

УДК 615.07, 543

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ ЙОДИРОВАННЫХ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МАТРИЦЫ МИКРОВОДОРОСЛИ *SPIRULINA PLATENSIS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЯДЕРНО-ФИЗИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА

Л.М.Мосулишвили^а, Е.И.Киркесали^а, А.И.Белокобыльский^а,
А.И.Хизанишвили^а, М.В.Фронтасьева^б, С.С.Павлов^б,
С.Ф.Гундорина^б

^аИнститут физики им. Э.Л.Андроникашвили АН Грузии, Тбилиси

^бОбъединенный институт ядерных исследований, Дубна

Показана возможность создания лечебно-профилактических лекарственных препаратов на основе сине-зеленой микроводоросли *Spirulina platensis*. Методом НАА определен фоновый уровень концентраций йода в биомассе *Spirulina platensis* и содержание примесных элементов. Найден оптимальный интервал концентраций йода в качестве нагрузки питательной среды при культивации *Spirulina platensis* для получения лекарственных препаратов с заданным содержанием йода. Установлены технологические параметры для изготовления йодированных таблеток и предложен способ их маркировки.

The possibility of the treatment and prophylactic pharmaceuticals based on blue-green algae *Spirulina platensis* was demonstrated. NAA was used to determine the background level of iodine concentration as well as of element-impurities in the *Spirulina* biomass. The optimal range of iodine concentrations used for leading the nutrient media for *Spirulina platensis* cultivation for production of iodine-containing pharmaceuticals with a desirable iodine content was found. The technological parameters to produce iodinated pellets were established and the mode of their labeling was offered.

ВВЕДЕНИЕ

Йод — это один из химических элементов, являющихся постоянной составной частью растительных и животных организмов. Он жизненно необходим для функционирования, развития и роста человеческого организма и поступает в него с пищей, водой и воздухом. Из пищевых продуктов наиболее богаты йодом молоко, овощи (особенно капуста), яйца и морские продукты.

Попадая в организм, йод оказывает влияние на обмен веществ, усиливая окислительно-восстановительные процессы. Щитовидная железа активно аккумулирует йод из крови с помощью электрохимического градиента и включает его в гормоны — тироксин и трийодтиронин, которые контролируют метаболизм множества клеток. Транспорт йода в щитовидную железу осуществляется особым белком — трансмембранного одновременного переноса натрия и йода, NIS (sodium-iodide symporter) [1]. При недостатке йода

происходит нарушение функций щитовидной железы, уменьшается выделение в кровь тироксина и трийодтиронина, что приводит к развитию гипотиреоза (зобной болезни).

Содержание йода в воздухе сильно зависит от близости региона к морю. Морской воздух способен восполнить суточную потребность человека в йоде (50–200 мкг). В высокогорных районах, наоборот, наблюдается низкое содержание йода в воздухе, что служит причиной его дефицита в человеческом организме и ведет к массовым заболеваниям щитовидной железы. Примером такого региона служит горная Сванетия (Грузия), где наиболее ярко проявляется массовая тенденция заболеваний щитовидной железы. Особенности этих эндемических заболеваний, а также методы их профилактики были хорошо изучены в 50–60 годах XX века [2].

К традиционным профилактическим мерам в йододефицитных регионах относится использование йодированных продуктов, и особенно, йодированной поваренной соли. Использование методов профилактики в 60–80 годах, на фоне улучшения социальных условий, позволило существенно снизить заболеваемость населения. Однако в последующие годы ситуация резко изменилась к худшему. Причинами этого послужили ухудшение общей экологической обстановки, радиоактивные выбросы в атмосферу в случаях аварий ядерных систем, а также резкое снижение жизненного уровня на всей постсоветской территории.

После Чернобыльской катастрофы 26 апреля 1986 г. на территории Украины, Белоруссии, Грузии и некоторых регионов России в течение 2–3 месяцев, вместе с другими радионуклидами, наблюдалось распространение радиоактивного йода ^{131}I . Исследования, выполненные в 1986 году, показали повышенное содержание ^{131}I в молоке и молочных продуктах, в овощах, особенно в ранней капусте [3, 4].

Несмотря на то, что изотоп йода ^{131}I имеет сравнительно небольшой период полураспада, равный 8 суткам, его накопление в щитовидной железе, специфичной по отношению к йоду, ведет к серьезным нарушениям ее функций под действием β - и γ -излучений.

