

Лю М.Б., Мухтарбекова И.С., Адамбеков Д.А.

**ЙОД КОШУЛМАСЫ МЕНЕН БОЛГОН ФУНКЦИОНАЛДЫК
ПРОДУКТУНУН ТОКСИКОЛОГИЯЛЫК КАСИЕТТЕРИ
ЖАНА БАКТЕРИЯГА КАРШЫ НАТЫЙЖАЛУУЛУГУ**

Лю М.Б., Мухтарбекова И.С., Адамбеков Д.А.

**ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПРОДУКТА
С СОЕДИНЕНИЕМ ИОДА**

M.B. Lyu, I.S. Mukhtarbekova, D.A. Adambekov

**TOXICOLOGICAL PROPERTIES AND
ANTIBACTERIAL EFFICACY OF A FUNCTIONAL
PRODUCT WITH IODINE COMPOUND**

УДК: 57.084

Бул изилдөөлөрдүн объектиси *Shlorella* йод кошулманы, анын уу изилдөө жана антибактериалдык касиеттерге же уятсыз бир макулдашуу менен жаңы иш негизделген продуктту иштеп чыгуу болуп саналат. Микробалырлар көчүрмөсүнө биргелишип маданият колдонулган йод кошулмаларды суммасына жараша *iodides* белгилүү бир топтуу, камтыйт. Курч жана суб-өнөкөт өтүмө *Shlorella* же уятсыз зуландыргычтыктын менен коштолгон жатаканалары йод менен макулдашуу татаал жана жүрүш-жөөшү *Danio rerio* өзгөрткөн жок. Кийин диета *Danio rerio* кедерги бактериялык булгануу өнүктүрүү кабыл натыйжасында көчүрмөсү. Натыйжасында тираждык дары организмдин йод жетишсиздигинин абалын алдын алат, ийкемдүү иммундук механизмдерин жандандыруу жана антимикробдук ишин камсыз кылуу. Бул изилдөөлөрдүн иштелип чыккан йод менен *Shlorella* же уятсыз макулдашуу иш продукт негизделген кошулманы өндүрүү арыгы жана тажрыйбалык өзүнүн каршы жугуп касиеттерин негиздүү эле.

Негизги сөздөр: макулдашуу татаал, йод, бир иш продукт, катуу уулануу, өнөкөт уулануу, бактерияга каршы иш-аракеттер, *Chlorella vulgaris*, *Danio rerio*, *E. coli*.

Предметом данных исследований являлась разработка нового функционального продукта на основе *Chlorella vulgaris* с координационным соединением иода и изучение его токсикологических и антибактериальных свойств. Экстракт микроводоросли содержит определенный уровень концентрации иодидов, зависящий от объема используемого соединения иода при совместном культивировании. Острое и субхроническое применение *Chlorella vulgaris* с координационным соединением иода не сопровождалось токсическими проявлениями и не изменяла поведенческие реакции *Danio rerio*. Полученный экстракт при внесении в пищевой рацион *Danio rerio* предотвращает развитие бактериальной контаминации. Полученный полифункциональный пре-

парат позволит предотвратить иододефицитные состояния организма, активизируя адаптивные иммунные механизмы и оказывать противомикробное действие. В настоящих исследованиях разработана технологическая схема получения функционального продукта на основе *Chlorella vulgaris* с координационным соединением иода и экспериментально обосновано его противоинфекционное свойство.

Ключевые слова: координационное соединение, йод, функциональный продукт, острая токсичность, хроническая токсичность, антибактериальное действие, *Chlorella vulgaris*, *Danio rerio*, *E. coli*.

The subject of these studies was the development of a new functional product based on *Chlorella vulgaris* with the coordination compound of iodine and the study of its toxicological and antibacterial properties. The microalgae extract contains a certain level of concentration of iodides, depending on the volume of iodine compound used during co-cultivation. The acute and subchronic use of *Chlorella vulgaris* with the coordination compound of iodine was not accompanied by toxic manifestations and did not alter the behavioral reactions of *Danio rerio*. The resulting extract, when added to the *Danio rerio* diet, prevents the development of bacterial contamination. The resulting multifunctional drug will prevent iodine deficiency states of the body by activating adaptive immune mechanisms and exerting an antimicrobial effect. In the present studies, a technological scheme for obtaining a functional product based on *Chlorella vulgaris* with a coordination compound of iodine was developed and its anti-infection property was experimentally substantiated.

Key words: coordination compound, iodine, functional product, acute toxicity, chronic toxicity, antibacterial effect, *Chlorella vulgaris*, *Danio rerio*, *E. coli*.

