

УДК 577.127.3: 616.036.12

Л. М. Карпов, д.б.н., профессор,
О. Д. Павличенко, старший преподаватель,
О. Н. Ершова, к.б.н., старший научный сотрудник,
С. Г. Каракис, старший научный сотрудник,
А. В. Майкова, к.б.н, доцент,
А. Г. Драгоева, младший научный сотрудник,
Т. И. Лавренюк, младший научный сотрудник,
В. А. Сагариц, младший научный сотрудник,
Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
кафедра физиологии человека и животных,
ул. Дворянская 2, Одесса 65082, Украина, e-mail: lmkarpov@onu.edu.ua

ОСОБЕННОСТИ АДАПТАЦИОННОГО ДЕЙСТВИЯ СПИРУЛИНЫ И ЕЕ МУТАНТНЫХ ШТАММОВ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

Установлено адаптогенное действие спирулины дикого типа и ее мутантных штаммов 198В и 27G на фоне хронического стресса. Показано, что процедура интрагастрального введения крысам физиологического раствора вызывает состояние стресса и, как следствие, увеличение количества β -липопротеинов, усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ). Интрагастральное введение крысам спирулины снижает интенсивность ПОЛ и уровень β -липопротеинов, что свидетельствует об адаптационных возможностях спирулины для организма.

Ключевые слова: спирулина, стресс, ПОЛ, общий белок, холестерин, β -липопротеины, крысы.

В настоящее время на фоне возросших нервно-эмоциональных перегрузок, напряженной экологической ситуации, изменений питания у населения все чаще возникают симптомы адаптационной недостаточности, снижения неспецифической резистентности организма к неблагоприятным факторам окружающей среды – физической, химической и биологической природы. Вполне вероятно, что именно с этим связан рост таких хронических заболеваний, как атеросклероз, сердечно-сосудистые, онкологические заболевания, диабет и др. [9]. Одной из основных причин снижения адаптации является недостаточная обеспеченность организма, прежде всего биологически активными веществами, которые необходимы для нормального функционирования системы антиоксидантной защиты, определяющей адаптационный потенциал организма [2]. В связи с этим особую актуальность приобретают вопросы его повышения и поиск эффективных и безопасных адаптогенов. Среди веществ природного происхождения с такими свойствами большое внимание привлекает микроводоросль спирулина (*Spirulina (Arthrospira) platensis*), обладающая исключительно высокой пищевой ценностью. Наряду с высоким (до 62 % на сухой вес) содержанием биологически полноценного белка она включает почти полный спектр каротиноидов, значительные количества витаминов группы В, витамин Е, эссенциальную гамма-линоленовую кислоту, целый ряд микроэлементов [10]. Учитывая потенциальные возможности природных штаммов спирулины, в лаборатории селекционно-генетическим путем были получены новые штаммы *Spirulina platensis* – 27G и 198В, которые

в отличие от дикого штамма характеризуются повышенным содержанием компонентов с антиоксидантным действием: с-фикоцианина, алофикоцианина, каротиноидов, хлорофилла «а», серусодержащих аминокислот, фенилаланина [4]. Антиоксидантные свойства штаммов спирулины 27G и 198В в сравнении со штаммом дикого типа (ДТ) были изучены ранее в тканях сердца и эритроцитах крыс на модели хронического стресса [5].

Цель данного исследования: изучить адаптогенное влияние спирулины дикого типа и ее мутантных штаммов 198В и 27G на интенсивность ПОЛ, белковый и липидный обмен при хроническом стрессе у крыс.

Материалы и методы исследования

Опыт проводили на белых нелинейных крысах-самцах, возрастом около 3 месяцев, с исходной массой тела 200–270 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Животные были разделены на 5 групп по 8 крыс в каждой. Первую группу (контроль 1) составили интактные животные. Животным второй группы (контроль 2) с помощью зонда ежедневно вводили в желудок по 2 мл физиологического раствора в течение 14 суток. Опытные группы (3-я, 4-я и 5-я) составляли животные, получавшие таким же способом в течение 14 дней штаммы спирулины в дозе 250 мг/кг массы тела в виде суспензии в физиологическом растворе в объеме 2 мл. Крысам второй группы вводили спирулину дикого типа (*Spirulina platensis*), животные 4-й и 5-й групп получали мутантные штаммы 198В и 27G соответственно. Массу тела животных определяли каждые 7 дней. Через 14 суток животных декапитировали под хлороформным наркозом с соблюдением норм биологической этики при экспериментальной работе с животными. Гомогенаты органов готовили, как описано ранее [7].

