

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и  
безопасности пищи

**На правах рукописи**

**Бирюлина Надежда Александровна**

**ВЛИЯНИЕ ФИКОЦИАНИНОВ *ARTHROSPIRA PLATENSIS* НА ЖИРОВОЙ,  
ХОЛЕСТЕРИНОВЫЙ И УГЛЕВОДНЫЙ ОБМЕН У КРЫС**

**1.5.4 Биохимия**

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,  
профессор,  
Мазо Владимир Кимович

**Москва, 2025**

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1 <i>Arthrospira platensis</i> : состав и физиологические свойства биомассы.....	13
1.2 С-Фикоцианин и аллофикоцианин: физико-химическая характеристика и физиологические свойства .....	18
1.3 Методы выделения и очистки фикоцианинов биомассы <i>Arthrospira platensis</i> .....	26
1.4 Моделирование нарушений углеводного и липидного обмена в опытах <i>in vivo</i> на грызунах .....	31
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	37
2.1 Характеристика используемых материалов .....	37
2.2 Аналитические методы исследования .....	37
2.3 Концентраты фикоцианинов биомассы <i>Arthrospira platensis</i> : модифицированные методы получения.....	39
2.4 Биохимические методы исследования .....	42
2.5 Физиологические методы исследования .....	44
2.6 Экспериментальные животные.....	46
2.7 Дизайны экспериментов <i>in vivo</i> . Биологические модели.....	50
2.7.1 Моделирование у крыс нарушений углеводного, липидного и холестерина обмена, индуцированных потреблением различных по калорийности рационов (без и с добавлением холестерина) Эксперимент 1 ..	50
2.7.2 Моделирование у крыс нарушений углеводного, липидного и холестерина обмена, индуцированных потреблением высокожирового рациона, содержащего холестерин, и хронической принудительной иммобилизацией Эксперимент 2 .....	52
2.7.3 Моделирование у крыс нарушений жирового, холестерина и углеводного обмена, индуцированных потреблением высокожировых рационов с различным содержанием экзогенного холестерина Эксперимент 3 .....	54

2.8 Дизайны экспериментов <i>in vivo</i> . Физиолого-биохимическая оценка влияния концентратов фикоцианинов на состояние углеводного, липидного и холестерина обмена.....	56
2.8.1 Физиолого-биохимическая оценка влияния потребления концентрата фикоцианинов (концентрат 4) на нарушения у половозрелых крыс углеводного, липидного и холестерина обмена, индуцированные потреблением высокожирового рациона с добавлением 1% холестерина Эксперимент 4 .....	56
2.8.2 Сравнительная физиолого-биохимическая оценка влияния потребления концентрата фикоцианинов (концентрат 2) на нарушения у растущих крыс углеводного, липидного и холестерина обмена, индуцированные потреблением высокожирового рациона с добавлением 2% холестерина Эксперимент 5 .....	58
2.9 Статистическая обработка данных.....	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	62
3.1 Характеристика концентратов фикоцианинов биомассы <i>Arthrospira platensis</i> .....	62
3.2 Моделирование у крыс нарушений углеводного, липидного и холестерина обмена, индуцированных потреблением различных по калорийности рационов (без и с добавлением холестерина) .....	71
3.3 Моделирование у крыс нарушений углеводного, липидного и холестерина обмена, индуцированных потреблением высокожирового рациона, содержащего холестерин, и хронической принудительной иммобилизацией (дизайн эксперимента №2).....	80
3.4 Моделирование у крыс нарушений жирового, холестерина обмена и углеводного обмена, индуцированных потреблением высокожировых рационов с различным содержанием экзогенного холестерина .....	88
3.5 Физиолого-биохимическая оценка влияния потребления концентрата фикоцианинов (концентрат 4) на нарушения у половозрелых крыс углеводного, липидного и холестерина обмена, индуцированные потреблением животными высокожирового рациона с добавлением 1% холестерина (дизайн эксперимента №4) .....	100
3.6 Сравнительная физиолого-биохимическая оценка влияния потребления концентрата фикоцианинов (концентрат 2) на нарушения у растущих крыс углеводного, липидного и холестерина обмена, индуцированные	

потреблением высокожирового рациона с добавлением 2% холестерина (дизайн эксперимента №5) .....	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	125
ВЫВОДЫ .....	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	133

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Нарушения углеводного и жирового обмена в организме человека приводят к развитию целого ряда социально-значимых заболеваний, включая сахарный диабет 2 типа и ожирение, связанные с ним сердечно-сосудистые заболевания, желчнокаменную болезнь, заболевания опорно-двигательного аппарата и другие, что способствует снижению качества и продолжительности жизни [17, 19, 36]. В частности в рамках реализации Национального проекта «Демография», одним из приоритетных фундаментальных и поисковых научных направлений в области нутрициологии являются биохимические и физиологические исследования, связанные с обоснованием возможного использования биологически активных минорных компонентов пищи для профилактики и диетической коррекции алиментарно-зависимых заболеваний, связанных с нарушениями углеводного и /или липидного обмена [38, 39]. Благоприятные эффекты *Arthrospira platensis* (*A. platensis*), в качестве источника минорных биологически активных веществ на состояние углеводного и/или липидного обмена изучаются экспериментально *in vitro* и *in vivo* и свидетельствуют о нормализующем влиянии приема биомассы этой пищевой цианобактерии и её экстрактов на метаболизм глюкозы и липидного обмена [27, 67, 147]. Неудовлетворительные органолептические свойства биомассы *A. platensis* (прежде всего выраженный горький вкус) существенно лимитируют её использование в составе специализированной пищевой продукции. Токсикологическими исследованиями *in vivo* показано безопасное и эффективное использование экстрактов биомассы *A. platensis* с высоким содержанием мажорных белков С-фикоцианина и аллофикоцианина [65, 72]. Актуально комплексное физико-химическое, биохимическое и физиологическое исследование, включающее получение высокоочищенных экстрактов *A. platensis*, и тестирование их влияния на нарушения углеводного и липидного обмена, моделируемые с использованием лабораторных грызунов.

В соответствии с вышеизложенным, **целью исследования** явилось получение концентратов фикоцианинов биомассы пищевой цианобактерии *Arthrospira platensis* и физиолого-биохимическая оценка их влияния на состояние липидного, холестеринового и углеводного обмена у крыс.

### **Задачи исследования**

1. Модификации технологических подходов к получению высокоочищенных концентратов фикоцианинов биомассы *Arthrospira platensis* и их физико-химическая характеристика.
2. Характеристика и выбор моделей нарушений липидного, холестеринового и углеводного обмена, индуцированных потреблением рационов различных по калорийности и содержанию экзогенного холестерина крысами-самцами линии Вистар.
3. Физиолого-биохимическая оценка влияния высокоочищенных концентратов фикоцианинов биомассы *Arthrospira platensis* на состояние липидного, холестеринового и углеводного обмена у крыс-самцов линии Вистар, потребляющих высокожировые рационы, содержащие экзогенный холестерин.

### **Степень разработанности проблемы**

В современной научной литературе подробно исследованы химический состав и особенности структуры С-фикоцианина и аллофикоцианина, содержащих тетрапирольный хромофор фикоцианобилин [41, 60, 114]. Сравнительно охарактеризованы антиоксидантные активности этих биллипротеинов. Установлено, что С-фикоцианин эффективно нейтрализует свободные радикалы и активные формы кислорода, подавляет экспрессию индуцибельной синтазы оксида азота, снижает выработку нитритов и ингибирует перекисное окисление липидов в микросомах печени [92]. Аллофикоцианин более эффективно по сравнению с С-фикоцианином улавливает пероксильные радикалы, при этом С-фикоцианин эффективней в захвате гидроксильных радикалов [56]. С-фикоцианин эффективно улавливают неорганический токсин-пероксинитрит,

инактивирующий важные клеточные мишени [99]. В результате многочисленных исследований *in vitro* и *in vivo* установлена определяющая роль фикоцианобилина в проявлении антиоксидантных свойств биомассой и билипротеинами *A. platensis* [68, 71, 137]. Выдвинута гипотеза о том, что антиоксидантные свойства фикоцианобилина обусловлены его структурной гомологичностью к биливердину и превращением в организме млекопитающих под действием биливердинредуктазы в фикоцианорубин, соединение, структурно гомологичное билирубину [99].

Анализ научных публикаций свидетельствует, что в отличие от многочисленных экспериментов *in vitro* и *in vivo* и клинических исследований антиоксидантных эффектов экстрактов фикоцианинов биомассы *A. platensis*, их гипогликемические, гиполипидемические и гипохолестеринемические свойства исследованы относительно недостаточно [61, 108, 113]. Для воспроизведения в экспериментальных условиях нарушений углеводного и жирового обмена достаточно широко используются генетические, стрептозотоциновые и диет-индуцированные модели на лабораторных грызунах [2, 25, 30, 69, 89, 150]. Однако представляется необходимым проведение оценки валидности используемых биомоделей, подтверждающей их обоснованность и применимость для оценки влияния потребления концентратов фикоцианинов биомассы *A. platensis* на развитие нарушений углеводного, жирового и холестерина обмена.

Разработаны современные высокотехнологичные методы разрушения клеточных стенок и экстракции, позволяющие получать концентраты белков биомассы *A. platensis* [26, 31, 31, 37, 91, 144]. Тем не менее, анализ используемых методов свидетельствует о целесообразности их модификаций, позволяющих получать с минимальными потерями концентраты с высоким содержанием фикоцианинов и необходимой степенью чистоты.

Таким образом, в соответствии с вышеизложенным, представляется перспективным физиолого-биохимическая оценка гипогликемических и гиполипидемических свойств фикоцианинов в экспериментах *in vivo* при

нарушениях углеводного и липидного обмена, что требует, во-первых, целенаправленного извлечения фикоцианинов из биомассы *A. platensis* и их концентрирования, во-вторых, подбора оптимальной биомодели, воспроизводящей клинические, биохимические и морфологические нарушения в организме, характерные для данных нарушений.

### **Научная новизна**

Разработан метод, позволяющий интенсифицировать и оптимизировать процесс получения высокоочищенных концентратов фикоцианинов биомассы *A. platensis* путем замены стадии сульфатно-аммонийного осаждения ультра и микрофильтрацией.

Впервые показано, что воздействие принудительной хронической иммобилизации в сочетании с потреблением высокожирового рациона с добавлением 2% холестерина не оказывает влияния на показатели углеводного, жирового и холестеринового обмена растущих крыс самцов линии Вистар.

Впервые установлено, что потребление в течение трех месяцев высокоочищенных концентратов фикоцианинов в дозах 30 мг/кг массы тела и 100 мг/кг массы тела предотвращает развитие инсулинорезистентности, снижает уровни лептина и МДА в сыворотке крови у растущих и половозрелых крыс-самцов линии Вистар с нарушениями углеводного и жирового обмена, индуцированными потреблением высокожирового рациона с добавлением экзогенного холестерина.

### **Финансирование**

Разработка, характеристика и физиолого-биохимическая оценка *in vivo* концентратов фикоцианинов проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы фундаментальных научных исследований (Тема № FGMPF-2022-0002, регистрационный номер в ЕГИСУ НИОКТР 122012400297-2) «Разработка дифференцированных рекомендаций по оптимизации питания населения с использованием региональных биоресурсов и



создание инновационных цифровых технологий специализированной пищевой продукции для профилактики ожирения и социально-значимых заболеваний».

Модификация технологических способов получения высокоочищенных концентратов биомассы *A. platensis* выполнена в рамках гранта РФФИ № 22-16-00006 (регистрационный номер в ЕГИСУ НИОКТР 122080100037-6) «Пищевые ингредиенты, повышающие эффективность вакцинации против коронавирусной инфекции: технология, доклиническая оценка *in vivo*».

### **Научно-практическая значимость**

Полученные данные обосновывают целенаправленное профилактическое влияние алиментарного фактора (фикоцианинов биомассы *A. platensis*) на состояние жирового и углеводного обмена у млекопитающих.

Значимым результатом проведенного экспериментального физиолого-биохимического исследования явилась доклиническая оценка гипогликемических и гиполипидемических свойств концентратов фикоцианинов.

Данные, полученные в результате проведенного исследования, могут быть использованы при разработке инновационных технологий, основанных на переработке биомассы пищевых микроводорослей и цианобактерий, для высокоэффективного производства специализированной пищевой продукции нового поколения, необходимой для сохранения и повышения уровня здоровья населения Российской Федерации.

Разработанная модифицированная технология высокоочищенного концентрата фикоцианинов биомассы *A. platensis* масштабирована и использована для получения ингредиента специализированной пищевой продукции. В рамках государственного задания № FGMF-2022-0002 разработаны и утверждены проекты технической документации: Технические условия (ТУ 10.86.10-017-01897222-2024) и Технологическая инструкция (ТИ 10.86.10-017-01897222-2024) на «Специализированный пищевой продукт диетического лечебного питания - сухой напиток с включением концентрата фикоцианинов». В Клинике лечебного питания ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» проведены клинические

испытания нового специализированного пищевого продукта у пациентов с нарушениями углеводного и жирового обмена.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Замена стадии сульфатно-аммонийного осаждения ультра и микрофильтрацией оптимизирует получение высокоочищенных концентратов фикоцианинов.
2. Потребление высокоочищенного концентрата фикоцианинов в дозе 30 мг/кг массы тела, растущими и половозрелыми крысами-самцами линии Вистар в составе высокожирового рациона с добавлением экзогенного холестерина, препятствует развитию инсулинорезистентности, снижает в сыворотке крови концентрацию МДА и лептина.

### **Методология и методы исследования**

В работе использовали физико-химические методы для качественного и количественного анализа содержания биологически активных веществ в полученных концентратах. В экспериментах *in vivo* использовали молодых крыс-самцов линии Вистар (исходный возраст 5 недель). При проведении оценки *in vivo* полученных концентратов фикоцианинов применяли физиологические и биохимические методы исследования. Подробное описание методов исследования представлено в разделе «Материалы и методы».

### **Степень достоверности результатов**

Результаты исследований, представленные в работе, получены на современном оборудовании, с использованием общепринятых биологических моделей. Достоверность полученных результатов подтверждается первичными данными, а также статистической обработкой данных. Статистическую обработку данных проводили с использованием программных пакетов IBM SPSS Statistics 20 и Microsoft Excel 2007. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы ( $p$ ) принимали равным 0,05.

### **Апробация работы**

Результаты исследований были представлены на III международной научно-практической конференции «Эффективный менеджмент здравоохранения: стратегии инноваций» (Саратов, Российская Федерация, 2022), V школе молодых ученых «Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний» (Москва, Российская Федерация, 2022), IV Конгрессе «Наука, питание и здоровье» (Минск, Республика Беларусь, 2023), XVI Международной научно-практической конференции молодых учёных и специалистов «Фуд-бум: новые технологии для будущего пищевой отрасли» (Москва, Российская Федерация, 2023), международной ежегодной научно-практической конференции по сельскому хозяйству и биотехнологии (IASAB 2023) (Самарканд, Узбекистан, 2023), международной научно-практической конференции «Здоровье и окружающая среда» (Минск, Республика Беларусь, 2023), Республиканской научно-практической конференции «Актуальные проблемы общей и клинической биохимии-2024» (Гродно, Республика Беларусь, 2024), XX Международной научно-практической конференции «Инновационные технологии в пищевой промышленности» (Минск, Республика Беларусь, 2024).

### **Публикации**

Всего опубликовано 20 печатных работ, из которых 6 – статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, рекомендованный Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 3- статьи в других изданиях, 11 – публикаций в сборниках материалов российских и международных конференций.

### **Личный вклад**

Все результаты экспериментальных исследований, изложенные в диссертации, получены автором самостоятельно или при его непосредственном

участии. Постановка цели и задач исследования, выбор методических подходов, анализ и обобщение результатов осуществлялись совместно с научным руководителем. Личное участие в сборе, накоплении и систематизации научных материалов, анализе, интерпретации, обобщении и изложении материалов диссертации составляет не менее 90%.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, включает 33 таблицы и иллюстрирована 40 рисунками. Список литературы включает 155 источников, из которых 40 на русском и 115 на иностранных языках.

## ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 *Arthrospira platensis*: состав и физиологические свойства биомассы

Биомасса *Arthrospira platensis* (*A. platensis*), по современной классификации относящаяся к царству цианобактерий – сложно организованных и морфологически дифференцированных прокариотов, являющихся фотосинтетическими организмами, наиболее близкими к древнейшим микроорганизмам, обнаруженным на Земле [28, 52]. Ранее род *Spirulina* и род *Arthrospira* были объединены в единый род *Spirulina*, а с уточнением таксономии микроорганизмов род *Arthrospira* выделен из рода *Spirulina* в самостоятельный род и вначале отнесен к семейству *Phormidiaceae*, а затем к новому семейству *Microcoleaceae* [79]. Принадлежность *A. platensis* к цианобактериям, как древнейшим обитателям биосферы, определяет особенности ее метаболизма – высокую степень приспособляемости обменных процессов к неблагоприятным факторам среды обитания и наличие соответствующих вторичных метаболитов [21, 146]. Биомасса *A. platensis* содержит (4–7)% жиров, которые в основном состоят из незаменимых полиненасыщенных жирных кислот:  $\gamma$ -линоленовой кислоты,  $\alpha$ -линолевой кислоты, эйкозапентаеновой кислоты, докозагексаеновой кислоты. В состав биомасса *A. platensis* также входят каротиноиды, такие как астаксантин, зеаксантин и  $\beta$ -каротин, витамины группы В, витамин Е, витамин С и целый ряд макро и микроэлементов (калий, кальций, магний, селен, железо, цинк) [136]. Состав биомассы может различаться в зависимости от условий окружающей среды и выращивания, таких как температура, свет, соленость и другие [35]. Отличительной особенностью *A. platensis* является очень высокое (до 70%) содержание белков, из которых приблизительно 50% составляют в сумме С-фикоцианин и аллофикоцианин [122]. Именно фикоцианины определяют в основном антиоксидантные и связанные с ними гипогликемические, гиполипидемические, противовоспалительные и иммуномодулирующие эффекты биомассы *A. platensis*, выявляемые в опытах *in vivo*, *in vitro* и клинических исследованиях. Характеристика состава и физиологические (фармакологические)

свойства этих фикоцианобиллинов будет представлена в следующем разделе обзора.

Полученные на протяжении последних двух десятилетий результаты многочисленных экспериментов *in vitro* и *in vivo*, а также клинических исследований, свидетельствуют о широком спектре физиологических свойств биомассы *A. platensis* [9, 23, 67, 147]. Следующие примеры демонстрируют антиоксидантные и связанные с ними гипогликемические, гиполипидемические, противовоспалительные и иммуномодулирующие эффекты биомассы *A. platensis*, выявляемые в опытах *in vivo*, *in vitro* и клинических исследованиях.

Интоксикация ацетатом свинца приводила к значительному повышению активности аспаратаминотрансферазы, каспазы-3 и уровня малонового диальдегида в сыворотке крови, а также к выраженному снижению уровней глутатиона и активности супероксиддисмутазы в печени белых крыс линии Вистар [62]. Пероральное введение в течение 4 недель биомассы *A. platensis* (в дозировках 500 или 1000 мг/кг массы тела) обеспечило дозозависимое повышение уровня глутатиона, активности супероксиддисмутазы, снижение уровня малонового диальдегида, повышенного уровня фактора некроза опухоли  $\alpha$  и каспазы-3. Введение биомассы *A. platensis* в течение 28 дней в корм нильской тиляпии (0,5 или 1%) повышало уровень глутатиона и активность глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы, каталазы в тканях, также ослабляя предварительное токсическое окислительное воздействие дельтаметрина на эту рыбу [44].

При моделировании колита у белых крыс линии Вистар прием в течение 17 дней биомассы *A. platensis* (перорально 500 мг/кг массы тела) минимизировал токсическое действие тилмикозина, индуцирующее перекисное окисление липидов и подавляющее экспрессию супероксидазы и каталазы. Нормализовалась повышенная активность лактатдегидрогеназы и креатинкиназы в сыворотке крови и снижалась интенсивность перекисного окисления липидов [42]. Предварительное пероральное введение в течение 5 дней биомассы *A. platensis*

(300 мг/кг массы тела) крысам-самцам линии Вистар ослабляло повреждающее действие диклофенака на печень этих животных, снижая активность аланин- и аспаратаминотрансферазы и щелочной фосфатазы, содержание общего билирубина, липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), общего холестерина в сыворотке крови, а также интенсивность перекисного окисления липидов в ткани печени [123]. Продолжительный прием биомассы *A. platensis* (300 мг/кг массы тела в течение 3 месяцев) снижал вызванную хромом нефротоксичность у крыс линии Sprague-Dawley, понижая повышенный уровень мочевины и креатинина в сыворотке крови, повышая активности каталазы и супероксиддисмутазы и восстанавливая типичную гистологическую структуру почек [62].

Потребление 2 раза в неделю в течение 2 месяцев биомассы *A. platensis* (500 мг/кг массы тела) крысами-альбиносами с индуцированным стрептозотоцином диабетом достоверно снижало уровни глюкозы, гликированного гемоглобина, малонового диальдегида и значительно повышало уровень инсулина, активность супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы в крови этих животных. Прием биомассы *A. platensis* также снижал индуцированную стрептозотоцином активацию пируваткарбоксилазы и каспазы-3, экспрессию гена фактора некроза опухоли  $\alpha$  [126]. По мнению авторов данной работы, снижение уровня глюкозы в крови у этих животных является следствием антиоксидантного и апоптического действия *A. platensis*, ингибирующего активацию митогенактивируемого протеинкиназного пути в тканях печени диабетических крыс и индуцирующего восстановление поврежденных гепатоцитов и  $\beta$ -клеток поджелудочной железы.

При пероральном введении в течение 30 дней биомассы *A. platensis* (в дозе 500 мг/кг в сутки) крысам-альбиносам с нефропатией и диабетом, индуцированным стрептозотоцином, у животных снижался уровень глюкозы в крови. Инсулиноподобный эффект *A. platensis* был связан с защитой  $\beta$ -клеток поджелудочной железы и соответствующим контролем уровня глюкозы в крови [43]. У крыс с диабетическими нарушениями, получавших биомассу *A. platensis* (10 и 20 мг/кг массы тела), наблюдалось снижение уровня малонового диальдегида в тканях печени по сравнению с показателями контрольной группы,

увеличение дозировки спирулины коррелировало с повышением активности антиоксидантных ферментов в печени [109].

Внутрижелудочное введение раствора сухой биомассы *A. platensis* в дозе 650 мг/кг массы тела крысам-самцам линии Вистар на фоне высокожирового рациона в течение 10 недель приводило к достоверному снижению уровня ЛПНП, общего холестерина и активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке крови животных по сравнению с контролем [51]. В существенно более раннем исследовании [81] *in vitro* было охарактеризовано гипохолестеринемическое влияние метанол-хлороформного экстракта из *A. platensis* на клетки HepG2 гепатомы человека. Наблюдалось значительное снижение экспрессии 3-гидрокси-3-метил-глутарил-КоА-редуктазы (HMGCR), фермента, лимитирующего скорость биосинтеза холестерина, а также подавление экспрессии рецепторов ЛПНП и липогенных генов синтазы жирных кислот и стеароил-КоА десатуразы-1. Репрессия липогенных генов происходила наряду со снижением зрелых форм стерол-регуляторного элемент-связывающего белка 1 (SREBP-1) и белка 2 (SREBP-2), которые эффективно регулируют транскрипцию вышеупомянутых генов. При скормливании в течение 60 дней биомассы *A. platensis* (500 мг/кг массы тела) половозрелым крысам-самцам альбиносам с нефропатией и диабетом, индуцированным стрептозотоцином (45 мг/кг массы тела), имело место снижение уровня глюкозы, гликированного гемоглобина, малонового диальдегида (МДА) и повышение уровня инсулина и активности антиоксидантных ферментов в сыворотке крови [126].

Изучение антивирусных и иммуномодулирующих свойств *A. platensis* не входит в задачи данной работы, тем не менее, хочется отметить два исследования, результаты которых свидетельствуют о перспективности использования этого микроорганизма для профилактики вирусных инфекций.

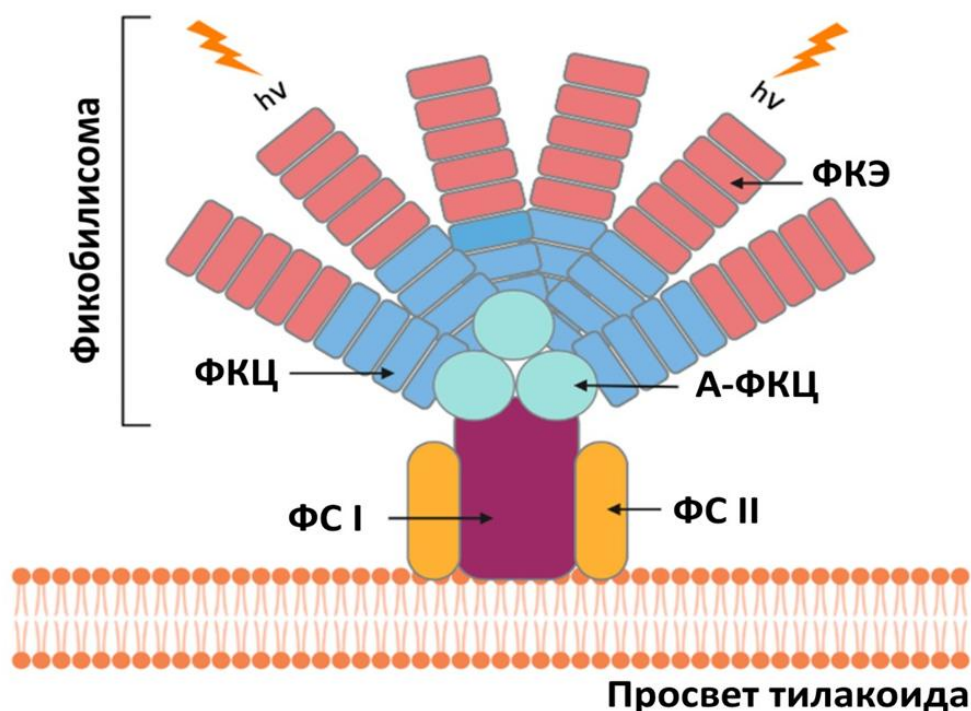
В работе [55] показано, что экстракт *A. platensis* ингибирует образование вирусных бляшек и снижает репликацию вируса гриппа в клеточных культурах. Экстракт *A. platensis* при пероральном введении в дозе 50 мг/ кг массы тела в течение 4 дней действовал на ранней стадии инфекции, снижая количество вируса



в клетках и улучшая выживаемость мышей BALB, инфицированных гриппом, нарушая при этом гемагглютинацию вирусных частиц с эритроцитами и тем самым подавляя инфекционный процесс. Усиление иммунного ответа, имевшее место у добровольцев, потреблявших 50 мл водного экстракта *A. platensis* в течение 2 месяцев, установлено в работе [124]. В этом исследовании пероральное введение водорастворимой фракции *A. platensis* значительно увеличивало продукцию  $\gamma$ -интерферона (ИФН- $\gamma$ ) более чем у 50% принимавших участие в исследовании добровольцев-мужчин в возрасте 40–65 лет.

## 1.2 С-Фикоцианин и аллофикоцианин: физико-химическая характеристика и физиологические свойства

С-фикоцианин и аллофикоцианин являются мажорными белками биомассы *A. platensis* и относятся к фикобиллипротеинам – светособирающим макромолекулам, поглощающим свет в той области видимого спектра, в которой хлорофилл имеет низкое поглощение [41]. Фикоцианин локализуется в фикобилисомах, супрамолекулярном белковом комплексе, который действует как антенна фотосинтетического аппарата на уровне тилакоидов, прикрепленная к тилакоидной мембране (рис. 1) [147].

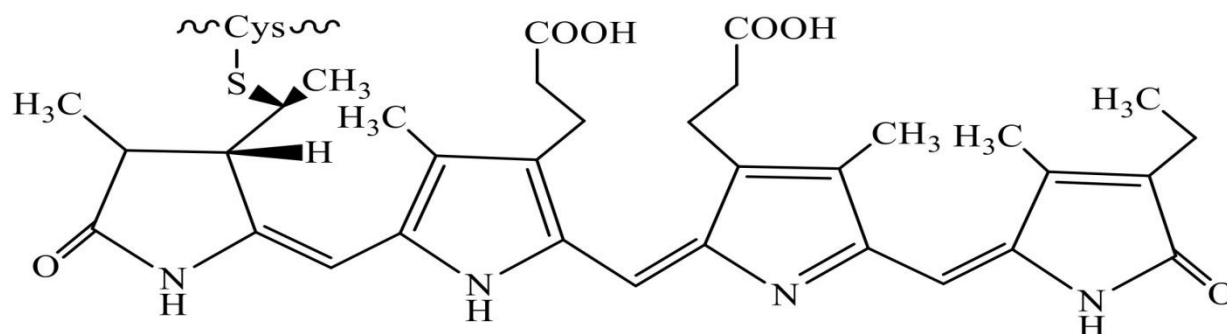


Примечание – Комплекс состоит из фикоэритрина (ФКЭ), фикоцианина (ФКЦ) и аллофикоцианина (А-ФКЦ), организованных для передачи энергии ( $h\nu$ ). ФС I и ФС II – фотосистемы I и II.

**Рисунок 1** – Структура фикобилисомы [41]

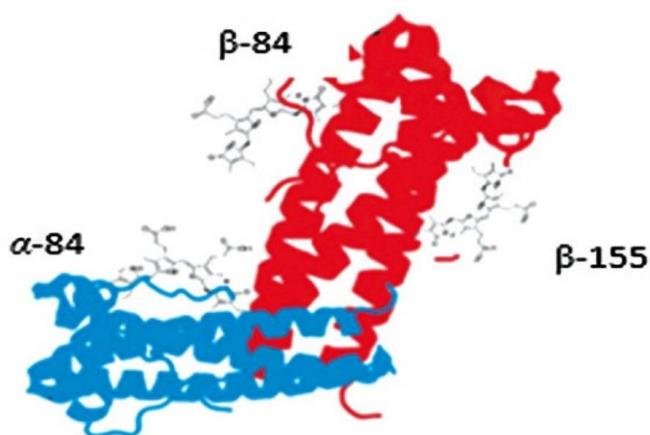
Антиоксидантная активность С-фикоцианина и аллофикоцианина, связанная с их способностью улавливать свободные радикалы, обусловлена в

первую очередь входящими в их состав – фикоцианобилинами - синими тетрапиррольными хромофорами (элементный состав  $C_{33}H_{38}N_4O_6$ ) (рис. 2) [56].



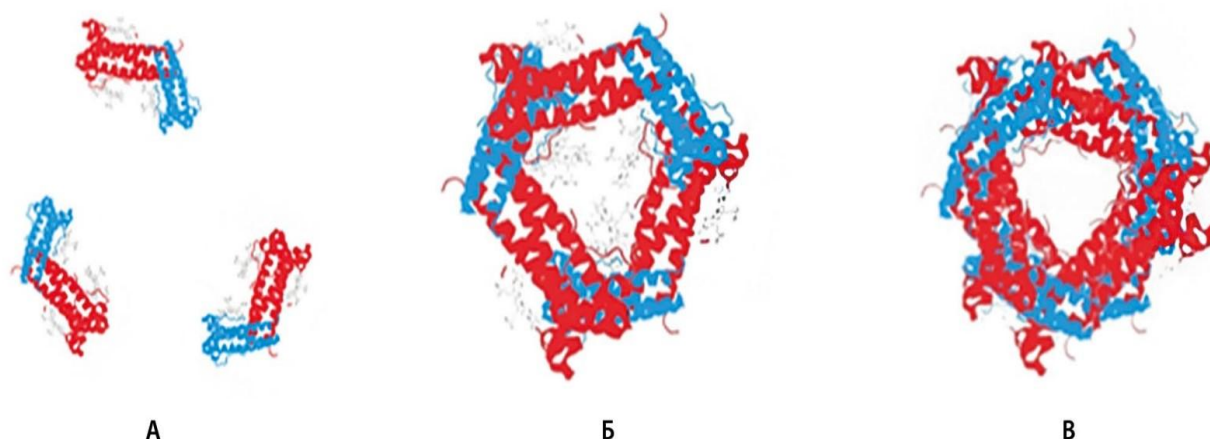
**Рисунок 2** – Структура фикоцианобилина [60]

С-фикоцианин состоит из двух белковых субъединиц, альфа ( $\alpha$ ) массой от 10 до 19 кДа и бета ( $\beta$ ) массой от 14 до 21 кДа, содержащих один и два фикоцианобилина, ковалентно связаны с цистеинами в положениях 84 ( $\alpha$ ), 84 и 155 ( $\beta$ ) (рис. 3) [60]. В растворе фикоцианин представляет собой сложную смесь тримеров, гексамеров и других олигомеров с молекулярной массой от 44 до 260 кДа (рис. 4). Фикоцианин стабилен в диапазоне pH от 4,5 до 8,0 и имеет максимум поглощения на длине волны 620 нм. Аллофикоцианин состоит из тримера ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> при нейтральном pH с молекулярной массой 110 кДа. Обе субъединицы  $\alpha$  и  $\beta$  содержат один хромофор фикоцианобилин. Длина волны максимального поглощения раствора аллофикоцианина составляет 650 нм. Фикоцианин чувствителен к теплу, pH и воздействию высоких температур [114].



Примечание – Синим и красным показаны полипептидные цепи, представляющие собой  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы соответственно. Черным выделены светопоглощающие хромофорные группы – фикоцианобилины. 84 ( $\alpha$ ), 84 и 155 ( $\beta$ )- места связывания фикоцианобилина с полипептидной цепью через остаток цистеина.

