

УДК 616.155.194.18+577.121-616.29]-092.9

О. І. Станев¹, асп., **О. В. Запорожченко**¹, доц., **Л. М. Карпов**¹, проф.,
С. Г. Коломійчук², наук. співроб., **О. О. Косошкіна**¹, асист.,
Л. А. Преснова¹, наук. співроб.

¹ Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
кафедра біохімії і кафедра фізіології людини і тварин,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна, sana33@ukr.net

² Інститут очних хвороб та тканинної терапії
ім. В. П. Філатова АМН України, лабораторія біохімії,
Французький бульвар, 49/51, Одеса, 65061, Україна

ВПЛИВ РІЗНИХ ШТАМІВ СПІРУЛІНИ НА ВМІСТ ЛАКТАТУ, МАЛАТУ ТА ПІРУВАТУ В ОРГАНАХ ЩУРІВ ЗА ГЕМОЛІТИЧНОЇ АНЕМІЇ

Визначали вміст лактату, малату та пірувату, співвідношень лактат/піруват, малат/піруват, а також НАД/НАДН і НАДФ/НАДФН в органах щурів за гемолітичної анемії та при застосуванні різних штамів спіруліни. Встановлено, що за дії фенілгідразину вміст лактату, малату та пірувату в досліджуваних органах щурів змінюється в різній мірі і напрямках, а співвідношення НАД/НАДН, як правило, зменшується. Застосування спіруліни сприяло корекції зазначених змін.

Ключові слова: гемолітична анемія, лактат, малат, піруват, спіруліна.

З'ясуванню механізмів регуляції кровотворної системи за різних умов функціонування присвячено багато робіт як в країнах СНД, так і зарубіжних авторів [1, 2, 3]. Гемолітичні анемії становлять велику групу захворювань, що розрізняються за етіологією, патогенезом, клінічною картиною, методами лікування. Основною ознакою гемолітичних анемій є підвищене руйнування еритроцитів і накопичення у крові продуктів розпаду гемоглобіну (білірубін).

Одним із засобів лікування гемолітичної анемії є прийом препаратів *Spirulina platensis* [4]. При їх застосуванні рівень гемоглобіну повертається до норми, підвищується засвоєння заліза еритроцитами [5, 6].

Відомо, що важливим показником енергетичного стану клітини є загальний вміст нікотинамідних коферментів у ній та співвідношення їх вільних форм в окремих компартментах [7, 8]. Окиснювально-відновлювальний статус нікотинамідних коферментів відіграє важливу регуляторну роль у клітинному метаболізмі, оскільки співвідношення НАД/НАДН і НАДФ/НАДФН визначає швидкість і напрям зворотних реакцій оксидоредукції та регулює функціонування загальних метаболічних шляхів у клітині [8]. Отже, від зміни співвідношення НАД/НАДН залежить роль анаеробного шляху окиснення глюкози, де лактат є кінцевим продуктом гліко-

лізу, а також аеробного обміну, у якому лактат після перетворення в піруват окиснюється у циклі трикарбонових кислот [9]. Від зміни співвідношення НАДФ/НАДФН залежить інтенсивність ліпогенезу, за якого малат декарбоксилюється до пірувату та утворюється НАДФН. В організмі тварин піруват є одним із центральних метаболітів, що беруть участь у багатьох ферментативних процесах.

Метою наших досліджень є вивчення можливості застосування різних штамів *Spirulina platensis* для корекції вмісту субстратів НАД-залежних дегідрогеназних систем та співвідношень нікотинамідних коферментів в умовах фенілгідазинової гемолітичної анемії у щурів.

Матеріали і методи

Дослідження виконано на білих щурах (самцях) лінії Вістар масою 180–200 г, які були поділені на 5 груп, по 8 у кожній. Перша група тварин (інтактні) була контрольною (контроль-1). Іншим чотирьом групам вводили для моделювання гемолітичної анемії фенілгідазин (ФГ) внутрішньом'язово (в/м) у дозі 20 мг/кг протягом 4-х днів. Одна з них була групою порівняння (контроль-2), а трьом останнім, крім того, вводили внутрішньошлунково (в/ш) суспензію клітин різних штамів спіруліни у фізіологічному розчині по 1 мл, в розрахунку 250 мг сирової ваги на кг маси щодня протягом 2-х тижнів, починаючи з другого дня після першої ін'єкції фенілгідазину. Вивчали дію дикого типу *Sp. platensis* (група 3) та штамів 198-B (група 4) і 27-G (група 5) (останні два отримані в лабораторії фізіологічно активних речовин ОНУ ім. І. І. Мечникова). У дослід тварин брали через 3 тижні після введення ФГ. В органах щурів визначали вміст лактату, малату і пірувату.

