

УДК 577.127.3: 616.036.12

Ершова О. Н., Карпов Л. М., Каракис С. Г.,
Драгоева А. Г., Лавренюк Т. И., Павличенко О. Д.,
Капова А. Ю., Станев А.И.

ДЕЙСТВИЕ СПИРУЛИНЫ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА У БЕЛЫХ КРЫС

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская 2, Одесса 65082, Украина
e-mail: ershova_ok@mail.ru, lmkarпов@onu.edu.ua

Ключевые слова: спирулина, стресс, ПОЛ, глутатион, антиоксидантные ферменты.

Жизнь современного человека сопряжена со стрессом, и его организм реагирует на изменения окружающей среды. Формирование защитных эффектов адаптации обеспечивается изменением функционирования практически всех основных систем организма [1]. Поэтому поиск биологически активных веществ природного происхождения, способствующих более быстрой адаптации организма в стрессовых условиях особенно актуален. Сине-зеленая микроводоросль *Spirulina platensis* занимает особое место среди источников соединений обладающих адаптогенной активностью. Установлено, что антиоксидантное действие спирулины обусловлено содержащимися в ней фикобилипротеинами (с-фикоцианин и аллофикоцианин), β -каротином, фенольными кислотами, токоферолами, сульфатированными полисахаридами [8, 11]. С-фикоцианин способен обезвреживать алкоксильные, гидроксильные, пероксильные радикалы, в частности, с-фикоцианин защищает эритроциты человеческой крови от лизиса, вызванного воздействием пероксильных радикалов [13, 14]. Спирулина ДТ, которая традиционно используется, имеет потенциальные возможности для усиления ее антиоксидантных свойств. В нашей лаборатории, как сообщалось ранее, селекционно-генетическим методом были получены новые штаммы *Spirulina platensis* 198В и 27G. Новые штаммы отличаются от исходного родительского ДТ повышенным содержанием компонентов, обладающих антиоксидантными свойствами: серусодержащих аминокислот и фенилаланина, а также

пигментов – с-фикоцианина, аллофикоцианина и хлорофилла *a*, а штамм 198В – еще и повышенным содержанием каротиноидов [4, 5]. Однако, по нашим неопубликованным данным, содержание такого сильного антиоксиданта как ГВ в спирулине ДТ остается максимальным. Антиоксидантные свойства штаммов 198В и 27G и спирулины ДТ были изучены нами на крысах на фоне хронического стресса в эритроцитах и сердце белых крыс [6]. Учитывая полученные результаты, интересно было продолжить эксперимент и исследовать такие показатели как содержание малонового диальдегида (МДА), GSH, активность каталазы и СОД, которые были использованы нами как показатели состояния прооксидантно-антиоксидантной системы в печени, почках и мозге экспериментальных животных.

Цель данной работы – сравнительное изучение влияния биомассы сине-зеленой водоросли *Spirulina platensis* ДТ и его мутантных штаммов 198В и 27G на содержание МДА, GSH, активности каталазы и СОД в печени, почках и мозге белых крыс на фоне хронического стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыт проводили на белых нелинейных крысах-самцах с исходной массой тела 200-270 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Животные были распределены на 5 групп по 8 крыс в каждой. Первую группу составили интактные животные. Животным второй группы вводили в желудок по 2 мл физиологического раствора с помощью зонда ежедневно в течение 14 суток. Опытные группы (3-я, 4-я и 5-я) составляли животные, получавшие в течение 14 дней биомассу различных штаммов спирулины в дозе 250 мг сухого вещества на кг массы тела ежедневно в виде суспензии в физиологическом растворе в объеме 2 мл. Крысам 3-й группы вводили биомассу ДТ, животные 4-й и 5-й групп получали биомассу мутантных штаммов 198В и 27G, соответственно. Через 14 суток, с момента начала эксперимента, животных брали в эксперимент. Гомогенаты органов готовили как описано в [7].

