

ВЛИЯНИЕ ЙОДБИОПОЛИМЕРОВ НА ПРОЦЕССЫ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В МОДЕЛЬНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ

А.Н. Мамцев, Е.М. Моргунова, Е.Е. Пономарев, Л.И. Васильев, В.Н. Козлов

Методом хемилюминесцентного анализа выявлены прооксидантные свойства неорганических форм йода. Разработана инновационная технология промышленного производства нового вида йодосодержащего органоминерального соединения на основе высокомолекулярных биополимеров. Изучена антиоксидантная активность ингредиентов, входящих в состав биологически активной добавки «Йодхитозан», предназначенной для йодирования продуктов питания массового спроса – молочных, хлебобулочных и мясных изделий.

Введение

Известно, что многие физиологические и метаболические процессы в организме сопровождаются образованием активных частиц – свободных радикалов. Наиболее часто свободные радикалы образуются при одноэлектронном восстановлении кислорода (так называемые активные формы кислорода - АФК) и при перекисном окислении липидов (ПОЛ). Их содержание в организме поддерживается на постоянном уровне, который регулируется разнообразными физико-химическими механизмами [1,2]. Увеличение содержания супероксиданион-кислорода ($O_2^{\cdot-}$), гидропероксильного (O_2H^{\cdot}), гидроксильного (OH^{\cdot}) радикалов, гипохлорита (OCl^-) и оксида азота (NO^{\cdot}) в биологическом материале ведет к развитию многих заболеваний. Исследованию окислительного стресса и факторов, приводящих к его развитию, участию активных форм кислорода и роли перекисного окисления липидов (ПОЛ) в различных патологических процессах посвящено огромное число работ [3,4].

Значительное количество исследований выполнено по вопросам фармакологической регуляции свободнорадикального и перекисного окисления, применению антиоксидантов для повышения резистентности организма к различного рода стрессовым воздействиям или при лечении заболеваний [5,6]. Для профилактики и коррекции нарушений свободнорадикального окисления и связанных с этим процессом патологий все шире начинают использовать антиоксиданты, в том числе и пищевые добавки, способные регулировать скорость окисления. Биоантиоксиданты – вещества, которые тормозят процессы свободнорадикального окисления в простых модельных системах, имитирующих наиболее распространенные реакции окисления с участием АФК. Перспективным методом определения скорости свободнорадикального окисления является регистрация хемилюминесценции (ХЛ) – свечения, возникающего при взаимодействии свободных радикалов. В данной работе была проведена оценка влияния йодосодержащей биологически активной добавки (БАД) «Йодхитозан» и препаратов неорганического йода на процессы свободнорадикального окисления в модельных тест-системах, где генерируются процессы образования АФК и ПОЛ. БАД представляет собой органически связанные формы йода, «встроенные» в биоматрицу – пищевой водорастворимый хитозан [7]. Хитозан представляет собой высокомолекулярный полимер глюкозамина, широко применяемый в различных отраслях пищевой промышленности, сельском хозяйстве и медицине. Уникальные свойства биополимеров – хитина и его производных (высокая сорбционная способность, биосовместимость, биodeградируемость, нетоксичность, бактерицидность) обуславливают все возрастающий интерес к применению хитозана для доставки и контролируемого освобождения биологически активных веществ через слизистые, в частности, при пероральном введении. Известны новые подходы к созданию веществ, обеспечивающих пролонгированное действие полифенольных антиоксидантов (кверцетина, дигидрокверцетина), встроенных в боковые цепи кватернизированного хитозана [8].

Результаты исследований и их обсуждение

В качестве первой модельной тест-системы был использован цитрат-фосфат-люминола, где генерировались активные формы кислорода при добавлении раствора солей двухвалентного железа [9]. Во второй системе использовали липиды куриного желтка, содержащего липопротеиновые комплексы, сходные с липидами крови. Желток смешивали с фосфатным буфером в соотношении 1:5, гомогенизировали, доводили содержание белка до 1 мг на см³ дальнейшим разведением (в среднем 25 мл полученного гомогената на 1 дм³ буфера). Отбирали 20 см³ раствора, ПОЛ инициировали добавлением 1 см³ 50 мМ раствора сернокислого железа при постоянном перемешивании. Происходило окисление ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов, и развивалась ХЛ, по интенсивности которой судили о процессах ПОЛ [10].

