

УДК 577.127.3.: 616.036.12.

Карпов Л.М., Єршова О.М., Каракіс С.Г.,
Драгоєва О.Г., Лавренюк Т.І., Сагаріц В.А.

ДІЯ РІЗНИХ ШТАМІВ СПІРУЛІНИ НА ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ У ЩУРІВ

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
e-mail: lmKarpov@onu.edu.ua

Ключові слова: спіруліна, перекисне окиснення ліпідів, глутатіон, глутатіонредуктаза, супероксиддисмутаза, каталаза

В умовах екологічної ситуації, що погіршується, і постійного техногенного впливу людина, як і все живе, перебуває в стані пригніченої адаптації. Живі організми по-різному реагують на ці негативні фактори. Формування захисних ефектів адаптації забезпечується відповідною зміною функціонування практично всіх основних систем організму. При інтенсивній або тривалій дії на організм негативних факторів у його клітинах відбувається активація процесів вільно-радикального окислювання, зниження синтезу білку і денатурація білкових структур. Це приводить до патологічних змін на рівні клітини та організму [2]. У зв'язку з цим є актуальною проблема пошуку нових джерел антиоксидантів. Серед природних біологічно активних речовин такої дії великої уваги дослідників заслуговує синьо-зелена водорість *Spirulina platensis*, яка має виражені антиоксидантні властивості. Відомо, що *S. platensis* пригнічуючи діє на віруси, що містять РНК і ДНК, у тому числі на вірус імунодефіциту людини [7], володіє антимікробною, антикоагулянтною, осморегулюючою активністю [9], а сірковмісні полісахариди поряд з глікопротеїдами є основою протипухлинних препаратів, які одержують з водорості [1].

Крім процесів вільно-радикального окиснення в клітинах в умовах дії різних агентів вивчають активність ферментів антиоксидантного захисту, тому що ці показники перебувають у постійній взаємозалежності один від одного. Збалансованість між рівнем перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантним захистом є необхідною умовою для підтримки нормальної життєдіяльності клітини. Зміщення цієї рівноваги є однією з перших неспецифічних ланок у розвитку патології і може зумовити біологічно важливу зміну внутрішнього середовища клітини, що запускає інші механізми захисту [2].

Мета даної роботи – вивчити вплив різних штамів *S. platensis* на швидкість перекисного окислювання ліпідів (ПОЛ) у тканинах здорових пацюків, а також активність антиоксидантних ферментів: глутатіонредуктази (ГР), супероксиддисмутази (СОД), каталази і вміст глутатіону відновленого.

Матеріали і методи

Експеримент проводили на 40 білих безпородних самцях пацюків вагою 180 – 200 гр., поділених на 5 груп по 8 тварин у кожній: 1 група – інтактні тварини; 2 група – тварини, яким внутрішньошлунково вводили фізіологічний розчин (ФР); 3, 4, 5 групи – тварини, які отримували масу штамів спіруліни (дикого типу (ДТ), 198В и 27G відповідно) протягом 2-х тижнів щодобово. Біомасу спіруліни (по 250 мг сухої речовини на кг маси пацюків) вводили за допомогою зонду внутрішньошлунково у вигляді водної суспензії в об'ємі 2 мл.

Через 2 тижні від початку досліду проводили біохімічні дослідження. За стандартними методиками готували гомогенати [8] серця та гемолізати еритроцитів [5].

Вміст малонового діальдегіду визначали за допомогою тіобарбітурової кислоти [11], вміст глутатіону відновленого в гомогенатах – за реакцією його взаємодії з реактивом Елмана з утворенням забарвленого продукту 2-нітро-6-меркаптобензойної кислоти, який має максимум поглинання при λ 412 нм [5]. Глутатіонредуктазну активність вимірювали за швидкістю окиснення відновленого НАДФ у реакційному середовищі (100 мМ К-На-фосфатний буфер). Реакцію ініціювали окисленим глутатіоном. Динаміку зменшення концентрації НАДФН реєстрували впродовж 5 хв. при λ 340 нм [8].

Каталазну активність гомогенатів визначали спектрофотометрично за зменшенням світлопоглинання перекису водню при $\lambda = 240$ нм у реакційному середовищі (50 мМК – фосфатний буфер, рН 7,0; 10 мМ H₂O₂, гомогенат) впродовж 5 хв. [13]. СОД активність вимірювали за ступенем інгібування автоокиснення адреналіну у лужному середовищі шляхом спектрофотометричної реєстрації проміжного продукту автоокиснення адреналіну з максимумом поглинання при $\lambda = 347$ нм [10].

