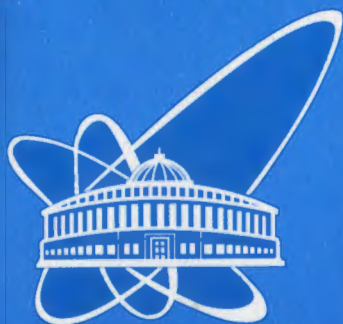


109-02



ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Дубна

57 308

Д14-2002-109

Л. М. Мосулишвили*, А. И. Белокобыльский*,
Е. И. Киркесали*, М. В. Фронгасьева, С. С. Павлов,
Н. Г. Аксенова

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
СОЕДИНЕНИЙ ХРОМА С СИНЕ-ЗЕЛЕННОЙ
МИКРОВОДОРОСЛЬЮ *SPIRULINA PLATENSIS*

Направлено в журнал «Nature»

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

2002

Введение

Одним из важнейших направлений современных исследований в области экологии и медицины является определение роли следовых элементов в жизненно важных функциях человеческого организма, а также их возможного воздействия на здоровье человека через окружающую среду [1]. Особый интерес с этой точки зрения представляет хром, жизненно необходимый следовой элемент, одновременно обладающий способностью оказывать канцерогенное и токсичное воздействие на человека [2-5].

Драматическая история хрома началась более ста лет назад, когда его шестивалентные соединения были отнесены к самым опасным для человека канцерогенам [6]. Хрому посвящено огромное число исследований ученых различных специальностей (<http://www.iyte.edu.tr/chemistry/new.htm>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/>).

Хром относится к числу глобально рассеянных элементов. Содержание его в земной коре $8,3 \cdot 10^{-3} \%$, в водах мирового океана в среднем 0,2 мкг/л, а в питьевой воде – в пределах от 0,0023–0,079 мг/л. Присутствие хрома в почвах от 50 до 70 мг/кг сухой почвы обуславливает передвижение его по пищевой цепи: почва – растения – животные – человек. В элементарном состоянии Cr в природе не встречается. Общий характер токсического действия хрома находится в прямой зависимости от степени его окисления. Независимо от пути введения в организм избыточного количества хрома, его соединения, в первую очередь, воздействуют на почки, а затем на печень, поджелудочную железу, центральную нервную систему, репродуктивную систему, а также оказывают канцерогенный эффект [7]. Обладая различной валентностью (+2, +3, +4, +5 и +6), хром образует многочисленные комплексные соединения. Однако неизвестно, какие из промежуточных форм являются канцерогенами или мутагенами. В природе наиболее устойчивы соединения CrIII и CrVI. CrIII более распространен в окружающей среде, но основной (primary) токсичной формой является CrVI. Через каналы транспорта анионов SO_4^{-2} и HPO_4^{-2} CrVI легче проникает в клетки, чем CrIII. В клетках соединения CrVI участвуют в окислительно-восстановительных реакциях и снижают степень окисления до +5, +4, +3, вплоть до кинетически стабильного CrIII [8]. Восстановление CrVI внутри клеток обуславливает канцерогенный и генотоксический эффект соединений хрома. Предполагается, что повреждение генетического материала клеток – хромосомные aberrации, разрывы одиночных спиралей ДНК, образование

всякого рода поперечных связей, окислительные повреждения и т.д. – все это является причиной канцерогенности и мутагенности больших концентраций хрома [7].

С другой стороны, хром является жизненно важным элементом, без которого организм не может нормально функционировать. Наиболее важной ролью хрома является регуляция сахара (фактор глюкозной толерантности, или переносимости глюкозы). По поводу механизма активации хромом инсулина существует множество предположений. Авторы работы [3] предполагают, что биологически активная форма хрома есть комплекс хрома, никотиновой кислоты и, возможно, аминокислот – глутаминовой кислоты, глицина и цистеина. В работе [9] показано, что связывание хрома с матрицей ДНК приводит к усилению синтеза РНК (*in vitro*), что может свидетельствовать о том, что Cr, подобно Zn, регулирует экспрессию генов, и в результате этого синтезируется молекула, потенцирующая действие инсулина. Хром способствует участию инсулина в метаболизме углеводов, липидов, белков и нуклеиновых кислот. Под воздействием хрома у инсулина формируется нужная стереоформа, благодаря чему этот гормон эффективно переносит глюкозу в клетки тканей.