ХЛ измеряли прибором «хемиллюминометр ХЛ-003», включенным в регистр оборудования медицинской промышленности Российской Федерации [6]. Проверку стабильности работы установки проводили перед каждым измерением по излучению вторичного эталона СФХМ – 1 (ГОСТ 9411 – 81). Интенсивность свечения эталона составляла $5,1 \cdot 10^5$ квантов в секунду. Для удобства эта величина была принята за одну относительную единицу. Регистрировали спонтанное свечение и светосумму ХЛ за 5 мин измерения, величину быстрой вспышки в момент введения солей железа и максимальную амплитуду свечения. В ходе исследования температура образца поддерживалась на уровне 37 °С.

Исследуемые препараты добавляли к желточным липопротеидам в концентрациях, соответствующих регламентированной дозе. Результаты экспериментов в модельных системах определяли по степени изменения светосуммы ХЛ в присутствии исследуемых препаратов и пересчитывали в процентах от контроля по формуле (1):

$$\frac{[100 - (S_{\text{ХЛ КОНТРОЛЬ}} - S_{\text{ХЛ С ПРЕПАРАТОМ}})] \cdot 100\%}{S_{\text{ХЛ КОНТРОЛЬ}}} \quad (1)$$

$S_{\text{ХЛ КОНТРОЛЬ}}$ – светосумма ХЛ (контрольный образец)

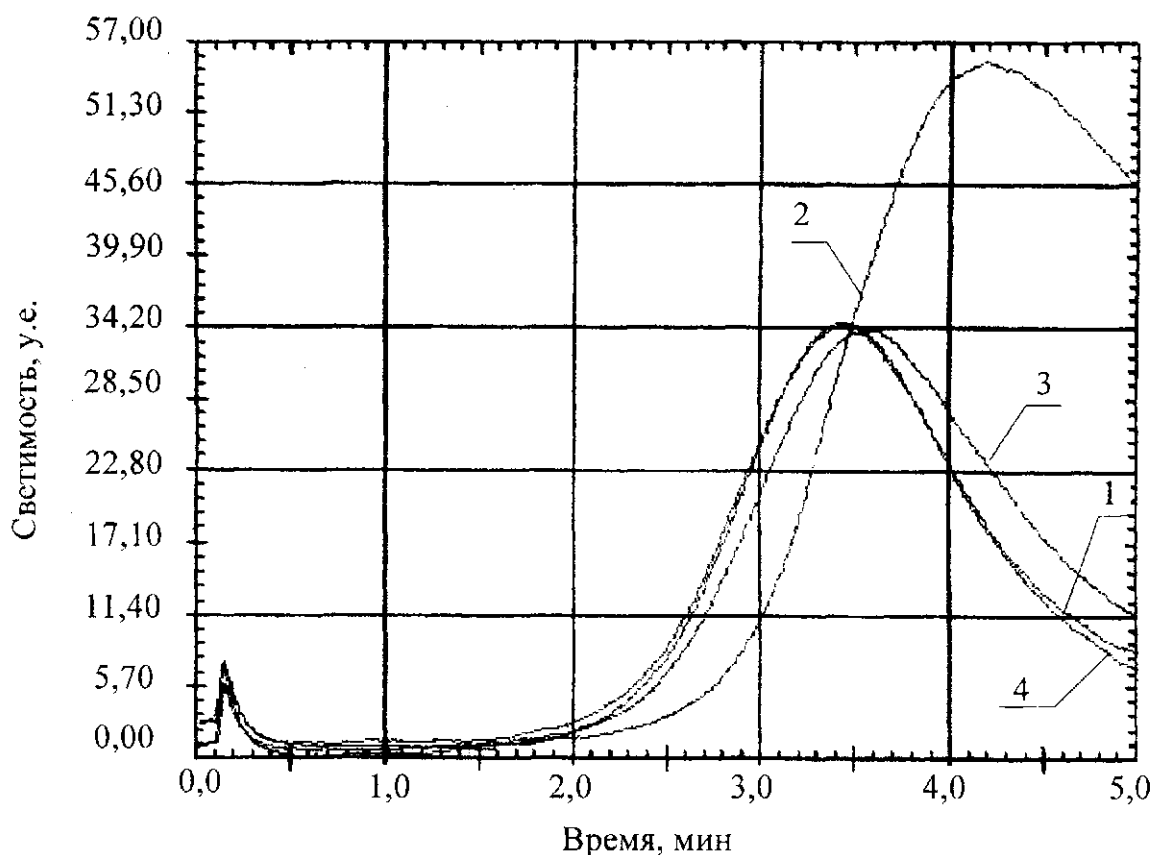
$S_{\text{ХЛ С ПРЕПАРАТОМ}}$ – светосумма ХЛ (в присутствии исследуемых препаратов)