Результати досліджень та їх обговорення

При виконанні досліджень було встановлено, що процедура внутрішньошлункового введення щурам 2 мл ФР викликає в стан, подібний до хронічного стресу. В результаті цього кількість кінцевого продукту ПОЛ – малонового діальдегіду (МДА) в

еритроцитах щурів збільшувалася в 3,5 рази в порівнянні з інтактними тваринами, що свідчить про значну інтенсифікацію вільно-радикального процесу. Всі три штами спіруліни вірогідно знижували таку дію ФР: дикий тип і штам спіруліни 198В – в 1,6 і в 1,87 рази відповідно, штам 27G – у 2,7 рази (табл.1).

Таблиця 1. Вміст малонового діальдегіду в серці та еритроцитах білих щурів після введення різних штамів спіруліни (нмоль /г тк.), n = 8

Варіанти дослідів	Еритроцити	P ₁	P ₂	Серце	P ₁	P ₂
Інтактні тварини	3,7 ± 1,1	–	<0,001	68,6 ± 9,5	-	<0,01
Введення ФР	13,2 ± 0,1	<0,001	-	200,9 ± 24,4	<0,001	-
Введення ДТ	7,9 ± 1,7	>0,05	<0,01	125,4 ± 57,6	<0,05	<0,05
Введення 198В	7,0 ± 0,7	<0,05	<0,001	144,4 ± 79,4	<0,05	<0,05
Введення 27G	4,8 ± 0,3	>0,05	<0,001	123,7 ± 0,1	<0,05	<0,01

Примітка: P₁ – різниця достовірна у порівнянні з інтактними тваринами; P₂ – різниця достовірна у порівнянні з введенням ФР.

В серці тварин, які одержували ФР, швидкість утворення вільних радикалів, також зростала – в 2,9 рази в порівнянні з контрольною групою. Всі три штами спіруліни зменшували утворення МДА: дикий тип – в 1,6 рази, штам 198В в 1,4 рази, а штам 27G – в 1,7 рази.

Згідно з концепцією фізико-хімічної регуляції системи ПОЛ активація процесів вільно-радикального окиснення може викликати адаптаційну перебудову ліпідного шару мембран. Підвищується вміст холестерину і знижується рівень загальних фосфоліпідів з високим вмістом насичених залишків жирних кислот, що призводить до зменшення окислення мембранних фосфоліпідів, зниження в'язкості мембранних ліпідів і порушення клітинного гомеостазу [3].

Подібні зміни ліпідної фази клітинних мембран негативно впливають на показники функціонального стану й свідчать про виснаження компенсаторних механізмів. Спіруліна містить речовини антиоксидантного ряду (бета-каротин, фікобіліпротеїни, глутатіон, глутамінову кислоту, селен, фермент супероксиддисмутази) і завдяки оптимальному співвідношенню ненасичених і насичених жирних кислот забезпечує високу антиоксидантну й мембранопротекторну активність [12, 4]. Біомаса мутантних штамів 198В и 27G має більш сильну антиоксидантну дію, ніж біомаса штаму ДТ. Імовірно, це пов'язано з тим, що обидва штами відрізняються підвищеним вмістом компонентів, які мають антиоксидантну дію: сірковмісних амінокислот, фенілаланіну, а також пігментів – с-фікоціаніну,

алофікоціаніну та хлорофілу *a*, а штам 198В – ще і підвищеним вмістом каротиноїдів [6].

Вивчення глутатіонового захисту (активності глутатіонредуктази і вмісту глутатіону відновленого) в клітинах еритроцитів тварин, які перебували в стані хронічного стресу після введення ФР, показало (табл. 2), що активність глутатіонредуктази збільшувалася в 3,6 рази в порівнянні з інтактними щурами.

Таблиця 2. Активність глутатіонредуктази в серці та еритроцитах білих щурів за умов введення різних штамів спіруліни (мк моль/ г тк.хв), n = 8

Варіанти дослідів	Еритроцити	P ₁	P ₂	Серце	P ₁	P ₂
Інтактні тварини	0,2 ± 0,1	–	<0,05	0,5 ± 0,1	–	>0,05
Введення ФР	0,8 ± 0,2	<0,05	–	0,5 ± 0,1	>0,05	–
Введення ДТ	0,6 ± 0,1	<0,05	>0,05	0,3 ± 0,1	>0,05	>0,05
Введення 198В	1,0 ± 0,3	<0,05	>0,05	0,6 ± 0,1	>0,05	>0,05
Введення 27G	1,4 ± 0,5	<0,01	>0,05	0,5 ± 0,2	>0,05	>0,05

Примітка: P₁ – достовірна різниця у порівнянні з інтактними тваринами; P₂ – достовірна різниця у порівнянні з введенням ФР.

