

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ СИРОПОВ ЛАКТУЛОЗЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХЛОРИДА КАДМИЯ

Будкевич Р.О., Гатина Ю.С., Будкевич Е.В.

ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет», Ставрополь, Россия (355029, г. Ставрополь, просп. Кулакова, 2), e-mail: budkev@mail.ru

Проведено исследование антиоксидантной активности трех образцов лактулозы различных производителей при моделировании окислительных процессов *in vitro* и *in vivo* с использованием хлорида кадмия. Все исследуемые образцы проявляли антиоксидантную активность разной степени выраженности. Выявлен образец лактулозы с наибольшей АОА, способный повышать АОА в условиях действия кадмия в сыром молоке-сырье. Для выявления молекулярной массы компонентов сиропа, проявляющих антиоксидантную активность, проводили его разделение на компоненты методом прямого диализа (12–14 кДа, 6–8 кДа, 3,5 кДа) с последующей оценкой АОА. В модели наибольшую АОА проявил раствор с размером молекул более 3,5 кДа, но менее 6–8 кДа. В исследованиях на крысах показана антиоксидантная активность двух исследованных образцов лактулозы при моделировании кадмиевой интоксикации. Наибольшую активность *in vivo* проявил образец лактулозы, проявляющий наибольшую АОА в модельных растворах. Полученные данные позволяют рассматривать данный образец в применении как антиоксидант в функциональных продуктах питания.

Ключевые слова: лактулоза, антиоксидантная активность, кадмий, кадмиевая интоксикация, функциональные продукты питания.

INVESTIGATION OF LACTULOSE SYRUP ANTIOXIDANT ACTIVITY IN MODELS OF OXIDATIVE PROCESS WITH THE USE OF CADMIUM CHLORIDE

Budkevich R.O., Gatina J.S., Budkevich E.V.

FSAEI HPE "North-Caucasus Federal University" Postal address: 2, Kulakov Prospect, Stavropol 355029, e-mail: budkev@mail.ru

In this study the antioxidant activity of lactulose from different manufactures was investigated. Cadmium chloride was used for modeling of oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. Antioxidant activity of lactulose samples *in vitro* was different. It was detected the sample of lactulose which increase to the maximum level of antioxidant activity in cadmium contaminated raw-milk. Molecular weight of components in the lactulose syrup with the highest antioxidant activity was determined by dialysis bag experiment. The highest manifested antioxidant activity corresponded to components with molecular weight between 3.5 and 6-8 kDa. Lactulose syrup with the highest and the lowest antioxidant activity was administrated for rats during 1 months. The best effect of lactulose syrup *in vivo* was showed by that sample, which showed the best antioxidant activity in the model reactions. The results suggest using lactulose syrup with components of isomerization (molecular weight 3.5 - 6-8 kDa) as an antioxidant component in a functional food.

Keywords: lactulose, antioxidant activity, cadmium, cadmium intoxication, functional food.

Введение

Лактулоза – углевод, признанный бифидус-фактор, широко изучаемый как профилактическое и терапевтическое средство при ряде заболеваний, особенно в случае формирования дисбиотических явлений. В научной школе СКФУ «Живые системы» активно ведется разработка технологий получения лактулозы и продуктов лечебного и функционального назначения, содержащих лактулозу [6]. Основной механизм действия лактулозы связывают с вовлечением в её метаболизм бактерий, которые могут обуславливать косвенный антиоксидантный эффект в организме млекопитающих [9]. Данный эффект лактулозы слабо исследован, а в условиях роста загрязнения окружающей среды [2] может

быть одним из подходов создания функциональных продуктов для загрязненных территорий. Кадмий известен как металл, инициирующий развитие оксидативных процессов в целом организме [5] и влияющий на уровень гормонов [1].

Учитывая возможность прямого доступа молекул лактулозы в кровь [10], ранее были проведены исследования на эритроцитах *in vitro*. Выявлена различная протективная функция лактулозы при действии хлорида кадмия в зависимости от технологии производства. Наибольшую биологическую активность показал образец сиропа лактулозы, полученного путем изомеризации лактозы в лактулозу по ТУ ВУ 100377914.512-2008 (Беларусь) [3]. Это послужило основой для проведения модельных экспериментов по проверке антиоксидантной активности (АОА) различных образцов лактулозы при моделировании окислительных процессов с использованием хлорида кадмия.

