

Д14-2001-39

Л.М.Мосулишвили*, Е.И.Киркесали*,
А.И.Белокобильский*, А.И.Хизанишвили*,
М.В.Фронтасьева, С.С.Павлов, С.Ф.Гундорина

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ВОЗМОЖНОСТИ РАЗРАБОТКИ
СЕЛЕН- И ИОДСОДЕРЖАЩИХ МЕДИЦИНСКИХ
ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ СИНЕ-ЗЕЛЕННОЙ
ВОДОРОСЛИ *SPIRULINA PLATENSIS*

Направлено в «Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis»

*Институт физики им. Э.Л.Андрионикашвили АН Грузии, Тбилиси

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в среде человеческого обитания научно-технический прогресс и увеличение темпов жизнедеятельности людей ведут к развитию болезней цивилизации. Нервно-эмоциональные и физические перегрузки, а также ухудшающаяся экологическая ситуация способствуют нарушению обмена веществ и функций иммунной системы и, как следствие, росту сердечно-сосудистых, вирусных, раковых и многих других тяжелых заболеваний.

Изменение характера питания – ограниченное потребление натуральных продуктов и переход к рафинированным, лишенным витаминов, минеральных компонентов и клетчатки продуктам, богатым жирами и углеводами, также стали серьезными факторами риска для человеческого организма. Исходя из этого совершенно очевидно, почему в настоящее время интенсивно развиваются новые прогрессивные направления современной медицины, фармакологии и биотехнологии, ведутся поиски более эффективных безвредных препаратов для лечения и профилактики различных заболеваний.

Одним из таких направлений является область научной и прикладной биотехнологии, связанная с применением сине-зеленой микроводоросли *Spirulina platensis*, которая, начиная с девяностых годов, стала одним из наиболее широко используемых объектов. Биомасса спирулины и продукты ее переработки применяются как пищевые и кормовые добавки в различных областях сельского хозяйства, пищевой, фармацевтической, парфюмерной промышленности, медицине и научных исследованиях.

Это обусловлено ее быстрым ростом, нетоксичностью, легкой усвояемостью (85–95%), высоким содержанием белка (60–70%), хорошо сбалансированным аминокислотным составом, насыщенностью витаминами и широким спектром биологически активных веществ, содержащихся в ней в значительных количествах [1,2].

Спирулина считается эффективным иммуностимулятором и характеризуется антиканцерогенными и противовирусными эффектами.

Экспертами Всемирной организации здравоохранения установлено, что в качестве оздоровительного средства *Spirulina platensis* превосходит все известные на сегодняшний день элементы питания и лекарственные препараты.

Спирулина часто используется до и параллельно с медикаментозным лечением для превентивной очистки организма от вредных веществ и одновременного внесения в него целого ряда жизненно необходимых биологически активных элементов и соединений. При этом в организме нормализуются обменные процессы и укрепляется иммунная система, т.е. создается благоприятный фон для воздействия лечебных препаратов. Примером может служить использование спирулины для лечения детей, пострадавших после Чернобыльской аварии [3].

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Исследования в области молекулярной биологии показывают, что большинство человеческих недугов носит характер так называемых «молекулярных болезней», связанных с недостатком в организме тех или иных элементов и соединений.

Одним из таких элементов является селен. Биологически важная роль селена в организме человека признана более 40 лет назад, а понимание механизмов его биологического и медицинского воздействия особенно продвинулось за последние 20 лет [4]. Селен является нормальной компонентой некоторых ферментов, белков, а также аминокриловых производных нуклеиновых кислот. Не так давно установлено, что селен входит в состав 21-й аминокислоты – селеноцистеина, играющего уникальную роль в считывании генетической информации при синтезе белков [5].

Низкий уровень селена может вызвать такие заболевания, как кардиомиопатия, рак, эндемическая остеоартропатия, анемия и др. В Китае известен обширный регион с пониженным содержанием селена в почве, так называемый «селендефицитный пояс», где наблюдается большое число этих заболеваний эндемического характера [6]. Исследования, выполненные в США, показали, что в областях, где уровень содержания селена в злаках низок, смертность от различных видов раковых заболеваний выше, чем в других областях [7].

Как известно, следовые элементы играют важную роль в кислородном метаболизме. Некоторые из них, например Fe и Cu, образуют свободные гидроксильные радикалы, а другие, такие как Zn и Se, способны уменьшать вредное воздействие радикалов на организм. Это свойство селена связано с тем, что он входит в состав фермента-антиоксиданта глутатионовой пероксидазы, защищающего клетки от пероксидантного стресса [8,9]. При этом на активность глутатионпероксидазы, помимо содержания селена, влияет и уровень концентраций витаминов A и C, способствующих усвоению, транспорту и утилизации селена в ферменте.

С функциональной ролью селена в организме тесно связаны и функции витамина E и бета-каротина. Согласно некоторым гипотезам ингибирование канцерогенеза при приеме селена связано с его антиоксидательными свойствами, влиянием на метаболизм раковых опухолей, эффектами воздействия на эндокринную и иммунную системы, а также ингибированием специфических ферментов.

Селен участвует в фотохимических реакциях, связанных с функцией зрения. Глутатионпероксидаза, входящая в состав фоторецепторов сетчатки, влияет на светочувствительность глаза [10,11]. Селен также обладает способностью детоксикации организма от таких вредных элементов, как As, Cd, Hg, Bi и др., способствуя связыванию этих элементов с высокомолекулярными белками плазмы крови и выводу их из организма. В отсутствие селена эти элементы связываются с низкомолекулярным белком металлотioneином и вместе с ним оседают в почках [10,12].