Штами спіруліни 198В та 27G посилювали цей показник, а штам ДТ спіруліни діяв корегуючи на активність глутатіонредуктази в еритроцитах щурів. У серці достовірних змін активності даного ферменту під дією стресу не спостерігали, у той час як штам 198В підсилював активність цього антиоксидантного ферменту, а штам 27G практично не впливав на даний показник.

Введення ФР значно зменшувало вміст глутатіону відновленого як у крові, так і в серці піддослідних тварин (табл. 3).

Всі три штами спіруліни, особливо її мутантні штами, збільшували вміст глутатіону відновленого порівняно з групою щурів, яким вводили ФР, хоча вихідний рівень не досягався. Одна припустити, що кількість глутатіону збільшувалася за рахунок того, що ця сполука входить до складу синьо-зеленої водорості і можливо за рахунок додаткового синтезу даної речовини з цистеїну, вміст якого в даних штаммах значно підвищений. Це, можливо, вплинуло і на активність глутатіонредуктази, оскільки глутатіон є субстратом цього ферменту.

Вивчення дії досліджуваних факторів на активність СОД свідчить, що внутрішньошлункове введення ФР не впливало на активність її як в еритроцитах, так і в серці піддослідних тварин (табл. 4). Штами спіруліни ДТ, 198В і 27G також не змінювали активність цього ферменту як в еритроцитах, так і в серці щурів.

Таблиця 3. Вміст глутатіону відновленого в серці і еритроцитах білих щурів за умов введення різних штамів спіруліни (нмоль/г тк.), n = 8

Варіанти дослідів	Еритроцити	P ₁	P ₂	Серце	P ₁	P ₂
Інтактні тварини	356,4 ± 84,9	–	<0,001	311,5 ± 13,1	–	<0,001
Введення ФР	110,4 ± 18,0	<0,001	–	188,3 ± 16,4	<0,001	–
Введення ДТ	112,4 ± 18,8	<0,001	>0,05	189,1 ± 18,3	<0,001	>0,05
Введення 198В	141,8 ± 16,2	<0,001	>0,05	253,1 ± 19,0	<0,05	>0,05
Введення 27G	125,5 ± 16,4	<0,001	>0,01	274,2 ± 29,0	>0,05	>0,05

Примітка: P₁ – достовірна різниця у порівнянні з інтактними тваринами; P₂ – достовірна різниця у порівнянні з введенням ФР.

Таблиця 4. Активність СОД в серці та еритроцитах білих щурів за умов введення різних штамів спіруліни (інгібування ОД₃₄₇/г тк. за хв.), n = 8

Варіанти дослідів	Еритроцити	Серце
Інтактні тварини	25,4 ± 0,1	15,1 ± 2,2
Введення ФР	21,1 ± 9,3	14,7 ± 1,6
Введення ДТ	21,1 ± 5,7	14,0 ± 1,8
Введення 198В	24,6 ± 8,7	16,6 ± 1,5
Введення 27G	22,7 ± 1,0	15,7 ± 0,4

При дослідженні впливу ФР на каталазну активність виявлено посилення активності (в 2,1 рази) цього антиоксидантного ферменту лише в еритроцитах (табл. 5).

Таблиця 5. Активність каталази в серці і еритроцитах білих щурів в умовах введення різних штамів спіруліни (мк моль Н₂О₂ / г тк. хв.) n = 8

Варіанти дослідів	Еритроцити	P ₁	P ₂	Серце	P ₁	P ₂
Інтактні тварини	6,5 ± 0,05	–	<0,001	3,05 ± 1,84	–	>0,05
Введення ФР	13,8 ± 0,4	<0,001	–	1,97 ± 0,4	>0,05	–
Введення ДТ	6,4 ± 0,8	>0,05	<0,001	3,9 ± 1,78	>0,05	>0,05
Введення 198В	11,4 ± 1,8	<0,01	>0,05	1,74 ± 0,1	>0,05	>0,05
Введення 27G	13,2 ± 1,7	<0,01	>0,05	2,8 ± 0,02	>0,05	>0,05

Примітка: P₁ – достовірна різниця у порівнянні з інтактними тваринами; P₂ – достовірна різниця у порівнянні з введенням ФР.

Дикий тип спіруліни знижував активність каталази практично до контрольних значень (у 2,1 рази). Штами спіруліни 198В і 27G посилювали активність каталази в 1,75 та в 2,0 рази відповідно, не

змінюючи при цьому дію внутрішлункового введення ФР в еритроцитах щурів. ФР практично не впливав на активність каталази в серці піддослідних тварин. При внутрішньошлунковому введенні маси спіруліни ДТ, 198В і 27G показники цього антиоксидантного ферменту також залишались на рівні контролю.