Хром является активатором ряда ферментов (фосфоглюкомутазы, цитохромоксидазы, трипсина и др.), участвует в регулировании метаболизма холестерина, влияет на синтез макромолекул [5].

Исследования показали, что исключение хрома из диеты животных вызывает повышение концентраций глюкозы в крови и моче, характерное для сахарного диабета и связанное с недостаточной выработкой гормона инсулина клетками поджелудочной железы. При этом содержание инсулина в крови было нормальным, но в отсутствие хрома его активность не проявлялась. Добавление хрома в диету или его внутривенное введение быстро снижало уровень глюкозы в крови животных [4].

Недостаток хрома в организме человека ведет к нарушению обмена липидов и жиров, угнетению роста, уменьшению веса, сокращению продолжительности жизни, нарушению координации движений и метаболизма азота. С недостатком хрома иногда связаны высокий уровень холестерина, утомляемость, непереносимость алкоголя и т.д. Особенно часто дефицит хрома проявляется у детей и юношей в заболеваниях, связанных с нарушением белкового обмена.

Во всех перечисленных случаях, как правило, добавление хрома в диету способствует лечению заболеваний. Общее содержание хрома в человеческом организме порядка 6 мг [10]. В мягких тканях порядка 1,8 мг, в костных – 4,8 мг. Баланс хрома для человека в среднем 150 мкг в сутки с пищей и жидкостями, а с воздухом – 0,1 мкг. Выводится хром преимущественно с мочой (70 мкг) и калом (80 мкг).

Содержание хрома в продуктах питания колеблется от 0,57 мг/кг в щавеле до 0,01 мг/кг в рисе [10]. Содержание хрома наиболее высоко в говяжьей печени, мясе, птице, натуральных зернобобовых, дрожжах [4].

Известно, что CrVI всасывается лучше, чем CrIII. В желудке CrVI восстанавливается до CrIII, который соединяется с β -глобулиновой фракцией белков сыворотки и расходуется по организму в физиологических концентрациях в составе трансферрина.

Постановка задачи

Из всего вышеизложенного очевидно, насколько важно создание эффективных и биологически активных препаратов хрома для лечебных и профилактических целей. Для определения необходимых доз Cr следует учитывать, что его суточная доза, применяемая в специальных лечебных целях при диабете для стимулирования адаптогенных реакций организма, составляет 75–200 мкг и не должна превышать 250 мкг [1]

В настоящее время в качестве биоактивной пищевой добавки часто применяется пиколинат хрома – дериват аминокислоты, способствующий эффективному использованию хрома в организме для формирования стереоформы инсулина, необходимой для транспорта глюкозы в клетки тканей [11].

Поставив задачу разработки хромсодержащего препарата, мы выбрали в качестве основы биомассу сине-зеленой микроводоросли *Spirulina platensis*.

Благодаря своим разносторонним уникальным свойствам и богатому составу (белки, аминокислоты, β-каротин, γ-линоленовая кислота, витамины и др.) спирулина в настоящее время все более широко применяется в фармакологии и медицине.

Биомасса *Spirulina platensis* уже использовалась нами ранее в исследованиях возможности создания селен- и иодсодержащих препаратов [12, 13]. Помимо этого, известно, что препараты спирулины сами по себе при длительном применении приводят к значительному улучшению состояния диабетиков. Поэтому можно ожидать, что препараты спирулины, содержащие в оптимальных количествах эндогенно связанный хром, окажутся еще более эффективными в борьбе с диабетом и другими заболеваниями, вызванными дефицитом хрома.