Содержание МДА определяли спектрофотометрически в кислой среде по реакции его взаимодействия с тиобарбитуровой кислотой с образованием триметилового комплекса с максимумом поглощения при $\lambda = 532$ нм [10]. Содержание глутатиона восстановленного – по реакции его взаимодействия с реактивом Элмана с образованием окрашенного продукта 2-нитро-6-меркаптобензойной кислоты, которая имеет максимум поглощения при 412 нм [2]. Каталазную активность гомогенатов определяли спектрофотометрически по уменьшению светопоглощения перекиси водорода при $\lambda = 240$ нм в

реакционной среде (50 мМ К-фосфатный буфер, рН 7,0; 10 мМ H_2O_2 , гомогенат) в течение 5 мин [12]. Активность СОД измеряли по степени ингибирования аутоокисления адреналина в щелочной среде путем спектрофотометрической регистрации промежуточного продукта аутоокисления адреналина с максимумом поглощения при 347 нм [9].

В работе использовали альгологически чистые культуры *Spirulina platensis* Gom.Geitl исходного штамма (штамм Моусе) и мутантных штаммов 198В и 27G, полученных в лаборатории цианобактерий ОНУ имени И. И. Мечникова.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из возможных механизмов быстрой реакции организмов на стресс является активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), вследствие чего нарушается равновесие между прооксидантной и антиоксидантной системами, что активизирует механизмы нормализации этого процесса [1].

В результате процедуры введения экспериментальным животным ФР при помощи зонда повышалось количество одного из конечных продуктов перекисного окисления липидов – МДА в печени, почках и мозге крыс в 1,7, 1,5 и 1,3 раза соответственно, что свидетельствует о смещении равновесия в сторону прооксидантной системы и усилении свободнорадикального процесса, а также о том, что сама процедура введения ФР при помощи зонда животным является стрессогенной (рис. 1).

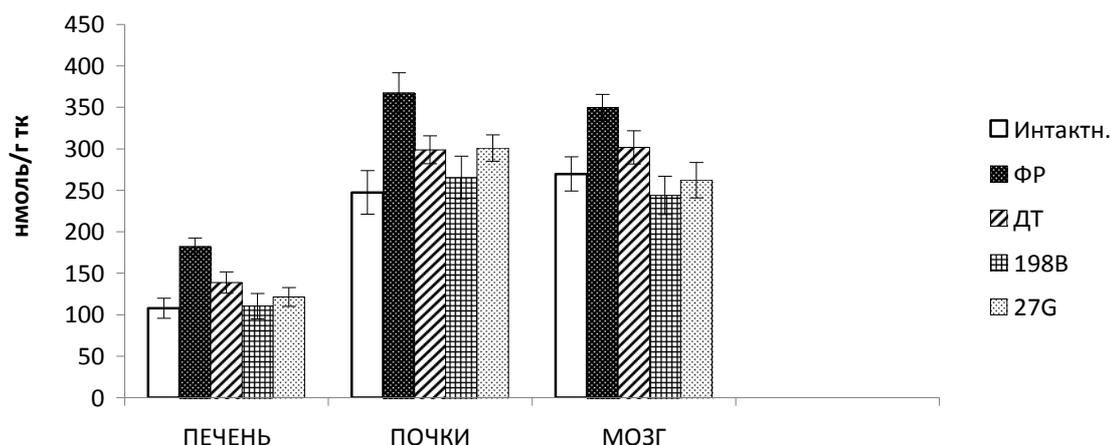


Рис. 1. Содержание МДА в печени, почках и мозге крыс на фоне хронического стресса и приема биомассы штаммов спирулины.

В то же время, внутрижелудочное введение биомассы ДТ спирулины и ее мутантных штаммов 198В и 27G при помощи зонда приводило к снижению количества МДА в печени, почках и мозге крыс. Наиболее сильно подавлял интенсивность ПОЛ штамм 198В. Во всех исследуемых органах биомасса штамма 198В снижала количество МДА в печени – в 1,7 раза, в почках и мозге в 1,4 раза, практически возвращая показатели к исходным значениям.