Материалы и методы

Исследования проведены на 3-х образцах: препарат фирмы Иналко (Италия) с содержанием лактулозы – 98 % (Л1), сироп «Лазет» (ООО «Шехонь-Лактулоза», Россия) с содержанием лактулозы – 41 % (Л2), концентрат пищевой лактулозы, подготовленный по ТУ ВУ 100377914.512-2008 (Беларусь) с содержанием лактулозы – 34 % (Л3). Проводили сравнение АОА данных образцов лактулозы методом FRAP (ferris reducing/antioxidant power). В ходе этого анализа под действием антиоксидантов (восстановителей) образуются комплексы железа (II) с фотометрическим реагентом. Для оценки их количества измеряли оптическую плотность при $\lambda = 490$ нм с помощью спектрофотометра СФ-46. Рассчитывали величину антиоксидантной активности по градуировочному графику [7]. В модели с суспензией липопротеидов желтка куриных яиц АОА оценивали в относительных единицах (%) в соответствии с ранее описанной моделью [4]. В экспериментальных моделях изучали АОА с добавлением сырого молока. Внесение лактулозы производилось из расчета 5 мг/мл в модельной системе. Поскольку моделировали загрязнение кадмием молока, исходили из норм, определяемых Федеральным Законом от 12.06.2008 № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию»: допустимый уровень содержания в сыром молоке кадмия 0,03 мг/л, что соответствует ПДК (предельно допустимая концентрация). В модельной смеси (молоко) концентрация кадмия соответствовала значениям ПДК. Все эксперименты проведены в 3-х кратной повторяемости.

Изучение перекисных процессов проводили на самцах крыс линии Вистар. Оксидативный стресс моделировали ежедневным добавлением в питьевую воду раствора хлорида кадмия. Сравнивали антиоксидантный эффект растворов лактулозы. Для проведения исследования сформировано четыре группы животных: 1-я (контрольная) группа – крысы, получавшие питьевую воду; 2-я группа – животные, получавшие 1 месяц питьевую воду с

хлоридом кадмия в дозе 50 ppm; 3-я и 4-я группа – животные, получавшие 1 месяц питьевую воду с хлоридом кадмия в дозе 50 ppm и сироп лактулозы 5 мг/мл (0,5 %) различных производителей: 3гр – препарат фирмы Иналко (Италия) (образец Л1), 4гр – концентрат пищевой лактулозы ТУ ВУ 100377914.512-2008 (Беларусь) (образец Л3). Питьевая вода с данными растворами давалась животными *ad libitum*. Кровь забиралась из хвостовой вены через месяц после начала эксперимента под эфирным наркозом. Содержание продуктов перекисного окисления липидов определяли в соответствии с инструкцией набора реактивов «ТБК-Агат».

Результаты исследования и их обсуждение

Для сравнительной оценки уровня АОА различных образцов лактулозы в модельном эксперименте подобраны адекватные и наиболее часто используемые методы для оценки пищевых компонентов. Выявлена схожая динамика изменения АОА в использованных методиках. Образец Л1 проявил наименьшую АОА, а наибольшую активность проявил образец Л3. В дальнейшем при эксперименте с кадмием использовали образец лактулозы с наибольшей АОА (рисунок 1).

Для сравнения степени АОА образца Л3 исследовали её зависимость от роста концентрации кадмия. Добавление Л3 в модельную систему с сырым молоком увеличило АОА на 20 %. Рост ПДК кадмия в молоке значительно не менял АОА, что может быть обусловлено активацией АОА молока [8]. Добавление Л3 к образцам, загрязненным кадмием, увеличивало АОА на 16–19 % в сравнении с пробами без лактулозы. Следовательно, использование образца Л3 увеличивало антиоксидантную активность и способствовало понижению уровня образования продуктов перекисного окисления в условиях действия тяжелых металлов в сыром молоке-сырье (таблица 1).

