

На правах рукописи



ГЛАДКИХ ОЛЬГА ЛЕОНИДОВНА

**ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СПИРУЛИНЫ
И ЕЕ КОМПОНЕНТОВ**

03.00.04. – биохимия

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Москва – 2008

**Работа выполнена в ГУ Научно-исследовательский институт питания
Российской академии медицинских наук**

Научный руководитель: доктор медицинских наук
профессор
академик РАМН
Тутельян Виктор Александрович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
профессор
Соколов Николай Николаевич

доктор биологических наук
профессор
Глухов Александр Иванович

Ведущая организация:

ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет
Минздравсоцразвития России

Защита состоится 18 февраля 2008 г в 14-00 на заседании
Диссертационного Совета Д001 002 01 в ГУ НИИ питания РАМН по адресу
Москва, Устьинский проезд, д 2/14

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ питания РАМН

Автореферат разослан 16 января 2008 г

Ученый секретарь
Диссертационного Совета
доктор биологических наук, профессор

Коденцова В М

Актуальность темы

В настоящее время на фоне возросших нервно-эмоциональных перегрузок, напряженной экологической ситуации, изменения питания, у населения все чаще возникают симптомы недостаточной адаптации (маладаптации) - снижения неспецифической резистентности организма к неблагоприятным факторам окружающей среды физической, химической и биологической природы. Вполне вероятно, что в настоящее время именно с этим связан рост таких хронических заболеваний, как атеросклероз, сердечно-сосудистые, онкологические заболевания, диабет [Шабров А В и др, 2003, Тутельян В А и др, 2007]. Одной из причин маладаптации является недостаточная обеспеченность организма, прежде всего, микронутриентами (витаминами, минеральными веществами) и минорными биологически активными компонентами, которые необходимы для нормального функционирования систем, определяющих адаптационный потенциал организма системы антиоксидантной защиты и детоксикации чужеродных химических соединений (ксенобиотиков) [Гичев Ю П и др, 1998, Тутельян В А и др, 1999]. В связи с этим особую актуальность приобретают вопросы повышения адаптационного потенциала организма и поиск эффективных и безопасных адаптогенов.

Среди средств природного происхождения, оказывающих адаптогенное действие на организм, особое внимание привлекает микроводоросль спирулина (*Spirulina (Arthrospira) platensis*) (Сп), обладающая исключительно высокой пищевой плотностью. Наряду с высоким (до 62%) содержанием белка она содержит почти полный спектр каротиноидов, значительные количества витаминов группы В, витамин Е, эссенциальную гамма-линоленовую кислоту, целый ряд микроэлементов [Купраш Л П и др, 2000, Алешко-Ожевский Ю П и др, 2002, Мазо В К и др, 2004, Challem J J, 1981, Belay A, 2002].

Среди ряда компонентов микроводоросли наибольший интерес вызывает ее пигмент фикоцианин (ФЦ), который рассматривается в качестве ее основного биологического маркера [Гмошинский И В и др, 2006, Romay Ch et al, 2003]. Экспериментальные исследования свидетельствуют о наличии у Сп и ФЦ антиоксидантных, иммуномодулирующих и онкопротекторных свойств [Belay A,

2002, Romay C et al , 1998, 2003] В последние годы Сп используется в качестве источника для биотехнологического получения новых пищевых форм эссенциальных микроэлементов, в первую очередь селена (Se) Имеющиеся данные о биодоступности Se из Сп свидетельствуют, что она является весьма перспективным источником органической формы Se [Мазо В К и др , 2003, 2004, Гмошинский И В и др , 2006, Cases J et al , 2001] Совсем недавно показано, что ФЦ в составе микроводоросли также включает в свою структуру Se [Гмошинский И В и др , 2006] В то же время появляются исследования, результаты которых показывают, что взаимодействие между биологически активными компонентами обогащенных Se растений может приводить к метаболическим изменениям, как в самих растениях, так и у животных, их потребляющих [Finley J W et al , 2005, Keck A S et al , 2006]

Цель и задачи исследования

Цель работы изучение биологической активности спирулины, ее селенсодержащей формы и компонентов, входящих в состав биомасс обеих форм микроводоросли

Задачи исследования

- Изучить влияние Сп, Se-Сп, ее компонентов (ФЦ, Se-ФЦ, липидного компонента - масла Сп (МС)) и неорганического Se на антиоксидантный статус крыс, активность ферментов детоксикации ксенобиотиков и стабильность мембран лизосом печени крыс
- Провести сравнительную оценку антиоксидантной активности ФЦ и Se-ФЦ с использованием различных систем *in vitro*
- Исследовать биодоступность селена из Se-Сп и Se-ФЦ по сравнению с его неорганической формой – селенитом натрия

Научная новизна работы

Получены новые данные об антиоксидантных свойствах Сп и Se-Сп Показано, что обе формы микроводоросли оказывают выраженное дозозависимое активирующее действие на систему антиоксидантной защиты крыс, проявляющееся в уменьшении накопления продуктов ПОЛ (МДА) в плазме крови крыс на фоне

повышения ее общей антиоксидантной емкости (АОЕ) Впервые обнаружено подавляющее действие Сп, Se-Сп, ФЦ, Se-ФЦ и МС на активность прооксидантного фермента ксантиноксидазы ($Se-ФЦ \geq ФЦ > Se-Сп > Сп > МС$) Установлено, что антиоксидантные свойства Сп в первую очередь связаны с содержанием в ее составе пигмента ФЦ, активность которого в разных тест-системах *in vitro* сопоставима с активностью билирубина и Тролокса

