

Адаптогенные эффекты нанокompозитов хитозан – золото в условиях моделирования гипоксии

**А. С. Корягин, А. Е. Мочалова, Е. В. Саломатина,
О. Ю. Ешкова, Л. А. Смирнова**

Установлена антиоксидантная и адаптогенная активность наноструктурированной системы хитозан – наночастицы золота на экспериментальных животных в условиях гипоксии. Профилактическое применение препарата приводит к снижению в плазме крови в несколько раз конечных продуктов липопероксидации – оснований Шиффа и нормализации активности одного из ключевых ферментов энергетического обмена — лактатдегидрогеназы после перенесенной гипоксии.

Ключевые слова: наноструктурированная система хитозан – золото, гипоксия, стресс, система крови, энергетический обмен, лактатдегидрогеназа, перекисное окисление липидов.

Antioxidant and adaptogenic activity of a nanostructured system chitosan-gold nanoparticles determined on experimental animals in hypoxic conditions. Prophylactic use of the drug leads to decrement in several times of products the end-point lipid peroxidation — Schiff's subiculum in the blood plasma and the normalization of activity one of the key enzymes of energy metabolism — lactate dehydrogenase rub through the hypoxia.

Keywords: nanostructured system of chitosan-gold, hypoxia, stress, blood system, lactate dehydrogenase, energy metabolism, lipid peroxidation.

Введение

В подавляющем большинстве случаев при нарушениях в работе сердечно-сосудистой системы, лёгких, системы крови, отравлениях изменяется либо доставка, либо утилизация кислорода. Известно, что одним из главных повреждающих механизмов при гипоксии является резкое увеличение интенсивности свободно-радикальных процессов, сопровождающихся образованием активных форм кислорода (окислительный стресс). Классические химически синтезированные антигипоксанты зачастую обладают симптоматическим действием и имеют серьезные побочные эффекты. В связи с этим актуальным является поиск новых эффективных антигипоксических и адаптогенных средств. Ранее нами в опытах *in vitro* с применением метода электронного парамагнитного резонанса была показана антиоксидантная активность наночастиц золота [1].

Изучение биологической активности наночастиц золота в живых системах требует использования биосовместимого стабилизатора, выполняющего одновременно функцию транспортного средства. В решении указанной проблемы перспективным представляется применение природного полимера хитозана (ХТЗ) — поли((1,4)-2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкозы). Наличие в структуре amino- и гидроксильных групп обуславливают его высокую способность к комплексообразованию с ионами металлов и стабилизации их наночастиц. ХТЗ и его производные имеют широкие перспективы применения в биологии и медицине благодаря отсутствию токсичности, гипоаллергенности и биосовместимости, в частности для компонентов биологически активных препаратов, стабилизаторов и средств доставки лекарственных веществ [2, 3]. Авторами [4, 5] также выявлена антиоксидантная активность ХТЗ при повреждающем действии радиации.

Можно ожидать высокую антиоксидантную активность наноструктурированных препаратов “ХТЗ – золото”.

Цель данной работы — исследование антиоксидантных и адаптогенных свойств нанодисперсий золота, стабилизированных ХТЗ (нанопрепарата ХТЗ – золото), на лабораторных животных в условиях гипоксии при пероральном применении.

Экспериментальная часть

В работе использовали водные дисперсии наночастиц золота, стабилизированных ХТЗ с молекулярной массой $1,3 \cdot 10^5$ и степенью деацетилирования 0,80 – 0,82. Нанодисперсии золота получали в водных растворах ХТЗ, содержащих HAuCl_4 , при ультрафиолетовом воздействии по методике, разработанной авторами [6]. Установлено [1], что антиоксидантная активность наночастиц золота зависит от их размера: максимальной активностью обладают системы с размером наночастиц до 10 нм, при увеличении размеров активность резко уменьшается. На основании этого при изучении антиоксидантной активности композиции “ХТЗ – наночастицы золота” мы подбирали условия, обеспечивающие получение наночастиц золота наименьшего размера (средний размер 8 нм) и узким распределением по размерам (от 2 до 12 нм) (рис. 1). Размер наночастиц определяли неразрушающим методом рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами (РМУ). Для получения малоугловых рентгенограмм использовали оригинальную установку КРМ-1 с коллимацией первичного пучка по схеме Кратки [7], $\text{Cu } K_\alpha$ -излучение, монохроматизированное с помощью Ni-фильтра; интенсивность рассеянного излучения регистрировали в угловом интервале от $5'$ до $160'$. Точность регистрации не менее 3%. Обработку полученных экспериментальных данных по РМУ проводили по методике [7].