Образец сиропа лактулозы Л3 в соответствии с ТУ ВУ 100377914.512 – 2008 и физико-химическим характеристикам (таблица 2) в своем составе может содержать побочные продукты изомеризации лактозы в лактулозу, проявляющих антиоксидантную активность. Учитывая, что химически чистая лактулоза не проявляет антиоксидантную активность и ее молекулярная масса составляет 342,3 г/моль, проведено выделение активных компонентов сиропа.

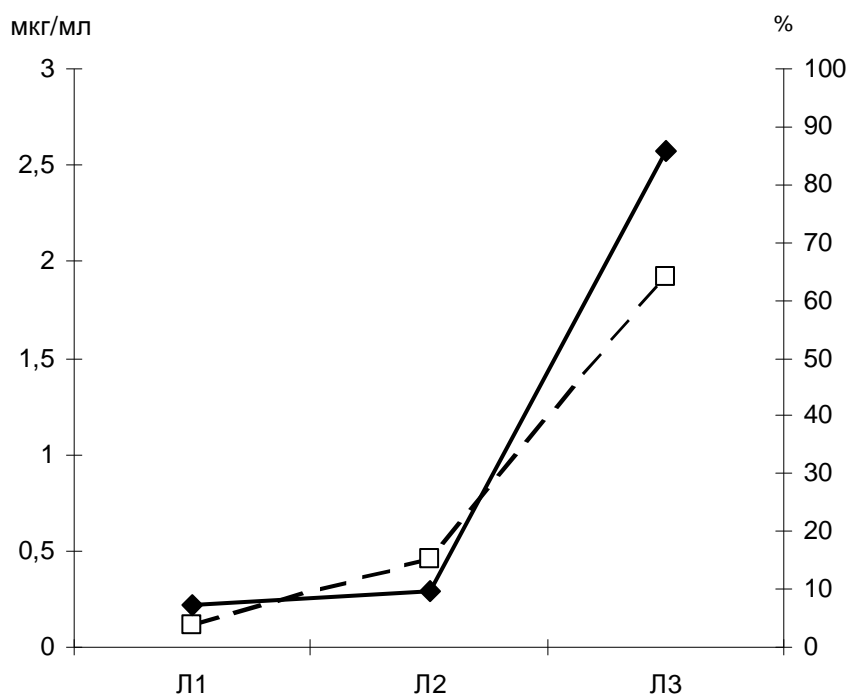


Рисунок 1. Оценка АОА различных образцов сиропов лактулозы в модели с липопротеидами желтка куриных яиц (% , сплошная линия) и методом FRAP (по аскорбиновой кислоте – мкг/мл, пунктирная линия)

Таблица 1. Уровень АОА в зависимости от концентрации кадмия в модельной системе

Концентрация тяжелых металлов	ТМ+молоко	ТМ+молоко +лактuloза (Л3)
Контроль	75,8%	96,5%
(1ПДК) Cd 0,03мг/кг	77,1%	96,1%
(2ПДК) Cd0,06мг/кг	78,0%	95,5%
(10ПДК) Cd0,3мг/кг	77,6%	94,4%

Таблица 2. Физико-химические показатели сиропа лактулозы (Л3)

Наименование показателя	Норма для продукта
Массовая доля сухих веществ, %, не менее	60,0
Массовая доля лактулозы, %, не менее	45,0
Массовая доля лактозы, %, не более	10,0
Массовая доля золы, %, не более	1,0
Натрий – карбоксиметилцеллюлозы %, не более	0,3
Плотность, кг/м ³ , не менее	1280

Для выявления молекулярной массы компонентов сиропа, проявляющих наибольшую АОА, проводили его диализ и проверку АОА компонентов с различной молекулярной массой. Использованы диализные мешки с размером пор 12–14 кДа, 6–8 кДа, 3,5 кДа (CelluSep, производитель MFPI). Диализ проводили против дистиллированной воды 48 часов. Оценка выявила рост АОА концентрата в диализном мешке с уменьшением размеров молекул. Выявлено, что АОА меняется с молекулярной массой компонентов сиропа. Наибольшую АОА (72 %) проявил раствор с размером молекул более 3,5 кДа, но менее 6–8 кДа (рисунок 2), что указывает на АОА не лактулозы, а сиропа в целом.