**Рисунок 3** – Субъединицы фикоцианина [41]



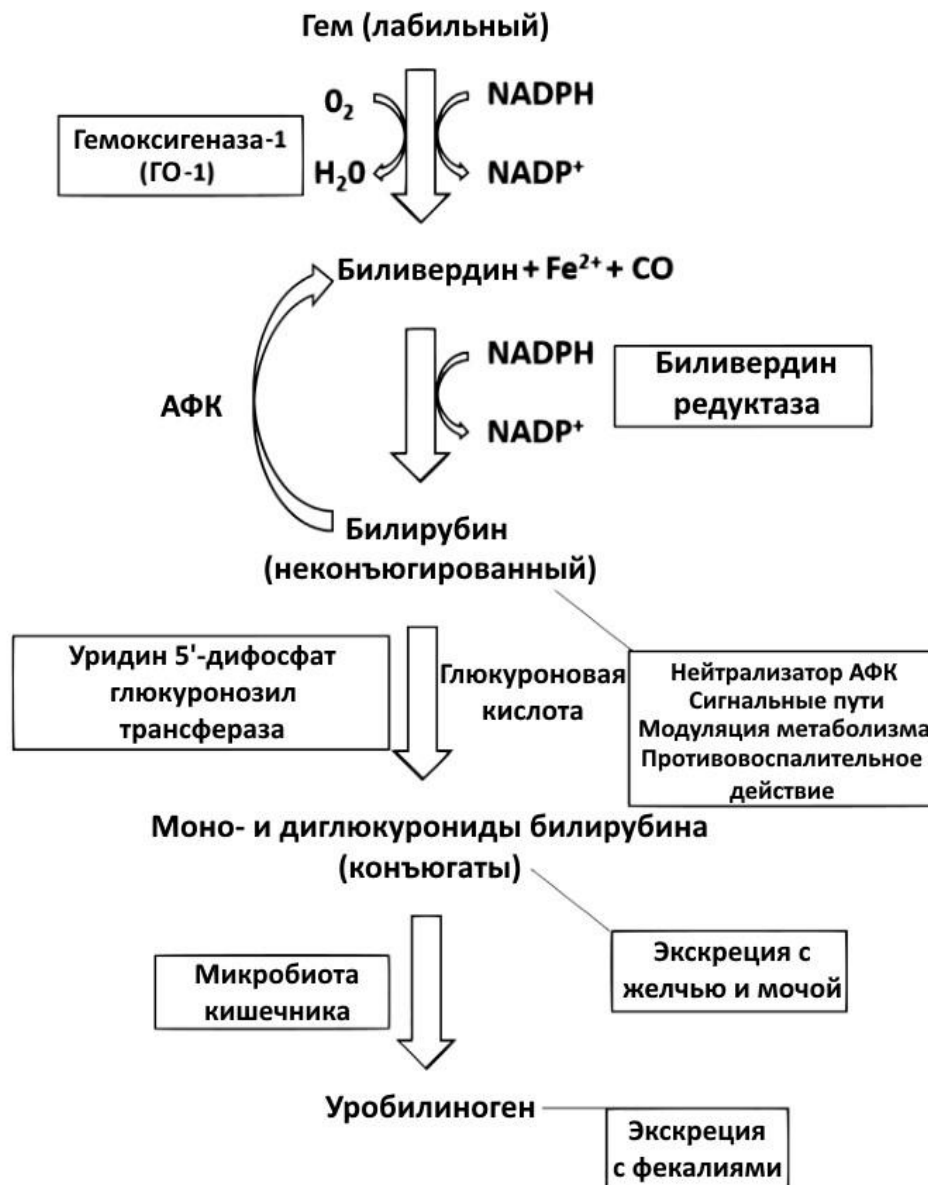
Примечание – А –  $\alpha\beta$ -димеры, состоящие из двух субъединиц; Б – тример  $(\alpha\beta)_3$ ; В – гексамер  $[(\alpha\beta)_3]_2$

**Рисунок 4** – Комплексы фикоцианина [41]

С-фикоцианин нейтрализует свободные радикалы (такие как супероксид, гидроксильный радикал, пероксид водорода, пероксильную группу радикала и молекулу хлорноватистой кислоты) и активные формы кислорода, подавляет экспрессию индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), снижает выработку нитритов и ингибирует перекисное окисление липидов в микросомах печени [92].

В работе [99] показано, что С-фикоцианин и фикоцианобилин улавливают неорганический токсин пероксинитрит, инактивирующий важные клеточные мишени, опосредуя окислительное повреждение ДНК. Аллофикоцианин также проявляет высокую антиоксидантную активность, более эффективно по сравнению с фикоцианином улавливая пероксильные радикалы [56].

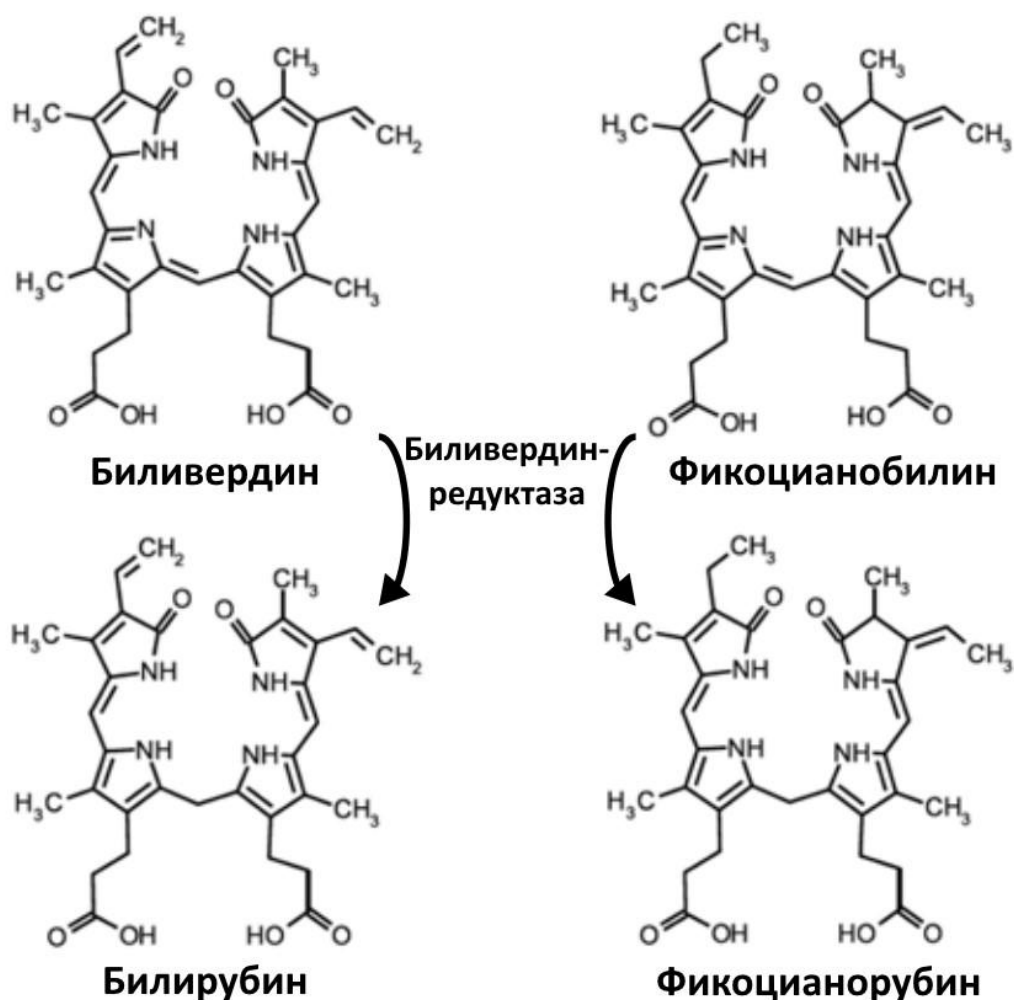
Фикоцианобилин, как уже отмечалось, является структурным аналогом биливердина и билирубина - эндогенных тетрапиррольных соединений участвующих в окислительно-восстановительном цикле, катализируемом гемоксигеназой 1 типа и биливердинредуктазой (рис. 5). Эти эндогенные антиоксиданты с противовоспалительными свойствами, способны влиять на течение атеросклеротических заболеваний, снижать ишемическое повреждение тканей, предотвращать окисление жирных кислот, транспортируемых альбумином [19, 77].



Примечание – Лабильная (безбелковая) гемовая группа катаболируется под действием фермента гемоксигеназы-1 (ГО-1) в биливердин, оксид углерода (CO) и Fe<sup>2+</sup>. Биливердин под действием фермента биливердинредуктазы может быть преобразован в билирубин. В противоположном направлении билирубин может производить биливердин посредством восстановления активных форм кислорода (АФК). Билирубин действует как эндогенный поглотитель АФК, опосредует сигнальные пути, участвует в модуляции метаболизма и оказывает противовоспалительное действие. В печени уридин 5'-дифосфат глюкуронозилтрансфераза катализирует конъюгацию билирубина с глюкуроновой кислотой, образуя гидрофильное производное для выделения с желчью и мочой. Микробиота кишечника может преобразовывать билирубин моно-идиглюкурониды в уробилиноген, который выделяется с калом.

**Рисунок 5** – Путь катаболизма гема у млекопитающих [118]

Фикоцианобилин в клетках млекопитающих под действием фермента биливердинредуктазы превращается в фикоцианорубин - соединение сходное с билирубином (рис. 6). Таким образом фикоцианобилин имитирует ингибирующую активность неконъюгированного билирубина по отношению к НАДФН-оксидазе и соответственно ингибирует образование активных форм кислорода в лизосомах [100]. Выявленный феномен объясняет многие выраженные антиоксидантные и противовоспалительные эффекты фикоцианинов [34, 98].



**Рисунок 6**—Схема метаболического пути биливердина и фикоцианобилина [100]

В опытах *in vitro* (эндотелиальные клетки линии EA.hy926) и *in vivo* с использованием мышей, дефицитных по аполипопротеину E, было показано, что фикоцианобилин активировал атеропротекторную гем-оксигеназу-1 (Hmox1), ключевой фермент ответственный за выработку билирубина, и оказывал модулирующее действие на маркеры окислительного стресса: эндотелиальную синтазу оксида азота (*eNOS*), субъединицу НАДФН оксидазы p22 (phox), сосудистый белок клеточной адгезии1 (VCAM-1) [137].

Антиоксидантные свойства фикоцианинов тестировали с использованием модели *ex vivo* изолированной перфузированной печени крыс, поврежденной ишемией/реперфузией. Было показано уменьшение повреждений печени вследствие снижения активности печеночных трансаминаз и щелочной фосфатазы, активированных окислительным стрессом [71].

Пероральное введение С-фикоцианина и фикоцианобилина предотвращает толерантность к морфину и гипералгезию у грызунов за счет эффективного улавливания свободных радикалов пероксинитрита и ингибирования НАДФН-оксидазных комплексов [99].

Антиоксидантные, иммуностимулирующие и противовоспалительные свойства С-фикоцианина установлены при использовании этого белка в дозе 200 мг/кг массы тела в течение 15 дней в качестве нейропротектора при моделировании энцефаломиелита у грызунов, индуцированного субплантарным введением энцефалитогена, выделенного из спинного мозга крыс линии Sprague Dawley [68].

Потребление крысами-альбиносами в течение 30 суток фикоцианина (50 мг/кг массы тела) и фикоцианобилина (в дозе 982 мкг/кг массы тела) приводило к более значимому снижению уровня атерогенных липидов и повышению уровня холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в сыворотке крови крыс со стрептозотоциновым диабетом по сравнению с изменениями при использовании суспензии биомассы *A. platensis* (50 мг/мл/кг массы тела) [61].

Пероральное введение С-фикоцианина, экстрагированного из биомассы *A. platensis*, в дозе 100 мг/кг массы тела 1 раз в сутки в течение 3 недель мышам



линии ККАу вызывало значительное снижение уровня глюкозы в плазме крови, снижение уровней общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови и в печени, а также улучшало чувствительность и секрецию инсулина, увеличивало синтез гликогена в печени и мышцах и тем самым регулировало метаболизм гликолипидов [113].

Гипохолестеринемическое действие С-фикоцианина *in vivo* подтверждает данные об ингибировании всасывания холестерина в тощей кишке и реабсорбции желчных кислот в подвздошной кишке крыс линии Вистар, получавших высокохолестериновую диету, при потреблении этими животными фикоцианина (3% от общего белка в рационе в течение 5 дней) [108].

Введение экстракта фикобилипротеинов в дозах 125 и 500 мг/кг массы тела ежедневно в течение 6 недель половозрелым крысам-самцам линии Sprague Dawley, получавшим высокожировой рацион, способствовало снижению набора массы тела, накопления липидных капель в тканях печени, уменьшению уровня в ней триглицеридов, общего холестерина и ЛПНП [88].

Таким образом, по сравнительно немногочисленным данным экспериментальных исследований *in vivo* внутрижелудочное введение достаточно высоких доз экстрактов биомассы *A. platensis*, содержащих в своем составе фикоцианины, оказывало благоприятные эффекты на организм животных при нарушениях углеводного, жирового и холестерина обмена.

### 1.3 Методы выделения и очистки фикоцианинов биомассы *Arthrospira platensis*

Неудовлетворительные органолептические свойства биомассы *A. platensis* (выраженный горький вкус) существенно ограничивают её применение в составе пищевых продуктов. Решением этой проблемы является широкое использование для пищевых целей концентратов фикоцианинов *A. platensis*. К тому же, как отмечается в работе [85] биодоступность пищевых веществ биомассы *A. platensis* значительно ограничена прочной клеточной стенкой, преимущественно состоящей из нерастворимых углеводов, в частности, полимеров глюкана и пептидогликана, в составе многослойной структуры, покрытой кислыми полисахаридами. Аминокислотные остатки соединяют углеводные цепи пептидогликанов, образуя пептидные связи в поперечных стенках *A. platensis*. Кроме того, клеточная стенка содержит нейтральные моносахариды и остатки уроновой кислоты в качестве полисахаридных компонентов.

Современные высокотехнологичные методы разрушения клеточных стенок и экстракции позволяют получать высокоочищенные белковые концентраты *A. platensis*, в которых биодоступность фикоцианинов существенно выше. В течение многих лет разрабатывались методические подходы, позволяющие получать экстракты этих фикобиллипротеинов с различными диапазонами выходов, степенью чистоты и различным содержанием фикоцианинов. Для пищевых целей степень чистоты концентратов фикоцианина, определяемая соотношением оптических плотностей их водных растворов при двух длинах волн, а именно  $OP_{620}/OP_{280}$ , должна быть выше 0,7 [65, 73]. Степень чистоты концентратов фикоцианинов выше 4,0 считается аналитической степенью чистоты [45, 134]. На полноту «перехода» фикоцианинов в экстракт и чистоту получаемого концентрата влияют условия проведения экстракции: продолжительность экстракции, состояние биомассы (сухая или влажная), тип растворителя, температура, соотношение биомасса/растворитель, физическая природа используемого воздействия. Получение экстрактов из биомассы *A. platensis*, так

или иначе, связано с нарушением на первом этапе целостности клеточных стенок. Для этой цели применяют механические воздействия, включающие ультразвуковую обработку, гомогенизацию, высокое давление, экстракцию с помощью стеклянных шариков и другие [31, 37, 91, 97, 144]. Также находят применение химический осмос, повторное замораживание-оттаивание, ферментативная обработка с использованием лизоцима [95, 121, 128, 129]. Химические методы, как правило, включают экстракцию с использованием соляной и уксусной кислот различной концентрации, буферных растворов со значениями pH 6,0- 7,0 [47, 91, 144]. Поскольку *A. platensis* имеет плотную клеточную стенку, эффективного разрушения клеток, более полной экстракции и получения концентрата фикоцианинов можно достичь, комбинируя, например, химическую экстракцию с фосфатным буфером и осаждение сульфатом аммония [74, 142, 155]. Комбинация ультрафильтрации, абсорбции углем и распылительной сушки, позволяет получать концентрат фикоцианина со степенью чистоты 0,74 с выходом 34% [74]. По результатам сравнительной оценки эффективности различных методов в работе [105] был предложен способ извлечения С-фикоцианина из влажной биомассы *A. platensis* с использованием ультразвукового воздействия и добавления в биомассу стеклянных шариков (для повышения эффективности разрушения клеток), что обеспечивало выход экстрагируемого продукта - 43,75 мг фикоцианина/г биомассы и содержание в экстракте С-фикоцианина 0,21 мг/мл. Этой же группой исследователей приводятся данные о получении водного экстракта С-фикоцианина из высушенной, замороженной и измельченной биомассы *A. platensis* с выходом 82,5 мг фикоцианина/г биомассы [104]. В работе [95] показано, что использование 0,05 ммоль/л аммония хлорида вместо фосфата натрия в качестве экстрагента при четырех последовательных повторных стадиях замораживания-оттаивания биомассы *A. platensis* повышает в два раза чистоту экстракта фикоцианина. В последнее время на смену чисто механическому разрушению клеток биомассы *A. platensis* посредством трения используются методы нарушения клеточной стенки при воздействии импульсных электрических полей (ИЭП), ультразвукового и

микроволнового воздействий. Преимущество использования для экстракции фикоцианина из свежей биомассы *A. platensis* воздействия ИЭП по сравнению с механическим разрушением клеток в водной среде продемонстрировано в работе [97]. Экстракт С-фикоцианина, полученный при воздействии на биомассу ИЭП имел чистоту в 2,5 раза выше, чем полученный с использованием метода полного механического разрушения клеток бисерной мешалкой:  $(0,51 \pm 0,021)$  и  $(0,21 \pm 0,013)$ , соответственно. Ультразвуковое воздействие ускоряет разрыв клеточной стенки, путем прямого осмоса, существенно сокращая время экстракции, и его использование вместе с другими методами предварительной обработки сопровождается синергетическим эффектом, приводящим к увеличению выхода экстрагируемого вещества. Так ультразвуковое воздействие плюс «замораживание и оттаивание» привело к самой высокой эффективности экстракции фикоцианина (92,08%), а сочетание обработки ультразвуком и мацерации привело к более чем 84% выходу фикоцианина в экстракт [142]. В этом же исследовании было показано, что этап предварительного замачивания (120 минут) биомассы *A. platensis*, значительно повышал эффективность всех использованных методов экстракции. В работе [144] проведена сравнительная оценка эффективности ультразвукового и микроволнового методов воздействия на биомассу *A. platensis* в процессе экстракции С-фикоцианина. При использовании микроволнового метода содержание С-фикоцианина в экстракте составило 4,54 мг/мл при чистоте 1,27, а при использовании ультразвукового воздействия содержание С-фикоцианина в экстракте было равным 2,84 при чистоте 0,65 (то есть в 2 раза ниже).