Полученные данные статистически обрабатывали с использованием стандартных методов по программе «Statistica-5,0». Значимость различий среднеарифметических оценивали с использованием t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

В первую очередь была изучена антиокислительная активность (АОА) ингредиентов, входящих в состав исследуемой БАД. На рисунке 1 приведена запись хемиллюминесценции модельной системы (кривая 1), в которой моделировалось образование активных форм кислорода (контроль). Добавление солей железа ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) сопровождалось быстрой вспышкой, за которой следовало развитие медленной вспышки. Светосумма хемиллюминесценции, как известно, пропорциональна образованию активных форм кислорода. Среднее значение светосуммы ХЛ в контроле составило $56,10 \pm 1,40$ условных единиц (у.е.).

Как видно из данных таблицы 1, водный раствор йода в концентрации 0,015 мкг на 1 см³ дистиллированной воды (рисунок 1, кривая 2) вызывает повышение светосуммы хемиллюминесценции в 1,7 раза по сравнению с контролем (с $56,10 \pm 1,40$ у.е. контроль и $96,51 \pm 2,36$ у.е. ($p \leq 0,001$) опыт). В данном случае неорганический йод проявляет прооксидантные свойства, генерируя процессы образования АФК. При изучении антиоксидантной активности высокомолекулярного полисахарида хитозана (рисунок 1, кривая 3) было установлено, что в модельной системе он не оказывает существенного влияния на показатели хемиллюминесценции. В концентрации 0,05 мг/см³ показатель светосуммы составил $51,02 \pm 1,16$ у.е. ($p \leq 0,05$), а в контроле $56,10 \pm 1,40$ у.е. (таблица 1). При добавлении в среду инкубации йодосодержащей БАД в концентрации 0,015 мкг/см³ (рисунок 1, кривая 4) светосумма хемиллюминесценции незначительно отклонялась от среднеарифметического показателя свето-

суммы в контроле, составляя $50,45 \pm 1,51$ у.е.



1 – контроль; 2 – добавление водного раствора неорганического йода ($0,015 \text{ мкг/см}^3$);
3 – добавление хитозана ($0,15 \text{ мг/см}^3$); 4 – добавление комплекса «Йодхитозан» ($0,015 \text{ мкг/см}^3$)

Рисунок 1 – Запись хемилюминесценции модельной системы с содержанием в среде инкубации исследуемых ингредиентов в регламентированной дозе

Таблица 1 – Показатели хемилюминесценции в модельной системе, где генерировались АФК ($M \pm m$, $n=15$)

Общие сведения	Показатели хемилюминесценции				
	Светосумма, у.е.	Спонтанная светимость, у.е.	Вспышка, у.е.	Максимальная светимость, у.е.	Наклон, у.е.
Контроль	56,10 $\pm 1,40$	2,44 $\pm 0,34$	6,71 $\pm 0,31$	33,11 $\pm 0,56$	1,58 $\pm 0,28$
Кристаллический J_2 – концентрация $0,015 \text{ мкг/см}^3$	*** 96,51 $\pm 2,36$	* 4,38 $\pm 0,70$	** 8,90 $\pm 0,58$	*** 51,46 $\pm 3,2$	* 3,10 $\pm 0,68$
Хитозан – концентрация $0,15 \text{ мг/мл}$	* 51,02 $\pm 1,16$	 1,72 $\pm 0,23$	 6,87 $\pm 0,25$	 31,66 $\pm 0,54$	 0,93 $\pm 0,18$
БАД «Йодхитозан» – концентрация $0,015 \text{ мкг/см}^3$	 50,45 $\pm 1,51$	** 1,39 $\pm 0,09$	* 6,04 $\pm 0,08$	 30,72 $\pm 0,46$	* 0,80 $\pm 0,09$

* – различие с контролем статистически достоверно ($p \leq 0,05$)