Обнаружено индуцирующее действие Сп и Se-Сп на активность ключевых ферментов детоксикации ксенобиотиков, которое в определенной степени связано с содержанием в липидном компоненте микроводоросли каротиноидов и хлорофилла

Впервые показано стабилизирующее действие Сп на лизосомальную мембрану

Установлено, что обогащение Сп селеном усиливает ее биологическую активность

Практическая значимость работы

Полученные экспериментальные доказательства эффективности спирулины и ее основных компонентов в повышении адаптационного потенциала являются основанием для рекомендации включения спирулины, фикоцианина и ее каротиноидного комплекса в состав БАД и обогащения специализированных пищевых продуктов для лечебного и профилактического питания

Полученные данные по биодоступности Se из Se-Сп и Se-ФЦ, сопоставимой с неорганической формой Se – селенитом натрия, подтверждают возможность использования Se-Сп и Se-ФЦ при селеновой недостаточности

Апробация работы

Апробация работы состоялась 10 декабря 2007 г на межлабораторной конференции ГУ НИИ питания РАМН Материалы диссертации доложены на Восьмом Всероссийском конгрессе «Оптимальное питание – здоровье нации» (Москва, 2005), Третьей (Санкт-Петербург, 2005) и Четвертой (Санкт-Петербург, 2006) Межрегиональных научно-практических конференциях «Питание здорового и больного человека», Девятом Международном Съезде «ФИТОФАРМ 2005» (Санкт-Петербург, 2005), Четырнадцатой Международной конференции и дискуссионном

научном клубе «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Ялта-Гурзуф, 2006), Первом Всероссийском Съезде диетологов и нутрициологов «Диетология проблемы и горизонты» (Москва, 2006), Второй Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье» (Рязань, 2007)

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 3 статьи в научных рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 173 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, обоснования цели и выбора методов исследования, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, включает 39 таблиц и иллюстрирована 34 рисунками

Указатель литературы включает 106 отечественных и 192 зарубежных источников

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы сухая биомасса Сп (*Arthrospira platensis*) и Se-Сп, предоставленные ООО «Агро-Виктория», Сочи Для экспериментов *in vivo* из образцов сухих биомасс микроводоросли были выделены ФЦ в количестве 6,23 г и Se-ФЦ в количестве 5,42 г¹ Чистота полученных препаратов составила 80-90% Процесс выделения пигмента включал в себя 3 стадии водную экстракцию, солевое фракционирование и градиентную ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-сефацеле

МС, выделенное экстракционным способом из биомассы Сп было предоставлено ЗАО «Исследовательские лаборатории Рада-Фарма» Содержание

¹ Совместно с вед н сотр , д б н Гмошинским И В

ПНЖК в МС составляло 46%, в том числе γ -линоленовой кислоты – 23%, суммарное содержание каротиноидов – 11,8 мг/г, содержание хлорофилла – 35 мг/г

Методы исследования *in vivo*. Изучение биологической активности Сп и ее компонентов *in vivo* проводили с использованием половозрелых крыс-самцов Вистар, получающих полноценный полусинтетический рацион. Длительность экспериментов составляла 2 недели. В рацион крыс 1-й опытной группы включали 0,3% Сп, 2-й – 0,3% Se-Сп (0,3 г на 1 кг м.т.) Животные 1а опытной группы с кормом получали 1% Сп, 2а – 1% Se-Сп (1 г на 1 кг м.т.) Крысам 3-й и 4-й опытных групп в рацион добавляли ФЦ и Se-ФЦ, соответственно, в количестве, равном их содержанию в корме 1а и 2а опытных групп 0,8-0,9 г на 1 кг рациона (0,1 г на 1 кг м.т.) В рацион животных 5-й опытной группы добавляли Se в количестве 96 мкг/кг корма в виде селенита натрия, что соответствовало уровню его содержания в рационе крыс 4-й опытной группы (Se-ФЦ), в рацион 6-й – 350 мкг Se на 1 кг корма, что равнялось его содержанию в рационе опытной группы 2а (1% Se-Сп). Крысы 7-й опытной группы получали с кормом 0,05% МС (0,05 г/кг м.т.), что соответствует его содержанию в рационе, содержащем 1% Сп, и составляет всего 0,5% от всех липидов рациона, 8-й – 0,5% МС, что составляет 5% от всех липидов рациона.

Для оценки биодоступности Se из Se-Сп и Se-ФЦ использовали животных 1а, 2а, 3, 4, 5, 6 опытных групп.

За 12 ч до забоя животных лишали пищи. Животных забивали декапигацией. Для исследования отбирали кровь и печень. Плазму крови получали немедленно после забора крови путем центрифугирования при комнатной температуре 3000 об/мин в течение 20 мин и хранили при -20° -25°С. Исследования проводили в течение 3-х дней и повторно плазму не замораживали. Из гомогенатов печени выделяли цитозольную и микросомальную фракции, которые хранили при температуре -24°С. Все работы по выделению фракций производили при температуре +4°С.