Исходя из этого нами была поставлена задача культивации *Spirulina platensis* при различных нагрузках питательной среды соединениями хрома. Учитывая разную степень токсичности CrIII и CrVI, мы исследовали степень их усвояемости клетками спирулины в динамике роста с одновременным контролем качества биомассы. Исследовалась также зависимость концентрации эндогенно связанного хрома в спирулине от концентраций Cr в питательной среде. На основе этих исследований определялись оптимальные дозы CrIII в предлагаемых хромсодержащих препаратах на основе биомассы *Spirulina platensis*.

В связи с тем, что некоторые микроорганизмы в процессе метаболизма способны взаимодействовать с рядом элементов, меняя их валентность, необходимо было проверить, не имеет ли место переход CrIII→CrVI в питательной среде при культивации клеток спирулины с нагрузкой CrIII. Ввиду характера поставленной задачи создания хромсодержащих фармацевтических препаратов проведение этих исследований было особенно важным. Наряду с поиском CrVI можно было проверить и присутствие CrV, как промежуточной формы: в двух вариантах гипотетической схемы трансформации валентности хрома: CrIII→CrV→CrVI и CrVI→CrV→CrIII.

Материалы и методы

В работе использовалась сине-зеленая микроводоросль *Spirulina platensis* (штамм IPPAS В-256), приобретенная в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Культуру выращивали в течение 5 суток в стандартной питательной среде Заруха по методу, описанному в работе [14]. Клетки пятисуточной культуры *Spirulina platensis* осаждали центрифугированием при 3000 g в течению 10 мин.

Полученный осадок вручную суспензировали в слабо притертом гомогенизаторе Поттера в среде Заруха. Гомогенизация давала возможность частичного укорочения нитей спирулины, что впоследствии способствовало ускорению ее роста при культивации.

Таким способом из 30 г плотного осадка готовились 3 л гомогенной суспензии спирулины, которая в дальнейшем использовалась в экспериментах. По окончании экспериментов во всех случаях отбирались пробы полученной суспензии спирулины и после центрифугирования и промывки из них готовились таблетки для нейтронного активационного анализа.

Содержание хрома в экспериментальных образцах определялось методом эпитеплового нейтронного активационного анализа (ЭНАА) на импульсном быстром реакторе ИБР-2 в ЛНФ ОИЯИ (Дубна) при потоке нейтронов 10^{12} н/(см²·с). Характеристики каналов облучения и пневмотранспортной системы лаборатории активационного анализа подробно даны в работе [15].

Методика ЭНАА образцов спирулины, ранее применённая нами, описана в работах [12, 13].

Контроль качества аналитических измерений проводился с помощью аттестованных стандартов, предназначенных для анализа биологических образцов: лишайника (IAEA, Lichen-336), донных отложений (IAEA SDM-2Т) и датского мха (ДК-1).

Обработка данных ЭНАА и определение концентраций хрома проводились с помощью методики и программ, разработанных и используемых в ЛНФ ОИЯИ [16].

Контроль качества биомассы спирулины проводился с помощью микроскопа, а белковый состав проверялся с помощью метода геле-электрофореза.

Для доказательства того, что в питательной среде при культивации спирулины не происходит перехода CrIII в токсичный CrVI под действием продуктов жизнедеятельности клеток *Spirulina platensis* применялась методика колориметрического определения CrVI с помощью дифенилкарбазида (1,5 дифенилкарбогидразида, (C₆H₅NHNH)₂CO) [17,18]. Этот реагент в присутствии CrVI в диапазоне концентраций 0,1-10 мкг/мл окрашивается в красно-фиолетовый цвет и при последующем фотометрировании дает пик 540 нм.

Для определения промужеточной формы CrV использовался метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с чувствительностью порядка $5 \cdot 10^{-10}$ г по CrV.

Экспериментальная часть

В первой серии экспериментов исследовалась зависимость концентрации CrIII в биомассе *Spirulina platensis* от концентрации хрома в питательной среде.

Суспензия спирулины, приготовленная по способу, описанному выше, разливалась в 12 конических колб по 150 мл в каждую, а затем в них добавляли в качестве нагрузки питательной среды 0,1 М раствор уксуснокислого хрома $\text{Cr}(\text{CH}_3\text{COOH})_3$ в различных концентрациях CrIII – от 38 до 2250 мкг на 150 мл.