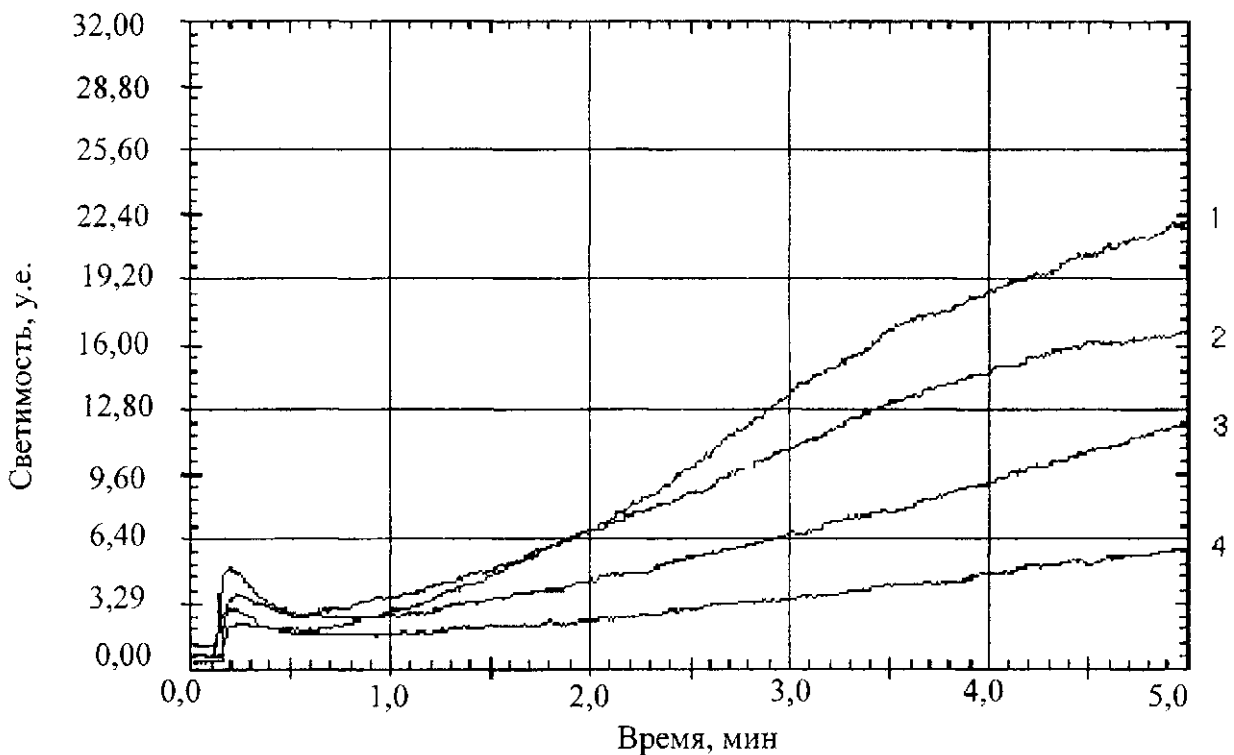
** – различие с контролем статистически достоверно ($p \leq 0,01$)

*** – различие с контролем статистически достоверно ($p \leq 0,001$)

Технология стабилизации ионов йода (J^-) в биополисахаридах позволила синтезировать

соединение, которое проявляло антиоксидантные свойства в модельной тест-системе, где генерировались реакции образования АФК. Выявлена способность данной формы йодосодержащего органоминерального комплекса ингибировать процессы образования АФК.

На втором этапе опытно-экспериментальных исследований изучалась антиоксидантная активность йодосодержащей БАД во второй модельной тест-системе, содержащей желточные липопротеиды. Общая антиокислительная активность (АОА) может быть определена по величине торможения перекисления липидов какой-либо модели. В качестве субстрата окисления в моделях используют эмульсию линолевой кислоты, суспензию липосом, мембраны эритроцитов и гомогенаты мозга. Применение таких моделей в клинике ограничено нестабильностью или труднодоступностью субстрата. В нашей работе для исследования АОА использовали модельную тест-систему, представляющую собой суспензию липопротеидов желтка куриных яиц. Выбранная модель имеет преимущества: она доступна, выделение липопротеидов осуществляется легко, модель стабильна при хранении и вместе с тем обладает высокой окисляемостью [11]. На рисунке 2 представлена запись ХЛ липидов, выделенных из куриного желтка.