В плазме крови определяли уровень содержания МДА по методу [Uchiyama M et al, 1978] в небольшой модификации АОЕ плазмы крови и цитозоля определяли по методу [Теселкин Ю.О. и др., 1998] в небольшой модификации В

цитозольной фракции определяли активность каталазы по методу [Chance B, Herbert D, 1950] в модификации [Аebi H E, 1984], глутатионпероксидазы методом [Lawrence R A et al, 1976] в модификации [Igarashi T et al, 1983], глутатионредуктазы [Mohandas J et al, 1984], ксантиноксидазы [Lin W et al, 2005], глутатионтрансферазы [Habig W H et al, 1974], хинонредуктазы [Benson A, 1980] В гомогенате и цитозоле печени крыс определяли неседиментируемую активность ферментов лизосом печени крыс по методу [Дингл Г, 1980]² Содержание белка определяли по [Lowry O H et al, 1951]

Статистическую обработку получаемых данных производили с использованием t-критерия Стьюдента и методом дисперсионного анализа ANOVA при помощи компьютерной программы «Statgraphics» ver 2.7

Методы исследования *in vitro* Для изучения антирадикальной активности ФЦ и Se-ФЦ использовали систему Hb-H₂O₂-люминол. Метод основан на способности антиоксидантов перехватывать образующиеся в системе свободнорадикальные соединения (супероксидный анион-радикал, гидроксильный радикал, феррил-радикалы гемоглобина) и подавлять люминолзависимую хемилюминесценцию (ХЛ) [Теселкин Ю О и др, 1997, 1998]

Для оценки антиоксидантных свойств ФЦ и Se-ФЦ была использована модель индуцированного ПОЛ микросом. Микросомы выделяли из печени крыс-самцов Вистар, с массой тела 100-150 г. ПОЛ мембран микросом индуцировали системой НАДФН-Fe²⁺ [Владимиров Ю А, Арчаков А И, 1972]. Окислительную модификацию липидов оценивали по накоплению ТБК-реактивных продуктов ПОЛ

Fe³⁺-восстанавливающую активность исследуемых соединений определяли в тест-системе FRAP (ferric reducing antioxidant power) по методу [Benzie F F I et al, 1990]

В качестве антиоксидантов сравнения были выбраны билирубин и Тролокс (водорастворимый аналог витамина E)

Результаты представлены как средние величины по данным 3 независимых экспериментов

² Совместно со ст н с , к м н Авреньева Л И

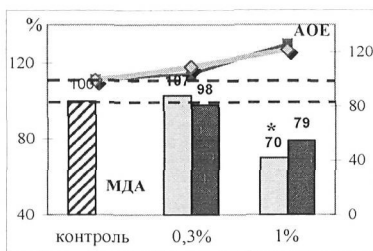
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение биологической активности нативной и селенсодержащей спирулины

Полученные результаты показали, что небольшие количества (0,3 %) Сп или Se-Сп не оказывают существенного влияния на показатели антиоксидантного статуса крыс. Отмечена лишь тенденция к повышению АОЕ плазмы крови крыс, получавших как 0,3% Сп, так и Se-Сп. Увеличение в рационе животных количества Сп или Se-Сп до 1% приводит к дозозависимому повышению АОЕ плазмы крови и снижению уровня содержания в ней МДА (рис. 1).

Рис. 1.

АОЕ и содержание МДА (столбики) в плазме крови крыс на рационах с включением Сп (■) и Se-Сп (■)



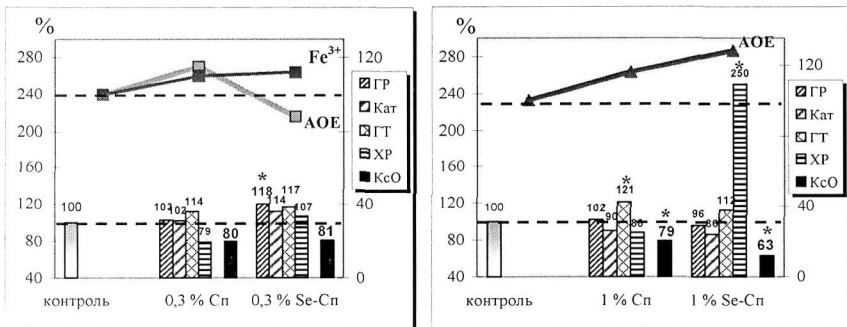
Также не обнаружено существенного влияния низкой дозы Сп или Se-Сп на активность ферментов антиоксидантной защиты и детоксикации ксенобиотиков. Установлена лишь тенденция к увеличению Fe^{3+} -восстанавливающей активности цитозоля печени у крыс, получавших с рационом 0,3% Сп или Se-Сп (рис. 2). Обращает внимание подавление (на 20%) активности ксантиноксидазы в печени животных на рационе с 0,3% Se-Сп.

Включение в рацион 1% Сп приводит к повышению АОЕ цитозоля печени крыс на 16% при одновременном подавлении активности ксантиноксидазы на 21%. 1% Se-Сп в рационе вызывает ещё более значительное увеличение АОЕ цитозоля печени (на 28%), и сильнее подавляет активность ксантиноксидазы - на 37% (рис. 2).

Добавление в корм крысам 1% Сп или Se-Сп приводит к небольшому возрастанию активности глутатионтрансферазы, а у крыс на рационе с 1% Se-Сп – к повышению активности хинонредуктазы на 250% от уровня контроля (рис. 2).

Рис. 2.