Лактат і малат визначали за методом Хохорста, а піруват — за методом Цока і Лампрехта [10]. Співвідношення вільних НАД/НАДН та НАДФ/НАДФН визначали на основі констант рівноваги лактатдегідрогеназної та малатдегідрогеназної реакцій [8, 11].

Результати оцінювали за загальноприйнятим t-критерієм Ст'юдента [12].

Результати досліджень

Результати визначення вмісту лактату, малату, пірувату, співвідношень лактат/піруват, малат/піруват, а також співвідношення цитоплазматичних нефосфорильованих і фосфорильованих окиснених нікотинамідних коферментів до відновлених представлені в таблицях 1 і 2.

З'ясувалося, що за введення ФГ вміст лактату вірогідно підвищувався у нирках та серці до 152 та 147% відповідно, а піруват вірогідно зменшувався у печінці та серці до 51% щодо контролю-1. Рівень малату вірогідно зменшувався у мозку та серці до 68 та 50% відносно контролю-1.

Таблиця 1

Вплив штамів *Sp. platensis* на вміст лактату та пірувату (мкмоль/г тканини) і співвідношення НАД/НАДН в органах щурів за гемолітичної анемії, n = 8

| Органи | Субстрати | Контроль-1 (інтактні) | Контроль-2 (ФГ в/м) | ФГ (в/м)+ <i>Sp. platensis</i> (дикий тип) (в/ш) | ФГ (в/м)+ <i>Sp. platensis</i> (198-B) (в/ш) | ФГ (в/м) + <i>Sp. platensis</i> (27-G) (в/ш) |
|---------|-------------|--------------------------|------------------------|--|--|--|
| Печінка | Лактат (Л) | 1,397 ± 0,074 | 1,127 ± 0,083 * | 1,571 ± 0,109 ** | 2,266 ± 0,188 */ ** | 1,895 ± 0,163 */ ** |
| | Піруват (П) | 0,191 ± 0,014 | 0,098 ± 0,010 * | 0,135 ± 0,011 */ ** | 0,135 ± 0,014 * | 0,156 ± 0,018 ** |
| | Л/П | 7,563 ± 0,711 | 12,533 ± 1,790 * | 12,065 ± 1,048 * | 18,910 ± 3,257 * | 13,827 ± 2,243 * |
| | НАД/НАДН | 1256,035 ± 100,560 | 815,503 ± 100,016 * | 808,121 ± 105,377 * | 589,904 ± 106,774 * | 855,328 ± 204,801 |
| Нирки | Лактат | 1,047 ± 0,059 | 1,597 ± 0,095 * | 1,561 ± 0,102 * | 1,160 ± 0,130 ** | 1,158 ± 0,108 ** |
| | Піруват | 0,160 ± 0,010 | 0,163 ± 0,012 | 0,192 ± 0,017 | 0,130 ± 0,012 | 0,105 ± 0,007 */ ** |
| | Л/П | 6,685 ± 0,511 | 10,138 ± 0,855 * | 8,562 ± 0,975 | 9,349 ± 1,297 | 11,073 ± 0,970 * |
| | НАД/НАДН | 1404,668 ± 108,190 | 938,973 ± 86,523 * | 1126,357 ± 94,721 | 1117,202 ± 173,403 | 884,187 ± 119,481 * |
| Мозок | Лактат | 1,210 ± 0,090 | 1,432 ± 0,127 | 1,591 ± 0,134 | 1,307 ± 0,139 | 0,896 ± 0,090 */ ** |
| | Піруват | 0,171 ± 0,019 | 0,212 ± 0,011 | 0,201 ± 0,020 | 0,124 ± 0,012 ** | 0,101 ± 0,008 */ ** |
| | Л/П | 7,998 ± 1,589 | 6,911 ± 0,751 | 8,499 ± 1,138 | 11,156 ± 1,462 ** | 9,546 ± 1,572 |
| | НАД/НАДН | 1313,777 ± 143,988 | 1414,995 ± 151,636 | 1190,103 ± 151,775 | 898,912 ± 104,731 ** | 1110,668 ± 159,731 |
| Серце | Лактат | 2,124 ± 0,120 | 3,126 ± 0,129 * | 2,885 ± 0,135 * | 3,217 ± 0,294 * | 3,242 ± 0,190 * |
| | Піруват | 0,227 ± 0,021 | 0,115 ± 0,011 * | 0,154 ± 0,019 * | 0,174 ± 0,016 ** | 0,126 ± 0,012 * |
| | Л/П | 10,024 ± 1,110 | 29,456 ± 3,754 * | 20,563 ± 2,488 * | 19,429 ± 2,518 * | 26,615 ± 1,743 * |
| | НАД/НАДН | 963,265 ± 87,091 | 340,143 ± 39,331 * | 480,301 ± 53,445 * | 527,113 ± 73,556 * | 348,755 ± 22,549 * |