Известно, что и в нормальных условиях жизнедеятельности клетки постоянно присутствует определенный уровень ПОЛ, индуцированный образованием активных форм кислорода (АФК), который поддерживается благодаря многоуровневой антиоксидантной системе защиты [1]. Интенсификация свободнорадикального процесса приводит к увеличению нагрузки на антиоксидантные механизмы, которые сдерживают этот процесс и препятствуют окислительной деструкции биологических структур. В результате увеличения количества АФК, H_2O_2 и свободных радикалов наблюдается снижение активности антиоксидантных ферментов. Исследование ферментной системы показало, что во второй группе животных, после процедуры введения ФР с помощью зонда подавляется каталазная активность в печени, почках и мозге животных в 1,8; 1,4 и 2,6 раза, соответственно, что свидетельствует об истощении данного антиоксиданта и приводит к накоплению продуктов ПОЛ (рис. 2).

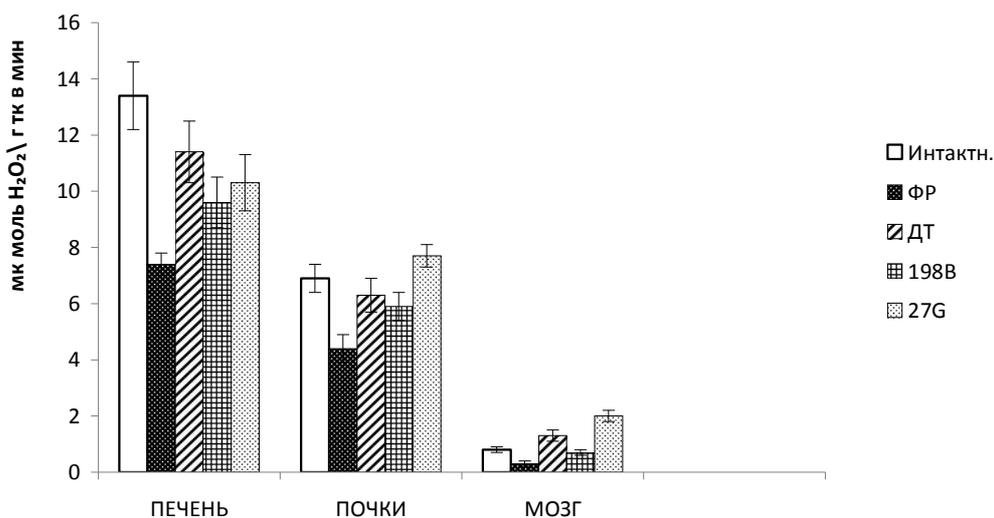


Рис. 2. Активность каталазы в печени, почках и мозге крыс на фоне хронического стресса и приема биомассы штаммов спирулины

Биомасса всех трех штаммов спирулины достоверно увеличивала каталазную активность (3-я, 4-я и 5-я группы) по сравнению со второй группой животных в исследуемых органах. Так, биомасса ДТ спирулины повышала каталазную активность по сравнению со второй группой в печени в 1,5 раза, в почках в – 1,4 раза, а в мозге – в 4,3 раза. Добавление в рацион животных биомассы мутантного штамма 198В на фоне хронического стресса также увеличивало данный показатель в печени и почках в 1,3, а в мозге – в 2,3 раза. Биомасса мутантного штамма 27G на фоне хронического стресса увеличивала активность каталазы по сравнению со второй группой в печени в 1,4 раза, в почках – в 1,8 и в мозге – в 6,7 раза, что свидетельствует об антиоксидантных возможностях этого штамма. Известно, что мутантный штамм 27G содержит повышенное количество метионина и такой сильный антиоксидант, как фикобилипротеин, количество которого в 3 раза больше, чем в ДТ, что, возможно способствовало подавлению ПОЛ и восстановлению активности каталазы в исследуемых органах

Антиоксидантные ферменты СОД и каталаза, функционируя совместно, в большинстве случаев своевременно инактивируют АФК, которые образуются как в процессе нормальной жизнедеятельности, так и при патологических отклонениях, но в значительно больших количествах. Однако, при хроническом стрессе, который вызван введением ФР при помощи зонда, отмечалось снижение СОД активности в печени и почках в 1,6 и 1,5 раза соответственно, что приводит к увеличению количества свободных радикалов (рис. 3).