Исследования на субклеточном уровне показывают, что в клетках человеческого организма селен содержится в ядрах, митохондриях, цитоплазме, микросомах и т.д. [6,13,14]. В митохондриях, играющих важную роль в процессах электронного транспорта, синтеза АТФ и др., селена довольно много. А колебания его содержания сильно влияют на функции и структуру митохондрий. Кардиомиопатия (болезнь Кешана) связана именно с нарушением функций митохондрий миокарда.

Установлено, что добавление селена в диету в определенных дозах способствует снижению риска заболевания раком, лечению кардиологических больных, снижению синдрома иммунодефицита (СПИД), замедляет процессы старения и т.д. [15-19]. С другой стороны, высокий уровень селена вызывает эффе́кты токсикоза.

Лечение селеном проводится в разных комбинациях: в одном случае добавлением 50 мкг селена в пищу с α -токоферолом (витамином *E*) и бета-каротином. В другом – с 26 другими минералами и витаминами [9]. В работе [9] лечение рака кожи проводилось с ежедневным приемом 200 мкг селена вместе с пищевой добавкой (nutrition-21).

Особенно часто применяется селен вместе с витамином *E*, дефицит которого часто сопутствует селенодефициту [9,20].

О важной разносторонней роли селена в человеческом организме свидетельствуют материалы 7-го Международного симпозиума «Selenium-2000» (Венеция, октябрь 2000 г.), где селен назван элементом века. По данным Института питания РАМН (Москва) практически на всей территории России наблюдается дефицит селена. С 1998 года в Российской Федерации действует программа «Селен, здоровье, человек», в соответствии с которой производится селенизация населения.

Другим, не менее важным для человеческого организма элементом, входящим в состав всех растений и животных, является иод. Он жизненно необходим для функционирования, развития и роста организма и поступает в него с пищей, водой и воздухом. Из пищевых продуктов наиболее богаты иодом молоко, овощи (особенно капуста), яйца и морские продукты.

Попадая в организм, иод оказывает влияние на обмен веществ, усиливая окислительно-восстановительные процессы. При недостатке иода происходит нарушение функций щитовидной железы, уменьшается выделение в кровь ее гормонов – тироксина и трийодтиронина, что приводит к развитию гипотиреоза.

Содержание иода в воздухе сильно зависит от близости региона к морю. Морской воздух способен восполнить суточную потребность человека в иоде (~200 мкг).

В высокогорных районах, наоборот, наблюдается низкое содержание иода в воздухе, что служит преимущественной причиной его дефицита в человеческом организме и ведет к массовым заболеваниям щитовидной железы. Примером такого региона может служить горная Сванетия в Грузии, где наиболее ярко проявляется массовая тенденция заболеваний щитовидной железы. Особенности этих эндемических заболеваний, а также методы их профилактики были хорошо изучены в 50-60-е годы [21].

В 60–80-х годах на фоне улучшения социальных условий и профилактических мер, связанных с употреблением йодированных продуктов, заболеваемость населения несколько снизилась. Однако впоследствии ситуация изменилась в худшую сторону.

После Чернобыльской аварии в апреле 1986 года на территории Украины, Белоруссии, Грузии и некоторых регионов России в течение 2-3 месяцев наблюдалось распространение радиоактивного йода ^{131}I вместе с другими радионуклидами. Исследования, выполненные в 1986 году, показали повышенное содержание ^{131}I в молоке, молочных продуктах и в овощах, особенно в ранней капусте [22, 23].

Несмотря на то, что изотоп ^{131}I имеет сравнительно небольшой период полураспада, равный 8 суткам, его накопление в щитовидной железе ведет к серьезному нарушению ее функции под действием бета- и гамма-излучений.

Особенно сильно пострадали дети, основой питания которых служило молоко, обогащенное радиоактивным йодом. Исследования показали, что в этот период на территории Грузии содержание ^{131}I в клетках щитовидной железы у детей в 12 раз превышало содержание йода у взрослых [24]. При этом, кроме радиобиологического эффекта, возможен и генетический эффект со всеми далеко идущими последствиями.

Неблагоприятная экологическая обстановка, радиоактивные выбросы в атмосферу при авариях, а также снижение жизненного уровня населения сильно осложнили положение как на постсоветской территории, так и во всем мире. На территории России в настоящее время недостаток йода в той или иной мере испытывает 70 % населения.

В последнее время более глубоко изучены симптомы и результаты йодной недостаточности: эмоциональные (раздражительность, понижение памяти, сонливость и т.д.), кардиологические (артеросклероз, аритмия, деформация сосудистых стенок и т.д.), иммунодефицитные (подверженность инфекциям и простудам). Установлено, что уровень умственного развития, так называемый коэффициент IQ, напрямую связан с содержанием йода в организме.

Установлено, что дефицит йода является причиной умственной отсталости 43 миллионов человек в мире. Ежегодно из-за нехватки йода появляются на свет 100000 детей с врожденным кретинизмом. Поэтому ликвидация йоддефицитных заболеваний является одним из приоритетов ООН в области здоровья человека.

Опыт применения йодированной соли для профилактики йоддефицита в США, Швейцарии и других странах показал, что в случае переизбытка йода возникает заболевание щитовидной железы – индуцированный гипертиреоз. Исследования показали, что только в биотрансформированной форме, синтезированный молекулами белка, йод может усваиваться в организме именно в том количестве, которое ему необходимо – не больше и не меньше.