Кровь центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 минут. Содержание общего холестерина в сыворотке крови определяли по реакции с уксусным ангидридом (метод Илька), β -липопротеинов - турбидиметрическим методом (по Бурштейну и Самаю), общего белка – по реакции с сернохлоридом меди в щелочной среде (биуретовая реакция) [6]. Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли в кислой среде по реакции его взаимодействия с тиобарбитуровой кислотой с образованием триметилового комплекса с максимумом поглощения при λ 532 нм [11].

В работе использовали альгологически чистую культуру *Spirulina platensis* Gom. Geitl (штамм *Moyses*), а также мутантные штаммы 27G с повышенным содержанием фикоцианина и 198В с повышенным содержанием β -каротина. Мутантные штаммы получены в лаборатории цианобактерий ОНУ имени И. И. Мечникова [4].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью стандартных статистических программ «Microsoft Excel» для Windows-2007.

Результаты исследования

Прирост массы тела является важным показателем благополучия физиологического состояния у молодых животных. Изменения массы тела у крыс всех групп представлены на рис. 1. Животные интактной группы, которые ежедневно получали стандартное питание вивария, интенсивно росли в течение эксперимента.

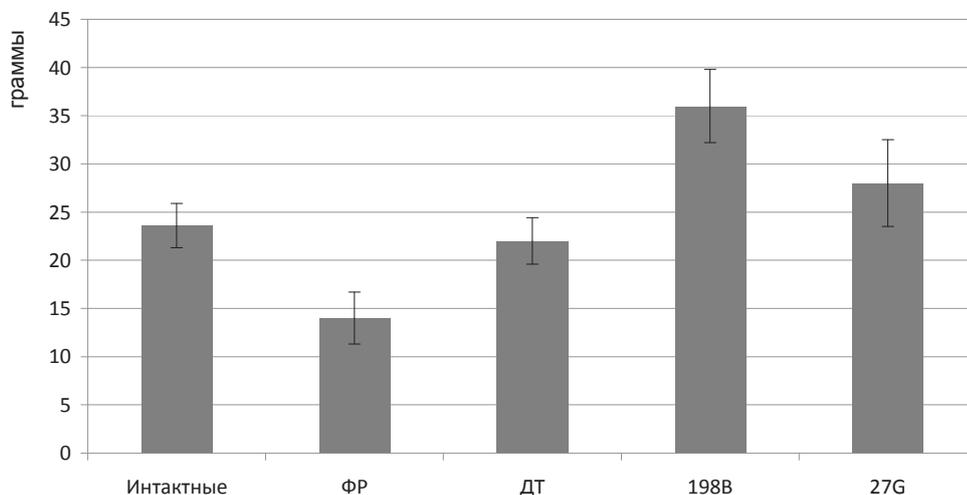


Рис.1. Прирост массы животных (г) за 14 дней эксперимента

Так, уже на 14-е сутки их масса превышала исходную на 9,6 %. Крысы, которым вводили физиологический раствор, изменяли свою массу тела медленнее: через 14 суток их вес увеличился только на 5,6 %, что было достоверно ($P < 0,05$) меньше относительно привеса интактных животных. Введение спирулины ДТ, ее штаммов 27G и 198В сопровождалось значительным ускорением роста животных: к 14-м суткам эксперимента их вес увеличился на 9,5 %, 15,7 % и 17,0 % соответственно. Прирост массы животных этих групп достоверно ($P < 0,05$) отличался от 2-й группы. Кроме того, средние значения привеса животных на 6,25 % и 7,5 % выше в группах, получавших спирулину штаммов 27G и 198В соответственно, чем в группе, получавшей ДТ. Учитывая тот факт, что исследуемые штаммы спирулины составляли около 0,1 % от основной пищи, можно предположить, что прием спирулины способствует лучшему усвоению питательных веществ из основной пищи и в большей степени этому способствуют штаммы 198В и 27G.

Общее состояние и поведение крыс, получавших спирулину, не отличались от интактных животных. Животные были активны, рефлексы живые, прием воды и пищи без особенностей, естественные отправления не нарушены. Таким образом, в условиях двухнедельного введения спирулины через зонд состояние центральной нервной системы было в пределах физиологической нормы.

Было установлено, что в норме общий белок в сыворотке крови крыс интактной группы составил 91,30 г/л (табл. 1).

В сыворотке крови крыс 2-й группы наблюдалась тенденция к уменьшению количества белка на 7 % по сравнению с интактной группой. У крыс, принимавших штаммы спирулины 198В и 27G, отмечена тенденция к увеличению содержания общего белка в плазме крови на 11,6 % и 10,2 % соответственно по сравнению со 2-й группой животных.