Особенно сильно пострадали дети, основой питания которых было 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 [5]. Как известно, радиоактивный ^{131}I через загрязненную траву концентрировался в молочных железах коров, передавался по железам внутренней секреции в молоко, с ним поступал в организм детей и концентрировался в щитовидной железе, часто вызывая в ней раковые заболевания.

При этом, кроме радиобиологического эффекта, возможен и генетический эффект со всеми далеко идущими последствиями.

Исследования, выполненные недавно, показывают, что трансмембранный белок NIS играет особую роль во время беременности и лактации, осуществляя активный транспорт и концентрирование йода в молочных железах женщин под действием гормонов щитовидной железы [1]. С окончанием беременности и кормления этот процесс прекращается, однако, как оказалось, в случае развития в грудных тканях раковых опухолей, NIS опять начинает играть активную роль в аккумуляции йода в области опухоли. Это обстоятельство служит основой для ранней диагностики и лечения рака груди.

На территории России в настоящее время недостаток йода в той или иной мере испытывает 70 % населения, а заболеваемость эндемическим зобом среди подростков составляет 20–60 %.

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). Недостаток йода вызывает рак щитовидной железы, глухоту, бесплодие, скрытый голод, слабоумие и многие другие тяжелые заболевания. Установлено, что уровень умственного развития, так называемый коэффициент IQ, напрямую связан с содержанием йода в организме.

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 йод-дефицитных заболеваний является одним из приоритетов ООН в сфере здоровья человека.

Опыт применения йодированной соли для профилактики йод-дефицита в США, Швейцарии и других странах показал, что в случае избытка йода возникает заболевание щитовидной железы — йодиндуцированный гипертиреоз. Исследования показали, что только в биотрансформированной форме, синтезированной молекулами белка, йод может усваиваться в организме именно в том количестве, которое ему необходимо — не больше и не меньше.

Один из таких препаратов, содержащий йод в биомолекулах молочного белка, разработан в Радиационном центре Российской Академии наук и называется «йод-актив». Молочный белок — казеин — содержит ионы Ca^{2+} , фосфат и аминокислоты — вещества, не заменимые в питании грудных детей. Однако широкими лечебными и профилактическими свойствами он не обладает и играет лишь роль во включении йода в биодоступной форме.

Создание более эффективных лекарственных препаратов возможно и на основе белково-минеральных комплексов, содержащих одновременно целый ряд необходимых для организма веществ. Такой основой для йодированных препаратов, благодаря своим уникальным свойствам, может служить сине-зеленая микроводоросль *Spirulina platensis* (*Spirulina pl.*). *Spirulina platensis* весьма полезна для человеческого организма, ее использование в пищевых и лечебных целях насчитывает тысячелетия, и никаких отрицательных эффектов при этом не было замечено.

Биомасса клеток *Spirulina pl.*, которая богата витаминами и минералами и содержит 60–70% белка, считается эффективным иммуностимулятором и характеризуется антиканцерогенными и противовирусными эффектами [6]. Ее успешно используют для лечения целого ряда заболеваний. Примером может служить опыт лечения детей, пострадавших в Чернобыле [7].

Можно предположить, что йодсодержащие лекарственные препараты на основе *Spirulina platensis* будут оказывать на организм гораздо более эффективное воздействие, чем обычно применяемые соли и растворы йода.

Сущность рабочей гипотезы состояла в предположении, что если во время культивации *Spirulina platensis* в питательную среду вводить ионы йода с заданной концентрацией, то их определенное число должно будет связываться со структурными компонентами клеток, вследствие чего полученная биомасса *Spirulina platensis* будет обогащаться йодом. Такая биомасса должна служить основой для изготовления таблеток лечебного и профилактического назначения.

Суточная потребность в йоде для взрослого человека составляет ~200 мкг. В нормальных условиях из организма человека за сутки путем секреции выводится ~100–200 мкг

йода. Такое же количество йода должно восполняться ежедневно с пищей и водой. Эти данные определяют необходимую концентрацию йода в таблетках, изготавливаемых на основании клеточной биомассы *Spirulina pl.*

В лечебных таблетках содержание йода должно быть 200–500 мкг, а в таблетках, предназначенных для профилактики, 100–200 мкг. Исходя из этого определялись условия эксперимента.