GSH, определяемый нами в качестве одного из маркеров состояния антиоксидантной системы, имеет как собственную антиоксидантную активность, так и функционирует в качестве кофактора, донора водорода, метаболита и субстрата с ферментами антиоксидантной системы. Содержание GSH на фоне хронического стресса оставалось неизменным в мозге подопытных животных, что свидетельствует о высоком уровне глутатионовой защиты в исследуемом органе (рис. 4). Однако количество этого антиоксиданта в печени и в почках на фоне стресса снижается в 2,1 и 1,5 раза соответственно, что может приводить к накоплению свободных радикалов и к разрушению клеточной мембраны в исследуемых органах. Биомасса ДТ спирулины увеличивала содержания GSH в печени в 2,7 раза, в почках - в 1,7 раза, а в мозге - в 2 раза. Добавление в рацион биомассы штамма 198В увеличивало содержание этого антиоксиданта на фоне стресса в печени, почках и мозге животных в 1,7, 1,3 и 1,5 раза соответственно. У животных 5-й группы отмечено

повышение содержания GSH в исследуемых органах в 2,6, в 1,5 и в 1,4 раза по сравнению с контрольной группой.

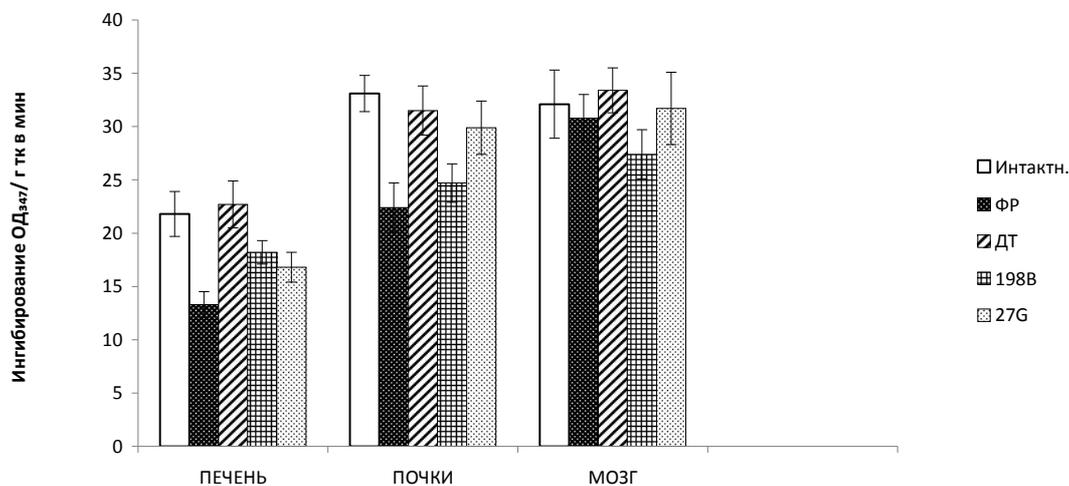


Рис. 3. Активность СОД в печени, почках и мозге крыс на фоне хронического стресса и приема биомассы штаммов спирулины.

Увеличение содержания ГВ связано, вероятно, с тем, что микроводоросль в своем составе содержит этот антиоксидант, особенно спирулина ДТ. Кроме того, как нами показано ранее [6, 3], добавление в рацион ДТ спирулины и ее мутантных штаммов повышало активность глутатионредуктазы, которая в свою очередь восстанавливает окисленный глутатион в исследуемых органах, увеличивая содержание глутатиона восстановленного.