Вплив штамів *Sp. platensis* на вміст малату та пірувату (мкмоль/г тканини), і співвідношення НАДФ/НАДФН в органах щурів за гемолітичної анемії, n = 8

| Органи | Субстрати | Контроль-1 (інтактні) | Контроль-2 (ФГ в/м) | ФГ (в/м)+ <i>Sp. platensis</i> (дикий тип) (в/ш) | ФГ (в/м)+ <i>Sp. platensis</i> (198-B) (в/ш) | ФГ (в/м) + <i>Sp. platensis</i> (27-G) (в/ш) |
|---------|-------------|--------------------------|------------------------|--|--|--|
| Печінка | Малаг (М) | 0,764 ± 0,073 | 0,685 ± 0,028 | 0,696 ± 0,030 | 0,615 ± 0,045 | 0,619 ± 0,042 |
| | Піруват (П) | 0,191 ± 0,014 | 0,098 ± 0,010 * | 0,135 ± 0,011 */ ** | 0,135 ± 0,014 * | 0,156 ± 0,018 ** |
| | М/П | 4,190 ± 0,576 | 7,536 ± 0,831 * | 5,432 ± 0,576 | 4,912 ± 0,605 ** | 4,357 ± 0,599 ** |
| | НАДФ/НАДФН | 0,009 ± 0,001 | 0,005 ± 0,001 * | 0,007 ± 0,001 | 0,008 ± 0,001 | 0,009 ± 0,001 |
| Нирки | Малаг | 0,456 ± 0,025 | 0,415 ± 0,032 | 0,434 ± 0,041 | 0,432 ± 0,033 | 0,370 ± 0,029 |
| | Піруват | 0,160 ± 0,010 | 0,163 ± 0,012 | 0,192 ± 0,017 | 0,130 ± 0,012 | 0,105 ± 0,007 */ ** |
| | М/П | 2,908 ± 0,220 | 2,630 ± 0,251 | 2,292 ± 0,117 * | 3,475 ± 0,335 | 3,610 ± 0,333 |
| | НАДФ/НАДФН | 0,012 ± 0,001 | 0,014 ± 0,001 | 0,015 ± 0,001 * | 0,010 ± 0,001 | 0,010 ± 0,001 ** |
| Мозок | Малаг | 0,609 ± 0,036 | 0,414 ± 0,030 * | 0,409 ± 0,031 * | 0,501 ± 0,040 | 0,406 ± 0,026 * |
| | Піруват | 0,171 ± 0,019 | 0,212 ± 0,011 | 0,201 ± 0,020 | 0,124 ± 0,012 ** | 0,101 ± 0,008 */ ** |
| | М/П | 3,775 ± 0,304 | 1,959 ± 0,120 * | 2,143 ± 0,223 * | 4,389 ± 0,710 ** | 4,143 ± 0,326 ** |
| | НАДФ/НАДФН | 0,009 ± 0,001 | 0,018 ± 0,001 * | 0,017 ± 0,002 * | 0,009 ± 0,001 ** | 0,009 ± 0,001 ** |
| Серце | Малаг | 0,637 ± 0,029 | 0,317 ± 0,023 * | 0,374 ± 0,030 * | 0,569 ± 0,049 ** | 0,550 ± 0,057 ** |
| | Піруват | 0,227 ± 0,021 | 0,115 ± 0,011 * | 0,154 ± 0,019 * | 0,174 ± 0,016 ** | 0,126 ± 0,012 * |
| | М/П | 3,109 ± 0,498 | 2,934 ± 0,326 | 2,830 ± 0,572 | 3,477 ± 0,430 | 4,600 ± 0,553 ** |
| | НАДФ/НАДФН | 0,012 ± 0,001 | 0,013 ± 0,002 | 0,015 ± 0,002 | 0,011 ± 0,002 | 0,008 ± 0,001 |

Примітки: * — різниця з контролем 1 вірогідна (p<0,05); ** — різниця з контролем 2 вірогідна (p<0,05).