Таблица 1

Показатели белкового и липидного обмена сыворотки крови крыс на фоне введения различных штаммов спирулины (M±m, n=8)

Показатели	Интактные (контроль 1)	ФР (контроль 2)	Дикий тип	198В	27G
Общий белок, г/л	91,30±5,31	85,00±6,93	88,14±8,59	94,86±4,86	93,71±9,81
Общий холестерин, ммоль/л	1,57±0,06	1,61±0,08	1,56±0,02	1,54±0,02	1,54±0,07
β-липопротеины, мг/100мл	15,76±0,37	18,75±0,95**	14,52±0,85*	14,19±1,06*	14,35±1,09*

Примечание: * - P < 0,01 по сравнению с контролем 2;

** - P < 0,01 по сравнению с контролем 1

У животных 1-й и 2-й групп содержание общего холестерина в сыворотке крови было в пределах физиологической нормы. Введение в рацион различных штаммов спирулины существенным образом не влияло на показатели общего холестерина, которые достоверно не отличались от соответствующих показателей интактных крыс.

Уровень β-липопротеинов в крови крыс 2-й группы был достоверно (P < 0,01) выше на 18,9 % по сравнению с интактной группой. Введение штаммов спирулины способствовало снижению концентрации β-липопротеинов относительно 2-й группы в среднем на 23,46±0,86 % при достоверности (P < 0,01).

В результате проведенных исследований не выявлено достоверных изменений показателей белкового обмена. Известно, что все виды стресса требуют срочной мобилизации белка для покрытия энергетических нужд организма [14]. Поэтому даже тенденция к увеличению содержания общего белка после введения спирулины может быть значимой и отражать позитивное влияние ее мутантных штаммов на функциональное состояние гепатоцитов. Позитивный эффект на белоксинтезирующую функцию печени, по-видимому, связан с тем, что аминокислотный состав белка спирулины хорошо сбалансирован, а витамины группы В, которые необходимы для усвоения аминокислот и регуляции их обмена, находятся у нее в физиологически сбалансированном количестве [10].

Известно, что стресс может вызывать проатерогенные нарушения липидного спектра [12]. У крыс, получавших с помощью зонда физиологический раствор, выявлено достоверное увеличение β-липопротеинов, которые относятся к классу липопротеинов крови, который является наиболее атерогенным [3]. Достоверное снижение β-липопротеинов после введения различных штаммов спирулины очевидно отражает антиатерогенные свойства микроводорослей за счет вхождения в их состав витаминов В₆ и В₁₂, ненасыщенной гамма-линоленовой кислоты, влияющих на обмен липидов. Бета-липопротеины являются основной транспортной формой холестерина и в своем составе в норме содержат до 65 % холестерина, который преобладает над другими типами липидов в данном классе липопротеинов. Известно, что показатель бета-холестерин больше коррелирует с риском атеросклероза, чем уровень общего холестерина, поскольку именно эта фракция обеспечивает приток холестерина к сосудам и органам [3]. Липопротеины определяют

уровень холестерина и динамику его обмена. Выявленные незначительные изменения содержания общего холестерина в сыворотке крови по сравнению со статистически значимым уменьшением концентрации β -липопротеинов, очевидно, связано с изменением соотношения фракций α - и β -липопротеинов, так как согласно литературным данным, спирулина вызывает повышение α -холестерина [13].

Учитывая, что исследованные биохимические показатели крови характеризуют состояние метаболических процессов в первую очередь в печени, можно сделать вывод о том, что мутантные штаммы спирулины оказывали положительное влияние на белоксинтезирующую функцию и вызывали выраженный гиполипидемический эффект.

Одним из возможных компонентов быстрой реакции на стресс является активация ПОЛ. Известно, что в нормальных условиях жизнедеятельности клетки постоянно присутствует определенный уровень ПОЛ, индуцированный образованием активных форм кислорода, который поддерживается благодаря многоуровневой антиоксидантной системе защиты [1]. Исследование процесса ПОЛ показало (рис. 2), что в результате процедуры введения экспериментальным животным ФР при помощи зонда повышалось количество одного из конечных продуктов ПОЛ – МДА в печени, почках и мозге крыс в 1,7, 1,5 и 1,3 раза соответственно, что говорит об усилении свободно-радикального процесса. Следовательно, можно предположить, что сама процедура введения зонда животным является стрессогенной (рис. 2).