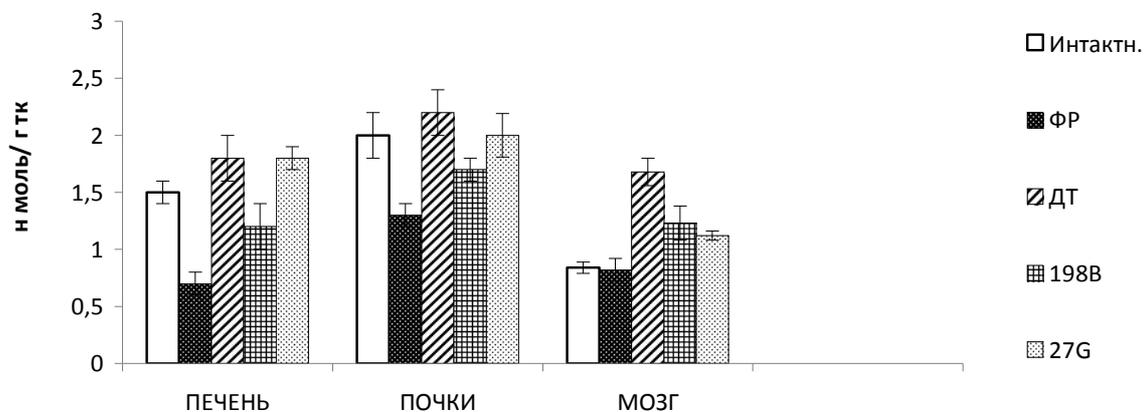


Рис. 4. Содержание восстановленного глутатиона в печени, почках и мозге крыс на фоне хронического стресса и приема биомассы штаммов спирулины.

Все исследованные нами штаммы спирулины на фоне хронического стресса подавляли интенсивность ПОЛ. Однако, содержание МДА, которое увеличивалось в результате хронического стресса, в наибольшей степени снижалось в присутствии штамма 198В, возможно, вследствие повышенного содержания в нем β -каротинов. Каталазная активность на фоне хронического стресса снижалась во всех исследуемых органах. Максимальное снижение активности этого антиоксидантного фермента на фоне минимальных исходных значений отмечалось в мозге, что свидетельствует о быстром истощении данного фермента в период хронического стресса. Все три штамма достоверно повышали активность каталазы в условиях хронического стресса в исследуемых органах, максимально увеличивая активность каталазы в мозге. Активность СОД и содержание ГВ снижались в результате действия хронического стресса в печени и почках, но оставались неизменными в мозге, что, вероятно, является следствием достаточно высокого уровня этих антиоксидантов в данном органе. Наиболее эффективно увеличивали активность СОД и повышали содержание GSH ДТ спирулины и его мутантный штамм 27G и, таким образом, противостояли разрушительному действию стресса за счет повышенного содержания антиоксидантов. Таким образом, все три штамма спирулины подавляли свободнорадикальный процесс и положительно влияли на антиоксидантный статус ферментов с некоторыми отличиями, что, на наш взгляд, обусловлено особенностями биохимического состава каждого штамма.