В подавляющем большинстве исследований для получения концентратов фикоцианинов из биомассы *A. platensis*, экстракцию сочетают с последующими фракционными сульфатно-аммонийными осаждениями белка [74, 76, 149, 155]. В работе [64] отмечено, что применение такого способа увеличивает степень чистоты фикоцианина из биомассы *A. platensis* на 47% и составляет 1,43. Схожие результаты были получены и в другой работе, где коэффициент чистоты экстракта фикоцианина увеличился с 0,85 до 1,26 (48%) при очистке с

использованием сульфата аммония [149]. Сульфатно-аммонийное осаждение белков из экстрактов *A.platensis* позволяет примерно в 2-3 раза повысить на этой стадии степень чистоты получаемого промежуточного продукта [76, 149]. Тем не менее, следует отметить относительную не технологичность и достаточно высокую трудоемкость стадий сульфатно-аммонийного осаждения, требующих дополнительное растворение осадков и последующее обессоливание растворов.

Современные методические подходы с использованием мембранной технологии позволяют в значительной степени интенсифицировать и упростить процесс получения белковых концентратов. В работе [54] степень чистоты экстракта фикоцианина, полученного с использованием метода ультрафильтрации через мембраны с размерами пор 50 кДа, 70 кДа и 100 кДа составила 1,11, 1,03 и 1,08 соответственно, что в среднем в два раза выше по сравнению с исходной чистой (0,54). Сочетание многократной двухфазной экстракции (смесью полиэтиленгликоля и буферного раствора фосфата калия) и ультрафильтрации через мембрану с размером пор 30 кДа увеличило степень чистоты экстракта фикоцианина от 0,74 до 1,5 [117]. Схожие результаты были получены и в другой работе, где степень чистоты экстракта фикоцианина увеличилась с 0,42 до 2,75 при использовании ультрафильтрации (мембрана с размером пор 50 кДа) [110]. Дальнейшее одностадийное осаждение сульфатом аммония (50% насыщения) после стадии ультрафильтрации повысило степень чистоты с 2,75 до 3,26.

Получение высокоочищенных концентратов фикоцианинов в большинстве исследований сочетает стадии экстракции, сульфатно-аммонийного осаждения с хроматографическим выделением белка с помощью ионообменной и гель-хроматографии, а также с использованием гидрофобных сорбентов [78, 82, 87, 135]. В работе [116] были представлены результаты сравнительной экспериментальной оценки эффективности четырех различных методов выделения и очистки фикоцианинов из биомассы *A. platensis* (включающих стадии экстракции, сульфатно-аммонийного осаждения, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации), а также предложен и осуществлен эффективный метод получения высокоочищенного препарата С-фикоцианина:

фактор очистки равен 6,35 и чистота равна 4. Извлечение и очистка фикоцианинов из биомассы *A. platensis* с использованием хитозана и активированного угля (в качестве адсорбентов примесей) с последующей одноступенчатой ионообменной хроматографией на ДЕАЕ сефадексе позволили получить высокоочищенный препарат с чистотой равной 4,3 [87]. В исследовании [82] был также разработан относительно простой метод выделения и получения, высокоочищенных фикоцианинов (чистота 4,5) с последовательными стадиями размораживания и оттаивания биомассы *A. platensis*, сульфатно-аммонийным осаждением и одностадийной хроматографией на ДЕАЕ целлюлозе. Многостадийный метод для получения в значительных количествах высокоочищенных фикоцианинов из высушенной биомассы *A. platensis* был использован в работе [135]. Высушенный порошок биомассы обрабатывали лизоцимом, клетки разрушали с использованием гомогенизатора высокого давления, экстракт осаждали 50% насыщенным сульфатом аммония. Дальнейшую очистку вели хроматографическими методами с использованием гидрофобной хроматографии на фенилсефарозе 6 FF, ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-сефарозе FF и гель фильтрации через Sephacryl S-100 HR. Чистота полученного препарата составила 5,32.

Таким образом, не существует единого стандартного метода, подходящего для выделения и очистки фикоцианинов из биомассы *A. platensis*. Огромное разнообразие разрабатываемых методов экстракции и последующих стадий очистки фикоцианинов преследует целью за минимальное количество стадий очистки получить концентрат с высоким содержанием фикоцианинов, степенью чистоты и высоким выходом.

#### 1.4 Моделирование нарушений углеводного и липидного обмена в опытах *in vivo* на грызунах

Нарушение регуляции как углеводного, так и липидного обмена повышает риск развития сердечнососудистых заболеваний, диабета 2 типа, ожирения, неалкогольной жировой болезни печени, атеросклероза, гиперлипидемии и дислипидемии [57, 66,120].

Для корректной экспериментальной оценки гиполипидемических и гипогликемических свойств биологически активных веществ, функциональных пищевых ингредиентов и специализированных пищевых продуктов и получения достоверных результатов требуется подбор соответствующей биомодели, воспроизводящей клинические, биохимические и морфологические нарушения в организме, характерные для данных нарушений. Оценка соответствия экспериментальной модели *in vivo* её целевому назначению предполагает наличие системы доказательств, свидетельствующих о том, что с определенной степенью вероятности результаты, полученные на лабораторных животных, могут быть экстраполированы на человека [33, 107]. Степень применимости модели в значительной мере определяется сочетанием выявляемого максимального числа изменений таких как: избыточная масса тела, абдоминальное ожирение, гипергликемия, инсулиновая и лептиновая резистентность, дислипидемия, неалкогольная жировая болезнь печени и другие.

При моделировании нарушений углеводного и липидного обмена у лабораторных грызунов применимы несколько альтернативных подходов. Во-первых, использование мутантных или нокаутных по отдельным ключевым генам липидного и углеводного обмена животных (генетические модели) [96, 125, 150]. Во-вторых, использование животных с нарушениями углеводного обмена, индуцированными введением таких химических соединений как аллоксан, стрептозотозин, дитизон и других, что приводит к деструкции панкреатических бета-клеток островков Лангерганса (медикаментозные модели) [25, 46, 69]. В-третьих, кормление животных обычных инбредных/аутбредных линий рационами

с несбалансированным соотношением растительных и животных жиров и простых углеводов, а также с повышенным содержанием холестерина (диет-индуцированные модели) [53, 89, 119].

Одним из главных преимуществ генетических моделей является быстрота их воспроизведения и воспроизводимость получаемых результатов, поскольку нарушения, как правило, быстро и спонтанно развиваются у этих животных уже при потреблении стандартного сбалансированного рациона. Однако, несмотря на это механизмы их развития, основанные на дефекте одного-единственного гена или совокупности нескольких генов, отвечающих за определенные звенья метаболизма (рецепция и обмен лептина, инсулина, липопротеинов), как правило, не соответствуют развитию нарушений у человека. Эти модели отличает высокая стоимость генетических линий животных, трудоёмкость воспроизведения модели, специальные условия ухода и высокая степень инбридинга [25]. Использование медикаментозных моделей также не может удовлетворительно отражать процесс развития заболеваний и в подавляющем большинстве случаев приводит к необратимым нарушениям метаболизма или к летальному исходу. В случае, когда речь идёт об алиментарной профилактике или коррекции нарушений углеводного и липидного обмена, при разработке экспериментальной модели необходимо учитывать, что наблюдаемые изменения в состоянии животных должны быть в потенциально обратимом диапазоне и поддаваться профилактике/коррекции введением в рацион биологически активных веществ пищи, функциональных пищевых ингредиентов, а также специализированных пищевых продуктов. К недостаткам диетического подхода индуцирования нарушений углеводного и липидного обмена относят длительность периода вскармливания животных для развития данных нарушений. При этом развитие нарушений углеводного и липидного обмена у людей в большинстве случаев происходит под действием совокупности факторов, из которых наибольшую роль играет нерациональное питание: избыточное потребление жиров, особенно насыщенных жирных кислот, источников холестерина, и простых углеводов (сахароза и фруктоза), и как следствие избыточная калорийность рациона. Ввиду этого в экспериментальных



исследованиях нарушений углеводного и липидного метаболизма широко применяются модели, воспроизводимые путем кормления животных подобными рационами.

Как показывает анализ результатов экспериментальных исследований *in vivo*, преимущественно используемыми являются несколько методических подходов, состоящие в кормлении лабораторных грызунов: во-первых, рационами с избыточным содержанием жира, превышающим физиологическую потребность; во-вторых, рационами с добавлением экзогенного холестерина без или с изменением жирового компонента; в-третьих, введением в рацион добавочных количеств простых углеводов (чаще всего фруктозы, сахарозы) в виде добавки к диете или путем замены питьевой воды раствором простых углеводов; в-четвертых, комбинацией первых трех подходов.

Во многих исследованиях использованы высокожировые рационы с содержанием жира по калорийности от 20% до 60%. Источником жирового компонента являлись растительные масла (например, кокосовое или оливковое масло), либо животные жиры (например, говяжий или свиной жир) [103, 115, 131]. Длительное кормление высокожировыми рационами, обогащенными как жирами животного, так и растительного происхождения, по окончании экспериментов приводило к развитию гипергликемии и гиперлипидемии, нарушению толерантности к глюкозе и развитию неалкогольной жировой болезни печени у крыс и мышей. Так в работах [141, 148] показано, что у мышей линии C57BL/6J (возраст 8 недель), получавших в течение 8 недель высокожировой рацион с содержанием свиного жира 60% по калорийности, увеличивались масса тела, уровень триглицеридов и общего холестерина в плазме крови, развивался стеатоз печени и резистентность к инсулину.

В работе [50] потребление крысами самцами линии Вистар (возраст 6 недель) в течение 12 недель высокожировых рационов с содержанием жира 42% по калорийности (жировой компонент представлен в виде свиного жира, кокосового и оливкового масла), приводило к увеличению массы тела, накоплению триглицеридов в печени, триглицеридов, свободных жирных кислот

и инсулина в плазме крови животных. При этом у животных, потреблявших рационы, содержащие свиной жир и оливковое масло развивалась инсулинорезистентность. При потреблении крысами линии Вистар (массой  $180 \pm 20$  г) высокожирового рациона с содержанием жира 42% по калорийности (в виде говяжьего жира) в течение 12 недель показано увеличение уровня глюкозы, инсулина, свободных жирных кислот, общего холестерина, ЛПВП и ЛПНП, а также триглицеридов в сыворотке крови, увеличение массы тела, висцерального жира и массы печени, а также увеличение концентрации МДА в сыворотке и в печени животных [143].

При введении в рацион животных избыточных количеств простых углеводов (чаще всего фруктозы, сахарозы) так же отмечено развитие нарушений липидного и углеводного обмена, а именно: увеличение массы тела, уровня глюкозы в сыворотке крови, развитие инсулинорезистентности, увеличение содержания триглицеридов и холестерина [3, 101, 139, 152].

Потребление стандартного рациона с добавкой 20% фруктозы к питьевой воде крысами самцами линии Вистар (масса тела 250-300 г) в течение восьми недель приводило к увеличению массы тела, содержания триглицеридов в плазме крови и гипертрофии адипоцитов жировой ткани [94]. Авторы другого исследования [93] также отмечают, что введение 10% фруктозы в питьевую воду при потреблении стандартного рациона крысами самцами линии Вистар (масса тела 140–160 г) в течение 12 недель повышает массу тела, уровень глюкозы, инсулина и общего холестерина в сыворотке крови, а также приводит к накоплению МДА и глутатиона в тканях аорты и развитию инсулинорезистентности.

Одной из распространенных моделей нарушения углеводного и липидного обмена является сочетание в рационе животных высокого содержания углеводов и жиров. При этом отмечается повышение массы тела, отложение жира в брюшной полости, гиперинсулинемия, гипергликемия, гиперлептинемия и развитие неалкогольной жировой болезни печени у животных [4, 47, 84, 106].

Так в работе [130] на крысах самцах Sprague-Dawley (весом 220–250 г) было показано, что потребление рациона с высоким содержанием жиров и углеводов (40% свиного жира по калорийности и 15% раствора фруктозы) в течение 16 недель приводило к увеличению массы тела, повышению уровня глюкозы, триглицеридов, общего холестерина в сыворотке крови, накоплению супероксиддисмутазы (СОД) и МДА в плазме крови и снижению ЛПВП в сыворотке крови, а также развитию глюкозотолерантности и инсулинорезистентности. У крыс линии Вистар (возраст 6 недель), потреблявших высокожировой рацион (38% по калорийности, жир в виде свиного сала) и фруктозы (20% по калорийности) в течение 8 недель, увеличилось в сыворотке крови содержание триглицеридов, общего холестерина, инсулина и развилась инсулинорезистентность, при этом рацион не влиял на уровень ЛПВП [70].

При потреблении самцами мышей линии C57BL/6 (возраст 5 недель) высокожирового рациона (45% свиного жира) и питьевой воды с 30% фруктозой в течение первых 8 недель отмечено увеличение массы тела, уровня глюкозы, триглицеридов, общего холестерина и ЛПНП в плазме крови. При гистологическом анализе печени по окончании эксперимента через 8 месяцев выявлено накопление жира в печени и развитие неалкогольной жировой болезни печени [59].

Одним из современных подходов к моделированию нарушений углеводного и липидного обмена является использование рационов с добавлением экзогенного холестерина (0,2% - 2%) [14, 83, 86]. Данные о нарушениях липидного обмена представлены в работе [1], свидетельствующие о повышении общего холестерина и ЛПНП в крови и жировой дистрофии печени у крыс линии Вистар (масса тела 120-130г), потреблявших в течение 63 суток стандартный полусинтетический рацион с добавкой 0,5% холестерина. В работе [154] введение 2% холестерина в состав высокожирового рациона (содержание жира 40% по калорийности в виде кукурузного масла) мышам линии C57BL/6N (6-8 недель) в течение 24 недель приводило к воспалению печени и развитию фиброза. Авторы исследования [80] также отмечают, что введение 2% холестерина в составе высокожирового рациона

(содержание жира 40% по калорийности) мышам линии АІМ повышало уровни сывороточного холестерина, ЛПНП и приводило к развитию стеатоза печени через 12 недель, и к повышению уровней АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы и развитию стеатогепатита и фиброза печени через 24 и 60 недель эксперимента.

Потребление высокожирового рациона (20% животного жира) с добавлением 1% холестерина крысами самцами линии Вистар (возраст 7-8 недель) приводило к увеличению общего холестерина, ЛПНП, триглицеридов и снижению ЛПВП в сыворотке крови, и увеличению массы тела животных через 30 дней эксперимента [153].

При введении в высокожировой рацион (60% кокосового жира по калорийности) 1,25% холестерина и 0,5% хелевой кислоты у крыс-самок линии Sprague-Dawley (возраст 4 недели) на 16 неделе кормления показано увеличение прироста массы тела, уровня АСТ, АЛТ и общего холестерина в сыворотке крови, накопление жира, триглицеридов и холестерина в печени [127].

В работе [75] половозрелых крыс линии Sprague–Dawley (6 недель) кормили стандартным рационом, содержащим 1% холестерина и 0,5% хелевой кислоты в течение 4 недель. По окончании эксперимента в сыворотке крови животных отмечены повышенные концентрации общего холестерин, ЛПНП и увеличение уровней триглицеридов и общего холестерина в печени.