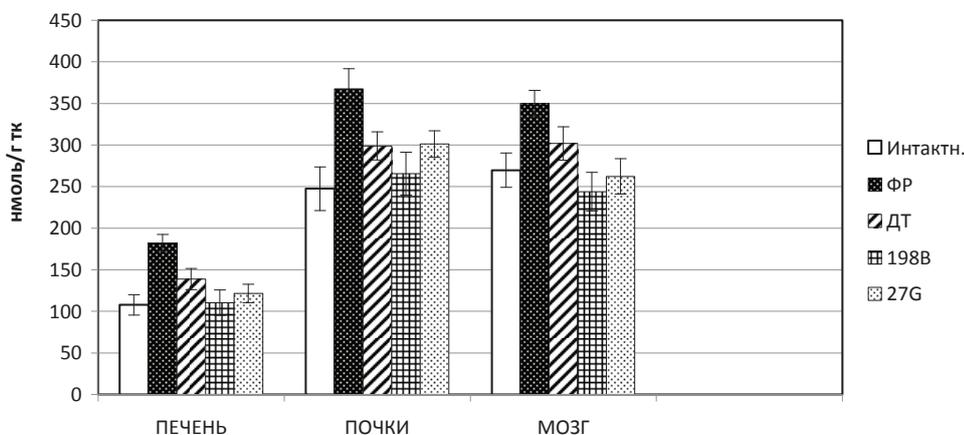


Рис.2. Содержание малонового диальдегида в печени, почках и мозге крыс на фоне хронического стресса и приема штаммов спирулины

Полученные результаты свидетельствуют о том, что происходит смещение равновесия между прооксидантной и антиоксидантной системами в сторону усиления образования свободных радикалов, что в свою очередь приводит к разрушению клеточных мембран и их проницаемости [17]. В то же время сохранение барьерных свойств биомембран является необходимым условием нормального функционирования отдельных органелл, особенно в экстремальных условиях.

Введение ДТ спирулины и его мутантных штаммов 198В и 27G при помощи зонда приводило к снижению количества МДА во всех исследуемых органах. Однако, мутантные штаммы 198В и 27G более эффективно подавляли интенсивность ПОЛ. Во всех исследуемых органах интрагастральное введение штамма 198В снижало количество образования МДА: в 1,7 раза – в печени, в 1,4 раза – в почках и мозге, приближая показатели к исходным значениям.

Таким образом, установлено, что на фоне хронического стресса спирулина ДТ и ее мутантные штаммы 198В и 27G подавляли интенсивность ПОЛ. Вероятно, антиоксидантное действие спирулины обусловлено содержащимися фикобилипротеинами (с-фикоцианин и аллофикоцианин), β-каротином, фенольными кислотами, токоферолами, сульфатированными полисахаридами [8, 15]. Согласно литературным данным [16], основным антиоксидантом является фикобилипротеин с-фикоцианин, который способен обезвреживать алкоксильные, гидроксильные, пероксильные радикалы. Наиболее выражены антиоксидантные свойства у мутантных штаммов 198В и 27G, что, вероятнее всего, связано с повышенным содержанием фикобилипротеинов и метионина, а у штамма 198В - еще и с повышенным содержанием β-каротинов.

Выводы

1. При хроническом стрессе у белых крыс наблюдалось повышение интенсивности ПОЛ, увеличение содержания β-липопротеинов.
2. Интрагастральное введение спирулины ДТ и ее мутантные штаммы 198В и 27G на фоне хронического стресса нормализовали липидный спектр крови, подавляли свободнорадикальный процесс.
3. Наиболее выраженное снижение содержания МДА в тканях печени, сердца, почек наблюдалось под действием мутантного штамма 198В.

Список использованной литературы

1. Барабой В. А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / В. А. Барабой // Успехи современной биологии. 1991. — Т. 111, вып. 6. — С. 923–932.
2. Гурин И. С. Биологически активные вещества гидробионтов – источник новых лекарств и препаратов / И. С. Гурин, И. С. Антихин. — М.: Наука, 1989. — 230 с.
3. Джанашия П. Х. Дислипопротеидемии: клиника, диагностика, лечение / П. Х. Джанашия, В. А. Назаренко, С. А. Николенко — М.: Рос. гос. мед. ун-т, 2000. — 137 с.
4. Каракіс С. Г. Селекція мутантних штамів *Spirulina platensis* з підвищеним вмістом метіоніну в біомасі / С. Г. Каракіс, О. Г. Драгоева, Т. І. Лавренюк та ін. // Вісник Одеського національного університету. — 2005. — Т. 10, вип. 3. — С. 55–62.
5. Карпов Л. М. Дія різних штамів спируліни на деякі показники антиоксидантного захисту у щурів / Л. М. Карпов, О. М. Ершова, С. Г. Каракіс // Природничий альманах. Біологічні науки. — 2009. випуск 13. — С. 50–56.
6. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / Под. ред В. В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.
7. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): учеб. пособие / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. — С. 30–31, 163–164, 181–183.