Работа выполнена на беспородных крысах-самцах массой 250 – 300 г, выращенных в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде и естественном чередовании суточной освещенности. Животные были разделены на 4 группы по 7 особей в каждой. В первую группу вошли интактные животные (относительная норма), во вторую (контрольная) — крысы, которым вводили физиологический раствор, в третью — животные, получавшие раствор ХТЗ (доза ХТЗ 100 мг/кг), в четвертую — нанодисперсию ХТЗ – золото (ХТЗ — 100 мг/кг, золото — 0,5 мг/кг). Ранее нами была показана высокая зффективность используемых доз препарата [4, 5]. Препараты вводили перорально при помощи зонда в

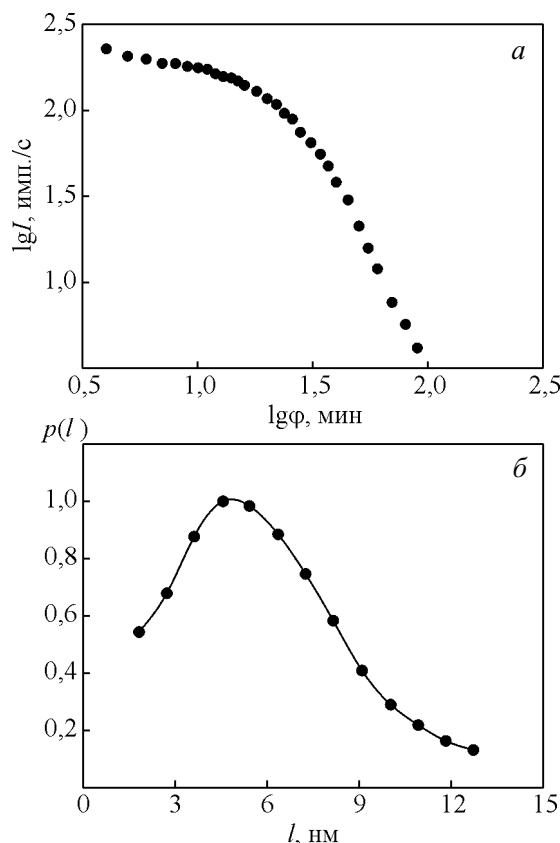


Рис. 1. Результаты исследования нанодисперсий “ХТЗ – золото” методом РМУ: а – кривая малоуглового рассеяния в координатах $\lg I - \lg \phi$; б – функции распределения $p(l)$ наночастиц золота по размерам.

объеме 1 мл на животное в течение 7 дней с периодичностью 1 раз в сутки. Следует отметить, что контрольная группа животных, которым вводится препарат только наночастиц золота, отсутствует, так как наночастицы не могут находиться в коллоидном растворе без стабилизатора. Поскольку система агрегативно неустойчива, происходит мгновенная агломерация наночастиц до “блочного” золота и выпадение осадка.

Специальными опытами нами установлено, что развитие неспецифической адаптационной реакции тренировки развивается через неделю после введения нанопрепарата. В связи с этим моделирование гипоксии проводили спустя 7 дней после окончания процедур. Животных 2 – 4 групп помещали в барокамеру на 30 мин, создавая разрежение, соответствующее высоте 8 тыс. метров. Анализ крови проводили на следующий день после экспозиции в барокамере.

Кровь для анализа забирали из подъязычной вены наркотизированных животных и определяли в ней количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу [8],

лейкоцитарный коэффициент (отношение процентного содержания лимфоцитов к процентному содержанию сегментоядерных нейтрофилов) [9], концентрацию гемоглобина [8] и в плазме крови содержание первичных (диеновых конъюгатов), вторичных (триеновых конъюгатов) и конечных (оснований Шиффа) продуктов липопероксидации [10], а также активность лактатдегидрогеназы [11].

Результаты исследований статистически обрабатывали с помощью программы BIOSTAT. Независимые выборки сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, непараметрических критериев Крускала – Уоллиса и Ньюмена – Кейлса.