Анализ данных, полученных в экспериментах на лабораторных грызунах свидетельствует, что из-за различий не только в используемых рационах, в возрасте животных, а также длительности кормления могут проявляться изменения липидного и углеводного обмена, характеризуемые различной степенью выраженности (и различными биомаркерами), выявляемые в одних моделях и отсутствующие в других. Соответственно актуальны исследования, направленные на сравнительную оценку применимости моделей на крысах-самцах Вистар различного возраста позволяющих с позиции доказательной медицины характеризовать нарушения липидного, холестеринового и углеводного обмена.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1 Характеристика используемых материалов

Сухая биомасса (хлопья) *A. platensis* (производства НПО «Биосоляр МГУ») получена культивированием в закрытой теплице под искусственным освещением, собрана, сконцентрирована, промыта и высушена до состояния порошка. Содержания белка 70%, жира 6%, углеводов 15%, влажность 5,0%, содержание фикоцианинов 10%.

#### 2.2 Аналитические методы исследования

**Содержание С-фикоцианина и аллофикоцианина** в анализируемых образцах количественно оценивали, определяя оптическую плотность при длинах волн 620 нм и 655 нм (спектрофотометр «Biowave II», Англия)) и используя для расчета формулы 1 и 2 согласно [16]:

$$\text{Содержание С-ФКЦ} = \frac{(0,154 \cdot \text{ОП}_{620} - 0,1 \cdot \text{ОП}_{655})}{m \cdot (1-k) \cdot l} \cdot V \cdot 100\% \quad (1)$$

$$\text{Содержание А-ФКЦ} = \frac{(0,194 \cdot \text{ОП}_{655} - 0,034 \cdot \text{ОП}_{620})}{m \cdot (1-k) \cdot l} \cdot V \cdot 100\% \quad (2),$$

где  $V$  — объём объединённого образца, см<sup>3</sup>;

$m$  — масса навески, мг;

$k$  — массовая доля воды в пробе;

$l$  — длина оптического пути, см.

**Степень чистоты** образцов рассчитывали по соотношению удельных оптических плотностей их растворов при длинах волн 620 нм и 280 нм (ОП<sub>620</sub>/ОП<sub>280</sub>).

**Молекулярно-массовое распределение белковых и пептидных фракций**<sup>1</sup> в образцах проводили с использованием эксклюзионной жидкостной хроматографии высокого давления. Анализ проводили на колонке TSK GEL 2000 SW<sub>lx</sub> (0.8\*30см Toyo Soda, Япония), откалиброванной по стандартным водорастворимым глобулярным белкам («SERVA», Германия). Предварительно 1,0%-ный водный раствор образцов центрифугировали в течение 15 мин при 15000 об/мин (центрифуга «IKA G-L», Германия) и наносили на колонку в количестве 100 мкм<sup>3</sup>. В качестве элюента использовали 0,2 М раствор NaCl с добавлением азида натрия, скорость элюирования 0,25 см<sup>3</sup>/мин. Оптическую плотность элюируемого раствора определяли при двух длинах волн 280 нм и 620 нм, используя спектрофотометрический однолучевой проточный детектор «UV/VIS-151» (GILSON, США).

**Массовую долю белка**<sup>2</sup> в образцах определяли методом Кьельдаля с использованием анализатора белка автоматического (Кьельтек 8400, Tecator Line, Foss, Китай) в соответствии с ГОСТ 26889-86 «Продукты пищевые и вкусовые. Общие указания по определению содержания азота методом Кьельдаля».

**Массовую долю влаги** в образцах определяли термографическим методом на анализаторе влажности (MJ33, Mettler Toledo, Швейцария).

---

<sup>1</sup> Выполнено совместно со старшим научным сотрудником лаборатории пищевых биотехнологий и специализированных продуктов к.б.н. Зориным С.Н.

<sup>2</sup> Выполнено инженером-исследователем 2-й категории лаборатории оценки безопасности биотехнологий и новых источников пищи Пашориной В.А.

## 2.3 Концентраты фикоцианинов биомассы *Arthrospira platensis*: модифицированные методы получения

Разработаны и последовательно модифицированы пять технологических подходов к получению высокоочищенных концентратов фикоцианинов *A. platensis* в лабораторных условиях.

Первый вариант технологического («традиционного») подхода к получению концентрата фикоцианинов *A. platensis* включал на начальной стадии предварительное измельчение в лабораторном блендере («WARING», США) 80 г биомассы *A. platensis* до порошкообразного состояния (с размерами частиц менее 0,5 мм) с последующей экстракцией 800 мл 0,1М калий фосфатного буфера pH 7,0, предварительно охлажденного до + 4°C. Экстракцию проводили в течение 8 часов при температуре +4°C, при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Затем образовавшуюся суспензию центрифугировали (центрифуга Beckman J-6В, США) при 4000 об/мин в течение 30 мин. Супернатант отделяли от осадка методом декантирования, повторно экстрагировали осадок по аналогичной схеме и экстракты объединяли. Далее к объединенному экстракту добавляли ¼ объема насыщенного водного раствора сульфата аммония (75 г на 100 мл воды). Смесь выдерживали 1ч при температуре +4°C, после чего центрифугировали при +4°C в течение 1 ч при 4000 об/мин. Осадок отбрасывали, а к супернатанту добавляли насыщенный раствор сульфата аммония в объеме, составлявшем 120% от объема исходного объединенного экстракта. Смесь выдерживали 1ч при температуре +4°C, после чего центрифугировали при +4°C в течение 1 ч при 4000 об/мин. Осадок растворяли в минимальном объеме дистиллированной воды и проводили ультрафильтрацию в тангенциальном потоке через мембрану с диаметром пор 30 кДа со сбором высокомолекулярной фракции и ее последующем обессоливании на этой же мембране на установке «МИНИТАН» (Производство Millipore, США). Полученный ультрафильтрат (высокомолекулярная фракция) лиофильно высушивали (лиофильная сушка ЛС-500, «ПРОИНТЕХ, РФ) и получали концентрат 1.

Второй вариант получения концентрата фикоцианинов *A. platensis* включал экстракцию биомассы *A. platensis* проведенную, также как и в первом эксперименте. Затем, исключив стадию сульфатно-аммонийного осаждения, полученный после центрифугирования суспензии биомассы *A. Platensis* объединенный супернатант подвергали ультрафильтрации в тангенциальном потоке через мембрану с диаметром пор 30 кДа со сбором высокомолекулярной фракции и получали концентрат 2.

В третьем методе по получению высокоочищенного концентрата фикоцианинов экстракцию предварительно измельченной биомассы *A. platensis* проводили в течение 3 часов при температуре +40°C на водяной бане при постоянном перемешивании. Образовавшуюся суспензию центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 мин. Супернатант отделяли от осадка методом декантирования, повторно экстрагировали осадок по аналогичной схеме и экстракты объединяли. Объединенный экстракт непосредственно подвергали ультрафильтрации в тангенциальном потоке через мембрану с диаметром пор 30 кДа на установке для микро- и ультрафильтрации на базе фильтродержателя АСФ-018 («Владисарт», РФ). Удаляли пермеат, содержащий низкомолекулярные примеси, и обессоливали на этой же мембране отобранный ретентат. Для дополнительной очистки ретентата от оставшихся в его составе высокомолекулярных примесей проводили микрофильтрацию в тангенциальном потоке через мембрану с размерами пор 0,2 мкм на той же установке. Отобранный микрофильтрат концентрировали обратным осмосом на установке с фильтром рулонным мембранным УРФ-1812 («Владисарт» РФ) и лиофильно высушивали, получая концентрат 3.

В четвертом методе получения высокоочищенного концентрата фикоцианинов экстракцию биомассы *A. platensis* проводили, также как и в третьем эксперименте, а затем объединенный экстракт подвергали микрофильтрации в тангенциальном потоке через мембрану с размерами пор 0,2 мкм с последующим промыванием мембраны водой и концентрированием обратным осмосом и получали пермеат 1. Ретентат был повторно



микрофильтрован по вышеприведенной схеме и получен пермеат 2. Объединенный пермеат (1 и 2) подвергали ультрафильтрации в тангенциальном потоке через мембрану с размерами пор 50 кДа и обессоливали на этой же мембране отобранный ретентат. Полученный обессоленный ретентант лиофильно высушивали, получая концентрат 4.

В завершающем (пятом) варианте в качестве исходного объекта для получения наиболее высокоочищенного продукта использовали концентрат 4, который был, подвергнут ионообменной хроматографии на ФЛЕШ хроматографе «Biotage Isolera» (производство Швеция) со встроенным коллектором фракций. На колонку (2,5×35см), заполненную гелем ДЭАЭ-сефарозы (производства «Pharmacia» Швеция), наносили 400 мг концентрата 4 в объеме 20 см<sup>3</sup> 0,05М уксуснокислого натрия рН 5,2 с 0,05М хлоридом натрия. Элюирование проводили раствором 0,05М уксуснокислого натрия рН 5,2 с возрастающей линейно концентрацией хлорида натрия от 0,05 до 1,0М (общий объем элюента 240 см<sup>3</sup>). Скорость элюирования составляла 2,0 мл/мин. Собирали фракции объемом по 8,0 см<sup>3</sup> элюата и измеряли значения его оптической плотности при длинах волн 280 нм и 620 нм (спектрофотометр «Biowave II», Англия). Степень чистоты образцов рассчитывали по соотношению удельных оптических плотностей их растворов при длинах волн 620 нм и 280 нм (ОП620/ОП280). Отбирали и объединяли фракции растворов со степенью чистоты не менее 3,0. Объединенный продукт обессоливали ультрафильтрацией в тангенциальном потоке через мембрану с размером пор 30 кДа (установка «МИНИТАН», производство «МИЛЛИПОР», США) и лиофильно высушивали, получая конечный продукт-концентрат 5.

## 2.4 Биохимические методы исследования

Проводили **общий биохимический анализ сыворотки крови крыс<sup>3</sup>** на автоматическом биохимическом анализаторе «Konelab 20i» (Thermo Fisher Scientific, США) и определяли показатели белкового обмена (общий белок, глобулины, альбумины, мочевины), липидного обмена (общий холестерин, холестерин ЛПВП, холестерин ЛПНП, триглицериды), пуринового обмена (мочевая кислота), функционального состояния печени (общий билирубин, АЛТ, АСТ, щелочная фосфатаза), минерального обмена (фосфор, магний, кальций) и уровень глюкозы.

Для **определения гликированного гемоглобина** кровь отбирали непосредственно в пробирку с заранее добавленным антикоагулянтом. Содержание гликированного гемоглобина определяли спектрофотометрически с использованием коммерческого набора «Гликогемотест» (ЭЛТА, Россия). Метод основан на принципе аффинного разделения гликированной и негликированной фракции гемоглобина гемолизата крови на сорбенте с привитой 4-аминометилфенилбороновой кислотой.

**Содержание триглицеридов (ТГ) и холестерина (ХС) в жире**, экстрагированном из печени, определяли спектрофотометрически на автоматическом биохимическом анализаторе Konelab 20i (ThermoScientific, США). Жир экстрагировали из печени по методу Фолча [40, 102]. К навескам лиофилизированной печени массой не более 3г добавляли смесь хлороформа с метанолом (2:1) в соотношении 1/10. Образцы перемешивали в течение 1,5 часов, затем дополнительно вносили дистиллированную воду в объеме 1/3 от объема растворителя, после чего смесь центрифугировали при 3500 об/мин в течение 5 мин. Жир, растворенный в хлороформе, отбирали в предварительно взвешенные колбы. После этого в пробирки добавляли хлороформ в объеме 1/3 от исходного объема растворителей, центрифугировали при 3500 об/мин в течение 5 мин и повторно переносили в колбы жир, растворенный в хлороформе. Получившиеся

---

<sup>3</sup> Выполнено научным сотрудником лаборатории энзимологии питания к.м.н. Гусевой Г.В.

объединенные экстракты жира упаривали на роторном испарителе до полного удаления хлороформа. Колбы с осевшим на стенках жиром помещали в муфельную печь при 80°C на 15 мин. После остывания, колбы взвешивали и по разнице с исходной массой определяли массу экстрагированного жира. Перед непосредственным анализом, навеску жира предварительно растворяли в 95% этаноле в концентрации 2,5 мг/мл [132].

В сыворотке крови методом твердофазного **иммуноферментного анализа (ИФА)**<sup>4</sup> «сэндвич» - методом определяли содержание лептина, инсулина, С-пептида, каталазы, глутатионпероксидазы, гидроперекисей и ИФА конкурентным методом определяли содержание грелина, супероксиддисмутазы, малонового диальдегида с использованием коммерческих ИФА наборов по инструкциям производителя (Cloud-Clone Corp, США; Elabscience, Китай; FineTest, Китай).

**Общий гематологический анализ крови**<sup>5</sup> проводили с использованием ветеринарного гемоанализатора Boule Exigo H400 (Boule, Швеция). Цельную кровь отбирали в пробирки с привитым К2ЭДТА на стенках и тщательно перемешивали, чтобы избежать сворачивания крови. Затем проводили измерение на приборе. Анализатор оснащен пробоотборником, который отбирает 200 мкл цельной крови для анализа. Принцип измерений в анализаторе Exigo H400 основан на измерении импеданса (общего сопротивления) и спектрофотометрии.

---

<sup>4</sup> Выполнено совместно со старшим научным сотрудником лаборатории пищевых биотехнологий и специализированных продуктов к.б.н. Сидоровой Ю.С.

<sup>5</sup> Выполнено совместно с научным сотрудником лаборатории пищевых биотехнологий и специализированных продуктов к.б.н. Петровым Н.А.

## 2.5 Физиологические методы исследования

Для **определения концентрации глюкозы** у животных отбирали кровь из хвостовой вены, уровень глюкозы определяли с помощью портативного электрохимического глюкометра («OneTouchSelect», США).

Для определения чувствительности тканей к инсулину применяли **тест на инсулинорезистентность (ИРТ)**. Животным всех экспериментальных групп вводили инсулин внутривенно в дозе 0,75 U/кг массы тела. Объем введения определялся индивидуально для каждого животного, учитывая последнее значение массы тела. Измеряли уровень глюкозы крови до введения раствора инсулина (0 точка) и через 30, 60, 120 и 180 минут. Строили кривые зависимости уровня глюкозы от времени после введения инсулина, определяли значение площади под кривой (ППК ммоль/л\*180 мин).

Для оценки общей двигательной активности, исследовательского поведения и эмоциональности в **тесте «Открытое поле» (ОП)** животное помещали в незнакомое открытое пространство, из которого оно не может выбраться. Незнакомая среда запускает сложный набор поведенческих реакций, отражающих тревожность и стремление исследовать новую территорию. Установка ОП представляет собой квадратную арену с длиной сторон 90 см, окруженную непрозрачными стенками высотой 40 см. Тестирование проводили в стандартных условиях освещенности, в течение 3 минут. В ходе тестирования регистрировали следующие поведенческие показатели: количество пересеченных зон, время, проведенное в каждой зоне, пройденную дистанцию. Перемещение животных по полю регистрировали с помощью системы видеонаблюдения «Smart 3.0.04» («Panlab Harvard Apparatus», Испания) [132].

**Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ)** позволяет оценить степень выраженности эмоциональной реакции страха и тревоги, двигательную активность, скорость ориентировочных реакций. Установка ПКЛ состоит из двух противоположных рукавов (45см×10см), пересекаемых двумя противоположными закрытыми рукавами того же размера со стенкой высотой 50

см. Лабиринт находится на высоте 65 см от пола. Время пребывания животного в лабиринте составляло 5 мин. При тестировании регистрировали число заходов и время пребывания в закрытых (ЗР) и открытых рукавах (ОР) лабиринта, число перемещений между зонами лабиринта и общую пройденную дистанцию. Перемещение животных по лабиринту регистрировали с помощью системы видеонаблюдения «Smart 3.0.04» («Panlab Harvard Apparatus», Испания) [133].

Краткосрочную и долгосрочную память животных оценивали в тесте **«Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ)**, используя установку черно-белая камера. При обучении крысу однократно помещали в светлый отсек камеры спиной к тёмному отсеку. Под влиянием исследовательского поведения и врожденного предпочтения темных участков пространства крысы быстро заходили в темный отсек. Регистрировали латентный период (ЛП) пребывания в светлом отсеке камеры. Как только крыса переходила в темный отсек камеры, она получала электрокожное раздражение на лапы (ток 0,4 мА не более 4 сек.). Затем животное сразу же переводили в жилую клетку. Через 24 после обучения оценивают сохранность памятного следа— краткосрочную память, через три недели оценивали долгосрочную память [133].

**Состав тела крыс** (жировую и тощую массу, общую и связанную воду) определяли методом магнитно-резонансной релаксометрии с использованием анализатора EchoMRI-1100 (EchoMRI LLC, США). Данный аппарат представляет собой систему количественного магнитного резонанса, которая позволяет измерить менее чем за 1 минуту полную жировую и не жировую массу тела живого животного без анестезии и усыпления. Анализ данных проводили автоматически с сохранением результатов в формате Excel.