8. Овсянникова Т. Н. Состав и антиоксидантная активность комплекса биополимеров из *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. / Т. Н. Овсянникова, Н. Г. Миронова, В. Н. Заболотны и др. // Альгология. — 1998. — Т. 8, № 1. — С. 75–81.
9. Пилат Т. Л. Способы коррекции питания при различных заболеваниях. Диагностика и терапия в клинике внутренних болезней // Вестник восстановительной медицины. — 2003 — № 4. — С. 41–45.
10. Спирулина – пища XXI века / Под ред. С. А. Кедика. – М.: Фарма Центр, 2010. — 166 с.
11. Стальная Д. И. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / Д. И. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Сб. Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С. 66–68.
12. Хомуло П. С. Эмоциональное напряжение и атеросклероз. — Л.: Медицина, 1982. — 151 с.
13. Чернова Н. И. Пищевая ценность спирулины: опыт выращивания и применения / Н. И. Чернова, С. В. Киселева, Н. М. Чернов // Вест. РАСХН. 2001. — № 6. — С. 60–63.
14. Якубке Х. Ф. Аминокислоты, пептиды, белки. — М.: Наука, 1985. — 340 с.
15. Miranda M. S. Antioxidant activity of the microalgae *Spirulina maxima* / M. S. Miranda, R. C. Cintra, S. B. Barros et al. // Braz J Med Biol Res. — 1998. — Vol. 31(8). — P. 1075–1079.
16. Pinero Estrado J. E. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract / J. E. Pinero Estrado, P. Bermejo Bescos, A. M. Villar del Frasco // Farmaco. — 2001. — Vol. 56 (5–7). — P. 497–500.
17. Rirutto R. Effect of Ca^{2+} , peroxides, SH-reagents, phosphate and agin on the permeability of mitochondrial membranes / R. Rirutto, G. Pitton, G. F. Azzone // Eur. J. Biochem. — 1987. — 162. — № 2. — P. 239–249.

Статья поступила в редакцию 10.09.2012

**Л. М. Карпов, О. Д. Павліченко, О. М. Єршова, С. Г. Каракіс, Г. В. Майкова,
А. Г. Драгоєва, Т. І. Лавренюк, В. А. Сагаріц**
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
кафедра фізіології людини та тварин,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

ОСОБЛИВОСТІ АДАПТАЦІЙНОЇ ДІЇ СПІРУЛІНИ І ЇЇ МУТАНТНИХ ШТАМІВ В УМОВАХ СТРЕСУ

Резюме

Встановлена адаптогенна дія дикого штаму спируліни і його мутантних штамів 198В і 27G на тлі хронічного стресу. Показано, що процедура інтрагастрального введення шурам фізіологічного розчину викликає стан стресу і, як наслідок, посилення перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і підвищення вмісту β-ліпопротеїнів. Інтрагастральне введення шурам різних штамів спируліни різною мірою знижує інтенсивність ПОЛ і рівень β-ліпопротеїнів, що свідчить про адаптаційні можливості спируліни для організму.

Ключові слова : спируліна, стрес, ПОЛ, холестерин, β-ліпопротеїни, шури.

**L. M. Karpov, O. D. Pavlichenko, O. N. Ershova, S. G. Karakis, A. V. Maykova,
A. G. Dragoeva, T. I. Lavrenyuk, V. A. Sagarits**
Odesa National Mechnykov I. I. University, Department of Biochemistry,
2, Dvoryanska Str., Odesa, 65082, Ukraine

THE ADAPTATION OF SPIRULINA FEATURES AND ITS MUTANT STRAINS IN STRESS CONDITIONS

Summary

There were established the adaptogenic effect of spirulina of wild-type and its mutant strains 198V and 27G on the background of chronic stress. There were shown that intragastric injection procedure of to rats of physiological salution causes the state of stress and, consequently, it increases the number of β -lipoprotein and increases lipid peroxidation. Intragastric injection of spirulina biomass to the rats reduces the intensity of lipid peroxidation and the level of β -lipoprotein, that which indicates the possibilities of adaptation for the body of spirulina.

Key words: spirulina, stress, lipid peroxidation, total protein, cholesterol, β -lipoproteins, rats.