Такой способностью биотрансформировать и эндогенно присоединять необходимые элементы (селен, йод и др.) в виде комплексов, легко усваиваемых человеческим организмом, обладает *Spirulina platensis*. При этом, будучи живым организмом, спирулина аккумулирует элементы в строго определенном количестве, необходимым организму. Препараты на основе спирулины, содержащей целый комплекс биологически активных веществ, обеспечивают одновременно как лечебное, так и оздоровительное воздействие. Так, например,

селенсодержащие препараты, изготовленные на основе спирулины, будут содержать и токоферол (витамин *E*), и бета-каротин, необходимые при лечении некоторых заболеваний [9, 19].

Исходя из всего изложенного, возникла рабочая гипотеза о целесообразности исследований по созданию Se- и I-содержащих лекарственных препаратов на основе матрицы *Spirulina platensis* для лечения больных той или иной патологией. Во время культивации спирулины селен встраивается в органические молекулы таких соединений, как метионин, цистен, цистин, а также белковые молекулы и др.

Для проверки этой гипотезы необходимо было:

- определить фоновый уровень концентраций элементов, присутствующих в биомассе спирулины;
- изучить динамику накопления селена матрицей спирулины при загрузке питательной среды соединениями селена;
- изучить степень усвоения токсичных элементов биомассой спирулины на примере загрузки ртутью;
- разработать технологию изготовления лечебных и профилактических таблеток на основе биомассы *Spirulina platensis* на примере иода.

Исследования проводились с использованием нейтронной активации. Преимущества инструментального нейтронного активационного анализа на эпитепловых нейтронах (ЭНАА) для изучения многоэлементного состава биологических образцов были показаны ранее [25]. Поэтому для изучения состава *Spirulina platensis* был использован ЭНАА, широко применяемый на импульсном быстром реакторе ИБР-2 ЛНФ ОИЯИ (Дубна) с очень высоким отношением числа эпитепловых нейтронов к тепловым.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия культивации Spirulina platensis

Спирулина хорошо растет в стандартной щелочной минеральной питательной среде при температуре 30–34 °С, рН 8,5–11 и при освещении натриевой лампой. Максимальный прирост клеток наблюдается на 4–5 день культивирования. Культивация проводилась в биореакторе объемом 20 литров. Питательная среда готовилась на дистиллированной воде с добавлением неорганических ингредиентов [26].

Подготовка проб

По окончании культивации клеточная масса спирулины сепарировалась от питательной среды, трижды промывалась дистиллированной водой, а затем центрифугировалась. Полученная сырая биомасса лиофильно высушивалась в адсорбционно-конденсационном лиофилизаторе оригинальной конструкции, разработанном нами ранее в соответствии с методикой, описанной в работах

[27,28]. Затем нативной сухой биомассе с помощью специальной титановой прессформы придавалась форма небольших таблеток различного диаметра и толщины.

Эксперимент

1. Для изучения уровня фоновых концентраций различных элементов в биомассе *Spirulina platensis* культивация проводилась в стандартной питательной среде с использованием дистиллированной воды.
2. Для изучения динамики аккумуляции селена биомассой *Spirulina platensis* культивация проводилась с нагрузкой питательной среды селеном в виде селенистой кислоты H_2SeO_3 («хч») при различных концентрациях в интервале 0,016–2770 мкг/л.
3. Для исследования возможности включения токсичных элементов в состав биомассы спирулины культивация проводилась в среде с нагрузкой ртутью (в качестве токсичного элемента) в виде нитрата ртути $Hg(NO_3)_2 \cdot 0,5 H_2O$ («ч») при концентрациях в интервале $0,0033 \div 33$ мкг/л.
4. Для разработки технологии изготовления йодсодержащих лечебных и профилактических таблеток на основе биомассы *Spirulina platensis* культивация проводилась с нагрузкой питательной среды йодистым калием КИ («осч») в пределах концентраций 10^{-8} – 10^{-4} г/л.
5. Условия эксперимента определялись из следующих соображений: как известно, суточная потребность в йоде для взрослого человека составляет ~200 мкг. В нормальных условиях из организма путем секреции в сутки выводится ~100–200 мкг йода. Исходя из этого в лечебных таблетках содержание йода должно быть ~200–500 мкг, а в профилактических - порядка 100–200 мкг.

Анализ

Для определения долгоживущих изотопов образцы спирулины весом ~0,5 г упаковывались в алюминиевую фольгу, а для определения короткоживущих изотопов – в полиэтилен. Характеристики каналов облучения, связанных с пневмотранспортной системой на реакторе ИБР-2 ЛНФ ОИЯИ, приведены в табл. 1.

Долгоживущие изотопы определялись при облучении в канале Ch1. Образцы облучались 5 суток, перепакуются и затем измерялись дважды – после выдержки 4 и 20 суток. Время измерения варьировалось от 1,5 до 10 часов. Для определения короткоживущих изотопов Mg, Al, Cl, Ca, V, Mn, и I использовался канал облучения Ch2.