Введение. Проводимые исследования связаны с тем, что Казахстан испытывает недостаток иода в почве и воде, и соответственно в местных продуктах питания, что сопровождается хронической иодной

недостаточностью и вызывает компенсаторные реакции организма. Город Алматы практически с двухмиллионным населением располагается на 95 позиции среди городов мира по уровню загрязнения атмосферного воздуха [1]. Именно в городах-мегаполисах создаются благоприятные условия, приводящие к увеличению числа бактериальных штаммов, формированию их резистентности к антибиотикам, что приводит к возрастанию интереса исследователей к медицинским разработкам новых, эффективных и экономически выгодных противомикробных препаратов. В частности, к возобновлению разработок лекарств на основе иода с более широкой биологической активностью и меньшей вероятностью индуцирования микробной резистентности, чем антибиотики. Координационные соединения иода на основе углеводов представляют собой инновационный комплекс, позволяющий активно- или пассивно проникать через клеточную стенку зеленых пресноводных микроводорослей, связываться с белками клетки, тем самым активизируя их метаболическую активность. Это позволяет создать полифункциональный препарат, позволяющий предотвратить иододефицит, активировать адаптивные иммунные механизмы, оказывать противомикробное действие.

Цель исследования – изучение токсикологических и антибактериальных свойств полифункционального препарата на основе *Chlorella vulgaris* с соединением иода в тест-системе с *Danio rerio*.

Задачи:

1. разработать технологическую схему культивирования *C.vulgaris* с координационными соединениями иода;

2. изучение острой и субхронической токсичности полученного экстракта *C.vulgaris* с координационным соединением иода.

3. определить микробиологическую чистоту воды и бактериальную контаминацию *Danio rerio* при введении в их пищевой рацион экстракта *C.vulgaris*, обогащенного иодом.

Методы исследований:

1) Методика приготовления экстракта *C.vulgaris* с координационными соединениями иода. Хлорелла обыкновенная (*Chlorella vulgaris*) получена от поставщика «Садовый центр Green Service». Для получения биомассы клетки культивировали в питательной среде HSM до стационарной фазы роста в соотношении 1:9 (1 часть *Chlorella vulgaris* и 9 частей среды HSM). Для этого проводили цитологический контроль точной культуры хлореллы обыкновенной. После

достижения стационарной фазы роста в культуральную среду с биомассой микроводорослей добавляли однократно координационное соединение иода в разных объемах и культивировали 48 часов при непрерывном перемешивании и постоянном освещении. Для получения экстракта, микроводоросли центрифугировали, убирали надосадочную жидкость, промывали дважды в дистиллированной воде. Экстракцию проводили на роторном испарителе в два этапа: в качестве растворителя сначала использовали дихлорметан, затем – 96% этанол. Полученные экстракты подсушивали под тягой, взвешивали и заливали 96% этанолом и повторяли процедуру экстракции.

2) Определение иода методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой проводили на масс-спектрометре Agilent 7500 «ICP-MS» на основании стандарта DIN EN 15111:2007 – Продукты пищевые. Определение следовых элементов. Для этого в полученный экстракт вносили 400 мкл тетраметиламмония гидроксида (TMAX), инкубировали в течение 3 часов, охлаждали и вносили 2 мл дистиллированной воды.

3) Исследование острой токсичности экстракта хлореллы с координационными соединениями иода проводили на тест-системе *Danio rerio*, которая содержалась при температуре +28 °С с циклом 12:12 часов (свет/темнота). Рыбу кормили один раз в день коммерческим кормом Tropica basic (Dajana, Czech Republic). Экстракт хлореллы с координационным соединением иода добавляли в воду за час до кормления. Исследование острой токсичности проводили на 5 взрослых рыбках возрастом около 5-6 месяцев путем их однократного помещения на 20 минут в водный раствор объемом 100 мл с добавлением 5000 мг сухого экстракта хлореллы с концентрацией иодионов 30,9 мг/л. После переноса рыбок в этот небольшой объем воды, им сначала давали адаптироваться в течение 45 мин, и только после этого вносили экстракт хлореллы с координационным соединением иода. После 20 минутного выдерживания в воде с экстрактом хлореллы и иодом, рыбок опять переносили обратно в аквариум с чистой водой. За рыбками наблюдали в течение 14 дней.

4) Исследования субхронической токсичности экстракта хлореллы с координационными соединениями иода проводили на тест-системе *Danio rerio*. Для этого *Danio rerio* выдерживали в водных растворах экстракта хлореллы в течении 14 дней из расчета 100 мг на 100 мл воды с концентрацией иодид-ионов 30,9 мг/л. Растворы менялись каждые три дня. По истечению 14 дней изучали поведенческие параметры

путем помещения каждой рыбки на 5 минут в аквариум с чистой водой с последующей эвтаназией путем быстрой заморозки.