Результаты и обсуждения

Изучение показателей крови после перенесенной гипоксии показало, что содержание продуктов липопероксидации в плазме крови животных контрольной группы (группа 2) увеличилось в 3 – 6 раз относительно интактных животных (группа 1) (табл. 1).

В контрольной группе наблюдалось также статистически значимое увеличение количества сегментоядерных нейтрофилов и снижение лимфоцитов. Это указывает на то, что животные контрольной группы находились в состоянии стресса. На это же указывало снижение величины лейкоцитарного

коэффициента. Авторами [9] показано, что его значение уменьшается при стрессе.

В группах животных, получавших раствор ХТЗ и нанопрепарат, содержание первичных продуктов перекисного окисления липидов было выше, чем у интактных и не отличалось от значений контрольной группы. Необходимо отметить, что содержание диеновых конъюгатов у животных, получавших нанопрепарат, было выше, чем в других группах. С большой долей вероятности это свидетельствует о том, что нанопрепарат фагоцитируется нейтрофилами. Известно, что процесс фагоцитоза сопровождается интенсивным синтезом активных форм кислорода и соответственно всплеском свободно-радикальных процессов [12]. С другой стороны, усиление фагоцитоза указывает на стимуляцию препаратом неспецифического (врожденного) иммунитета. Эти эффекты, по-видимому, связаны с наноструктурированной формой препарата, которая обеспечивается наночастицами золота, имеющими высокую удельную поверхность.

Повышение активности свободно-радикальных процессов индуцирует увеличение мощности стресс-лимитирующей антиоксидантной системы организма. Из табл. 1 видно, что содержание наиболее токсичных — конечных продуктов липопероксидации — оснований Шиффа, обладающих мутагенным, мембранодестабилизирующим эффектом, у животных 4 группы статистически значимо ниже (в три

Таблица 1

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови крыс на следующие сутки после моделирования гипобарической гипоксии при профилактическом применении нанопрепаратов ХТЗ – золото

№	Группа	Диеновые конъюгаты, отн. ед. (экстинкция)	Триеновые конъюгаты, отн. ед. (экстинкция)	Основания Шиффа, отн. ед. (экстинкция)
1	Интактные	0,060 ± 0,003	0,025 ± 0,005	0,053 ± 0,019
2	Контроль (физиологический раствор)	0,151 ± 0,017*	0,318 ± 0,063*	0,309 ± 0,058*
3	ХТЗ ММ = 1,3·10 ⁵ , 100 мг/кг	0,115 ± 0,021***	0,035 ± 0,005**	0,156 ± 0,029**
4	Нанопрепарат ХТЗ – золото (ХТЗ 100 мг/кг, наночастицы Au 0,5 мг/кг)	0,186 ± 0,019*	0,084 ± 0,029**	0,092 ± 0,016**

Примечания: статистически значимые отличия: * — $p \leq 0,05$ по отношению к интактным; ** — $p \leq 0,05$ по отношению к контролю (физиологический раствор); *** — по отношению у группе 3 (ХТЗ).

Таблица 2

Количество лейкоцитов, сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов в крови крыс и величина лейкоцитарного коэффициента на следующие сутки после моделирования гипоксии при профилактическом применении нанопрепарата

№	Группа	Количество лейкоцитов, 10 ⁹	Сегментоядерных нейтрофилов, %	Лимфоциты, %	Лейкоцитарный коэффициент
1	Интактные	11,30 ± 1,90	28,20 ± 1,20	52,60 ± 3,20	1,90 ± 0,10
2	Контроль (физиологический раствор)	19,30 ± 4,30*	35,80 ± 1,48*	43,30 ± 1,40	1,30 ± 0,10*
3	ХТЗ ММ = 1,3·10 ⁵ , 100 мг/кг	12,76 ± 2,30	26,50 ± 0,90	56,80 ± 1,50**	2,20 ± 0,10**
4	Нанопрепарат ХТЗ – золото (ХТЗ 100 мг/кг, наночастицы Au 0,5 мг/кг)	9,46 ± 1,83**	23,40 ± 1,00**	58,80 ± 2,40**	2,60 ± 0,20**

Примечания: статистически значимые отличия: * — $p \leq 0,05$ по отношению к интактным; ** — $p \leq 0,05$ по отношению к контролю (физиологический раствор).

