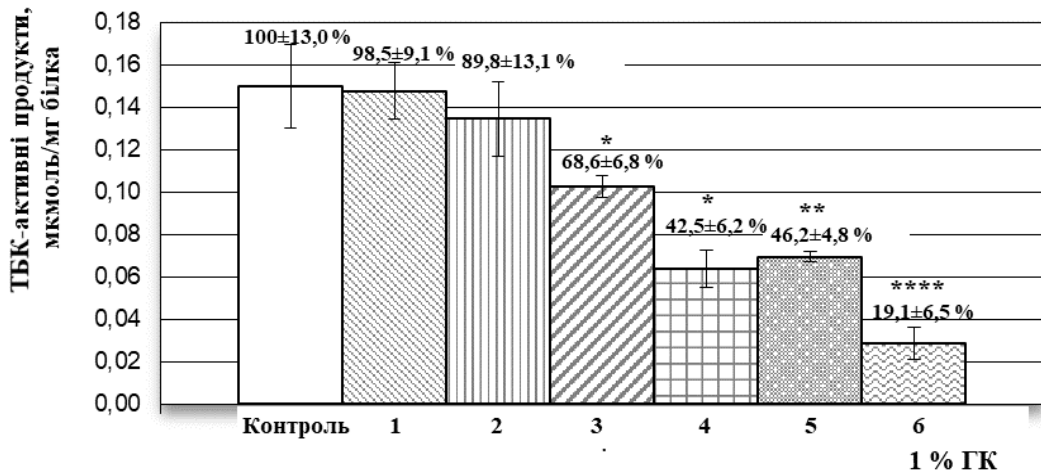


Рис. 3. Вміст ТБК-активних продуктів у гомогенаті печінки щура за дії гумінових кислот (\*-  $p \leq 0,05$ ; \*\*-  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*-  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*\*-  $p \leq 0,001$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ )

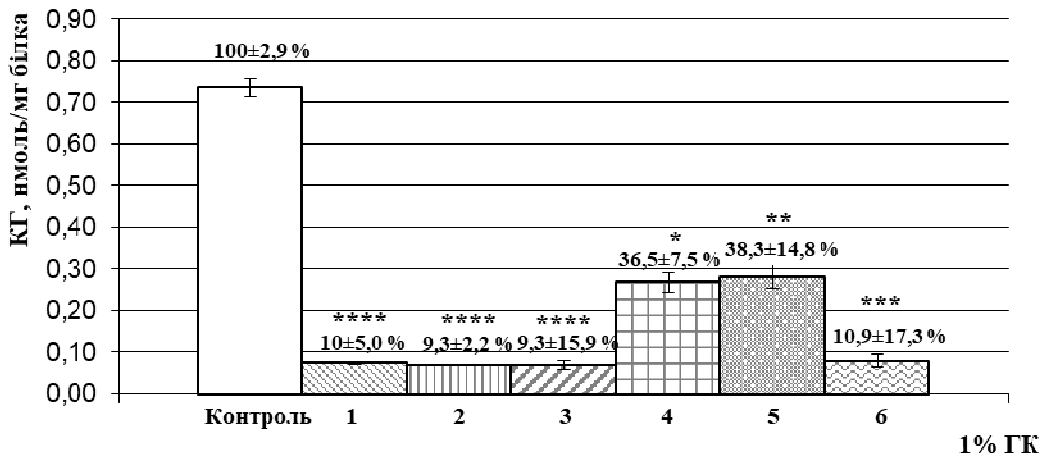


Рис. 4. Вміст карбонільних груп протеїнів у гомогенаті печінки щура за дії гумінових кислот (\*-  $p \leq 0,05$ ; \*\*-  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*-  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*\*-  $p \leq 0,001$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ )

Серед інших досліджуваних ГК різного походження найефективнішими виявилися 1% розчини ГК з торфу (зразки 4 і 5): за їх дії спостерігається зниження вмісту ТБК-активних продуктів на 57,5% та на 53,8% відповідно, а рівень утворення КГ в бічних групах амінокислот – на 63,5% та 61,7%, що свідчить про суттєве достовірне зниження процесів ПОЛ та ОМБ порівняно з контролем. Екстракт з біогумусу (зразок 3) має також високі антиоксидантні властивості, особливо його дія проявлялась у інгібуванні вільнорадикальних процесів у білках за рахунок суттєвого зниження інтенсивності утворення КГ на 90,7% (порівняно з контролем), а також зменшенні утворення ТБК-активних продуктів (у процесах ПОЛ) – на 31,4%.