Встановлено, що застосування штамів спіруліни при моделюванні гемолітичної анемії впливає на вміст лактату, малату, пірувату в органах щурів у різній мірі в залежності від тканини. У тварин, які водночас отримували ФГ та дикий тип *Sp. platensis* спостерігалось вірогідне підвищення лактату у печінці до 139%, а рівень пірувату вірогідно підвищувався до 138% щодо контролю-2.

У групі тварин з гемолітичною анемією, які отримували штам 198-В, вірогідно підвищувався рівень лактату у печінці до 201% та зменшувався у нирках до 72% відносно контролю-2. Вміст пірувату зменшувався у мозку та серці до 72 та 76% відносно контролю-2 відповідно. Вміст малату вірогідно зростав у серці до 179% у порівнянні з контролем-2.

У тварин, які водночас отримували ФГ та штам 27-Г, вірогідно підвищувався вміст лактату у печінці до 168% і зменшувався у нирках та мозку до 72% та 62% щодо контролю-2. Вміст пірувату зменшувався відносно контролю-2 у нирках та мозку до 65% та 47% відповідно. Рівень малату вірогідно підвищувався у серці до 173% відносно контролю-2.

За оцінки співвідношення відновлених субстратів до окиснених було з'ясовано, що у групі щурів, які отримували лише ФГ, воно вірогідно підвищувалося у печінці, нирках та серці тварин у порівнянні з контролем-1. При застосуванні дикого типу і штаму 198-В водночас з ФГ в нирках та серці спостерігалися протилежні зміни щодо контролю-2. Виявлене збільшення співвідношення лактату до пірувату свідчить про активацію анаеробних процесів, а зменшення — аеробних. У групі тварин, які отримували тільки ФГ (контроль-2), співвідношення малат/піруват вірогідно підвищувалося у печінці та знижувалося у мозку щодо контролю-1. Протилежні зміни спостерігалися при сумісному застосуванні ФГ та спіруліни у печінці та мозку щодо контролю-2. Збільшення співвідношення малат/піруват свідчить про зменшення інтенсивності ліпогенезу, а зменшення — про його активацію, що спостерігалось у печінці.

Аналіз співвідношення НАД/НАДН виявив його вірогідне зменшення в групі тварин, які отримували ФГ, а саме в печінці, нирках та серці щодо контролю-1. В нирках та серці тварин, які водночас отримували ФГ та *Sp. platensis* (дикий тип і 198-В), спостерігалися протилежні зміни щодо контролю-2. Підвищення відновленості НАД і накопичення НАДН в тканинах щурів може свідчити про інгібування процесів гліколізу і активацію глюконеогенезу [13, 14]. У групі тварин, які отримували ФГ, спостерігалось вірогідне зменшення співвідношення НАДФ/НАДФН в печінці та підвищення у мозку щодо контролю-1. Збільшення співвідношення НАДФ/НАДФН спостерігалось в печінці, а зменшення — в мозку у тварин, які водночас отримували ФГ та *Sp. platensis* щодо контролю-2.

Найбільш виразний позитивний вплив на співвідношення лактату до пірувату за фенілгідразинової анемії виявлявся у тварин, що отримували дикий тип спіруліни та штам 198-В. Це спостерігали у нирках, мозку та серці. На співвідношення малату до пірувату у печінці та мозку позитивно впливали всі штами *Sp. platensis*.

Висновки

1. Після введення фенілгідазину в різних тканинах щурів з неоднаковою інтенсивністю змінюється вміст лактату, малату і пірувату. Виявлений перерозподіл метаболітів НАД- та НАДФ-дегідрогеназних систем — лактату, малату і пірувату — зумовлює підвищення співвідношення лактат/піруват і малат/піруват у досліджуваних тканинах.

2. Введення фенілгідазину тваринам викликає зменшення співвідношення вільних НАД/НАДН і НАДФ/НАДФН у тканинах, що свідчить про спрямування енергетичних процесів у бік гліколізу та ліпогенезу.

3. Отримані дані свідчать про можливість застосування штамів спіруліни для корекції окиснювально-відновлювальних процесів у тканинах щурів за гемолітичної анемії.