Висновки

1. Внутрішньошлункове введення щурам ФР викликає посилення утворення вільних радикалів і відповідну активацію глутатіонового захисту (підвищення активності глутатіоредуктази і зменшення вмісту відновленого глутатіону).
2. Під дією ФР СОД активність залишається не змінною, а каталазна активність зростає тільки в еритроцитах.
3. Додавання в раціон щурів різних штамів спіруліни: знижує інтенсивність ПОЛ (вміст МДА), ДТ нормалізує дію каталази до контрольних значень в еритроцитах щурів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Апрышко Г.Н. Противоопухолевые препараты из морских организмов / Апрышко Г.Н., Нехорошев М.В. // Медицина и здравоохранение. – 1986. – № 2. – С. 17 – 23.
2. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / Барабой В.А. // Успехи современной биологии. – 1991. – Т. 111, вып. 6. – С. 923 – 932.
3. Барабой В.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии / Барабой В.А., Сутковой Д.А. – К.: Наукова думка, 1997. – 420 с.
4. Горбань Є.М. Вплив препарату спіруліни на ендокринний статус та систему перекисного окиснення ліпідів опромінених щурів / Горбань Є.М., Топольнікова Н. В. // Український радіологічний журнал. – 2003. – № 11. – С. 83 – 86.
5. Горячковский А.М. Клиническая биохимия. – Одесса.: Астропринт, 1998. – 2-е изд. – С. 367, 370 – 372.
6. Каракис С. Г. Биохимический состав биомассы штаммов *Arthrospira (Spirulina) platensis* / Каракис С.Г., Карпов Л.М., Драгоева Е.Г. [и др.] // Мікробіологія і біотехнологія. – 2008. – № 1(2). – С. 58 – 63.
7. Лоенко Ю.Н. Биологически активные полисахариды морских цветковых растений / Лоенко Ю.Н. [и др.] // Растительные ресурсы. – 1991. – Т. 27, № 3. – С. 150 – 157.
8. 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.
9. Сиренко Л.А. Биологически активные вещества водорослей и качество воды / Сиренко Л.А., Козицкая В.Н. – К.: Наукова думка, 1988. – 253 с.
10. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса авто окисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопросы медицинской химии. – 1999. – № 3. – С. 263 – 273.

11. Стальная Д.И., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии : сборник трудов. – М.: Медицина, 1977. – С. 66 – 68.
12. Manjit K. Biochemical studies on spirulina proteins / Manjit K., Dua S., Ahluwalia A.S. // Spirulina ETGA : Nat. symp. MCRC. – Madras, India, 1992. – P. 78 – 84.
13. Murlund S. Normal Cu, Zn superoxidedismutase, Mn- SOD, ctalase and glutathione peroxidase in werner's syndrome / Murlund S., Nordenson J., Back O. // J. Gerontjl. – 1981. – Vol. 36, № 4. – P. 405.

**Карпов Л. М. , Ершова О. Н. , Каракис С. Г. , Драгоева А. Г. ,
Лавренюк Т. И. , Сагариц В. А.**

ДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ СПИРУЛИНЫ НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У КРЫС

Ключевые слова: спирулина, перекисное окисление липидов, глутатион, тлутатионоксидаза, супероксиддисмутаза, каталаза

Исследовано влияние различных штаммов спирулины на содержание продуктов перекисного окисления липидов, на активность некоторых ферментов антиоксидантной защиты: супероксиддисмутаза, каталазы, глутатионредуктазы и содержание глутатиона восстановленного в сердце и эритроцитах крыс. Установлено, что внутрижелудочное введение крысам физиологического раствора вызывает усиление перекисного окисления липидов и активацию глутатионовой защиты. Внутрижелудочное введение крысам различных штаммов спирулины снижает интенсивность перекисного окисления липидов, усиливает активность глутатионредуктазы, увеличивает количество воссановленного глутатиона, нормализует активность каталазы, что свидетельствует про адаптационные возможности спирулины для организма.

**Karpov L.M., Yershova O.N., Karakis S.G., Dragoeva E.G.,
Lavren'uk T.I., Sagarits V.A.**

THE INFLUENCE OF DIFFERENT SPIRULINA STRAINS ON SOME CHARACTERISTICS OF ANTIOXIDATIVE PROTECTION OF RATS

Key words: spirulina, lipid peroxidation, glutathione, glutathionreductase, superoxidedismutase, catalase

The paper investigates the influence of different spirulina strains on the content of lipid peroxidation products and on the activity of some enzymes of antioxidative protection: superoxidedismutase, catalase, glutathionreductase, and the content of glutathion restored in the heart and erythrocytes of rats. It is determined that the in-stomach administration of physiological solution results in increased lipid peroxidation and activation of glutathione protection. The in-stomach administration of different spirulina strains lowers lipid peroxidation intensity, increases the amount of glutathione restored and normalizes the activity of superoxidedismutase and catalase, which testifies to the adaptive capabilities of spirulina.