Таблица 1. Основные характеристики каналов облучения реактора ИБР-2 ЛНФ ОИЯИ

Каналы облучения	Плотность потока нейтронов, (нейтроны/см ² с) · 10 ¹²			Т, °С [29]	Диаметр канала, мм	Длина канала, мм
	Тепловые	Резонансные	Быстрые			
Ch1	Cd-экран	3,31	4,32	70	28	260
Ch2	1,23	2,96	4,10	60	28	260

Образцы облучались 3 мин и измерялись дважды после выдержки 3–5 и 20 мин в течение 5–8 и 20 мин соответственно. Гамма-спектры наведенной активности измерялись детектором из сверхчистого германия большого объема с разрешением 1,96 кэВ для гамма-линии 1332,4 кэВ ⁶⁰Со с эффективностью регистрации 30 % относительно 3х3'' детектора NaI для той же линии. Обработка данных и определение концентраций элементов проводились с помощью аттестованных стандартов и эталонов, обычно используемых в лаборатории [30].

Так как селен и ртуть относятся к летучим элементам, температура облучения имеет большое значение. Как известно, 90–100 °С являются критической температурой для корректного определения селена и ртути в биологических образцах [31]. Температура облучения в каналах Ch1 и Ch2 не превышала 60–70 °С [29]. Тем не менее, не исключаются незначительные потери селена и ртути. При определении ⁷⁵Se и ¹⁸²Ta по γ-линии 279,1 кэВ учитывался вклад линии ²⁰³Hg.

Для ИНАА-образцов спироулины, обогащенных иодом, в качестве источника нейтронов использовался нейтронный размножитель ПС-1 Института физики АН Грузии, оснащенный пневмотранспортной системой. При плотности потока нейтронов порядка 2·10⁶ нейтронов/(см²·с) и временном режиме T_{обл} = 600 с, T_{выд} = 60 с и T_{изм} = 410 с γ-линия ¹²⁸I 442,9 кэВ (16,9 %) регистрировалась с чувствительностью 2·10³ распадов/(с·мг) иода, вполне достаточной для анализа образцов спироулины, обогащенной иодом.

Аналитический контроль качества

Для контроля качества аналитических измерений использовались три аттестованных стандарта, а именно: лишайник (IAEA, Lichen-336), донные отложения (IAEA SDM-2Т) и датский мох (DK-1). Кроме того, использовались синтетические многоэлементные стандарты для НАА-биологических образцов SSB-1 и SSB-2 [32], разработанные авторами на основе фенол-формальдегидной смолы. Из табл. 2 видно хорошее совпадение полученных результатов с рекомендованными значениями. Точность анализа в целом составляла 10–15 %. Расхождение между вводимым и определяемым количеством Hg в столбце 2 и 3 табл. 2 вызвано испарением ртути во время технологического процесса синтеза фенол-формальдегидной смолы [32].

Таблица 2. Сравнение рекомендованных и полученных НАА-результатов для синтетических многоэлементных стандартов SSB-1 и SSB-2

Элементы	Количество вводимого элемента [32]	Количество элемента, определенного НАА [32]	Количество элемента, определенного ЭНАА в настоящей работе
SSB-1			
Se	2.84	2.80 ± 0.07	2.26 ± 0.33
Cr	1.80	1.78 ± 0.05	1.85 ± 0.20
Au	0.028	0.026 ± 0.0006	0.034 ± 0.0008
Sb	0.47	0.45 ± 0.01	0.44 ± 0.09
Ag	1.89	1.72 ± 0.05	1.92 ± 0.12
Rb	9.45	9.05 ± 0.26	9.12 ± 1.09
Fe	284	296 ± 6	315 ± 40
Zn	18.9	19.5 ± 0.5	22.05 ± 3.52
Co	0.66	0.63 ± 0.05	0.75 ± 0.07
SSB-2			
Ca	5210	3740 ± 160	5400 ± 500
Ba	10.3	10.6 ± 0.3	10.2 ± 1.2
Hg	0.50	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.04
Sn	30.8	24.0 ± 1.9	28.0 ± 4.0
Br	20.8	20.7 ± 0.6	19.4 ± 2
Cs	0.50	0.48 ± 0.01	0.4 ± 0.1
Ni	10.3	9.5 ± 0.6	9.83 ± 1
Sc	37	37.2 ± 0.8	37.8 ± 2
Na	3070	3660 ± 590	3500 ± 320

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Был определен 31 макро-, микро- и следовой элемент в биомассе спирулины, полученной в первом эксперименте при культивации в стандартной питательной среде, приготовленной на дистиллированной воде. Результаты показаны на рис. 1, где элементы расположены по убыванию концентраций в пределах 8 порядков, от макро- до ультраследовых элементов. Полученный набор элементов в дальнейшем должен быть дополнен данными по Pb, Cd, Cu и др., которые могут быть определены с использованием других аналитических методов, таких как атомная абсорбционная спектрометрия (ААС) и масс-спектрометрия с индукционно-связанной плазмой. Результаты НАА для К, Na, Са, Mg, Mn и Zn хорошо совпадают с результатами ААС, полученными авторами в 1996 году [33]. Концентрация железа, полученная ЭНАА, в два раза выше, чем концентрация, полученная ААС, что, вполне вероятно, связано с неполным растворением соединений железа в процессе пробоподготовки в случае ААС.