Література

1. Сулова М. Н., Павлов А. Д., Морцакова Е. Ф. Динамика содержания тиреоидных гормонов в сыворотке крови при фенилгидразиновой и острой постгеморрагической анемиях // Пат. физиология и эксп. терапия. — 1994. — № 4. — С. 37–38.
2. Авдеева М. Г., Мойсова Д. Л., Городин В. Н. и др. Роль глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в патогенезе анемии при лептоспирозе // Клиническая медицина. — 2002. — № 6. — С. 42–44.
3. Valentini G., Chiarelli L. R., Fortin R. et al. Structure and Function of Human Erythrocyte Pyruvate Kinase. Molecular basis of nonspherocytic hemolytic anemia // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 277. — P. 23807–23814.
4. Takeuchi T. Clinical experiences of administration of Spirulina to patients with hypochromic anaemia. — Japan: Tokyo Medical and Dental University. — 1997. — 89 p.
5. Seshadri C. V., Villiamai V. The study of haemoglobin levels in humans fed on Spirulina supplement // Mono. Ser. Photosyn. — 1990. — Vol. 30. — P. 8–12.
6. Johnson P., Shubert E. Availability of iron to rats from Spirulina, a blue-green algae // Nutr. Rec. — 1988. — N 6. — P. 85–94.
7. Леутский К. М. Никотиновая кислота. Витамин РР. — Л., 1974. — С. 18–47, 181.
8. Великий Н. Н., Пархоменко П. К. Роль окислительно-восстановительного состояния никотинамидных коферментов в регуляции клеточного метаболизма // Витамины. — 1976. — № 9. — С. 3–15.
9. Островский Ю. М., Величко М. Г., Якубчик Т. Н. Пируват и лактат в животном организме. — Минск: Наука и техника, 1984. — С. 6–24.
10. Bergmeyer H. U. Methoden der enzymatischen Analyse / Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. — Berlin, 1970. — S. 1536–1539.
11. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. — 272 с.
12. Математический анализ биологических данных / Под ред. Г. Н. Зайцева. — М.: Наука, 1991. — 184 с.
13. Greenbaum A. L., Guma K. A., Mclean P. The distribution of hepatic metabolites and the control of the pathways of carbohydrate metabolism in animals of different dietary and hormonal status. // Arch. Biochem. and Biophys. — 1971. — 143, N 2. — P. 617–663.
14. Великий Н. Н., Кучмеровская Т. М., Пархоменко П. К. Окислительно-восстановительное состояние свободных никотинамидных коферментов и синтез фосфоенолпирувата в печени крыс и морских свинок // Укр. биохим. журн. — 1981. — Т. 53, № 1. — С. 60–66.

**А. И. Станев, А. В. Запорожченко, Л. М. Карпов, С. Г. Коломийчук,
О. А. Кокоскина, Л. А. Преснова**

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра биохимии и кафедра физиологии человека и животных,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина, sana33@ukr.net

Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова
АМН Украины, лаборатория биохимии,
Французский бульвар, 49/51, Одесса, 65061, Украина

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ ШТАММОВ СПИРУЛИНЫ НА СОДЕРЖАНИЕ ЛАКТАТА, МАЛАТА И ПИРУВАТА В ОРГАНАХ КРЫС ПРИ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ

Резюме

Определяли содержание лактата, малата и пирувата, соотношения лактат/пируват, малат/пируват, а также НАД/НАДН и НАДФ/НАДФН в органах крыс при гемолитической анемии с применением различных штаммов спирулины. Установлено, что при действии фенилгидразина содержание лактата, малата и пирувата изменяется в исследуемых органах крыс в различной степени и направлениях, а соотношение НАД/НАДН, как правило, уменьшается. Применение спирулины положительно влияло на отмеченные изменения.

Ключевые слова: гемолитическая анемия, лактат, малат, пируват, спирулина.

**A. I. Stanev, A.V. Zaporozhchenko, L. M. Karpov, S.G. Kolomiychuk,
O. A. Kokoshkina, L. A. Presnova**

Odessa Mechnikov National University,
Department of Biochemistry and Human and Animal Physiology,
Dvoryanska st., 2, 65026, Odessa, Ukraine

Filatov Institute of AMS of Ukraine, laboratory biochemistry,
49/51 Frantsuzky boulevard, 65061, Odessa, Ukraine

INFLUENCE OF DIFFERENT SPIRULINA CULTURES TO THE CONTENT OF LACTATE, MALATE AND PYRUVATE IN ORGANS OF RATS AT HEMOLYTIC ANEMIA

Summary

The content of lactate, malate and pyruvate, lactate/pyruvate, malate/pyruvate and NAD/NADH, NADP/NADPH ratios in organs of rats at hemolytic anemia and with cultures of spirulina was determined. It has been revealed that the content of lactate, malate and pyruvate having been researched in rat organs changes to different degree and ways at the injection of phenylhydrazin, and the ratio of NAD/NADH as a rule decreases. Application of spirulina had positive influence upon the noted changes.

Keywords: hemolytic anemia, lactate, malate, pyruvate, spirulina.