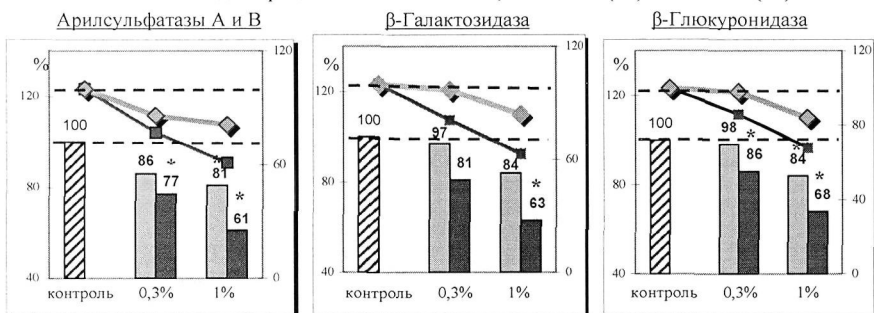
Показатели антиоксидантного статуса и активность ферментов метаболизма ксенобиотиков в печени крыс на рационах с включением 0,3% и 1% Сп или Se-Сп



Заслуживает внимание дозозависимое снижение неседиментируемой активности ферментов лизосом печени крыс, получавших с кормом Сп или Se-Сп, причём эффект значительно усиливался при замещении в рационе Сп на Se-Сп (рис. 3).

Рис. 3.

Неседиментируемая активность (% от общей) ферментов лизосом печени крыс, получавших в течение 2 недель рацион с включением 0,3 и 1% Сп (■) или Se-Сп (■)



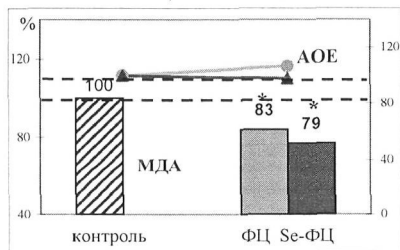
Таким образом, Сп оказывает благоприятное действие на антиоксидантный статус крыс, повышает активность ферментов детоксикации ксенобиотиков, усиливает стабильность мембран лизосом. Обогащение Сп селеном усиливает ее биологическую активность.

Изучение биологической активности фикоцианина и селен-фикоцианина

Включение в корм крыс ФЦ или Se-ФЦ в количестве 1 г/кг, соответствующем его содержанию в 1% Сп или Se-Сп, не оказывает существенного влияния на АОЕ плазмы крови, но снижает уровень содержания в ней МДА: у крыс на рационе с ФЦ на 17%, с Se-ФЦ – на 21% (рис. 4).

Рис. 4.

АОЕ и содержание МДА (столбики) в плазме крови крыс на рационах с включением ФЦ или Se-ФЦ



В печени крыс обнаружено значительное возрастание активности глутатионтрансферазы на 57% у крыс, получавших с рационом ФЦ, и на 32% у животных на рационе с Se-ФЦ, а также снижение активности ксантиноксидазы на 43 и 45% соответственно (рис. 5).

Включение ФЦ (но не Se-ФЦ) в рацион крыс приводит к значительному возрастанию резистентности микросом печени к НАДФН-индуцированному *ex vivo* ПОЛ (снижение образования МДА на 50%) (рис. 6).

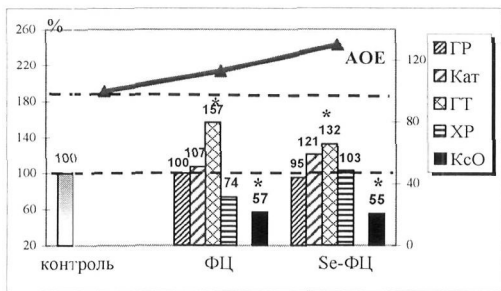


Рис. 5. АОЕ, активность ксантиноксидазы, антиоксидантных ферментов и ферментов детоксикации ксенобиотиков в печени крыс

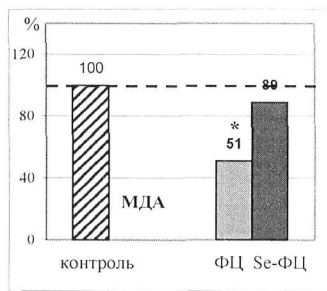


Рис. 6. НАДФН-Fe²⁺-индуцированное *ex vivo* ПОЛ микросом печени крыс на рационе с ФЦ или Se-ФЦ

Не обнаружено какого-либо влияния ФЦ или Se-ФЦ на неседиментируемую активность лизосом печени крыс.

Таким образом, ФЦ и Se-ФЦ оказывают в равной степени выраженное положительное влияние на антиоксидантный статус крыс и являются более сильными ингибиторами ксантинооксидазы, чем Сп и Se-Сп. В отличие от Сп и Se-Сп, ФЦ и Se-ФЦ в тех же количествах, содержащихся соответственно в нативной и селенсодержащей микроводоросли, не оказывают влияния на неседиментируемую активность ферментов лизосом печени.

Изучение биологической активности селенита Na

В связи с обнаруженными различиями во влиянии Сп и Se-Сп на некоторые показатели системы антиоксидантной защиты, активность ферментов детоксикации ксенобиотиков и неседиментируемую активность ферментов лизосом, не связанными с эффектами ФЦ и Se-ФЦ, было проведено исследование влияния самого Se на те же показатели.

В рацион крыс в течение 2 недель включали Se в количестве 96 или 350 мкг/кг, что соответствовало его содержанию в первом случае в рационе с Se-ФЦ, во втором - с 1% Se-Сп. Не обнаружено влияния Se на АОЕ плазмы крови и уровень содержания в ней МДА. Установлено, что включение в рацион Se в количестве как 96 мкг, так и 350 мкг приводит к незначительному изменению активности антиоксидантных ферментов (рис. 7). Заслуживает внимания достоверное подавление активности ксантинооксидазы (рис. 8), причём значительный эффект обнаружен у крыс на рационе с 96 мкг Se.