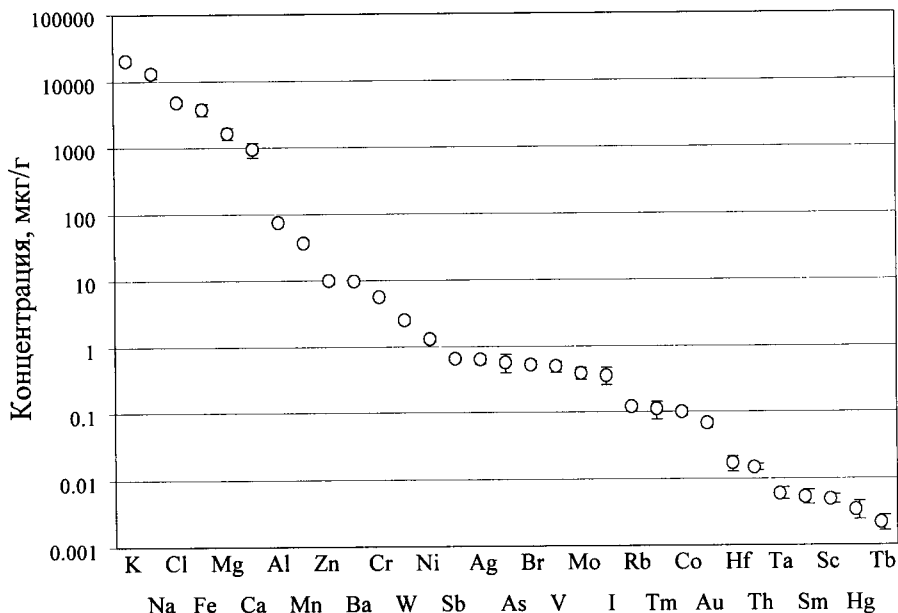


Рис. 1. Фоновый уровень концентраций макро- и микроэлементов в биомассе спирулины

Результаты, полученные НАА в экспериментах с селеном, иодом и ртутью приведены в табл. 3 и показаны на рис. 2. Во всех случаях им соответствует хорошая аппроксимация полиномом второго порядка: $y = -0,00008 \cdot x^2 + 0,3x - 1$, $y = 0,00001x^2 - 0,003x + 0,4$ и $y = 0,0005x^2 + 0,1x + 0,16$ для селена, иода и ртути соответственно. Начиная с концентрации селена 100 мкг/л, наблюдается рост аккумуляирования Se биомассой спирулины с возможным максимумом в области 1100–1200 мкг/л. Эта область концентраций должна быть более подробно изучена в будущих экспериментах.

Для ртути процесс интенсивного включения начинается раньше, когда концентрация Hg в питательной среде ~10 мкг/л.

Можно предположить, что в спирулине селен связывается с аминокислотой – цистином, так как концентрация последнего в биомассе спирулины ~1 % (см. <http://www.spirulina.com/SPBNutrition.html>). Возможность образования Se-цистиновых комплексов и их антиканцерогенная роль обсуждаются в работе [4].

Культивация клеток сопровождается синтезом нуклеиновых кислот, белков, углеводов, пигментов, липидов и др. макромолекулярных структур. Природа и характер биомолекулярных взаимодействий с различными

химическими элементами может быть различной: от слабых связей со свободной энергией 1–7 ккал/моль до сильных ковалентных связей с энергией от –50 до –110 ккал/моль.

Таблица 3. Зависимость аккумуляции Se, I и Hg в биомассе *Spirulina platensis* от нагрузки питательной среды этими элементами в различной концентрации

Тип образца	Нагрузка питательной среды, мкг/л	<i>Spirulina platensis</i> , мкг
Контроль Se*	—	0,69 ± 0,09
1+Se	0,106	1,37 ± 0,15
2+Se	0,55	2,07 ± 0,2
4+Se	5,50	2,06 ± 0,2
5+Se	11,30	6,35 ± 0,6
6+Se	113	12,2 ± 1,2
7+Se	553	128 ± 11
8+Se	2770	159 ± 14
Контроль I*	—	0,3
1+ I	170	0,24
2+I	250	0,42
3+I	500	2,00
Контроль Hg*	—	<0,050
1+Hg	0,0033	0,09 ± 0,05
2+Hg	0,033	0,38 ± 0,11
3+Hg	0,33	0,24 ± 0,07
4+Hg	3,3	0,49 ± 0,15
5+Hg	33	3,9 ± 1,2

* Фоновое содержание Se, I и Hg в биомассе спирулины.

Элементы, определяемые в данной работе методами ИНАА и ЭНАА, по нашей оценке, характеризуются слабыми связями, подобными вандерваальсовым (1–2 ккал/моль) или водородным (3–7 ккал/моль). Хорошо известно, что водородные связи играют существенную роль в биомолекулярных взаимодействиях, поэтому в дальнейшем целесообразно провести изучение природы энергии двойных и тройных комплексов типа Ме-ДНК, Ме-белок и Ме-ДНК-белок.

Технология изготовления лечебных и профилактических препаратов отработывалась на примере йодированной биомассы *Spirulina platensis*. За основу принимались данные ИНАА, полученные на нейтронном размножителе (табл. 4).