ЭКСПЕРИМЕНТ

Условия культивации *Spirulina platensis*. Сине-зеленая микроводоросль *Spirulina platensis* хорошо растет в стандартной щелочной минеральной питательной среде при температуре 30–34 °С, рН 10–11 и освещении в спектре натриевой лампы. Максимальный прирост клеток биомассы *Spirulina platensis* наблюдается на 4–5-е сутки культивации.

Культивация *Spirulina platensis* проводилась в биореакторе из органического стекла объемом 20 л. Питательная среда готовилась на дистиллированной воде с добавлением неорганических ингредиентов по рецепту, описанному в работе [8].

В питательную среду добавлялась соль йодистого калия квалификации «осч». Концентрация йода в питательной среде варьировалась в пределах 10^{-8} – 10^{-4} г/л.

Было осуществлено два эксперимента.

В первом эксперименте ставилась задача изучения фонового содержания йода и других примесных элементов в нативной биомассе *Spirulina platensis*. С этой целью ее культивация проводилась на питательной среде, приготовленной по указанному рецепту на дистиллированной и обычной питьевой воде г. Тбилиси без каких-либо дополнительных добавок йода.

Во втором эксперименте культивация *Spirulina platensis* проводилась в питательной среде, приготовленной на дистиллированной воде с нагрузкой КИ определенной концентрации.

Подготовка проб. На 4–5-е сутки клеточная биомасса *Spirulina platensis* сепарировалась от питательной среды, трижды промываясь дистиллированной водой, и центрифугировалась при 4000 г в течение 20 мин. Полученный осадок подвергался лиофильной сушке в адсорбционно-конденсационном лиофилизаторе по методике, описанной ранее [9]. Из лиофилизированной биомассы *Spirulina platensis* с помощью титановой пресс-формы готовились таблетки различного диаметра и формы.

Анализ проб. Таблетированные образцы исследовались методом нейтронно-активационного анализа (НАА), отличающегося высокой селективностью, точностью, надежностью, а главное, позволяющим анализировать пробы без их деструкции.

На тепловых нейтронах на изотопе ^{127}I идет реакция $^{127}\text{I}(n, \gamma)^{128}\text{I}$.

Сечение реакции $\sigma = 6,2$ б, период полураспада активированного йода ^{128}I равен $T_{1/2} = 25,3$ мин. В γ -спектре наблюдаются две линии: $E_{\gamma} = 442,7$ кэВ с выходом 14 % и $E_{\gamma} = 526,3$ кэВ с выходом 1,4 %. В аналитических целях используется более интенсивная γ -линия с энергией 442,7 кэВ.

Для НАА образцов *Spirulina pl.*, обогащенных йодом, в качестве источника нейтронов использовался нейтронный размножитель типа ПС-1, который и ранее использовался нами в аналитических целях [10].

Основой размножителя является подкритическая сборка, состоящая из уран-полиэтиленовых элементов, в которых использована двуокись урана, обогащенная ^{235}U до 36 %. Сборка окружена полиэтилен-графитовым отражателем, в зоне которого расположены экспериментальные каналы: три вертикальных и один горизонтальный.

В этой установке в качестве начального источника нейтронов используется ^{238}Pu -Ве изотопный источник с выходом $\sim 10^8$ нейтронов/с. В рабочем состоянии источник нейтронов, закрепленный на стержне-регуляторе, с помощью сервопривода вводится в центральный канал сборки. При этом обеспечивается плотность потока тепловых нейтронов $\sim 2 \cdot 10^6$ нейтронов/(см $^2 \cdot$ с).

Установка обслуживается пневмотранспортной системой, автоматически управляемой компьютером в соответствии с выбранной временной программой.

Измерение облученных образцов возможно как полупроводниковым Ge(Li)-детектором, так и сцинтилляционным детектором с кристаллом NaI(Tl).

Предварительные эксперименты показали, что если облучать йодированные пробы в вертикальном канале в экспрессном режиме (за 15–20 мин), то при выборе t_1 — времени облучения — 600 с, t_2 — времени охлаждения — 60 с, t_3 — времени детектирования — 410 с — регистрируемая активность ^{128}I составляет $\sim 2 \cdot 10^3$ распадов/с на мг йода.

Такая чувствительность вполне достаточна для анализа образцов *Spirulina platensis*, культивированных с нагрузкой йода. Поэтому таблетированные образцы, полученные во втором эксперименте с нагрузкой йода, измерялись на нейтронном размножителе ПС-1 Института физики им. Э. Андроникашвили АН Грузии.