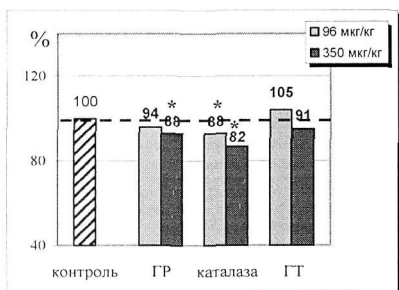


Рис. 7. Активность ферментов антиоксидантной защиты в печени крыс на рационах с включением селенита Na

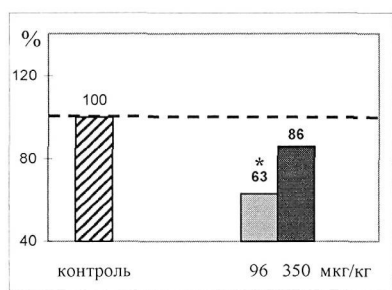


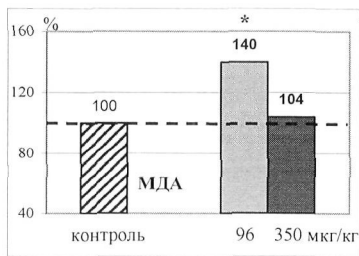
Рис. 8. Активность ксантинооксидазы в печени крыс на рационах с включением селенита Na

Не обнаружено влияния Se на неседиментируемую активность ферментов лизосом.

Микросомы, выделенные из печени крыс, получавших рацион с включением 350 мкг Se, не отличались от контроля по резистентности к НАДФН- Fe^{2+} -индуцированному *ex vivo* ПОЛ, в то время как более низкая концентрации Se в корме вызывала её значительное снижение (рис. 9).

Рис. 9.

НАДФН- Fe^{2+} -индуцированное *ex vivo* ПОЛ микросом печени крыс



Изучение биологической активности масла спирулины

Включение в рацион 0,05% МС, что соответствует его содержанию с рационе крыс, получавших 1% Сп, практически не оказывает влияния на антиоксидантный статус животных, активность ферментов детоксикации ксенобиотиков и неседиментируемую активность ферментов лизосом печени крыс. Добавление в корм 0,5% МС вызывает снижение АОЕ плазмы крови крыс, оцениваемой в системе Нв- H_2O_2 -люминол, и активности глутатионпероксидазы, при одновременном повышении уровня содержания МДА (рис. 10). В печени крыс, получавших с кормом 0,5% МС, достоверно возрастает АОЕ цитозоля на 36% и его Fe^{3+} -восстанавливающая активность на 13%. Установлено статистически достоверное небольшое возрастание активности глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы, и значительное, почти вдвое, увеличение активности хинонредуктазы (рис. 11). Заслуживает внимание и снижение активности ксантинооксидазы в печени крыс на рационе с 0,5% МС.

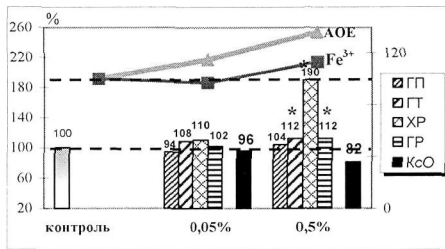
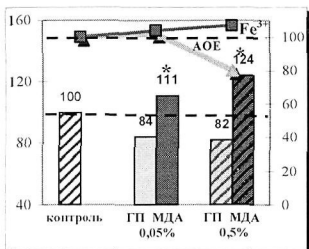


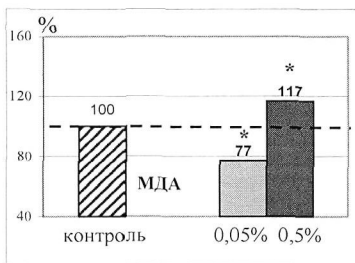
Рис. 10. Активность глутатионпероксидазы, АОЕ и содержание МДА в плазме крови крыс на рационах с включением 0,05 или 0,5% МС

Рис. 11. Показатели антиоксидантного статуса и активность ферментов детоксикации ксенобиотиков в печени крыс на рационах с включением 0,05 или 0,5% МС

Резистентность микросом печени крыс к НАДФН- Fe^{2+} -индуцированному *ex vivo* ПОЛ возрастает при включении в рацион 0,05% МС (снижение образования МДА на 23%), но достоверно снижается у животных на рационе с 0,5% МС (рис. 12).

НАДФН- Fe^{2+} -индуцированное *ex vivo* ПОЛ микросом печени крыс

Рис. 12.



Включение в корм МС не оказывает какого-либо влияния на неседиментируемую активность ферментов лизосом печени крыс.

МС, как и сама Сп, отличается высоким содержанием хлорофилла, каротиноидов. Содержание хлорофилла в рационе крыс при добавлении 0,05 или 0,5% МС составляло 18 мг/кг (1,8 мг/кг м. т.) или 180 мг/кг (18 мг/кг м. т.) соответственно. Имеются данные об антиоксидантном действии хлорофилла *in vitro* [Katiotis S. et al., 2005], но *in vivo* его биологическая активность практически не изучена, а значит, оценить его роль в обнаруженных нами эффектах не представляется возможным.