Зразки ГК 1 і 2 проявили антиоксидантні властивості лише на білки, зменшуючи рівень КГ відповідно на 90% і 90,7% щодо контролю ( $p \leq 0,001$ ). На відміну від цього, рівень ліпопероксидації у цих зразках порівняно з контролем не змінювався.

Аналіз отриманих результатів показав, що за дії досліджених ГК спостерігалось значне зменшення вмісту ТБК-активних продуктів та КГ порівняно з контролем, що свідчить про зниження інтенсивності вільнорадикальних процесів у ліпідах та білках. Така антиоксидантна дія пояснюється наявністю у хімічній структурі ГК фенольних радикалів, гідроксильних, хіноїдних та карбоксильних груп, властивості яких достатньо висвітлені у науковій літературі [19], а також

за рахунок стимулювання обмінних процесів в організмі тварин [20] та підвищення активності ферментативної системи антиоксидантного захисту [21].

### Висновки

Отримано гумінові кислоти із різних природних джерел (біогумусу, чорнозему і торфів) та визначено кількісний склад їх кислотних функціональних груп. За даними термогравіметричного аналізу, розраховано співвідношення їхньої аліфатичної частини до циклічної.

Серед отриманих гумінових кислот найвищі антиоксидантні властивості виявили 1%-ві 0,55 %-ві розчини ГК з біогумусу і з торфу району Дрогобича і Білорусі, що здатні зменшувати утворення вільних радикалів у білках та ліпідах більше ніж на 50 % порівняно з контролем.

Екстракти ГК з чорнозему та торфу на гепатоцитах печінки щура в умовах ініціювання вільно-радикального окиснення *in vitro* проявили високі антиоксидантні властивості лише на білки, зменшуючи щодо контролю рівень КГ відповідно на 90 % і 90,7 %.

Отже, висока антиоксидантна активність отриманих гумінових речовин свідчить про доцільність їх подальших експериментальних досліджень для встановлення механізму дії та перспективи їх застосування в екстремальних ситуаціях за умов вільно-радикального стресу.

### References

1. Yashchuk V. U., Koretskyi A. P., Kovbasenko R. V., Dmytriiev O. P., Kovbasenko V. M. (2016). Humic substances. *Safe ecosystem regulators*, 4. [in Ukraine].
2. <https://uk.wikipedia.org/wiki/>
3. Saranchuk V. I., Iliashov M. O., Oshovskyi V. V., Biletskyi V. S. (2008). *Chemistry and physics of combustible minerals*. Donetsk, Eastern Publishing House. [in Ukraine].
4. Horovaia A. Y., Orlov D. S., Shcherbenko O. V. (1995). *Humic substances. Structure, functions, mechanism of action, protector properties, ecological role*. Kiev, Scientific thought. [in Ukraine].
5. Mykhailenko Ye. O., Domshyna O. O., Ushakova H. O., Hryban V. H., Stepchenko L. M. (2016). The effect of feed additive "Humilid" on the indicators of protein and amino acid metabolism in broiler chickens cross Cobb 500. *Animal biology*, 4, 66–71. [in Ukraine].
6. Buchko O. M., Salyha N. O., Svarchevska O. Z., Maksymovych I. Ia., Senkiv O. M. (2013). Immunological and hematological parameters of the blood of piglets under the action of humic additives. *Bulletin of ONU, ser.: Biology*, 18, 3(32), 73–81. [in Ukraine].
7. Buzlama A. V., Chernov Yu. N. (2010). Analysis of pharmacological properties, mechanisms of action and prospects for the use of humic substances in medicine. *Experimental and clinical pharmacology*, 73(9), 43–48. [in Ukraine].
8. Lobodyn K. A., Nezhdanov A. H., Buzlama V. S. (2006). Ligfol to correct the reproductive function of cows. *Veterinary medicine*, 3, 39–44. [in Ukraine].
9. Hryban V. H. (1995). To the mechanism of action of drugs of humic nature on the body of animals. *Organic matter of peat*, Minsk, 120 c. [in Ukraine].
10. Ysmatova R. R., Zyhanshyn A. U., Dmytruk S. E. (2007). Experimental study of sodium humate from peat for allergodermatosis application. *Modern high technologies*, 3, 28–30. [in Ukraine].
11. Coates J., Cole K., Chakraborty R. (2002). Diversity and ubiquity of bacteria capable of utilization humic substances as electron donors for anaerobic respiration. *Applied and environmental microbiology*, 5, 2445–2452.
12. Ermahambet B. T., Kukhar E. V., Nurhalyev N. U., Kasenova Zh. M., Zykryna A. M. (2016). Effective use of humic preparations (based on humates) in animal husbandry and veterinary medicine. *Achievements of science and 149 education*, 10(11), 16–19. [in Ukraine].
13. Knight J. A. (2000). Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 30(2), 145–158.
14. Sanmiguel P., Rondon B. Iang. (2016). Supplementation with humic substances affects the innate immunity. *Rev. MVZ Cordoba*, 21(1), 5198–5210.
15. Buron N., Porceddu M., Roussel C., Begriche K., Trak-Smayra V., Gicquel T., Fromenty B., Borgne-Sanchez A. (2017). Chronic and low exposure to a pharmaceutical cocktail induces mitochondrial dysfunction in liver and hyperglycemia: Differential responses between lean and obese mice. *Environmental Toxicology*, 32, 1375–1389. doi:<https://doi.org/10.1002/tox.22331>.
16. Mykhailenko Ye. O., Domshyna O. O., Ushakova H. O., Stepchenko L. M. (2016). Efficiency of the antioxidant system of the broiler liver in the Cobb-500 cross with natural biological active additives based on humic fluids. *Bulletin of the State Agrarian and Economic University*, 4(42), 120–125. [in Ukraine].
17. Shostia A. M., Pavlova I. V., Chukhlib Ye. V., Kuzmenko L. M., Kodak T. S., Berezytskyi V. I., Shafirivskyi B. S. (2020). Infusion of humates on prooxidant-antioxidant homeostasis in knuriv-plidnikiv under heat