Таблица 4. Исходные данные для изготовления таблеток на основе биомассы *Spirulina platensis*

Содержание иода в питательной среде, мг/л	Выход лиофилизованной биомассы, г/л	Концентрация иода в биомассе мг/л	Коэффициент обогащения иодом, R, %
170	0.45	0.24	0.14
250	0.30	0.42	0.17
500	0.80	2.00	0.40

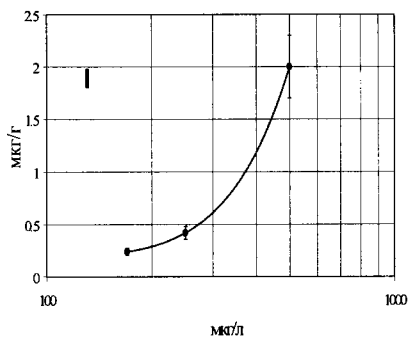
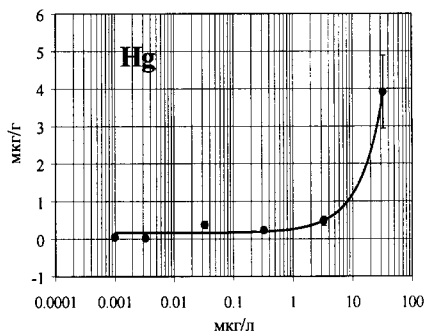
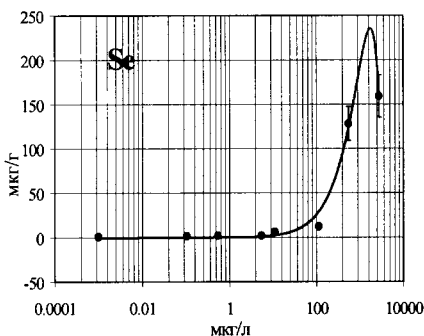


Рис. 2. Зависимость концентрации селена, иода и ртути в биомассе спирулины от концентраций этих элементов в питательной среде

Коэффициент обогащения иодом R определялся как отношение концентрации иода в биомассе спирулины к концентрации иода в питательной среде. Этот коэффициент служит исходным технологическим параметром, определяющим дозировку иода в лечебных таблетках и выбор их массы.

На основании предлагаемой методики были изготовлены иодированные таблетки на матрице *Spirulina platensis*, характеристики которых и способ маркировки приводятся в табл. 5.

Таблица 5. Данные о составе и форме йодированных таблеток на основе биомассы *Spirulina platensis*

Марка	Диаметр таблетки, мм	Биомасса таблетки, г	Содержание йода, мкг
I-100	5	0.5	100
I-200	5	0.5	200
I-400	10	1.0	400
I-500	10	1.0	500

Таблетки марки I-100 и I-200 предназначены для профилактики и лечения заболеваний, вызванных утренним дефицитом йода на ранних стадиях, а таблетки I-400 и I-500 для использования при лечении в особо тяжелых случаях.

В процессе культивации клетки спирулины могут усваивать из питательной среды и некоторые примесные токсичные элементы, такие как Hg, As, Cr, Cd, Pb и др. В табл. 6 приведены значения их фоновых концентраций в биомассе спирулины при данной квалификации используемых реактивов.

Таблица 6. Уровень фоновых концентраций некоторых токсичных элементов в биомассе *Spirulina platensis*

Элемент	Концентрация, мкг/г сухой массы	Примечания
Hg	3-5*	* - данные НАА, полученные на реакторе ИБР-2 в Дубне [34] ** - данные работ [35,36]
As	2-3*	
Cr	3-4*	
Pb	3**	
Cd	0.2**	

Как видно из полученных результатов, концентрации токсичных элементов в биомассе *Spirulina platensis* имеют порядок мкг/г. В следовых количествах эти элементы входят в состав химических реактивов, используемых для приготовления питательной среды. Поэтому для получения биомассы, предназначенной для лекарственных препаратов, необходимо использовать особо чистые химические реагенты («осч»).

В то же время данные США по дозам различных элементов, допустимых для человеческого организма (см. <http://www.spirulina.com/SPBNutrition.html>), показывают, что результаты, полученные нами с использованием реактивов квалификации «хч» и «ч», не превосходят допустимого уровня.

ВЫВОДЫ

1. Изучен состав биомассы сине-зеленой микроводоросли *Spirulina platensis*. Методом ЭНАА определены концентрации 31 макро- и микроэлемента в широком интервале концентраций. Показано, что биомасса спирулины, выращенная согласно предложенной технологии, не содержит токсичных элементов с концентрациями выше допустимых и может служить основой для изготовления лекарственных препаратов.
2. Показана возможность целенаправленного внедрения селена и иода в биомассу спирулины в процессе культивации. Установлена полиномиальная зависимость включения селена и иода в биомассу спирулины от их концентрации в питательной среде.
3. На примере ртути показана возможность аккумуляирования токсичных элементов биомассой спирулины.
4. На примере загрузки питательной среды ртутью показана возможность предварительного определения опасного уровня содержания токсичных элементов при создании лекарственных препаратов. Установлено, что для культивации биомассы спирулины при создании лекарственных препаратов желательно использовать химические реактивы высокой чистоты.
5. На основе результатов НАА в биомассе *Spirulina platensis*, культивированной с нагрузкой иодом, установлены важные технологические параметры для изготовления лечебно-профилактических иодированных таблеток.

Авторы выражают глубокую благодарность профессору **А.Чатту** (Университет, Дальхаузи, Канада) и профессору **Э. Стайнесу** (Норвежский университет науки и технологии, Трондхейм) за полезные обсуждения. Настоящая работа выполнена при поддержке гранта Международного агентства по атомной энергии IAEA - 11528/Regular Budget Fund (RBF).