5) Для изучения поведенческих реакций в субхроническом эксперименте каждую рыбку *Danio rerio* переносили индивидуально на 5 минут в специальные пластиковые контейнеры (длина 65 см, ширина и высота по 40 см) с отстоянной водой объемом 5 л с горизонтальной линией на внешней стенке. Отмечали следующие поведенческие параметры: время, проведенное в верхней зоне, что может указывать на анксиолитическое поведение, признаки стресса (затрудненное плавание, чрезмерное движение жабер, количество переходов/входов в верхнюю часть резервуара, количество неустойчивых движений, количество застывших приступов и время, проведенное в замороженном состоянии). Повышенная тревожность сопровождается снижением «исследовательского» поведения, тигмотаксиса и геотаксиса.

6) Для формирования бактериальной инфекции *E.coli* у *Danio rerio*. в качестве инфекционного агента были использованы суспензии *E.coli* в концентрации 10^6 КОЕ/мл и 10^8 КОЕ/мл. Бактериальный инокулят готовили путем размораживания бактериальной суспензии *E.coli* (от -80°C) в свежий бульон TSB в 15-мл пробирке. Культуры выращивали при $+25^\circ\text{C}$ до середины логарифмической фазы роста (до тех пор, пока OD 600 нм не достигла 0,250, что соответствует 10^8 клеткам мл^{-1}). Один миллилитр этой культуры центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин при $+4^\circ\text{C}$ и промывали в стерильном забуференном фосфатом

соловом растворе (PBS). Из этой пробирки проводили серийные разведения для достижения конечной концентрации инокулята 10^6 и 10^8 клеток мл^{-1} .

Для этого суспензии *E.coli* в объеме 0,5 мл помещали в водный раствор объемом 50 мл с *Danio rerio* возрастом около 5-6 месяцев. Через 72 часа проводили микробиологический контроль воды и мазка с поверхности тела рыбы. После установления наличия возбудителя приступали к ежедневному введению в рацион питания в течении семи дней 500 мг экстракта *Chlorella vulgaris* с координационным соединением йода с концентрацией 30,9 мг/л.

7) По истечению семи дней рыбок подвергали эвтаназии путем быстрой заморозки для микробиологических исследований. Для этого рыбу декапитуировали и разделяли в дорсально-вентральном направлении, удаляли кишечник, затем готовили гомогенат тканей в асептических условиях.

Результаты исследований. Разработка технологии получения экстрактов *C.vulgaris* с координационными соединениями йода. Начальная концентрация клеток *C.vulgaris* для всех образцов составляла $1,5 \times 10^3$ кл/мл. В логарифмической фазе роста в питательную среду HSM с культурой *C.vulgaris* вносили однократно координационное соединение йода в разных количествах. Проводили дальнейшую культивацию в течение 48 часов, при микроскопировании в клетках отмечались цитоплазматические включения коричневого цвета. Затем получали экстракт и определяли в нем концентрацию иодидов (табл. 1).

Таблица 1

Концентрация иодидов в экстракте *C.vulgaris*, $M \pm m$

№	Количество координационного соединения йода на 200 мл питательной среды HSM при культивировании, мл	Концентрация иодид-ионов, мг/л
1.	2,5	$50,5 \pm 8,4$
2.	1,0	$30,9 \pm 4,3$
3.	0,5	$5,37 \pm 0,78$

Для дальнейшего изучения острой и субхронической токсичности, а также антибактериальной активности был выбран экстракт *C.vulgaris* с концентрацией иодид-ионов $30,9 \pm 4,3$ мг/л.

Результаты исследования острой и субхронической токсичности экстракта *C.vulgaris*, обогащенного аддуктом йода. Экстракт *C.vulgaris* с кон-

центрацией иодид-ионов 30,9 мг/л при остром воздействии в течение 20 минут не вызывает смертность *Danio rerio*. Субхроническое воздействие в течение 14 дней не приводило к токсическим эффектам в течение всего периода наблюдения, гибели не происходило.

В результате изучения поведенческих реакций *Danio rerio* после острого и субхронического воздей-

ствия экстракта *C. vulgaris*, обогащенного координационным соединением иода, показано, что вне зависимости от времени воздействия у рыбок развиваются однотипные поведенческие реакции. В течении 5 минут наблюдения рыбки находились преимущественно в нижней части аквариума у одного угла, на уровне не превышающем одного литра объема воды. В последующее время отмечался подъем рыбок в верхнюю часть аквариума на не очень продолжительное время. В целом не наблюдалось затрудненного плавания, чрезмерного движения жабер, неустойчивых движений, застывших приступов в замороженном состоянии, рыбки проявляли «исследовательское» поведение и реагировали, проявляя тигмотаксис.