Содержание каротиноидов в рационе крыс при добавлении 0,05 или 0,5% МС составляло 6 мг/кг (0,6 мг/кг м т) или 60 мг/кг (6 мг/кг м т) соответственно Каротиноиды, относящиеся к полиенам, непосредственно сами инактивируют АФК (пероксильные радикалы и синглетный кислород) [Burton G W et al , 1984, Foote C S et al , 1968, Palozza P et al , 1992], а также индуцируют ферменты антиоксидантной защиты и метаболизма ксенобиотиков

Таким образом, можно предположить, что обнаруженные эффекты МС на антиоксидантный статус и ферменты метаболизма ксенобиотиков связаны в первую очередь с высоким содержанием в нем каротиноидов

Оценка антиоксидантной активности фикоцианина и селенфикоцианина в модельных системах *in vitro*.

Поскольку все проявления биоактивности ФЦ связывают с его антиоксидантными свойствами, что в определенной степени подтверждают результаты эксперимента *in vivo*, целью настоящего раздела работы явилось сравнительное изучение антиоксидантной активности ФЦ и Se-ФЦ *in vitro* в модельных системах окисления Исследования проводили на 3-х модельных системах окисления В гомогенной водной системе Nb-H₂O₂-люминол ФЦ и Se-ФЦ, также как и билирубин не оказывают существенного влияния на продолжительность латентного периода развития ХЛ (рис 13, А) (т е не взаимодействуют с радикалами инициаторами СРО - с феррил-радикалами и гидроксил-радикалами), но практически в равной степени тормозят окисление люминола (т е перехватывают продукты окисления люминола пероксид люминола и, возможно, супероксид анион-радикал, обрывая цепи СРО люминола), что проявляется в уменьшении интенсивности ХЛ Сходство влияния ФЦ и Se-ФЦ с билирубином на кинетику ХЛ системы косвенно подтверждает, что мишенью радикалов является хромофор – фикоцианобилин

Использование гетерогенной, содержащей микросомы, модельной системы окисления позволило показать, что ФЦ (но не Se-ФЦ) приводит к возрастанию резистентности микросом к ПОЛ, индуцированному НАДФН-Fe²⁺ (рис 13, В) Однако активность ФЦ в данной системе гораздо ниже активности

билирубина, что возможно связано с низкой способностью гидрофильного ФЦ встраиваться в гидрофобный слой мембран, в отличие от гидрофобного билирубина. Отсутствие влияния Se-ФЦ вероятно связано с включением Se в виде селеноцистеина или селенометионина в белковую часть ФЦ, что ведёт к исключению влияния определённых групп его апопротеина и изменению антиоксидантной активности хромофора. Эти данные коррелируют с результатами, полученными *ex vivo* (рис. 6).

В тест-системе FRAP ФЦ и Se-ФЦ проявляют равную Fe^{3+} -восстанавливающую активность, сопоставимую с Тролоксом, но низкую по сравнению с активностью билирубина (рис. 13, С). Это совпадает с литературными данными [Benzie F. F. I. et al, 1996], согласно которым в системе FRAP билирубин по активности превосходит аскорбиновую кислоту и α -токоферол.

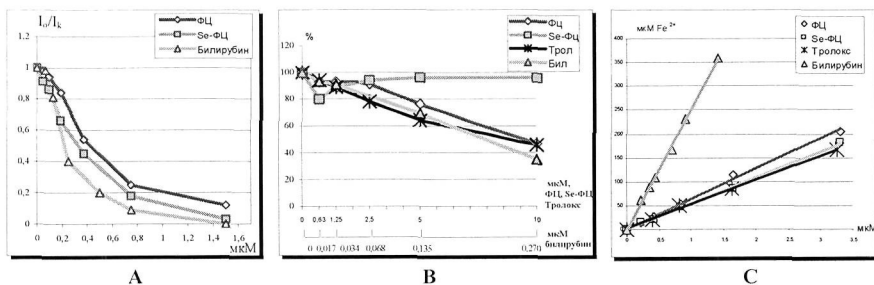


Рис. 13. А - Влияние ФЦ, Se-ФЦ и билирубина на интенсивность ХЛ системы $Nb-H_2O_2$ -люминол (I_0 – максимум ХЛ при добавлении антиоксиданта; I_k – максимум ХЛ в отсутствие антиоксиданта);
 В - Влияние ФЦ, Se-ФЦ, билирубина и Тролокса на НАДФН- Fe^{2+} -индуцированное ПОЛ микросом печени крыс *in vitro*;
 С - Fe^{3+} -восстанавливающая активность ФЦ, Se-ФЦ, билирубина и Тролокса.

Таким образом, антиоксидантная активность ФЦ сравнима в разных модельных системах окисления с активностью билирубина и Тролокса. Включение Se в ФЦ не оказывает существенного влияния на его антиоксидантные свойства.