Литература

1. D.Fox, Health Benefits of Spirulina. In *Spirulina, Algae of Life*, Bulletin No. 12. April 1993, Publ. by Institute of Oceanography, Monaco.
2. A.Belay, Y.Ota, K.Miyakawa., H.Shimamatsu, Current Knowledge on Potential Health Benefits of Spirulina. *J. Appl. Phycol.*, No.5 (1993) 235-241.
3. L.Evets et al. Means to normalize the levels of immunoglobuline E using the food supplements *Spirulina*. 1994, Grodnenski State Medical Univ. Russian Federation Committee of Patents and Trade. Patent (19)RU(11) 2005486. Jan.15, 1994, Russia.
4. H. Foster. Health, Disease and the Environment. Belhaven Press, London, 1992.
5. J.F.Atkins, R.F.Gestland. The Twenty-First Amino Acid. *Nature*, Vol. 407, 28 September (2000) 463-464.
6. C.Chen, P.Zhang, X.Hu, Z.Che. Subcellular distribution of selenium and Se-containing proteins in human liver. *Biochemica et Biophysica Acta* 1427 (1999) 205-215.

7. L.C.Clark, K.P.Cantor, W.H.Allaway. Selenium in forage crops and cancer mortality in US countries. *Arch. Environ. Health*, 46 (1991) 37-42.
8. C.Chen, B.Chen, J. Zhou, H.Xu. Study of the relationship of reactive oxygen species and biological dose-responsive curve of selenium. *Trace Elements and Electrolyte*. Vol. 14, No.4 (1997) 197-201.
9. L.C.Clark, G.F.Combs, B.W.Turnbull, et al. Effect of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. *J. Amer. Med. Assoc.* December 25, Vol.276, No.24 (1996) 1957-1963.
10. Ю.А.Петрович, Р.П.Подорожная. Селеноэнзимы и другие селенопротеиды, их биологическое значение. *Успехи современной биологии*, том 91, вып.1 (1981) 127-144.
11. Ж.И.Абрамова, Г.И.Оксенгендлер. Человек и противooksидлительные вещества. Л.: Наука, 1985.
12. L.A.Daniel. Selenium metabolism and bioavailability. *Biol.Trace Elem. Res.* 54 (1996) 185-199.
13. Л.К.Ткешелашвили, И.С.Меписашвили, Л.М.Мосулишвили, Н.Е.Кучава. Нейтронно-активационный анализ тяжелых металлов в субклеточных компонентах. Сб. Радиационные исследования, том. II, Тбилиси, Мецниереба, 1975, стр. 25-32.
14. C.Chen, P.Zhang, X.Hu, Z.Che. Investigation of selenium distribution in subcellular fraction of human liver by neutron activation analysis. *Biol. Trace Elem. Res.*, Vol.71-72 (1999) 131-138.
15. G. F.Combs Jr., Chemopreventive mechanisms of selenium. *Med. Klin.*, Oct.15, 94, Suppl. 3 (1999) 18-24.
16. M.Navarro-Alarcon, H.L.de la Serrana, V.Perez-Valero, C.Lopez-Martinez, Serum selenium levels as indicators of body status in cancer patients and their relationship with other nutritional and biochemical markers. *Sci. Total Environ.* 1998, Apr. 8, 212(2-3) (1998) 195-202.
17. K.Schumacher, Effect of selenium on the side effect profile of adjuvant chemotherapy/radiotherapy in patients with breast carcinoma. Design for a clinical study. *Med. Klin.* 1999, Oct.15, 94, Suppl 3 (1999) 45-48.
18. R.Ebert-Duming, J.Seufert, D.Schneider, J.Kohrel, N.Schutze, F.Jacob. Expression of selenoproteins in monocytes and macrophages - implications for the immune system. *Med. Klin.* Oct. 15; 94, Suppl. 3 (1999) 29-34.
19. D.H. Holben and A. M.Smith, The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J. An. Diet. Assoc.* 1999, July; 99(7) (1999) 836-843.
20. J.E.van Vleet, V.J.Ferrans. Etiological factors and pathology alteration in selenium-vitamin E deficiency and excess in animals and humans. *Biol. Trace Elem. Res.*, 33 (1992) 1-21.
21. А. И. Войнар. Микроэлементы в живой природе. М. 1962. стр. 74-92
22. L.M.Mosulishvili, N.M.Katamadze, N.I.Shoniya, E.I.Ginturi. Kinetic Regularities of Change in the Concentration of Radionuclides in the Georgian Tea Content. *Med. Radiol.*, No.1 (1990) 42-45.
23. L.M.Mosulishvili, N.I Shoniya, N.M.Katamadze, E.N.Ginturi, Environmental radionuclide distribution in Georgia after the Chernobyl catastrophe. *J Anal. Chem.* (in Russian), 49/1 (1994) 135-139.