## 2.6 Экспериментальные животные

В экспериментах *in vivo* использовали растущих крыс-самцов линии Вистар (300 животных, исходный возраст 5 недель, масса тела  $(45 \pm 5)$  г), полученных из питомника лабораторных животных Филиал "Столбовая" Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства". Исследования на животных выполнены в соответствии с требованиями, изложенными в Национальных стандартах РФ ГОСТ 33647-2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и ГОСТ 33216—2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами». Содержание лабораторных животных осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях (Совет Европы, Страсбург, 2004 г). На основании этической экспертизы планируемых в диссертационной работе исследований на лабораторных животных Комитетом по этике ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» было принято решение одобрить проведение исследований (Протокол №11 от 15.12.2021). Крыс содержали по 2 особи в клетке в контролируемых условиях окружающей среды (температура 20-26°C, относительная влажность 30-60%, 12 часовой цикл освещения). До начала всех экспериментов животные в течение семи суток находились в карантине.

При проведении экспериментов с кормлением были использованы 7 видов рационов: стандартный полусинтетический рацион (ПСР), стандартный полусинтетический рацион с добавлением 2% холестерина (ПСР+2% холестерина), модифицированный изоазотистый высокожировой рацион с содержанием жира 50% по калорийности (ВЖР), модифицированный изоазотистый высокожировой рацион с содержанием жира 60% по калорийности (ВЖР60), модифицированный изоазотистый высокожировой рацион с добавлением 0,5%, 1% и 2% холестерина (ВЖР+0,5% холестерина; ВЖР+1%

холестерина; ВЖР+2% холестерина) состав которых представлен в таблице 1 и 2. Содержание пищевых веществ, витаминов и минеральных веществ в корме соответствует международным стандартам и позволяет полностью обеспечить все физиологические потребности животных.

**Таблица 1 – Состав рационов**

№	Компоненты		Содержание на 100 г корма, г	
			ПСП	ПСП+2%холестерина
1	Казеин (содержание белка 85%) (г)		24,0	24,0
2	Жировая композиция	Подсолнечное масло (г)	5,0	5,0
		Лярд (г)	5,0	5,0
3	Крахмал (содержание углеводов 85%) (г)		61,0	59,0
5	Холестерин		-	2,0
Дополнительно вводили:				
6	Минеральная смесь <sup>1</sup> (г)		4,0	4,0
7	в/р витамины <sup>2</sup> (г)		1,0	1,0
8	ж/р витамины <sup>3</sup> (мл)		0,1	0,1
9	L-цистеин		0,3	0,3
Калорийность, ккал			382±2	392±2

Примечание:

<sup>1</sup> состав минеральной смеси представлен в табл.1.1

<sup>2</sup> состав смеси водорастворимых витаминов представлен в табл.1.2

<sup>3</sup> состав раствора жирорастворимых витаминов представлен в табл. 1.3

**Таблица 2 - Состав рационов**

№	Компоненты		Содержание на 100 г корма, г				
			ВЖР	ВЖР60	ВЖР + 0,5%хол *	ВЖР + 1% хол *	ВЖР + 2% хол *
1	Казеин (содержание белка 85%) (г)		24,0	24,0	24,0	24,0	24,0
2		Подсолнечное масло (г)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
	Жировая композиция	Лярд (г)	25,0	32,0	24,5	24,0	23,0
3	Крахмал (содержание углеводов 85%) (г)		21,0	19,0	21,0	21,0	21,0
4	Сахароза (г)		20,0	16,0	20,0	20,0	20,0
5	Холестерин (г)		-	-	0,5	1,0	2,0
Дополнительно вводили:							
6	Минеральная смесь <sup>1</sup> (г)		4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
7	в/р витамины <sup>2</sup> (г)		1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
8	ж/р витамины <sup>3</sup> (мл)		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

9	L-цистеин (г)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
	Калорийность, ккал	510±2	545±3	511±3	511±2	511±2

Примечание:

<sup>1</sup> состав минеральной смеси представлен в табл.1.1

<sup>2</sup> состав смеси водорастворимых витаминов представлен в табл.1.2

<sup>3</sup> состав раствора жирорастворимых витаминов представлен в табл. 1.3

\* холестерин

**Таблица 1.1 – Состав минеральной смеси**

№	Название соли	Формула	Количество, г
1	Кальций углекислый, безводный	$\text{CaCO}_3$	357
2	Калий фосфорнокислый, одноосновный	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	250
3	Натрий хлористый	$\text{NaCl}$	74
4	Калий сернокислый	$\text{K}_2\text{SO}_4$	46,6
5	Калий лимоннокислый, моногидрат	$\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$	28
6	Магния оксид	$\text{MgO}$	24
7	Железо лимоннокислое	$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6,06
8	Цинк углекислый	$\text{ZnCO}_3$	1,65
9	Марганец углекислый	$\text{MnCO}_3$	0,63
10	Медь углекислая	$\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$	0,3
11	Калия йодат	$\text{KIO}_3$	0,01
12	Натрия селенат, безводный	$\text{Na}_2\text{SeO}_4$	0,01025
13	Аммония парамолибдат, 4-водный	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,00795
14	Натрия метасиликат	$\text{Na}_2\text{SiO}_3$	0,63
15	Хромокалиевые квасцы, 12-водные	$\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$	0,275
16	Борная кислота	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,0815
17	Натрий фтористый	$\text{NaF}$	0,0635
18	Никель углекислый	$\text{NiCO}_3 \cdot 2\text{Ni}(\text{OH})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	0,0318
19	Литий хлористый	$\text{LiCl}$	0,0174
20	Аммония ванадат	$\text{NH}_4\text{VO}_3$	0,0066
21	Сахароза (декстроза, глюкоза)	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	210,626
	ИТОГО		1000

**Таблица 1.2 – Состав смеси водорастворимых витаминов**

№	Витамин	Количество, г
1	Никотиновая кислота (В <sub>3</sub> )	3
2	Пантотенат кальция (В <sub>5</sub> )	1,6
3	Пиридоксина гидрохлорид (В <sub>6</sub> )	0,7
4	Тиамин гидрохлорид (В <sub>1</sub> )	0,6
5	Рибофлавин (В <sub>2</sub> )	0,6
6	Фолиевая кислота (В <sub>9</sub> )	0,2



7	D-биотин (B <sub>7</sub> )	0,02
8	Цианкобаламин (B <sub>12</sub> )	0,0025
9	(витамин K <sub>1</sub> )	0,075
10	Глюкоза	993,2
	Итого	1000

**Таблица 1.3** – Состав раствора жирорастворимых витаминов

№	Витамин	Активность, МЕ/мл	Количество, мл
1	витамин Е (α-токоферол)	100	75
2	витамин Д (холекальциферол)	20000	5
3	витамин А (ретинол)	100000	4
4	Подсолнечное масло		16
	Итого		100

Животные всех групп на протяжении всего эксперимента получали корм и питьевую воду (фильтруемую системой MilliRO) *ad libitum*.

Животных выводили из экспериментов декапитацией под легким наркозом и подвергали патологоанатомическому вскрытию для извлечения и взвешивания внутренних органов, получения сыворотки или плазмы крови.

## 2.7 Дизайны экспериментов *in vivo*. Биологические модели

### 2.7.1 Моделирование у крыс нарушений углеводного, липидного и холестеринового обмена, индуцированных потреблением различных по калорийности рационов (без и с добавлением холестерина) Эксперимент 1

Эксперимент проведен на растущих крысах-самцах линии Вистар (52 животных). Продолжительность эксперимента – 100 суток. Непосредственно перед проведением эксперимента с кормлением животных взвешивали, определяли уровень глюкозы в крови (животных депривировали голодом в течение 4 часов) и оценивали их поведение и двигательную активность в тесте «Открытое поле» (ОП). Животных по массе тела, уровню глюкозы, результатам теста ОП разделили на 5 групп: К1 (n=20), Г2 (n=16), Г3 (n=16), Г4 (n=16), Г5 (n=16). Результаты разделения представлены в таблице 3.

**Таблица 3** – Разделение животных по группам

Показатель	Группа животных				
	К1	Г2	Г3	Г4	Г5
Масса тела, г	79,1±2,4	77,5±2,0	78,4±2,8	77,2±1,6	77,5±2,8
Уровень глюкозы, ммоль/л	4,1±0,3	4,1±0,2	4,1±0,2	4,0±0,2	4,0±0,3
Результаты теста «Открытое поле»					
Время в центре, с	1,1±0,9	0,8±0,3	0,6±0,3	0,9±0,3	0,8±0,3
Переходы	2,7±1,2	2,3±0,6	2,9±0,7	2,4±0,6	3,3±0,9
Пройденная дистанция, см	1118±86	1313±102	1364±156	1265±67	1381±117

На протяжении всего эксперимента животные контрольной группы К1 получали ПСР, животные опытной группы Г2 получали ПСР с добавлением 2% холестерина. Животные группы Г3 получали ВЖР с добавлением 2% холестерина. Животные опытной группы Г4 получали ВЖР; животные опытной группы Г5 получали ВЖР60.

Дизайн эксперимента схематически представлен на рисунке 7.



Примечание: ИРТ –инсулинорезистентный тест, ОП – открытое поле, ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт, УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания, ВЖР – высокожировой рацион, ПСР- полусинтетический рацион

**Рисунок 7** – Дизайн эксперимента №1

У крыс измеряли уровень глюкозы в крови на 12, 26, 40, 54, 80, 94 сутки. На 92 сутки проводили инсулинорезистентный тест. На 95 сутки эксперимента исследовали поведение и тревожность животных в «Приподнятом крестообразном лабиринте». Оценку поведения и памяти животных осуществляли с использованием теста УРПИ. Обучение проводили на 43 сутки эксперимента, проверку обучения (краткосрочная память) на 44 сутки эксперимента и оценку долгосрочной памяти на 65 сутки периода кормления. На 100 сутки животных выводили из эксперимента и при патологоанатомическом вскрытии извлекали печень. Проводили общий биохимический анализ сыворотки крови. Методом ИФА в сыворотке крови определяли содержание лептина, грелина, С-пептида, малонового диальдегида, супероксиддисмутазы, каталазы и гидроперекисей. В жире, экстрагированном из печени, определяли содержание триглицеридов и холестерина.

## 2.7.2 Моделирование у крыс нарушений углеводного, липидного и холестерина обмена, индуцированных потреблением высокожирового рациона, содержащего холестерин, и хронической принудительной иммобилизацией Эксперимент 2

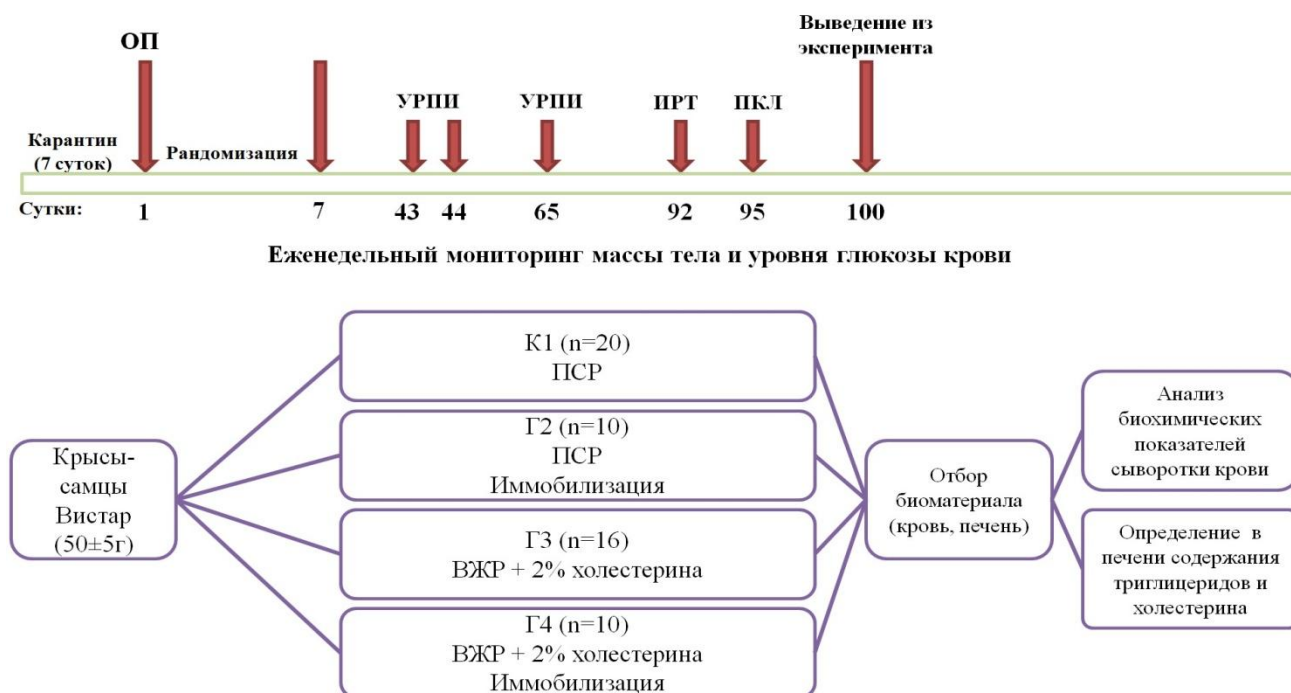
Эксперимент проведен на растущих крысах-самцах линии Вистар (56 животных). Продолжительность эксперимента – 100 суток. Животных по массе тела, уровню глюкозы, результатам теста «Открытое поле» разделили на 4 группы: К1 (n=20), Г2 (n=10), Г3 (n=16), Г4 (n=10). Результаты распределения представлены в таблице 4.

**Таблица 4 – Распределение животных по группам**

Показатель	Группа животных			
	К1 (n=20)	Г2 (n=10)	Г3 (n=16)	Г4 (n=10)
Масса тела, г	79,1±2,4	78,2±1,9	78,4±2,8	78,5±2,1
Уровень глюкозы, ммоль/л	4,1±0,3	4,1±0,4	4,1±0,3	4,1±0,2
Результаты теста открытое поле				
Время в центре, с	1,1±0,9	0,6±0,3	0,6±0,3	0,8±0,3
Переходы	2,7±1,2	2,6±0,6	2,9±0,7	3,0±1,1
Пройденная дистанция, см	1118±86	1381±115	1364±156	1153±117

На протяжении всего эксперимента животные группы К1 и Г2 получали ПСР, животные групп Г3 и Г4 получали ВЖР с добавлением 2% холестерина.

Дизайн эксперимента схематически представлен на рисунке 8.



Примечание: ИРТ – инсулинорезистентный тест, ОП – открытое поле, ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт, УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания, ВЖР – высокожировой рацион, ПСР – полусинтетический рацион.

**Рисунок 8** – Дизайн эксперимента №2

Животных групп Г2 и Г4 подвергали ежедневной 90-минутной иммобилизации, путем помещения в прозрачные домики-фиксаторы (ООО «Открытая наука», Россия), ограничивающие свободу движения крыс на протяжении всего эксперимента.

На 92 сутки проводили ИРТ. На 95 сутки эксперимента исследовали поведение и тревожность животных в «Приподнятом крестообразном лабиринте». На 43, 44 и 65 сутки эксперимента проводили тестирование животных в тесте «Условный рефлекс пассивного избегания». На 100 сутки животных выводили из эксперимента и при патологоанатомическом вскрытии извлекали печень. Проводили общий биохимический анализ сыворотки крови. В жире, экстрагированном из печени, определяли содержание триглицеридов и холестерина.

### 2.7.3 Моделирование у крыс нарушений жирового, холестеринового и углеводного обмена, индуцированных потреблением высокожировых рационов с различным содержанием экзогенного холестерина Эксперимент 3

Эксперимент проведен на растущих крысах-самцах линии Вистар (70 животных). Продолжительность эксперимента – 88 суток.