Оценка биодоступности селена из селен-содержащей спирулины и селен-фикоцианина

Биодоступность Se оценивали по уровню его содержания в плазме крови и печени³, а также по активности селензависимых глутатионпероксидаз в плазме крови (GPx-3) и цитозоле печени (GPx-1)

Содержание крыс на рационе с 1% Сп не оказывает влияния на содержание Se и активность GPx-1 и GPx-3. Добавление в корм 1% Se-Сп или равным по количеству Se (350 мкг/кг) селенита натрия приводит к повышению уровня его содержания в плазме крови крыс по сравнению с контролем соответственно в 2,8 и 2,7 раза (рис 14), а активность глутатионпероксидазы (GPx-3) в плазме одинаково превышает контрольный уровень в 2,2 и 2,1 раза соответственно. В печени крыс, получавших 1% Se-Сп или 350 мкг Se обнаружено увеличение уровня содержания Se в 3,7 и 4,2 раза соответственно. Активность глутатионпероксидазы (GPx-1) в печени крыс на рационе с включением селенита выше, чем на рационе с 1% Se-Сп, и возрастает, соответственно, в 5,6 и 4,6 раза (рис 14)

Включение в рацион ФЦ в количестве 1 г/кг не оказывает влияния на содержание Se и активность GPx-3 в плазме крови и GPx-1 в печени крыс (рис 14). Добавление в корм 1 г/кг Se-ФЦ или Se в количестве 96 мкг/кг, равном его содержанию в рационе с Se-ФЦ, приводит к повышению уровня содержания Se в плазме крови крыс в 2,2 и 1,8 раза соответственно. При этом активность GPx-3 увеличивается соответственно в 1,6 и 1,4 раза. В печени животных на рационе с Se-ФЦ содержание Se по отношению к контрольному уровню возрастает в 2,8 раза, с 96 мкг Se - в 2,3 раза. Активность GPx-1 повышается соответственно в 3,1 и 2,5 раза (рис 14)

Изменения содержания Se и активности глутатионпероксидазы (GPx-3) в плазме крови крыс, получавших Se-Сп, фактически не отличается от изменений этих параметров (принятых за 1) у крыс, получавших селенит натрия, хотя в печени величина изменения содержания Se и активности глутатионпероксидазы (GPx-1), ниже на рационе с Se-Сп (рис 15). В то же время, увеличение содержания

³ Совместно с вед. н. сотр., д. б. н. Гмошинским И. В.

Se и активности глутатионпероксидазы как в плазме крови, так и в печени выше (около 20%) у крыс, получавших Se-ФЦ, в сравнении с показателями у крыс, получавших то же количество Se в виде селенита натрия.

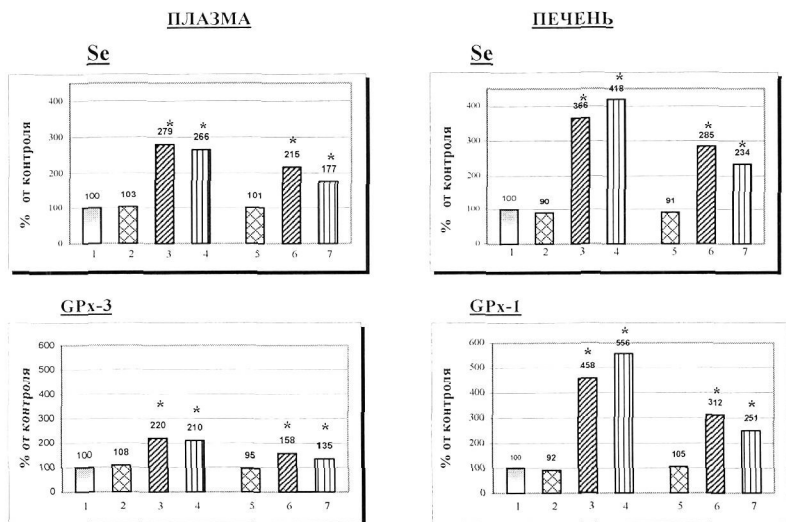
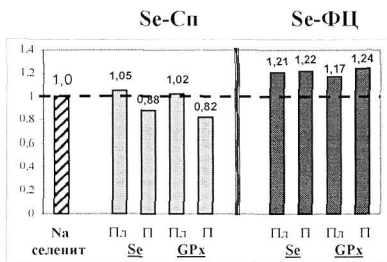


Рис. 14. Содержание селена (Se) и активность глутатионпероксидаз (GPx) в плазме крови и печени крыс:

- | | |
|--|---|
| 1 - контрольный рацион | 5 - + ФЦ |
| 2 - + Se | 6 - + Se-ФЦ (96 мкг Se/кг рациона) |
| 3 - + Se-Сп (350 мкг Se/кг рациона) | 7 - + селенит Na (96 мкг Se/кг рациона) |
| 4 - + селенит Na (350 мкг Se/кг рациона) | |

Рис. 15. Изменения содержания Se и активности глутатионпероксидаз (GPx) в плазме крови и печени крыс на рационах с включением Se-Сп и Se-ФЦ (относительно изменений у крыс на рационах с селенитом Na)



Результаты исследования свидетельствуют, что оба источника способны эффективно повышать уровень Se в плазме, печени и активность глутатионпероксидаз (GPx-3 и GPx-1), специфически регулируемых пищевым Se, то есть обладают достаточно высокой биодоступностью, сопоставимой с неорганической формой Se – селенитом натрия. Это подтверждает возможность использования Se-Сп и Se-ФЦ при селеновой недостаточности.