ВЫВОДЫ

1. На фоне хронического стресса у белых крыс наблюдалось повышение интенсивности ПОЛ, снижение активности СОД, каталазы и содержания GSH.
2. Биомасса ДТ спирулины и ее мутантные штаммы 198В и 27G на фоне хронического стресса:
 - а) подавляли свободнорадикальный процесс;
 - б) повышали активность антиоксидантных ферментов и содержание GSH.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барабой В. А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи соврем. биол. – 1991. – Т. 111. – Вып. 6. – С. 923-932.
2. Горячковский А.М. Клиническая биохимия. 2-е изд. – Одесса.: Астропринт, 1998. – С. 367, 370-372.
3. Єршова О. М. Антиоксидантна дія біомаси штамів спіруліни на фоні хронічного стресу у щурів // Вісник ОНУ (серія: біологія). – 2010. - Т. 15. – Вип. 17. – С. 16-21.
4. Каракіс С.Г., Драгоева О.Г., Лавренюк Т.І., Сагаріц В.А., Карпов Л.М. Селекція мутантних штамів *Spirulina platensis* з підвищеним вмістом метіоніну в біомасі // Вісник Одеського національного університету. – 2005. – Т. 10, випуск 3. – С. 55-62.
5. Каракіс С. Г., Карпов Л. М., Драгоева Е. Г., Лавренюк Т. И., Сагаріц В. А. Марченко В. С. Биохимический состав биомассы штаммов *Arthrospira (Spirulina) platensis* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2008. – № (2). – С. 58-63.
6. Карпов Л. М., Єршова О. М., Каракіс С. Г., Драгоева О. Г., Лавренюк Т.И., Сагаріц В.А. Дія різних штамів спіруліни на деякі показники антиоксидантного захисту у щурів // Природничий альманах. – 2009. – №13. – С. 50-56.
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., Миронова Н. Г., Заболотный В. Н., Губанова А. Г., Полищук Л. Я., Виноградова Г. Ю., Забелина И. А., Карпенко Н. А. Состав и антиоксидантная активность комплекса биополимеров из *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. // Альгология. – 1998. – Т. 8, № 1. – С. 75-81.
9. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса авто окисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопросы мед. химии. – 1999. – №3. – С. 263-273.
10. Стальная Д.И., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Сб. Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66 – 68.
11. Miranda M. S., Cintra R.C., Barros S.B., Mancini Filho J., Antioxidant activity of the microalgae *Spirulina maxima* // Braz J Med Res. – 1998. – Vol. 31(8). – P. 1075-1079.
12. Murlund S., Nordenson J., Back O. Normal Cu, Zn superoxidedismutase, Mn-SOD, catalase and glutathione peroxidase in werner's syndrome // J.Gerontol. – 1981. – 36, №4. – P.405-409.
13. Romay Ch., Gonzalez R., Phycocyanin is an antioxidant protector of human erythrocytes against lysis by peroxy radicals /pharm Pharmacol. – 2000. – Vol. 52(4). – P. 367-368.
14. Romay Ch., Gonzalez R., Ledon N., Ramirez D., Rimbau V., C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects // Curr Protein Pept Sci. – 2003. – Vol. 4(3). – P. 207-216.

**Єршова О.М., Карпов Л. М., Каракіс С. Г.,
Драгоева А. Г., Лавренюк Т. І., Павліченко О. Д.,
Карпова А. Ю., Станєв О.І.**

**ДІЯ СПІРУЛІНИ НА АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЇ
СИСТЕМИ В УМОВАХ СТРЕСУ У БІЛИХ ЩУРІВ**

Ключові слова: спіруліна, стрес, ПОЛ, глутатіон, антиоксидантні ферменти.

Вивчалась дія біомаси дикого типу (ДТ) спіруліни і його мутантних штамів 198В і 27G на фоні хронічного стресу. Визначався вміст продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), активність ферментів антиоксидантного захисту: супероксиддисмутази (СОД), каталази і вміст глутатіону відновленого (ГВ) в печінці, нирках та мозку щурів. Процедура внутрішньошлункового введення щурам фізіологічного розчину (ФР) викликала посилення ПОЛ і зниження активності каталази, СОД і вміст глутатіону відновленого (GSH). Внутрішньошлункове введення щурам біомаси спіруліни знижувало інтенсивність ПОЛ, посилювало активність каталази та СОД, збільшувало кількість GSH, що свідчить про адаптаційні можливості спіруліни в умовах стресу.

**Ershova O.M., Karpov L.M., Karakis S.G.,
Dragoeva A.G., Lavrenyuk T.I., Pavlichenko O.D.,
Kapova A.U., Stanev A.I.**

**THE ACTION OF SPIRULINA ON THE ACTIVITY OF
ANTIOXIDANT SYSTEM OF THE WHITE RATS
IN STRESS CONDITIONS**

Keywords: spirulina, stress, lipid peroxidation, glutathione, antioxidant enzymes

We studied the effect of biomass of wild-type (DF) of spirulina and its mutant strains 198B and 27G on a background of chronic stress. We determined the content of products of lipid peroxidation (LPO), activity of antioxidant enzymes: superoxidisedismutase (SOD), catalase and reduced glutathione content (GSH) in the liver, kidney and brain of rats. The procedure of intragastric administration to rats of normal saline (RF) caused increased lipid peroxidation and decreased activity of catalase, SOD and reduced glutathione content (GSH). Intragastric administration to rats reduced the intensity of Spirulina biomass lipid peroxidation, increased the activity of catalase and SOD increased the amount of GSH, which indicates adaptive capacity of spirulina for the body.