stress. *Bulletin of the Poltava State Agrarian Academy*, 1, 114–120. [in Ukraine].

18. Lushchak V. I., Bagnyukova T. V., Luzhna L. I. (2006). Indices of oxidative stress. 2. Lipid peroxides. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 78(5), 113–119. [in Ukraine].

19. Bravo L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56(11), 317–333.

20. Stepchenko L. M. (2010). System of antioxidant protection of the body of piglets under the action of additives of humic nature. Regulatory mechanisms of action of biologically active substances of humic nature on the body of productive birds. *Physiological Journal*, 56(2), 306 c. [in Ukraine].

21. Buchko O. M. (2012). The system of antioxidant protection of the body of piglets under the action of additives of humic nature. *Bulletin of Lviv University*, series: *Biology*, 58, 68–73. [in Ukraine].

**O. Ya. Ivanushun<sup>1</sup>, O. S. Iaremkevych<sup>1</sup>, I. V. Semeniuk<sup>2</sup>, O. V. Karpenko<sup>1,2</sup>,  
N. Ya. Monka, V. I. Lubenets<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Lviv Polytechnic National University

Department of Technology of Biologically Active Substances, Pharmacy and Biotechnology

<sup>2</sup> Department of Physical Chemistry of Fossil Fuels InPOCCC, NAS of Ukraine

yaremkevych.os@gmail.com

#### ANTIOXIDANT EFFECT OF HUMIC ACIDS ON RAT HEPATOCYTES

The antioxidant properties of humic acids of various origins have been investigated (from bio-humus, black soil from Ternopil region, and peat from different regions, such as: Velykyi Liubin, Drohobych and Belarus Republic). Titrimetric analysis has been shown the quantitative composition of the acidic functional groups of the obtained humic acids. According to the data of thermogravimetric analysis, the values of parameters, showing the ratio of their aliphatic to the cyclic part were determined. It was found that all obtained humic acids are characterized by high antioxidant activity: the formation of thiobarbituractive products and carbonyl groups of proteins in liver hepatocytes were decreased. The inhibition of the products of free radical formation of lipid components and proteins was better inhibited by 1 % solutions of humates from vermicompost and humic acids from peat. The results indicate prospects of the humic acids for creating the means of restoring the physiological functions of biological objects in pathological conditions under conditions of free radical stress for application in cosmetic pharmaceutical products.

**Key words:** humic acids, antioxidant properties, thiobarbituric products, oxidative modification of proteins.