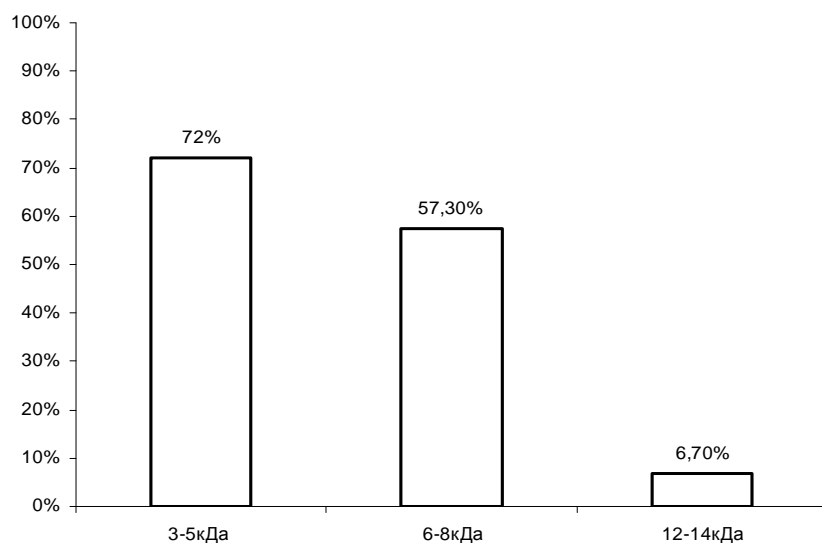


Рисунок 2. Уровень АОА компонентов сиропа с различной молекулярной массой лактулозы после диализа

В исследованиях на крысах показано, что употребление животными в течение месяца воды, загрязненной хлоридом кадмия, привело к росту количества перекисей в плазме крови в сравнении с контролем. Совместное употребление исследуемых образцов лактулозы с хлоридом кадмия снижает уровень ТБК-активных продуктов в плазме крови крыс, что указывает на антиоксидантный эффект сиропов лактулозы. Использование образцов Л1 и Л3 выявило различие их АОА. Образец Л3 вызвал достоверное снижение ТБК-активных продуктов в плазме крови животных в сравнении с лактулозой (Л1). Выявленные изменения АОА могут указывать на синергетический эффект лактулозы и компонентов сиропа с молекулярной массой более 3 кДа, проявляющих наибольшую антиоксидантную активность (рисунок 3). Возможно, что уже известные свойства лактулозы позволяют активировать резервы организма и снизить уровень окисленных продуктов [1, 9].

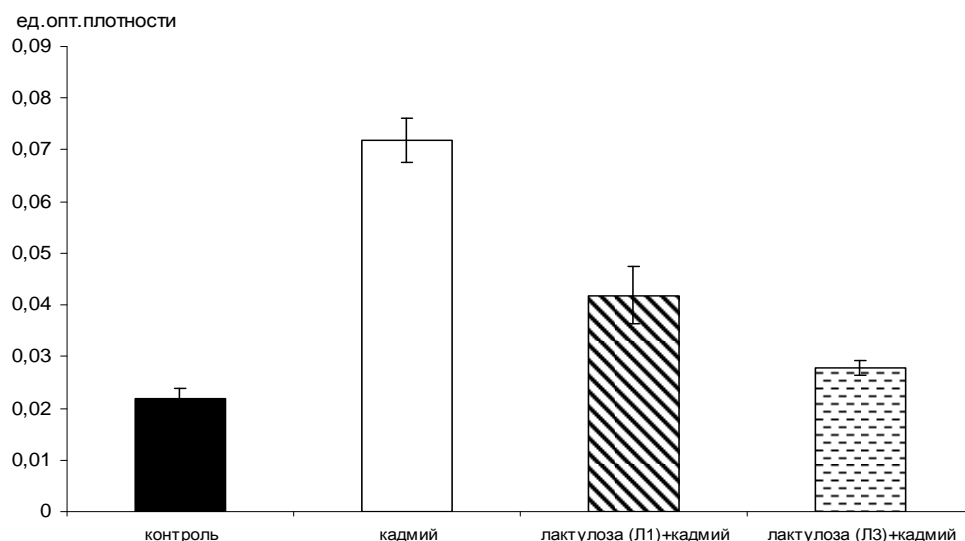


Рисунок 3. Уровень ТБК-активных продукты (в ед. опт. плотности) в плазме крови крыс, потреблявших различные образцы сиропа лактулозы, при действии хлорида кадмия