Культивация спирулины проводилась в течение 5 суток при температуре 34 °С, в щелочной среде при pH 9,5-10, освещении двумя лампами накаливания по 150 В каждая и перемешивании 160 об/мин на аппарате УВМТ-12-250.

Вторая серия экспериментов проводилась в точном соответствии с первой, но в качестве нагрузки питательной среды добавляли соединение CrVI в виде 0,1 М раствора бихромата калия $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ в аналогичных концентрациях по CrVI.

По окончании экспериментов во всех случаях собирался урожай со 150 мл раствора каждой колбы путем центрифугирования при 3000 г в течение 20 мин при 4 °С.

Полученные осадки промывались бидистиллированной водой и снова центрифугировались при тех же условиях. Окончательная промывка проводилась дистиллированной водой, затем следовало центрифугирование при 12000 г в течение 20 мин при 4 °С.

Полученный плотный осадок высушивался в адсорбционно-конденсационном лиофилизаторе собственной конструкции [17], а затем из полученной биомассы с помощью титановой прессформы готовились таблетки, предназначенные для ЭНАА.

Третья серия экспериментов проводилась с целью исследования влияния нагрузки CrIII на рост клеток спирулины. В суспензию спирулины, приготовленную способом, описанным выше, добавляли уксуснокислый хром в различных концентрациях (0; 0,5; 2,5 и 10 мг/л). Во всех случаях проводилась культивация клеток в течение 8 дней. Одновременно качество биомассы проверялось под микроскопом. Белковый состав биомассы определялся методом гель-электрофореза.

В четвертой серии экспериментов в раствор суспензии спирулины добавляли в одном случае уксуснокислый хром в концентрации 10мг/л по CrIII, а в другом – бихромат калия в аналогичной концентрации по CrVI.

Культивацию проводили в течение 7 дней. В первом случае каждый день отбирались пробы как для колориметрического определения присутствия CrVI, так и для определения присутствия CrV методом ЭПР. Во втором случае пробы отбирались только для определения CrV методом ЭПР.

Обсуждение результатов

Результаты, полученные методом ЭНАА в первом и втором экспериментах, представлены на рис. 1 и в табл. 1.

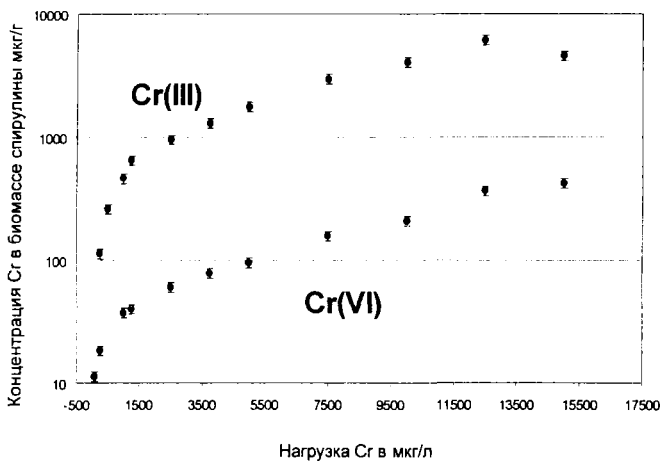


Рис. 1. Зависимость концентрации Cr в биомассе *Spirulina platensis* от концентрации Cr в питательной среде

На рис. 1 показана зависимость концентрации Cr в биомассе *Spirulina platensis* от концентраций Cr в питательной среде (для CrIII и CrVI).

Как видно из рисунка, спирулина, в противоположность другим живым объектам и клеточным культурам, преимущественно поглощает из питательной среды CrIII в виде уксуснокислого хрома. Степень связывания CrVI примерно на два порядка ниже по сравнению с CrIII. Возможно, что легкая усвояемость CrIII обусловлена тем, что он находится в соединении с органическим веществом – уксусной кислотой, а известно, что органические соединения Cr легче проникают в клетки.

Характерно, что добавление CrIII в концентрациях от 0,5 мг до 15 мг на 1 л питательной среды приводит к увеличению количества потребляемого клетками хрома без выхода на насыщение.