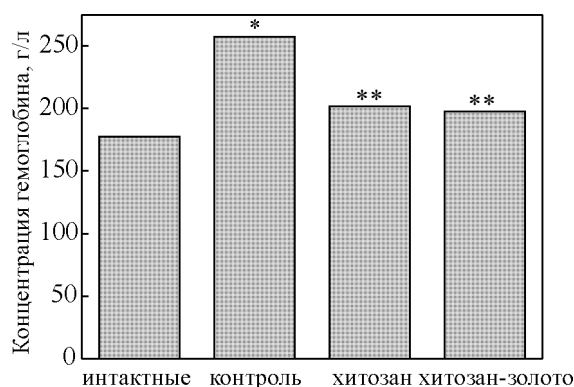


Рис. 2. Содержание гемоглобина в крови крыс после моделирования гипоксии при профилактическом применении нанопрепарата. Статистически значимые отличия: * — $p \leq 0,05$ по отношению к интактным; ** — $p \leq 0,05$ по отношению к контролю (физиологический раствор).

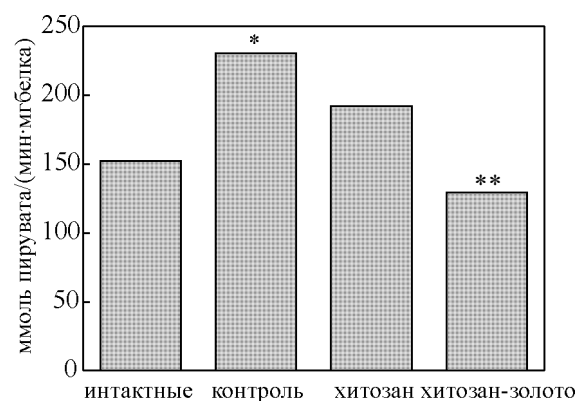


Рис. 3. Активность ЛДГ в плазме крови крыс после моделирования гипоксии при профилактическом применении нанопрепарата. Статистически значимые отличия: * — $p \leq 0,05$ по отношению к интактным; ** — $p \leq 0,05$ по отношению к контролю (физиологический раствор).

раза), чем в контрольной (физиологический раствор) и в 2 раза ниже, чем в третьей группе животных, получавших ХТЗ, и не отличается от значений интактных.

О резистентности к гипоксии животных, получавших как ХТЗ, так и нанопрепарат говорит тот факт, что в опытных группах 3 и 4 количество сегментоядерных нейтрофилов было ниже, а количество лимфоцитов выше, чем в контрольной группе и не отличалось от показателей интактной (табл. 2). Вместе с тем более высокое значение лейкоцитарного коэффициента у животных группы 4 является показателем того, что введение нанопрепарата в большей степени обеспечивает устойчивость организма к гипоксии. Обращает внимание повышение концентрации гемоглобина в крови контрольной группы по сравнению с интактными животными, что является следствием компенсаторной реакции организма на снижение парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе. В опытной группе 4 содержание гемоглобина было ниже, чем в контрольной группе и не отличалось от показателей интактных животных (рис. 2).

Существенному изменению в плазме крови при гипоксии подвергается активность одного из ключевых ферментов энергетического обмена, находящегося в точке ветвления аэробного и анаэробного пути окисления углеводов — лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Увеличение на 48% активности ЛДГ ($p < 0,05$) в контрольной группе 2 является показателем нарушения биоэнергетических процессов — резкого усиления анаэробного гликолиза, приводящего к накоплению молочной кислоты и закислению среды,

оказывающих неблагоприятное воздействие на организм вплоть до состояния несовместимого с жизнью (рис. 3). Активность фермента ЛДГ при гипобарической гипоксии в группе 4, получавшей нанопрепарат была ниже, чем в контрольной группе и достоверно не отличалась от значений интактных животных, что указывает на переключение энергетического обмена с анаэробного на аэробный путь окисления пирувата в условиях дефицита кислорода. В опытной группе 3, получавшей ХТЗ, активность ЛДГ была ниже, чем в группе контроля, но выше, чем у животных, получавших нанопрепарат. Полученные результаты подтверждают более высокую адаптогенную и антиоксидантную по сравнению с ХТЗ эффективность наноструктурированного препарата ХТЗ — золото.