Результаты микробиологического исследования при внесении в воду *E. coli* и экстракта *C.*

***vulgaris* с координационным соединением иода в рацион *Danio rerio*.** Через 72 часа после внесения в воду с рыбками дозы *E. coli* 10⁶ КОЕ/мл, возбудитель не обнаруживается ни в воде, ни на поверхности тела *Danio rerio*. Внесение в воду с рыбками *E. coli* в дозе 10⁸ КОЕ/мл сопровождается сплошным ростом возбудителя в воде и на поверхности рыбы (таблица 2).

На 10 сутки наблюдения после внесения *E. coli* в дозе 10⁶ КОЕ/мл в воде рост не обнаруживается, но на поверхности рыбы отмечается сплошной рост. Внесение *E. coli* в дозе 10⁸ КОЕ/мл сопровождается на 10 сутки сплошным ростом возбудителя в пробах из воды, с поверхности тела и гомогената тканей без кишечника (табл. 2).

Таблица 2

Показатели роста *E. coli* без добавления и с добавлением в воду экстракта *C. vulgaris*, обогащенного координационным соединением иода

Возбудитель, концентрация	Время наблюдения	Наличие в воде добавок	Точки отбора проб		
			Вода	Поверхность тела	Гомогенат <i>Danio rerio</i>
<i>E. coli</i> ATCC 8739 в дозе 10 ⁶ КОЕ/мл	72 часа	без экстракта <i>C. vulgaris</i>	роста нет	роста нет	-
	10 суток		роста нет	сплошной рост	отдельные колонии
	10 суток	с добавлением экстракта <i>C. vulgaris</i> , обогащенного координационным соединением иода	роста нет	роста нет	роста нет
<i>E. coli</i> ATCC 8739 в дозе 10 ⁸ КОЕ/мл	72 часа	без экстракта <i>C. vulgaris</i>	сплошной рост	сплошной рост	-
	10 суток		сплошной рост	сплошной рост	сплошной рост
	10 суток	с добавлением экстракта <i>C. vulgaris</i> , обогащенного координационным соединением иода	роста нет	роста нет	роста нет
Примечание: Экстракт <i>C. vulgaris</i> с координационными соединениями иода вносили в рацион <i>Danio rerio</i> в течение 7 дней, начиная с 3-х суток.					

При внесении в рацион питания *Danio rerio* экстракта *C. vulgaris* с соединениями иода на 7 дней, после введения в воду возбудителя в разных концентрациях, показало полное отсутствие роста *E. coli* в воде, на поверхности тела и в гомогенате ткани рыбы на 10 сутки (табл. 2).

Как известно, внедрение инфекционного агента

сопровождается физиологическим и иммунным ответом на повреждение тканей. Макрофаги играют важную роль в воспалении, генерируя воспалительные медиаторы, включая NO и PGE2 [2]. Ингибирование воспалительных медиаторов можно рассматривать одной из эффективных стратегий лечения бактериальных заболеваний.

Обсуждение полученных результатов. Применение растений можно рассматривать как быстрый, экологически безопасный и экономически выгодный подход для производства различных форм профилактических препаратов. В процессе биосинтеза функциональные группы растений служат как поставщики активной субстанции внутрь клетки, могут уменьшать токсичность активной субстанции потенциального биологически активного вещества. Микроводоросли, как любая клетка, могут адсорбировать, поглощать и биотрансформировать ионы иода, связывая их с белком и обеспечивая переход по пищевой цепочке. Органически связанный иод в биомассе микроводорослей менее токсичен для людей и животных, и может использоваться в качестве пищи и корма.

Впервые разрабатывается технология создания комплекса иода с белками микроводорослей, что позволит не только сохранить противомикробное действие иода, но и определить новые свойства. Разработанная технологическая схема культивирования *C. vulgaris* с координационными соединениями иода. Полученный экстракт на основании исследований острой и

субхронической токсичности и при внесении в пищевой рацион *Danio rerio*, предотвращает развитие бактериальной контаминации.

Также может рассматриваться возможность по целенаправленному применению разрабатываемой биологически активной добавки в виде микроводоросли в комплексе с соединениями иода в корм животным и дальнейшему поступлению биологически активных веществ и иода по пищевой цепочке в организм человека, что, в конечном счете, внесет вклад в обеспечение сбалансированного питания и иодной безопасности.

Литература:

1. <http://citycarbonfootprints.info/>
2. Sheppe A.E.F., Kummari E., Walker A., Richards A., Hui W.W., Lee J.H., Mangum L., Borazjani A., Ross M.K., Edelman MJ. PGE2 Augments Inflammation Activation and M1 Polarization in Macrophages Infected with *Salmonella Typhimurium* and *Yersinia enterocolitica* // Front Microbiol. - 2018 Oct 31;9:2447. doi: 10.3389/fmicb.2018.02447.e Collection 2018.