Заключение

Таким образом, изучение трех образцов лактулозы при моделировании окислительных процессов с использованием хлорида кадмия выявило наибольшую антиоксидантную активность образца Л3 (ТУ ВУ 100377914.512-2008). Использование образца Л3 увеличивало АОА и способствовало понижению уровня образования продуктов перекисного окисления в условиях действия тяжелых металлов в сыром молоке-сырье. В моделях наибольшую АОА проявил раствор с размером молекул более 3,5 кДа, но менее 6–8 кДа. В исследованиях *in vivo* показана антиоксидантная активность лактулозы при моделировании кадмиевой интоксикации. Наибольшую активность проявил образец Л3, что может быть обусловлено синергетическим эффектом антиоксидантных компонентов и метаболитов микроорганизмов [9]. Полученные данные позволяют рассматривать данный образец в применении как антиоксидант в функциональных продуктах питания.

Список литературы

1. Будкевич Р.О. Влияние употребления воды, загрязненной низкими дозами кадмия, на суточную динамику гормонов у крыс // Вестник Северо-Кавказского государственного технического университета. – 2010. – № 3. – С. 158-162.
2. Будкевич Е.В., Батурин В.А., Будкевич Р.О., Тинькова Е.Л. Некоторые показатели нервной системы у подростков в различных экологических условиях на протяжении дневного бодрствования // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2011. – № 3. – С-45-47.

3. Будкевич Р.О., Евдокимов И.А., Емельянов С.А., Лодыгин А.Д. Биологическая активность концентратов пищевой лактулозы *in vitro* по данным морфометрии эритроцитов методом атомно-силовой микроскопии // Вестник Северо-Кавказского государственного технического университета. – 2011. – № 4. – С. 115-118.
4. Катковская М.В., Кухарчик М.А. Определение общей антиоксидантной активности в пробах слюны и мочи студентов с помощью модельной системы / Актуальные проблемы современной медицины 2008: материалы 62-й Международной науч. конф. студентов и молодых ученых. В 2 ч. Ч. 1 / под ред. С. Л. Кабака, А. С. Леонтьюка. – Минск: БГМУ, 2008. – С. 173.
5. Котельникова С.В., Котельников А.В., Соколова Н.Г. Сравнительная характеристика перекисного окисления липидов при интоксикации солью кадмия в разных органах и тканях белых крыс в зимний и летний периоды // Вестник Астраханского государственного технического университета. – 2006. – № 3. – С. 214-217.
6. Синельников Б.М., Храмцов А. Г., Евдокимов И. А. и др. Лактоза и ее производные. – СПб.: Профессия, 2007. – 768 с.
7. Цюпко Т.Г., Петракова И.С., Бриленок Н.С. и др. Определение суммарного содержания антиоксидантов методом FRAP // Аналитика и контроль. – 2011. – Т.15. – № 3. – С.287–298.
8. Шидловская В. П., Юрова Е. А. Антиоксиданты молока их роль в оценке его качества // Молочная промышленность. – 2010. – № 2. – С. 26–27.
9. Chen X., Zuo Q., Hai Y., Sun X.J. Lactulose: an indirect antioxidant ameliorating inflammatory bowel disease by increasing hydrogen production // Med. Hypotheses. – 2011. – Vol. 76. – № 3. – P. 325-327.
10. Oriishi T., Sata M., Toyonaga A., Sasaki E., Tanikawa K. Evaluation of intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease using lactulose and measuring antibodies to lipid A // Gut. – 1995. – № 36. – P. 891-896.

Рецензенты:

Криворучко А.Ю., д.б.н., руководитель научно-диагностического и лечебно-ветеринарного центра, ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет» Минсельхоза России, г. Ставрополь.

Бондарь Т.П., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой медицинской биохимии, клинической лабораторной диагностики и фармации, ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет» Минобрнауки РФ, г. Ставрополь.