Заключение

Комплексный анализ различных показателей системы крови, характеризующих резистентность организма к гипоксии показал, что наноструктурированные препараты на основе комплексов ХТЗ — золото являются эффективными адаптогенами живых систем к гипоксии, а также на реальную возможность создания на их основе новых комплексных препаратов биологически активных веществ, повышающих устойчивость организма к экологически неблагоприятным условиям среды и стрессорным состояниям.

Авторы выражают благодарность Т.А.Грачевой за измерения наночастиц в растворах хитозана методом РМУ.

Литература

1. Якимович Н.О., Ежевский А.А., Гусейнов Д.В., Смирнова Л.А., Грачева Т.А., Клычков К.С. Изучение антиоксидантных свойств наночастиц золота методом спектроскопии ЭПР. Известия Российской академии наук. Серия химическая, 2008, № 3, с. 509 – 512.
2. Ravi Kumar M. N. V., Muzzarelli R. A. A., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. Chem. Rev., 2004, v. 104, p. 6017 – 6084.
3. Keun S.O., Ree S.K., Jinho L., Dongmin K., Sun H.C., Soon H.Y. Gold/Chitosan/Pluronic composite nanoparticles for drug delivery. Journal of Applied Polymer Science, 2008, v. 108, p. 3239 – 3244
4. Корягин А.С., Ерофеева Е.А., Якимович Н.О., Александрова Е.А., Смирнова Л.А., Мальков А.В. Анализ антиоксидантных свойств хитозана и его олигомеров. Бюлл. экспер. биологии и медицины, 2006, т. 142, № 10, с. 444 – 446.
5. Якимович Н.О., Ерофеева Е.А., Александрова Е.А., Корягина Е.А., Мальков А.В., Корягин А.С., Смирнова Л.А. Антиоксидантные свойства наночастиц золота в условиях нормы и действия ионизирующей радиации. Вестник ННГУ, Серия Химия, 2006, вып. 1 (5), с. 60 – 68.
6. Якимович Н.О., Смирнова Л.А., Грачева Т.А. и др. Синтез наночастиц Au, стабилизированных хитозаном, с регулируемыми размерами. Высокомолек. соед. Серия Б, 2008, т. 50, № 9, с. 1717 – 1722.
7. Гинье А. Рентгенография кристаллов. М.: Физматгиз, 1961, 604 с.
8. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина, 1987, 368 с.
9. Шихлярова А.И., Гаркави Л.Х., Квакина Е.В., Кузьменко Т.С. Антистрессорные реакции и активационная терапия. Реакции активации как путь к оздоровлению через процессы самоорганизации. Екатеринбург: Филантроп, 2002, 196 с.
10. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лившиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови. Вопросы медицинской химии, 1989, № 1, с. 127 – 131.
11. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1971, с. 114 – 115.
12. Хавинсон В.Х., Баринев В.А., Арутюнян А.В., Малинин В.В. Свободнорадикальное окисление и старение. Санкт-Петербург: Наука, 2003, 327 с.

Статья поступила в редакцию 19.07.2011 г.

Корягин Александр Сергеевич — Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского (г. Нижний Новгород), доктор биологических наук, профессор биологического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Специалист в области физиологии и биохимии человека и животных. E-mail: ask@bio.unn.ru.

Мочалова Алла Евгеньевна — Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского (г. Нижний Новгород), кандидат химических наук, старший преподаватель химического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Специалист в области высокомолекулярных соединений и коллоидной химии. E-mail: mochalova_ae@mail.ru.

Саломатина Евгения Владимировна — Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского (г. Нижний Новгород), аспирант. Специалист в области высокомолекулярных соединений и коллоидной химии химического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского. E-mail: ox-eye_daisy23@mail.ru.

Ешкова Оксана Юрьевна — Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского (г. Нижний Новгород), аспирант. Специалист в области физиологии и биохимии человека и животных. E-mail: ask@bio.unn.ru.

Смирнова Лариса Александровна — Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского (г. Нижний Новгород), химический факультет, доктор химических наук, профессор. Специалист в области высокомолекулярных соединений и коллоидной химии. E-mail: smirnova_la@mail.ru.