ВЫВОДЫ

1. Спирулина (*Spirulina*) является эффективным адаптогеном, обладая способностью увеличивать адаптационный потенциал организма за счет улучшения его антиоксидантного статуса, повышения активности ключевых ферментов детоксикации ксенобиотиков и мембранопротекторного действия.
2. Получены новые данные об антиоксидантных свойствах спирулины. Положительное влияние микроводоросли на антиоксидантный статус крыс выражается в повышении общей антиоксидантной емкости плазмы крови крыс (на 23%) при снижении уровня содержания в ней МДА (на 30%), а также повышении общей антиоксидантной емкости цитозоля печени животных (на 16%) при одновременном подавлении активности прооксидантного фермента ксантинооксидазы (на 20%).
3. Впервые обнаружено подавляющее действие спирулины и ее компонентов на активность прооксидантного фермента ксантинооксидазы: селен-фикоцианин \geq фикоцианин > селен-спирулина > спирулина > масло спирулины.
4. Антиоксидантные свойства спирулины главным образом связаны с ее пигментом – фикоцианином, который *in vivo* проявляет высокую антиоксидантную активность, что выражается в снижении уровня содержания МДА в плазме крови (на 17%), увеличении активности глутатионтрансферазы (на 57%), подавлении активности ксантинооксидазы (на 43%) и интенсивности процессов ПОЛ мембран микросом печени крыс (на 49%). Кроме того, в различных системах *in vitro* фикоцианин проявляет антиоксидантную активность, сопоставимую с активностью известных антиоксидантов сравнения – билирубина и Тролокса.
5. Обогащение спирулины селеном усиливает ее биологическую активность. При замене нативной спирулины на селен-спирулину степень увеличения общей антиоксидантной емкости цитозоля печени возрастает в 1,7 раза, подавления активности ксантинооксидазы – в 1,8

раза, увеличение активности хинонредуктазы – в 2,5 раза и снижения неседиментируемой активности лизосомальных ферментов – более чем в 2 раза

- 6 Показателем увеличения спироулиной и селен-спироулиной адаптационного потенциала организма является повышение активности ферментов детоксикации ксенобиотиков – глутатионтрансферазы (на 21%) и хинонредуктазы (на 250%) соответственно Установлена определенная связь влияния микроводоросли на активность ферментов детоксикации ксенобиотиков и антиоксидантной защиты с ее липидным компонентом, характеризующимся высоким содержанием каротиноидов и хлорофилла
- 7 Впервые показано стабилизирующее действие спироулины на лизосомальную мембрану, что проявляется в дозозависимом снижении неседиментируемой активности ферментов лизосом печени крыс
- 8 Обе органические формы селена – Se-спироулина и Se-фикоцианин, обладают достаточно высокой биодоступностью, так как включение их в рацион крыс вызывает повышение уровня содержания Se и активности селензависимых глутатионпероксидаз в плазме крови и печени животных, сопоставимое с увеличением данных показателей у крыс на рационе с добавлением неорганической формы Se – селенита натрия

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых журналах, определенных ВАК

1 *Кравченко Л В, Гладких О Л, Гмошинский И В, Авреньева Л И, Гусева Г В, Тутельян В А* Влияние обогащения селеном на биологическую активность спироулины и фикоцианина // *Вопр биол мед фарм химии* – 2006 - № 3 – С 17-21

2 *Кравченко Л В, Гладких О Л, Авреньева Л И, Гмошинский И В, Тутельян В А* Сравнительная оценка антиоксидантной активности фикоцианина и селенфикоцианина *in vitro* и *ex vivo* // *Вопр питания* – 2006 - № 6 – С 18-23

3 *Трушина Э Н, Гладких О Л, Кравченко Л В, Гаджиева З М, Мустафина О К, Поздняков А Л* Влияние спироулины и селен-спироулины на показатели иммунного ответа у крыс // *Вопр питания* – 2007 - № 2 - С 21-25

Материалы научных конференций

4 *Гмошинский ИВ, Кравченко ЛВ, Гладких ОЛ, Мазо ВК* Исследование биодоступности *in vivo* селена в составе биомассы селеносодержащей спирулины и селеносодержащего фикоцианина // «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (XIV Международная конференция и дискуссионный научный клуб) Ялта-Гурзуф, 2006 – С 137-140

5 *Кравченко ЛВ, Гладких ОЛ, Гмошинский ИВ* Сравнительное изучение антиоксидантных свойств фикоцианина и селенфикоцианина в модельных системах окисления // Материалы IX Международного Съезда ФИТОФАРМ 2005 С -Петербург, 2005 – С 161

6 *Гладких ОЛ, Авреньева ЛИ, Гусева ГВ, Гмошинский ИВ, Кравченко ЛВ* Биологическая активность спирулины натуральной и селенсодержащей // Материалы IV Межрегиональной научно-практической конференции «Питание здорового и больного человека» С -Петербург, 2006 - С 44-46

7 *Гладких ОЛ* Изучение биологической активности микроводоросли спирулины и ее компонентов // Материалы I Всероссийского съезда диетологов и нутрициологов «Диетология проблемы и горизонты» Москва, - 2006 – С 28

8 *Гладких ОЛ* Спирулина – природный источник биологически активных веществ // Материалы II Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье» Рязань, - 2007 – С 174-176

9 *OL Gladkih, GV Guseva, LI Avrenjeva, LV Kravchenko* Biological activity of *Spirulina platensis* components Spirulina oil // Abstracts Book The 11-th International Congress PHYTOPHARM 2007 Leiden, - 2007 – P 29-30

Заказ № 25/01/08 Подписано в печать 11 01 2008 Тираж 150 экз Усл. п. л. 1,25



ООО "Цифровичок", тел. (495) 797-75-76, (495) 778-22-20
www.cfr.ru, e-mail info@cfr.ru