Это облегчает задачу поиска оптимальных доз биологически связанного CrIII в *Spirulina platensis* при создании препаратов «Cr-спирулина» для медицинских целей и позволяет рекомендовать 30–100 мкг/г в качестве пищевой добавки и 200–250 мкг/г для лечебно-профилактических целей.

Таблица 1. Результаты ЭНАА образцов спирулины, культивированной с нагрузкой питательной среды хромом

	Концентрация Cr в питательной среде, мкг/л	Концентрация Cr в биомассе <i>Spirulina platensis</i> , мкг/г	Погрешность, %
CrIII	15007,50	4558,00	9
	12506,25	6171,00	9
	10005,00	4044,00	9
	7503,75	2993,00	9
	5002,50	1773,00	9
	3751,88	1309,00	9
	2501,25	956,20	9
	1250,63	653,00	9
	1000,50	464,60	9
	500,25	260,60	9
	250,13	113,40	10
	74,24	11,34	10
	CrVI	15007,50	422,5
12506,25		363,8	9
10005,00		208,1	9
7503,75		157,2	10
5002,50		95,51	10
3751,88		78,34	9
2501,25		60,39	11
1250,63		40,20	10
1000,50		37,28	10
250,13	18,40	23	

Результаты третьей серии экспериментов по исследованию влияния нагрузки CrIII в различных концентрациях на рост клеток *Spirulina platensis* показаны на рис. 2.

Как видно из рисунка, прирост биомассы спирулины в течение 5–6 суток практически не меняется и только после этого начинает уменьшаться под действием больших концентраций нагрузки. Одновременно проводимый микроскопический контроль качества биомассы и определение белкового состава методом гель-электрофореза показали, что они также не изменяются.

Аналогичные исследования, проводимые при культивации спирулины в присутствии CrVI, показали, что здесь наблюдается как изменение качества биомассы (появляются хлорозные клетки), так и ее белкового состава.

Методика колориметрического определения CrVI с помощью дифенилкарбазида показала отсутствие шестивалентной формы во всех 7 пробах из четвертой серии экспериментов по культивации спирулины с нагрузкой CrIII.

Метод ЭПР также показал отсутствие резонансного сигнала, соответствующего CrV, как во всех пробах с нагрузкой CrIII, так и в пробах с нагрузкой CrVI.