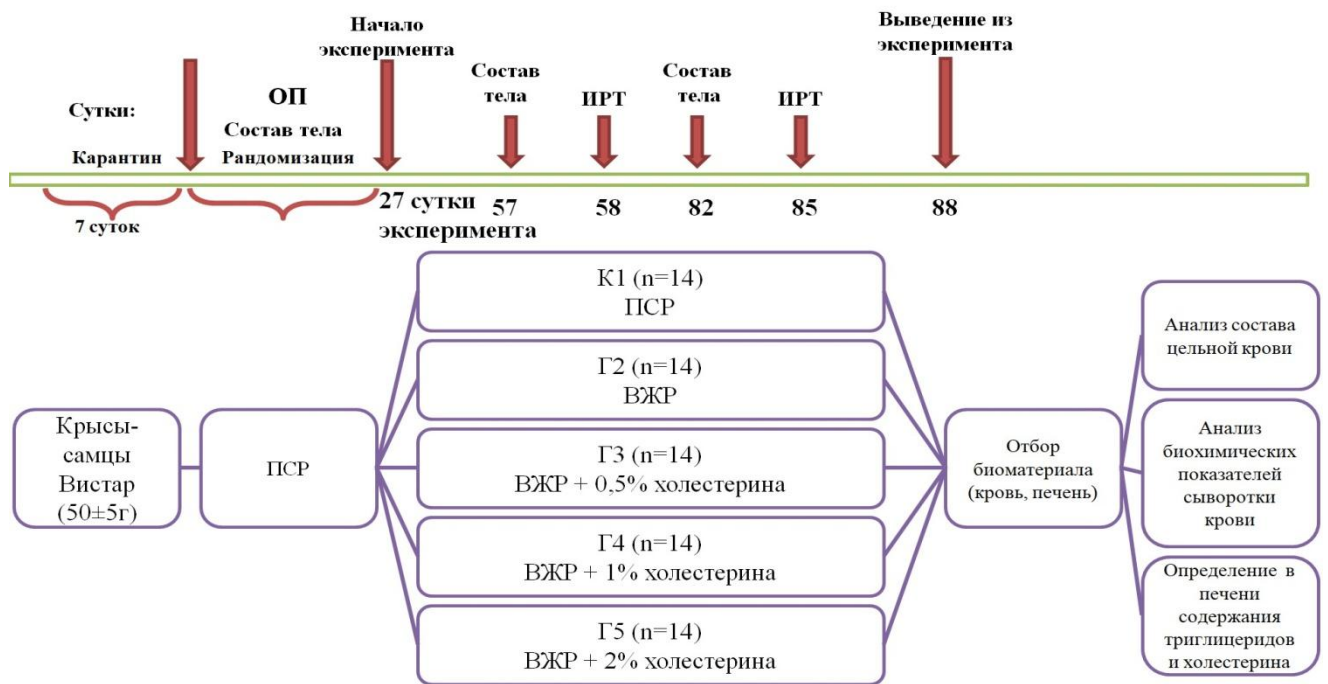
В течение первых 26 суток эксперимента все животные получали ПСР. На 27 сутки эксперимента животных разделили на 5 групп (n=14): контрольная группа К1 и опытные группы Г2, Г3, Г4 и Г5. Для разделения животных по группам оценивали массу тела, состав тела и показатели поведения крыс в тесте «Открытое Поле». Результаты разделения по группам представлены в таблице 5.

**Таблица 5** – Разделение животных по группам

Показатель	Группа животных				
	К1	Г2	Г3	Г4	Г5
Масса тела, г	235,8±4,3	235,0±6,6	232,6±7,1	235,3±4,9	232,3±6,4
Состав тела					
Содержание жира, %	6,5±0,5	8,0±0,8	6,8±0,7	7,1±0,8	7,8±0,6
Тощая масса, %	89,5±0,6	87,9±0,9	88,9±0,8	89,1±0,9	88,4±0,6
Результаты теста ОП					
Переходы	9,6±1,1	10,9±1,5	10,3±1,4	11,7±2,1	9,5±1,0
Время в центре, с	3,6±1,4	3,9±0,9	2,7±0,8	5,3±2,4	3,7±0,6
Пройденная дистанция, см	1528±118	1701±91	1502±105	1750±103	1683±72

На протяжении всего эксперимента крысы контрольной группы К1 получали ПСР, животные группы Г2 получали ВЖР. Животные групп Г3, Г4 и Г5 получали также ВЖР с добавлением 0,5%, 1% и 2% холестерина соответственно.

Дизайн эксперимента схематически представлен на рисунке 9.



Примечание: ИРТ – инсулинорезистентный тест, ОП – открытое поле, ВЖР – высокожировой рацион, ПСР - полусинтетический рацион.

**Рисунок 9** – Дизайн эксперимента №3

На 57 и 82 сутки эксперимента повторно изучали состав тела крыс. На 58 и дополнительно на 85 сутки проводили ИРТ. На 88 сутки животных выводили из эксперимента и при патологоанатомическом вскрытии извлекали печень. Проводили общий гематологический анализ цельной крови и общий биохимический анализ сыворотки крови. В сыворотке крови крыс методом ИФА определяли содержание грелина, лептина, глутатионпероксидазы, СОД, МДА, а также инсулина и С-пептида. В жире, экстрагированном из печени, определяли содержание триглицеридов и холестерина.

## 2.8 Дизайны экспериментов *in vivo*. Физиолого-биохимическая оценка влияния концентратов фикоцианинов на состояние углеводного, липидного и холестерина обмена

### 2.8.1 Физиолого-биохимическая оценка влияния потребления концентрата фикоцианинов (концентрат 4) на нарушения у половозрелых крыс углеводного, липидного и холестерина обмена, индуцированные потреблением высокожирового рациона с добавлением 1% холестерина

#### Эксперимент 4

Эксперимент проведен в течение 94 суток на 62 растущих крысах-самцах линии Вистар. По массе тела, составу тела и поведению крыс в тесте «Открытое Поле» животных разделили на 3 группы: контрольная группа К1 (n=34) и опытные группы Г2 (n=14) и Г3 (n=14) (таблица 6).

В течение первых 24 суток эксперимента все животные получали ПСР. В рацион животных групп Г2 и Г3 добавляли концентрат фикоцианинов (концентрат 4) в количествах 30 мг/ кг массы тела крысы и 100 мг/ кг массы тела крысы, соответственно.

**Таблица 6 - Разделение животных по группам**

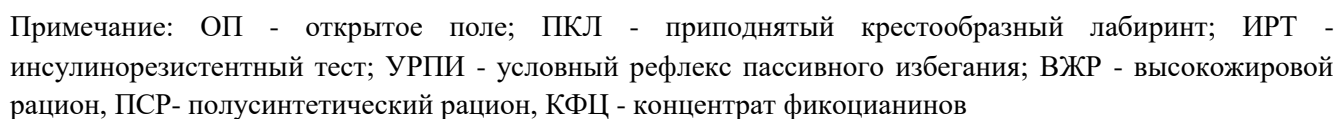
Показатель	Группа животных		
	К1	Г2	Г3
Масса тела, г	90,4±1,3	89,1±2,0	92,1±3,3
Состав тела			
Содержание жира, %	8,8±0,2	8,2±0,4	8,8±0,4
Тощая масса, %	86,7±0,3	88,2±0,5	87,5±0,3
Результаты теста ОП			
Переходы	3,0±0,3	3,9±0,9	4,3±0,8
Время в центре, с	0,8±0,2	1,3±0,4	1,1±0,4
Пройденная дистанция, см	1243±52	1278±113	1186±108

На 24 сутки эксперимента животных контрольной группы разделили на две группы К1 (n=14) и опытную группу К2 (n=14) (таблица 7).



На протяжении всего последующего эксперимента животные контрольной группы К1 получали ПСР, животные групп К2, Г2, Г3 получали ВЖР с добавлением 1% холестерина. В рацион животных групп Г2 и Г3 по-прежнему добавляли концентрат фикоцианинов в количествах 30 мг/кг массы тела крысы и 100 мг/кг массы тела крысы, соответственно.

The timeline illustrates the experimental schedule. Key events are marked with red arrows: 'Начало эксперимента' (Start of experiment) at day 1, 'Выведение из эксперимента' (Removal from experiment) at day 94, and 'Состав тела' (Body composition) at days 22, 23, 24, 47, 51, 52,53, 65, 72, 87, and 89. Sampling days are indicated by green arrows: 'Сутки' (Days) at days 7, 22, 23, 24, 47, 51, 52,53, 65, 72, 87, and 89. The timeline is divided into three main phases: 'Карантин' (Quarantine) from day 0 to 7, 'ОП' (Operational Period) from day 7 to 94, and 'Выведение из эксперимента' (Removal from experiment) at day 94. The 'ОП' phase is further divided into 'Состав тела' (Body composition) and 'Рандомизация' (Randomization).



**Рисунок 10 - Дизайн эксперимента №4**

На 51 и 87 сутки эксперимента повторно изучали состав тела крыс. Также на 47 и дополнительно на 89 сутки тестировали животных всех экспериментальных групп на инсулинорезистентность. На 65 сутки эксперимента исследовали поведение и тревожность животных в «Приподнятом крестообразном лабиринте». Поведение и память животных характеризовали с использованием теста УРПИ. Обучение проводили на 52 сутки эксперимента, и затем оценку обучения (краткосрочная память на 53 сутки и долгосрочная память на 72 сутки). На 94 сутки животных выводили из эксперимента и при патологоанатомическом вскрытии извлекали печень. Проводили общий гематологический анализ цельной крови и общий биохимический анализ сыворотки крови. Методом ИФА в сыворотке крови определяли содержание лептина, грелина, малонового диальдегида и супероксиддисмутазы. В жире, экстрагированном из печени, определяли содержание триглицеридов и холестерина.

## **2.8.2 Сравнительная физиолого-биохимическая оценка влияния потребления концентрата фикоцианинов (концентрат 2) на нарушения у растущих крыс углеводного, липидного и холестеринового обмена, индуцированные потреблением высокожирового рациона с добавлением 2% холестерина**

### **Эксперимент 5**

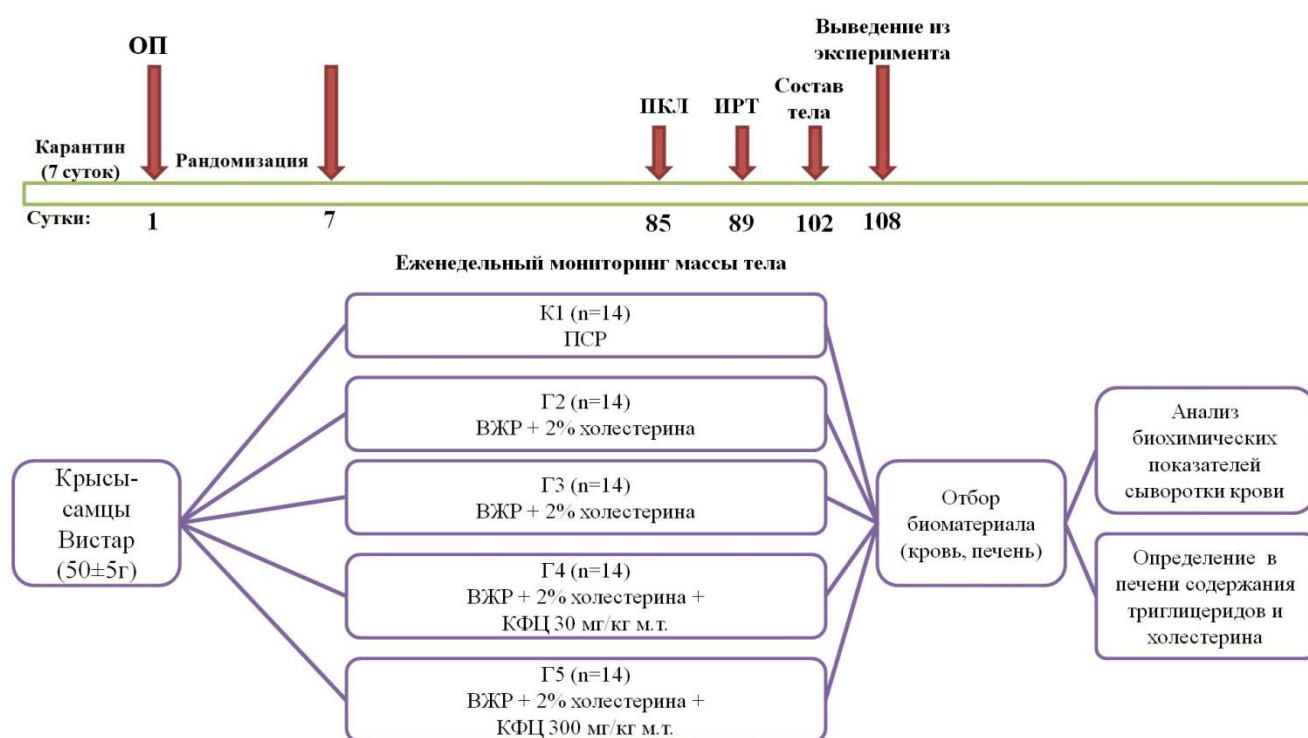
Эксперимент проведен в течение 108 суток на 60 растущих крысах-самцах линии Вистар. По массе тела, уровню глюкозы крови и результатам теста ОП животных разделили на 5 групп: К1 (n=12), Г2 (n=12), Г3 (n=12), Г4 (n=12), Г5 (n=12) (таблица 7).

**Таблица 7 - Разделение животных по группам**

Показатель	Группа животных				
	К1 (n=12)	Г2 (n=12)	Г3 (n=12)	Г4 (n=12)	Г5 (n=12)
Масса тела, г	110,4±3,3	111,4±1,7	110,7±2,3	110,8±2,2	111,0±2,9
Уровень глюкозы, ммоль/л	6,5±0,2	6,5±0,3	6,5±0,2	6,5±0,2	6,5±0,2
Результаты теста ОП					

Время в центре, с	2,4±0,5	2,2±0,8	2,0±0,9	1,6±0,6	1,8±0,6
Переходы	5,4±0,7	5,1±1,2	5,2±1,1	5,1±1,1	4,4±1,1
Пройденная дистанция, см	1432±83	1511±95	1486±87	1482±115	1452±86

На протяжении всего эксперимента животные контрольной группы К1 получали ПСР, животные группы Г2 получали ВЖР с добавлением 2% холестерина. Животные групп Г3, Г4 и Г5 получали ВЖР с добавлением 2% холестерина, при этом 50% белка казеина заменяли на изолят соевого белка (10% белка казеина, 10% белка сои, 29% жира, 2% холестерина, 18% углеводов, 20% сахарозы; энергетическая ценность 511 ккал/100 г). В рацион животных групп Г4 и Г5 на протяжении всего эксперимента добавляли концентрат фикоцианинов (концентрат 2), в количествах 30 мг/кг массы тела крысы и 300 мг/кг массы тела крысы соответственно. Дизайн эксперимента схематически представлен на рисунке 11.



Примечание: ОП – открытое поле, ИРТ – инсулинорезистентный тест, ПКЛ –приподнятый крестообразный лабиринт, ВЖР – высокожировой рацион, ПСР- полусинтетический рацион, КФЦ - концентрат фикоцианинов

**Рисунок 11** – Дизайн эксперимента №5

На 85 сутки эксперимента тестировали животных на приподнятом крестообразном лабиринте. На 89 сутки проводили инсулинорезистентный тест. На 102 сутки эксперимента изучали состав тела крыс. На 108 сутки животных выводили из эксперимента и при патологоанатомическом вскрытии извлекали печень. Проводили общий биохимический анализ сыворотки крови. В сыворотке крови крыс методом ИФА определяли содержание лептина, грелина, С-пептида, малонового диальдегида, супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и гидроперекисей. В жире, экстрагированном из печени, определяли содержание триглицеридов и холестерина.

## 2.9 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программного пакета SPSS Statistics 20 (IBM). Выборка подвергалась проверке на нормальность с использованием критерия Колмогорова—Смирнова при  $p=0,05$ . В случае нормального распределения применялись параметрические методы исследования: ANOVA по плану  $4^1$  (эксперимент однофакторный, четырёхуровневый, сбалансированный). В случае отклонения нулевой гипотезы применялся метод множественного сравнения средних — критерий Тьюки (q-тест). Вычисляли среднее значение (M) и стандартную ошибку среднего (SEM); данные представлены в виде  $M \pm SEM$ . Если выборка не соответствовала нормальному распределению, использовали непараметрические критерии согласия: H критерий Крускала—Уоллиса. В случае отклонения нулевой гипотезы был использован метод множественного сравнения — критерий Дункана (MRT). Определяли медиану (Me), нижний (Q1) и верхний (Q3) квартиль. Данные представлены в виде Me (Q1-Q3). Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1 Характеристика концентратов фикоцианинов биомассы *Arthrospira platensis*

В таблице 8 приведены сравнительные результаты определения содержания С-ФКЦ и А-ФКЦ в экстракте биомассы *A. platensis* и полученных концентратах фикоцианинов (конечных продуктов) в результате первого и второго вариантов выделения (соответственно концентрат 1 и концентрат 2). Первый вариант получения концентрата 1 (рис. 12), включающий в качестве одной из стадий, широко используемый метод сульфатно-аммонийного осаждения белка из водного экстракта биомассы *A. platensis*, с последующей ультрафильтрацией, обессоливанием и лиофильным высушиванием позволил получить концентрат со степенью чистоты 1,1, соответствующей требованиям, предъявляемым к пищевому использованию продукта и суммарным содержанием фикоцианинов  $(42,7 \pm 0,8)\%$  [22]. Модификация, связанная с исключением стадии сульфатно-аммонийного осаждения белка, существенно упростила метод получения концентрата 2 с суммарным содержанием фикоцианинов  $(37,0 \pm 0,8)\%$  и со степенью чистоты такой же, как и у концентрата 1 [5]. Сульфатно-аммонийное осаждение белков из экстрактов *A. platensis* позволяет примерно в 2 раза повысить на этой стадии степень чистоты получаемого промежуточного продукта. Последующая ультрафильтрация, как это было осуществлено при получении концентрата 1, используется, чтобы перевести осажденный белок в растворимое состояние, удаляя сульфат аммония из раствора. В модифицированной схеме ультрафильтрация непосредственно экстракта *A. platensis* заменила стадию сульфатно-аммонийного осаждения, в 1,8 раза повышая чистоту продукта по сравнению с исходным экстрактом.