Однако для определения фоновых значений содержания йода в *Spirulina platensis* и исследования уровня содержания примесных элементов такая чувствительность недостаточна, поэтому образцы, полученные в первом эксперименте облучались на импульсном быстром реакторе ИБР-2 Лаборатории нейтронной физики им. И.М. Франка ОИЯИ в Дубне с использованием пневмотранспортной установки РЕГАТА [11–12].

Высокая интенсивность нейтронных потоков ($\sim 3 \cdot 10^{12}$ нейтронов/(см $^2 \cdot$ с)) при облучении и хорошая разрешающая способность Ge(Li)-детектора (1,96 кэВ по линии ^{60}Co 1332,5 кэВ) при измерении обеспечили достаточную чувствительность в определении фоновых концентраций йода и примесных элементов в образцах *Spirulina platensis*, культивированных без нагрузки йодом. Особо следует подчеркнуть, что большое значение для анализа образцов *Spirulina platensis* имеет и возможность облучения образцов при температуре 60–70 °С, обеспечиваемая в каналах облучения реактора ИБР-2. При такой температуре биологические образцы не подвергаются деструкции и не происходит возгонки таких летучих элементов, как I, Hg, Sb.

Образцы *Spirulina platensis*, культивированные без нагрузки, исследовались методом НАА на реакторе ИБР-2 в следующем режиме: время облучения 3–5 мин с последующим измерением двух γ -спектров наведенной активности в течение 7–10 и 20 мин соответственно. Исходя из периода полураспада концентрация йода определялась из второго спектра.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали эксперименты, биомасса *Spirulina platensis*, культивированная без нагрузки йодом, уже изначально содержит некоторое его количество. Это связано, прежде

всего, с тем, что питательная среда готовится на реактивах, содержащих йод в качестве примеси.

В обычной питьевой воде также содержится йод в естественной концентрации в зависимости от региона. Так, например, вода р. Ангары (РФ) содержит 2 мкг/л йода [13], а в Верхней Сванетии (Грузия) содержание йода в питьевой воде не превышает 0,1–0,2 нг/л [2].

Результаты измерений фоновых концентраций йода на реакторе ИБР-2 в Дубне в биомассе *Spirulina platensis*, выращенной на дистиллированной воде и питьевой воде г. Тбилиси, приведены в табл. 1.

Таблица 1. Значения фоновых концентраций йода на 1 г лиофилизованной биомассы *Spirulina Platensis*

Культивация <i>Spirulina platensis</i> в случае минеральной среды, приготовленной	Интервал фоновых концентраций йода, мкг/г
на дистиллированной воде	0,15–0,47
на питьевой воде	5,5–7,5

В процессе культивации клетки *Spirulina platensis* могут усваивать из питательной среды и некоторые примесные токсичные элементы, такие, как Hg, As, Cr, Pb, Cd и другие. В табл. 2 приведены значения их фоновых концентраций в биомассе *Spirulina platensis* при данной квалификации используемых нами реактивов.

Таблица 2. Уровень фоновых концентраций некоторых токсичных элементов в биомассе *Spirulina platensis*

Элемент	Концентрация, мкг/г сухой массы
Hg	3–5*
As	2–3*
Cr	3–4*
Pb	3**
Cd	0,2**

*Данные НАА, полученные на реакторе ИБР-2, Дубна [14].
**Данные работы [15].

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 приготовления лекарственных препаратов, необходимо использовать особо чистые химические реагенты (марки «осч»). В то же время данные США по дозам различных элементов, допустимым для человеческого организма (см. <http://www.spirulina.com/SPBNutrition.html>), показывают, что результаты, полученные нами с использованием реактивов квалификации «хч» и «ч», не превосходят рекомендуемого уровня.

Во втором эксперименте культивация *Spirulina platensis* с нагрузкой йода проводилась для трех различных значений концентрации I в питательной среде.

Результаты НАА образцов *Spirulina platensis*, обогащенных йодом на нейтронном размножителе, приведены в табл. 3.

Таблица 3. Данные для определения параметров питательной среды, обогащенной йодом для культивации *Spirulina platensis*

Содержание йода в питательной среде, мкг/л	Выход лиофилизованной биомассы, г/л	Концентрация йода в биомассе, мг/л	Коэффициент распределения йода R , %
170	0,45	0,24	0,14
250	0,30	0,42	0,17
500	0,80	2,00	0,40

Коэффициент обогащения йодом (R) определяется как отношение концентрации йода в биомассе *Spirulina platensis* к концентрации йода в питательной среде. Этот коэффициент является исходным технологическим параметром, на основании которого проводится определение дозировки йода в лечебных таблетках и выбор их массы.