1 – контроль; 2 – в присутствии стандартного антиоксиданта - мексидола в концентрации 0,0025 мкг/ см³;
 3 – в присутствии стандартного антиоксиданта - мексидола в концентрации 0,1 мкг/ см³;
 4 – в присутствии стандартного антиоксиданта - мексидола в концентрации 0,25 мкг/ см³

Рисунок 2 – Хемилюминесценция системы желточных липопротеидов

Добавление солей железа в тест-систему, содержащую липиды, инициирует процессы перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот. При этом возникает быстрая вспышка, далее следует небольшой латентный период, переходящий в медленную вспышку. Амплитуда быстрой вспышки зависит от содержания гидроперекисей липидов. Длительность латентного периода свечения характеризует антиокислительную активность, а величина светосуммы ХЛ определяет способность липидов подвергаться окислению. Добавление антиоксидантов, в частности мексидола, взятого в качестве эталона, дозозависимо угнетало ХЛ систем, содержащих липиды.

В таблице 2 представлены средние значения показателей ХЛ исследуемых ингредиентов. Из приведенных данных видно, что хитозан снижает светосумму и максимальную амплитуду ХЛ желточных липопротеидов и, следовательно, обладает антиокислительным действием в

данной модельной системе. Изменения спонтанного свечения и амплитуды быстрой вспышки оказались не достоверны, возможно, в связи с их низкими значениями.

Таблица 2 – Показатели хемилюминесценции модельной тест-системы при добавлении пищевого хитозана, БАД «Йодхитозан» и солей йода

Условия опыта	Количество добавки	Показатели хемилюминесценции (у.е.)			
		светосумма	спонтанное свечение	амплитуда вспышки	максимальная интенсивность
Контроль	-	320,95±6,66	1,8±0,19	3,55±0,18	51,65±0,69
Хитозан пищевой	0,015 мг	294,02±5,46*	3,16±0,64	4,9±0,48	45,6±0,79*
	0,15 мг	279,41±5,11*	1,85±0,14	4,15±2,94	44,8±0,65*
	1,5 мг	304,93±4,5	1,83±0,13	4,39±0,08	46,7±0,06*
БАД «Йодхитозан»	0,0015 мкг	320,95±6,66	1,8±0,19	3,55±0,18	51,65±0,69
	0,015 мкг	329,3±4,22	2,6±0,22	4,42±0,11	50,66±0,5
	0,15 мкг	266,12±4,2*	1,89±0,13	3,96±0,1	45,15±0,51*
Соли йода	0,0015 мкг	320,95±6,66	1,8±0,19	3,55±0,18	51,65±0,69
	0,015 мкг	323,96±4,12	3,8±0,7	5,28±0,5	50,63±0,6
	0,15 мкг	303,71±7,33	1,71±0,16	3,62±0,1	48,33±1,07

* – различие с контролем статистически достоверно ($p \leq 0,05$)

БАД «Йодхитозан» в регламентируемой дозе снижает светосумму и максимальную амплитуду ХЛ желточных липопропротеидов и, следовательно, обладает антиоксидантным свойством. Соли йода в указанных дозировках статистически достоверно на показатели ХЛ желточных липопропротеидов не влияют.

Важные и разносторонние функции щитовидной железы позволяют предположить, что нарушения ее функционального состояния могут отражаться на системе окислительного гомеостаза [12]. Не последнюю роль в формировании аутоиммунной тиреоидной патологии играет функциональная недостаточность в антиоксидантной системе, представленной супероксиддисмутазой, глутатион-S-трансферазой, трансферрином, лактоферрином, альбумином. Можно констатировать, что нарушения в системе окислительного гомеостаза являются ключевыми в патогенезе тиреоидной патологии. Следовательно, при разработке методов коррекции йододефицитных заболеваний необходимо оценивать про- и/или антиоксидантные свойства йодосодержащих препаратов и биологически активных добавок. Бесконтрольное введение препаратов, наделенных прооксидантными свойствами, на фоне патофизиологических сдвигов в системе антиоксидантной защиты организма может привести к так называемому оксидативному стрессу с повреждением субклеточных структур [13]. Следует полагать, что использование неорганических форм йода в профилактике и лечении тиреоидной патологии по эндемическому типу окажет негативное влияние на функциональное состояние системы окислительного гомеостаза.