24. N.Katamadze, N.Kuchava, L.Mosulishvili, M.Tsitskishvili. Evaluation of thyroid gland irradiation dose induced by Chernobyl radiation for Tbilisi Region population. *Bull. Georg. AS*, 157/2 (1998) 213-216.
25. M.V.Frontasyeva and E.Steinnes. Epithermal neutron activation analysis for studying the environment. Proc. *Int. Symposium on Harmonization of Health Related Environmental Measurements Using Nuclear and Isotopic Techniques* (Hyderabad, India, 4-7 November, 1996), IAEA 1997, p. 301-311.
26. L.Mosulishvili, A.Belokobilsky, E.Gelagutashvili, A.Rcheulishvili, N.Tsibakhashvili. The study of the mechanism of cadmium accumulation during the cultivation of *Spirulina platensis*. *Proc. Georgian Acad. Sci., Biol. Ser.1*, Vol. 23, No.1-6 (1997) 105-113.
27. L.M.Mosulishvili, V.S.Nadareishvili, N.E.Kharabadze, A.I.Belokobilsky. Facility for lyophilization of biological preparations. Patent USSR N779765, *Bull.* 42 (1980).
28. L.Mosulishvili, N.Kharabadze, A.Belokobilsky, A.Gudushauri. Application of the absorbtion-condensation method of lyophilization in the activation analysis of biological materials. *Bull. Georg. AS*. 98/3 (1980) 685-688.
29. M.V.Frontasyeva, S.S.Pavlov: Analytical investigations at the IBR-2 reactor in Dubna. *JINR Preprint* E14-2000-177, Dubna, 2000.
30. T.M.Ostrovnyaya, L.S.Nefedyeva, V.M.Nazarov., S.B.Borzakov and L.P.Strelkova. Software for INAA on the basis of relative and absolute methods using nuclear data base, in Activation analysis in environment protection, D 14-93-325, Dubna, 1993, p. 319-326.
31. L.M.Mosulishvili, N.E.Kuchava, N.I.Shonia, Investigation of the termostability of Synthetic Standards for instrumental neutron activation analysis of biological samples. *Proc. Georg. AS, Biol. Ser.*, 1982, Vol.107, No.2 (1982) 501-504.
32. L.M.Mosulishvili, V.Yu.Dundua, N.E.Kharabadze, E.Yu.Efremova, N.V.Chikhkladze, Synthetic multielement standard samples for serial neutron activation analysis of biological materials, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, Article 83/1 (1984) 13-19.
33. A.Belokobilsky, M.Gelashvili, L.Mosulishvili, A.Rcheulishvili, A.Khizanishvili. Investigation of the Change of *Spirulina platensis* Physical-Chemical Properties in the Growth Dynamics. *Proc. Georg. AS, Biol. Ser.*, Vol. 22, No 1÷6 (1996) 104-109.
34. L.M.Mosulishvili, Ye.I.Kirkesali, A.I.Belokobylsky, A.I.Khizanishvili, M.V.Frontasyeva, S.F.Gundorina, C.D.Oprea. Epithermal neutron activation analysis of blue-green algae *Spirulina platensis* as a matrix for selenium-containing pharmaceuticals, *JINR Preprint* E14-2000-225, Dubna, 2000 (submitted to *JRNC*).
35. A.Belokobilsky, N.Tsibachashvili, A.Rcheulishvili, L.Mosulishvili, Accumulation of Cd(II) in C-phycoyanin from *Spirulina platensis*. *Bul. Georg. AS*. Vol.159, No.1 (1999) 140-143.
36. J.J.Ortega Calvo, C.Mazuelos, B.Hermosin, C.Saiz-Jimenez. Chemical composition of *Spirulina* and eucaryotic algae food products marketed in Spain. *J. Appl. Phyc.*, No.5 (1993) 425-435.

Рукопись поступила в издательский отдел
14 марта 2001 года.

Мосулишвили Л.М. и др.

D14-2001-39

Экспериментальное обоснование возможности разработки селен- и иодсодержащих медицинских препаратов на основе сине-зеленой водоросли *Spirulina platensis*

Экспериментально показана возможность создания селен- и иодсодержащих медицинских препаратов на основе сине-зеленой водоросли *Spirulina platensis*. Методом эпитеплового нейтронного активационного анализа изучен фоновый макро- и микроэлементный состав биомассы спирулины (Na, Mg, Al, Cl, K, Ca, Sc, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni (при помощи (*n, p*)-реакции), As, Br, Zn, Rb, Mo, Ag, Sb, I, Ba, Sm, Tb, Tm, Hf, Ta, W, Au, Hg, Th). Определен характер зависимости концентраций селена и иода в биомассе спирулины от их концентрации в питательной среде при культивации с нагрузкой. На примере ртути показана возможность предварительного определения уровня содержания токсичных элементов. Установлены технологические параметры для изготовления йодированных лечебно-профилактических таблеток на основе биомассы *Spirulina platensis*.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики им. И.М.Франка ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2001

Перевод авторов

Mosulishvili L.M. et al.

D14-2001-39

Experimental Substantiation of the Possibility of Developing Selenium- and Iodine-Containing Pharmaceuticals Based on Blue-Green Algae *Spirulina Platensis*

The great potential of using blue-green algae *Spirulina platensis* as a matrix for the production of selenium- and iodine-containing pharmaceuticals is shown experimentally. The background levels of 31 major, minor and trace elements (Na, Mg, Al, Cl, K, Ca, Sc, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni (using (*n, p*)-reaction), As, Br, Zn, Rb, Mo, Ag, Sb, I, Ba, Sm, Tb, Tm, Hf, Ta, W, Au, Hg, Th) in *Spirulina platensis* biomass were determined by means of epithermal neutron activation analysis. The dependence of selenium and iodine accumulation in spirulina biomass on a nutrient medium loading of the above elements was characterised. To demonstrate the possibilities of determining toxic element intake by spirulina biomass, mercury was selected. The technological parameters for production of iodinated treatment-and-prophylactic pills are developed.

The investigation has been performed at the Frank Laboratory of Neutron Physics, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2001

Редактор Е.Ю.Шаталова. Макет Н.А.Киселевой

Подписано в печать 22.05.2001

Формат 60 × 90/16. Офсетная печать. Уч.-изд. листов 1,62

Тираж 210. Заказ 52593. Цена 1 р. 95 к.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
Дубна Московской области