Таким образом, нами предлагается способ изготовления лечебных и профилактических таблеток на основе биомассы *Spirulina platensis*, обогащенной йодом.

Характеристики таких таблеток вместе с принятым нами способом их маркировки приводятся в табл. 4.

Таблица 4. 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.

ВЫВОДЫ

1. Показана возможность создания лечебно-профилактических йодированных препаратов на основе клеточной биомассы *Spirulina platensis*.
2. Исследован фоновый уровень концентрации йода и примесных элементов в биомассе *Spirulina platensis*.
3. На основе результатов НАА йода в биомассе *Spirulina platensis*, культивированной с нагрузкой йода, установлены технологические параметры для изготовления лечебно-профилактических таблеток на основе йодированной биомассы *Spirulina platensis*.
4. Предложен способ маркировки таблеток, предназначенных для профилактических и лечебных целей.

Работа выполнена в рамках координационного проекта МАГАТЭ (контракт №11528/RO/Regular Budget Fund IAEA Research Contract).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Welch P.L., Mankoff D.A.* Taking up Iodine in Breast Tissue // *Nature*. 2000. V.406. P.688–689.
2. *Войнар А.И.* Микроэлементы в живой природе. М., 1962. С.74–92.
3. *Mosulishvili L.M. et al.* Kinetic Regularities of Change in the Concentration of Radionuclides in the Georgian Tea Content // *Med. Radiol.* 1990. №1. P.42–45.
4. *Mosulishvili L.M. et al.* Environmental Radionuclide Distribution in Georgia after the Chernobyl Catastrophe // *Russ. J Anal. Chem.* 1994. V.49/1. P.135–139.
5. *Katamadze N. et al.* Evaluation of Thyroid Gland Irradiation Dose Induced by Chernobyl Radiation for Tbilisi Region Population // *Bull. Georg. AS.* 1998. V.157/2. P.213–216.
6. *Belokobilsky A. et al.* Investigation of the Change of *Spirulina Platensis* Physical-Chemical Properties in the Growth Dynamics // *Proc. of Georg. AS. Biol. Ser.* 1996. V.22, No.1–6. P.104–109.
7. *Evets L. et al.* Means to Normalize the Levels of Immunoglobuline 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.
8. *Mosulishvili L. et al.* The Study of the Mechanism of Cadmium Accumulation During the Cultivation of *Spirulina Platensis* // *Proc. of Georg. AS. Biol. Ser.* 1997. V.23, No.1–6. P.105–113.
9. *Mosulishvili L. et al.* Application of the Absorbtion-Condensation Method of Lyophilization in the Activation Analysis of Biological Materials // *Bull. Georg. AS.* 1980. V.98/3. P.685–688.
10. *Mosulishvili L., Shonia N., Dundua V.* Analytical Parameters of X-ray Fluorescence and Neutron Activation Analysis Methods for Determination of Gold Content in Ores and Concentrates // *Bull. Georg. AS.* 1999. V.159/3. P.414–416.
11. *Frontasyeva M.V., Steinnes E.* Epithermal Neutron Activation Analysis for Studying the Environment // *Proc. of the Intern. Symp. on Harmonization of Health Related Environmental Measurements Using Nuclear and Isotopic Techniques*, Hyderabad, India, Nov. 4–7, 1996. IAEA, 1997. P.301–311.
12. *Frontasyeva M.V., Pavlov S.S.* Analytical Investigations at the IBR-2 Reactor in Dubna. JINR Preprint E14-2000-177. Dubna, 2000.
13. *Покатилов Ю.* К методу определения подвижного и валового йода в почвах и пищевых объектах // *Микроэлементы в сельском хозяйстве и медицине: Сб. тр. Улан-Удэ*, 1968. С.729–731.
14. *Mosulishvili L.M. et al.* Epithermal Neutron Activation Analysis of Blue-Green Algae *Spirulina platensis* as a Matrix for Selenium-Containing Pharmaceuticals. JINR Preprint E14-2000-225. Dubna, 2000 (accepted by JRNC, 2001).
15. *Ortega-Calvo J.J. et al.* Chemical Composition of *Spirulina* and Eukaryotic Algae Food Products Marketed in Spain // *J. Appl. Phys.* 1993. No.5. P.425–435.

Получено 1 июля 2001 г.