Заключение

В результате проведенных исследований показано, что хитозан проявляет свои биоантиоксидантные свойства в модельной системе, ингибируя процессы цепного перекисного свободнорадикального окисления липопропротеидов. Биологически активная добавка (БАД), где йод органически связан с хитозаном, также проявляет антиокислительную активность. Высокмолекулярная биоматрица, использованная как стабилизатор неорганических форм йода, придает антиокислительные свойства рассматриваемого йодосодержащего органоминерального комплекса. Установлено, что пищевой водорастворимый хитозан нивелирует прооксидантные свойства солей йода *in vitro*, ингибируя генерацию свободных радикалов и реакции

перекисного окисления моно-, ди- и полиненасыщенных жирных кислот, входящих в состав желточных липопротеидов.

Литература

1. Колпикова, О.С. Влияние некоторых препаратов, используемых в лечении цереброваскулярных расстройств, на процессы свободнорадикального окисления в модельных системах / О.С. Колпикова, Р.Р. Фархутдинов, Р.В. Магжанов // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – Т. 102, № 8. – 2002. – С. 22–25.
2. Yamada, S. Immunochemical detection of lipofuscin-like fluorophore derived from malondialdehyde and lysine / S. Yamada, S. Kumazawa, Ishii [et al.] // J. Lipid Res. – 2001. – Vol. 42, № 8, P. 1187–1196.
3. Schulz, J.B. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration / J.B. Schulz, J. Lindenau, J. Seyfried, J. Dichgans // Eur. J. Biochem. – 2000. – Vol. 267. – P. 4904–4911.
4. Pierrefiche, G. Oxygen free radicals, melatonin, and aging / G. Pierrefiche, H. Laborit // Exp. Gerontol. – 1995. – Vol. 30. – P. 213–227.
5. Matuszek, A. Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals and spin trapping agents / A. Matuszek, K.J. Reszka, C.F. Chignell // Free Radical Bio. Med. – 1997. – Vol. 23. – P. 367–372.
6. Абрамова, Ж.И. Человек и противокислительные вещества / Ж.И. Абрамова, Г.И. Оксенгендлер. – Л.: Наука, 1985. – С. 34–36.
7. Пат. РФ 2380984. Биологически активная добавка к пище для профилактики йодной недостаточности и способ ее получения / А.Н. Мамцев, В.Н. Байматов, Ф.Х. Камиллов, Е.Е. Пономарев и др. Заявл. 08.07.2008. Опубл. 10.02.2010 // Бюл. – 2010. – № 4.
8. Александрова, В.А. Полиэлектrolитные комплексы на основе производных хитозан для рН-зависимого высвобождения антиоксидантов / В.А. Александрова, Н.Г. Балабушева, Г.Н. Бондаренко и др. // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Мат. 8-й Междунар. конф. – М.: Изд-во ВНИРО. – С. 14–17.
9. Фархутдинов, Р.Р. Методики исследования хемиллюминесценции биологического материала на хемиллюминиметре ХЛ-003 / Р.Р. Фархутдинов, С.И. Тевдоразе // Методы оценки антиоксидантной активности биологически активных веществ лечебного и профилактического назначения: Сборник докладов. Москва, Россия. 14–15 сентября 2004 / Под общей ред. проф. Е.Б. Бурлаковой – М.: РУДН, 2005. – С. 147–154.
10. Клебанов, Г.И.. Оценка антиоксидантной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов / Г.И. Клебанов, [и др.] // Лабораторное дело – № 5. – 1988. – С. 59–62.
11. Хавинсон, В.Х. Свободнорадикальное окисление и старение / В.Х. Хавинсон, В.А. Баринов, А.В. Арутюнян, В.В. Малинин. – СПб.: Наука, 2003. – 327 с.
12. Коган, А.Х. Модулирующая роль CO_2 в действии активных форм кислорода / А.Х. Коган, С.В. Грачев, С.В. Елисеева. – М.: ГЭОТАР-медиа, 2006. – 224 с.
13. Алехин, Е.К. Влияние лекарственных средств на процессы свободнорадикального окисления: Справочник / Е.К. Алехин, А.Ш. Богданова, В.В. Плечев, Р.Р. Фархутдинов. – Уфа, 2002. – 288 с.

Поступила в редакцию 22.12.2010