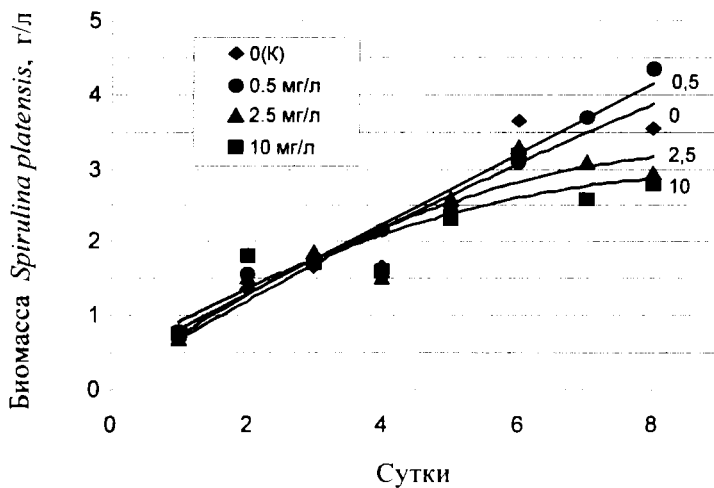


Рис. 2. Кинетика роста биомассы *Spirulina platensis*

Выводы

1. Установлено, что клетки сине-зеленой микроводоросли *Spirulina platensis* способны интенсивно аккумулировать из питательной среды CrIII, введенный в виде уксуснокислого хрома. При этом клетки спирулины поглощают CrIII из питательной среды, добавляемый в концентрациях от 0,5 мг/л до 15 мг/л без выхода концентрационной зависимости на насыщение.
2. Ионы CrVI в виде бихромата калия, добавляемые в питательную среду в тех же концентрациях, что и ионы CrIII, поглощаются клетками *Spirulina platensis* на два порядка меньше по сравнению с CrIII и подавляют рост и функционирование клеток.
3. На основании выполненных исследований установлен оптимальный уровень концентраций хрома в матрице *Spirulina platensis* в пределах 30–100 мкг/г в качестве пищевой добавки и до 200–250 мкг/г для лечебно-профилактических целей.
4. Выбранные условия культивации дают возможность эндогенного включения CrIII в биомассу спирулины в заданных дозах с сохранением ее природных качеств и белкового состава.
5. В процессе культивации клеток спирулины в питательной среде с нагрузкой CrIII переход хрома в токсичную форму CrVI не наблюдался.

Работа выполнена при поддержке МНТЦ (контракт G-408).

Литература

1. Trace elements in human nutrition and health. World Health Organization. Geneva. 1996, 155-160.
2. R.A. Anderson. Recent advances in the role of chromium in human health and diseases. In: Essential and toxic trace elements in human health and diseases. Ed. A.S. Prasad. New York, Alan R. Liss; 1988, 189-197.
3. W. Mertz et al. Chromium – an overview. In: Chromium in nutrition and metabolism. Ed. D. Shapcott, Y. Hubert, Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1979, 1-14.
4. R.A. Anderson et al. Dietary chromium intake. In: Abstracts of the 14th International Congress of Nutrition. Seoul, 1989, 488.
5. H.A. Schroeder, D.V. Frost, I.I. Balassa. Essential trace metals in man, J. Chron. Dis. Vol. 23, 1970, 227-243.
6. R.M. Stern in Biological and Environmental Aspects of Chromium. Ed. Langard, Elsevier, Amsterdam, 1982, 5-47.
7. М.И. Михеев. Хром и его соединения. Вредные химические вещества. Неорганические соединения элементов V-VIII группы. Ленинград, «Химия», 1989, 297-323.
8. R. Codd, C.T. Dillon, A. Levind, P.A. Lay. Studies of genotoxicity of chromium from the test tube cell. Coordination Chemistry Reviews. 216-217, 2001, 537-582.
9. S.Okada, H. Ohba, M. Tanijama. Alteration in acid synthesis by CrIII. J. of inorganic biochemistry. 15, 1981, 223-231.
10. Ю.Н. Москалев. Минеральный обмен. М. Медицина, 1985, 186-190.
11. М. Рисман. Биологически активные пищевые добавки. Арт-Бизнес-Центр, Москва, 1989, 220.
12. 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.
13. L.M. Mosulishvili, Ye.I. Kirkesali, A.I. Belokobylsky, A.I. Khizanishvili, M.V. Frontasyeva, S.S. Pavlov, S.F. Gundorina. Experimental substantiation of the possibility of developing selenium – and iodine-containing pharmaceuticals based on blue-green algae *Spirulina Platensis*. JINR Preprint D14-2001-39. Dubna, 2001.
14. М.Г. Владимирова, В.Е. Семененко. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. Москва. Мир, 1968.
15. M.V. Frontasyeva, S.S. Pavlov. Analytical Investigation at the IBR-2 Reactor in Dubna. JINR Preprint E14-2000-177. Dubna, 2000.
16. Т.М. Ostrovnaya, L.S. Nefedyeva, V.M. Nazarov, S.B. Borzacov, L.P. Strelkova. Software for INAA on the basis of relative and absolute methods using data base. In activation analysis in environment protection, D-14-93-325, Dubna, 1993, 319-326.
17. American Public Health Association In Standard Methods for Experimentation of Water and Wastewater, 18th ed.; Washington, DC, 1992, 3.5, 3.59, 5.2 and 9.35.
18. Urone P.F. Stability of colorimetric reagent for chromium determination by s-diphenylcarbazide, in various solvents. Anal. Chem. 1955, 27:13,1355.
19. L.M. Mosulishvili, V.S. Nadareishvili, N.E. Kharabadze, A.I. Belokobylsky. Facility for lyophilization of biological preparation. Patent USSR N779765, Bull. 42, 1980.