**Таблица 8** - Характеристика экстракта и концентратов фикоцианинов 1 и 2 ( $M \pm m$ )

Показатель	Образец		
	Экстракт	Концентрат 1	Концентрат 2
Содержание С-фикоцианина (С-ФКЦ), %	$8,9 \pm 0,1$	$38,6 \pm 0,5^1$	$31,8 \pm 0,6^1$
Содержание аллофикоцианина (А-ФКЦ), %	$2,3 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,3^1$	$5,2 \pm 0,2^1$
Суммарное содержание С-ФКЦ и А-ФКЦ, %	$11,2 \pm 0,2$	$42,7 \pm 0,8^1$	$37,0 \pm 0,8^1$
Содержание белка, %	$44,3 \pm 5,0$	$86,0 \pm 5,0^1$	$83,0 \pm 5,0^1$
$\Sigma(\text{С-ФКЦ} + \text{А-ФКЦ})/\text{Белок}$	$0,25 \pm 0,06$	$0,50 \pm 0,13^1$	$0,45 \pm 0,10^1$
Степень чистоты, $D_{620}/D_{280}$	$0,58 \pm 0,03$	$1,10 \pm 0,02^1$	$1,04 \pm 0,04^1$
Выход, %	100	63	65

Примечание - статистически значимое отличие ( $p < 0,05$ ): 1 - по сравнению с экстрактом

**Рисунок 12** – Схема получения концентрата 1 и концентрата 2

Последующая модификация схемы получения концентрата фикоцианинов (вариант 3), представленная на рисунке 13 и связанная с изменением температуры и времени проведения экстракции, и включением стадии микрофильтрации, позволила получить в качестве конечного продукта концентрат 3 с суммарным содержанием фикоцианинов  $(49,0 \pm 1,5)\%$  и степенью чистоты 2,0 (таблица 9) [8]. Результаты, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что при использовании этой модифицированной схемы в ретентате содержание белка повысилось в 1,7 раза, а суммарное содержание фикоцианинов в 2,8 раза по сравнению с экстрактом. Сравнительный анализ хроматограмм на рис. 14а и 14б показал, что в результате ультрафильтрации экстракта происходит частичная элиминация «балластных» низкомолекулярных фракций (менее 12 кДа) и их содержание в отобранном ретентате снижается в 5,7 раз. Последующая микрофильтрация ретентата практически полностью удалила высокомолекулярные примеси из его состава (хроматограммы на рис. 14 б и в) и дополнительно повысила содержание общего белка и суммарное содержание фикоцианинов в конечном продукте соответственно в 1,2 и 1,6 раз, и в 1,8 раза повысила чистоту концентрата 3 по сравнению с ретентатом.

Суммарное содержание фикоцианинов в концентрате 3 в 1,1 раза и в 1,3 раза выше по сравнению с концентратом 1 и концентратом 2 соответственно. В 1,8 раза повышена и чистота концентрата 3, при получении которого, также как и при варианте 2 была исключена трудоемкая стадия сульфатно-аммонийного осаждения.

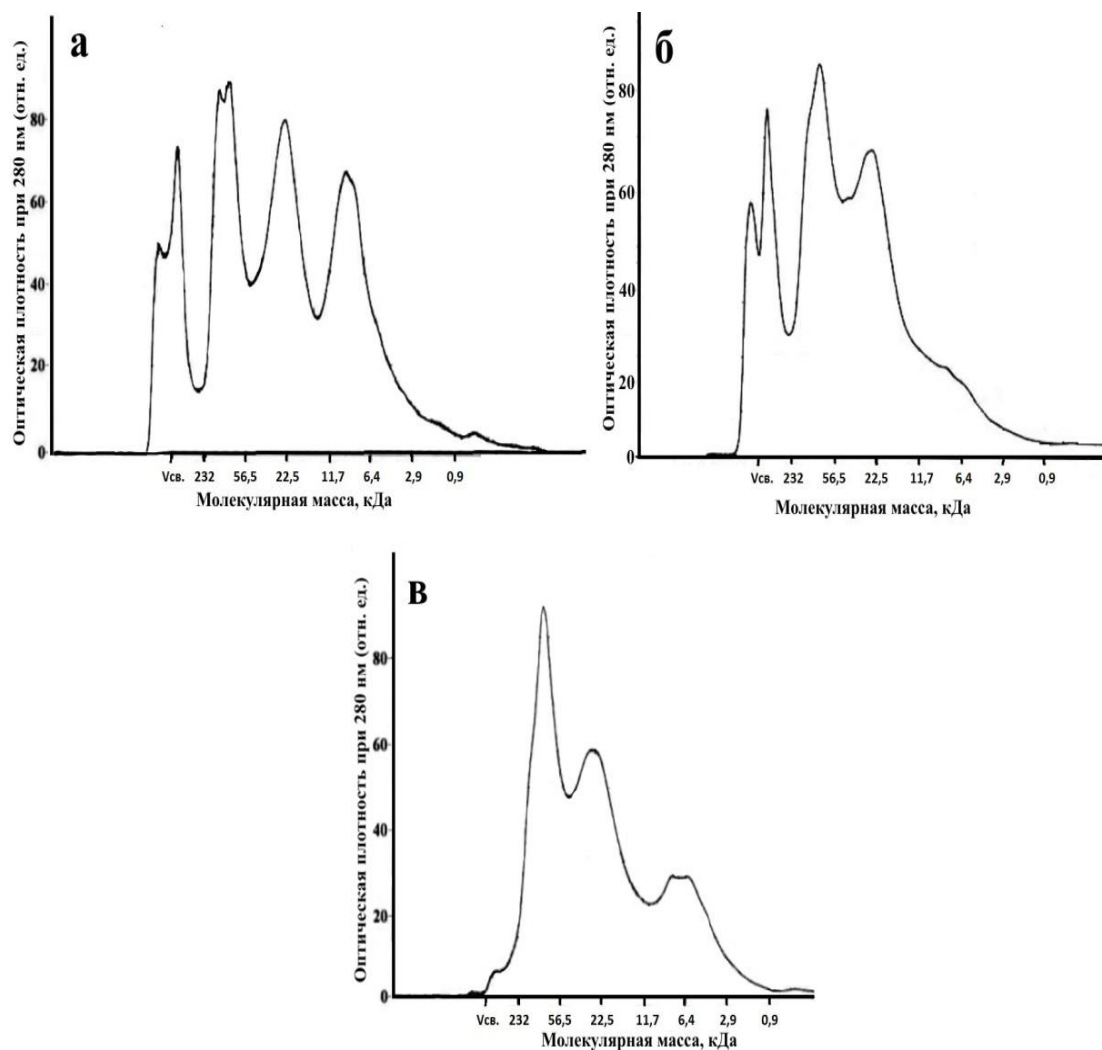


**Таблица 9** - Характеристика экстракта, ретентата и концентрата 3 ( $M \pm m$ )

Показатель	Образец		
	Экстракт	Ретентат	Концентрат 3
Содержание С-фикоцианина (С-ФКЦ), %	$8,7 \pm 0,2$	$27,8 \pm 0,4^1$	$42,0 \pm 1,3^{1,2}$
Содержание аллофикоцианина (А-ФКЦ), %	$1,7 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,2^1$	$7,0 \pm 0,3^{1,2}$
Суммарное содержание С-ФКЦ и А-ФКЦ, %	$10,4 \pm 0,3$	$31,3 \pm 0,6^1$	$49,0 \pm 1,5^{1,2}$
Содержание белка, %	$42,0 \pm 5,0$	$73,6 \pm 5,0^1$	$85,5 \pm 5,0^{1,2}$
$\Sigma(\text{С-ФКЦ} + \text{А-ФКЦ})/\text{Белок}$	$0,25 \pm 0,06$	$0,43 \pm 0,11^1$	$0,57 \pm 0,05^{1,2}$
Степень чистоты, $D_{620}/D_{280}$	$0,51 \pm 0,03$	$1,11 \pm 0,03^1$	$1,98 \pm 0,03^{1,2}$
Выход, %	100	75	31

Примечание – статистически значимое отличие ( $p < 0,05$ ): 1 - по сравнению с экстрактом; 2 – по сравнению с ретентатом; 3 - по сравнению с концентратом 1

**Рисунок 13**– Схема получения концентрата 3



**Рисунок 14** - Хроматограммы экстракта (а), ретентата (б), концентрата 3 (в) (вариант 3)

Модификация, связанная с включением двойной стадии микрофильтрации (вариант 4), позволила получить в качестве конечного продукта концентрат 4 с суммарным содержанием фикоцианинов ( $67,9 \pm 1,4$ )% и степенью чистоты 2,7 (рис. 15) [7, 49]. Как следует из данных, представленных в таблице 10, первая микрофильтрация объединенных супернатантов, позволила удалить мелкодисперсные частицы биомассы *A. platensis*, образовавшиеся в результате экстракции, а последующая микрофильтрация ретентата и объединение отобранных пермиатов минимизировали потери фикоцианинов. В результате последующей ультрафильтрации объединенного пермеата содержание белка, суммарное содержание фикоцианинов и степень чистоты в конечном продукте -

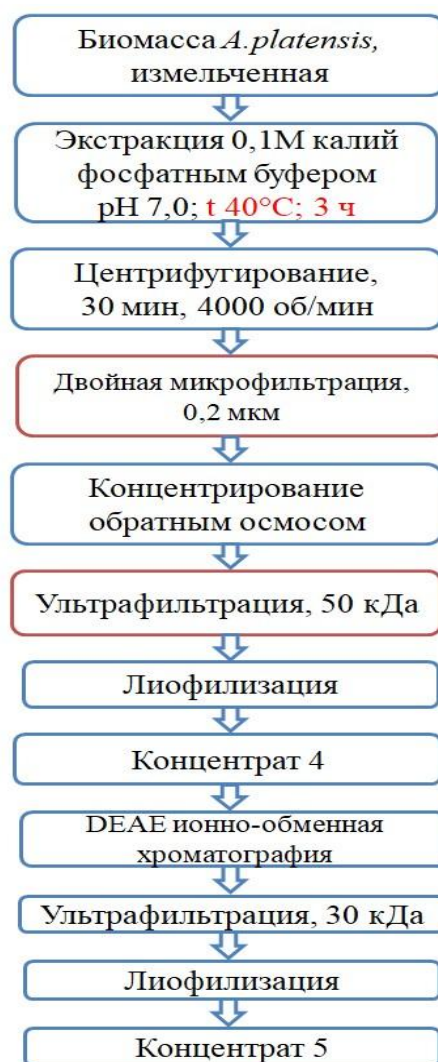
концентрате 4 повысилось в 1,9; 5,8 и 4,4 раза соответственно. Белково-пептидный профиль концентрата 4 представлен соответствующей хроматограммой (рис. 16А).

Заключительная модификация технологической схемы путем дополнительного использования ионно-обменной колоночной хроматографии на ДЕАЕ-сефарозе и обессоливания ультрафильтрацией (вариант 5), позволила получить концентрат 5 со степенью чистоты 4,0 и суммарным содержанием фикоцианинов ( $86,9 \pm 1,3$ )% [6]. Суммарное содержание фикоцианинов выросло в 6,7 раз по сравнению с исходным экстрактом. Содержание фикоцианинов относительно общего белка в конечном продукте составило не менее 90%, о чем на качественном уровне свидетельствует также белково-пептидный профиль конечного продукта, представленный соответствующими хроматограммами на рис. 16Б и 16В.

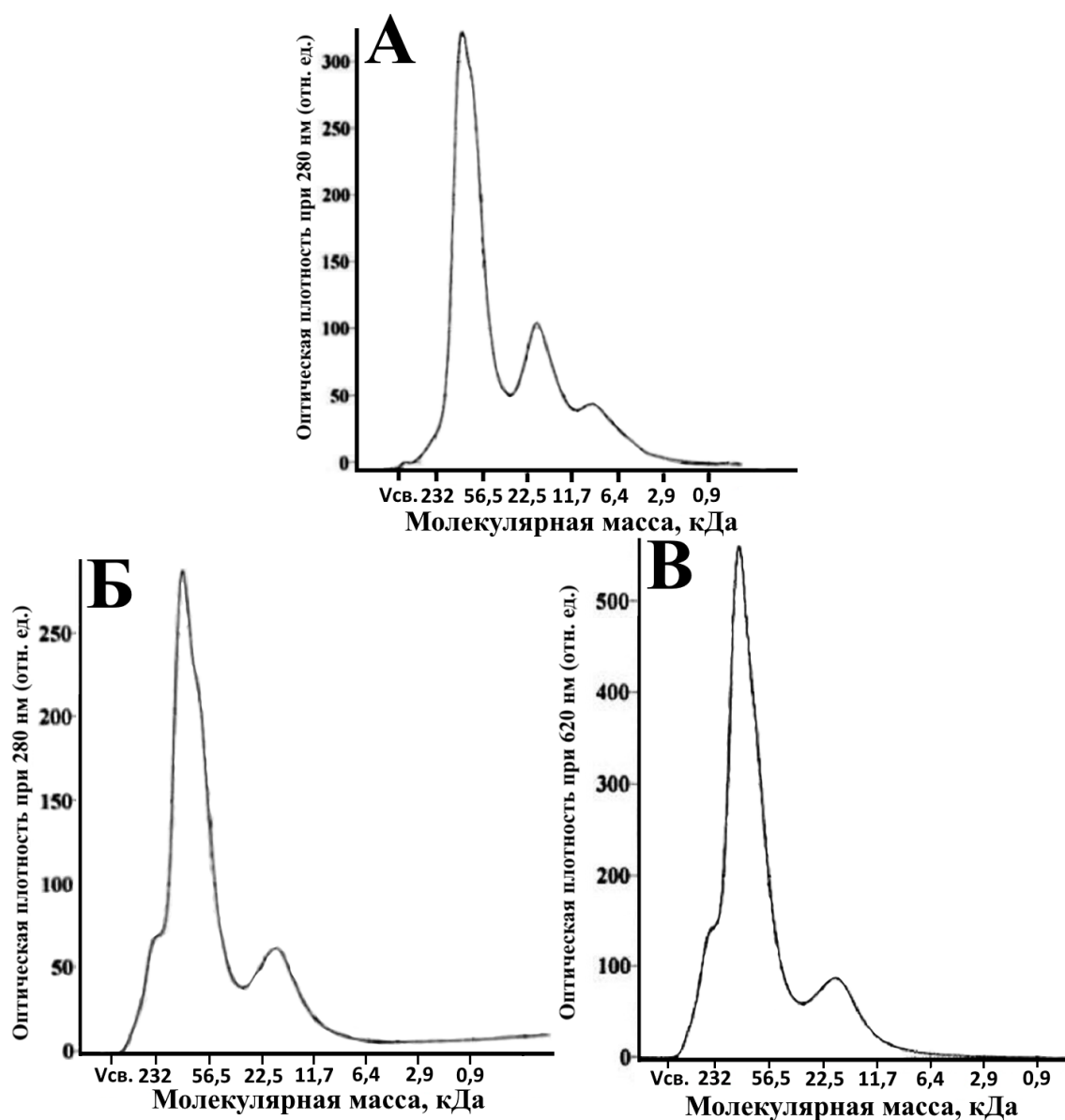
**Таблица 10** – Характеристика экстракта, пермеатов, концентрата4 и концентрата5

Показатель	Образец					
	Экстракт	Пермеат1	Пермеат2	Пермеат объед-ный (П1+П2)	Концентрат4	Концентрат5 (ДЕАЕ+УФ30)
Содержание С-фикоцианина (С-ФКЦ), %	10,2±0,1	8,1±0,1	52,3±0,8 <sup>1</sup>	9,7±0,2	63,6±1,0 <sup>1,2</sup>	78,8±0,9 <sup>1,2,3</sup>
Содержание аллофикоцианина (А-ФКЦ), %	2,7±0,2	2,5±0,1	2,5±0,3	2,1±0,2	4,3±0,4 <sup>1,2</sup>	8,1±0,4 <sup>1,2,3</sup>
Суммарное содержание С-ФКЦ и А-ФКЦ, %	12,9±0,3	10,7±0,2	54,8±1,1 <sup>1</sup>	11,8±0,4	67,9±1,4 <sup>1,2</sup>	86,9±1,3 <sup>1,2,3</sup>
Содержание белка, %	52,5±5,0	47,7±5,0	90,1±5,0 <sup>1</sup>	48,9±5,0	93,8±5,0 <sup>1,2</sup>	96,2±0,9 <sup>1,2,3</sup>
$\Sigma(\text{С-ФКЦ} + \text{А-ФКЦ})/\text{Белок}$	0,25±0,06	0,22±0,05	0,61±0,11 <sup>1</sup>	0,24±0,05	0,72±0,09 <sup>1,2</sup>	0,90±0,07 <sup>1,2,3</sup>
Степень чистоты, $D_{620}/D_{280}$	0,61±0,02	0,54±0,02	2,47±0,03 <sup>1</sup>	0,61±0,01	2,70±0,04 <sup>1,2</sup>	3,97±0,02 <sup>1,2,3</sup>
Выход, %	100	64,5	21,8	86,2	79,7	40,0

Примечание – статистически значимое отличие ( $p < 0,05$ ): 1 - по сравнению с экстрактом; 2 – по сравнению с пермеатом объединенным; 3 - по сравнению с ретентатом.



**Рисунок 15** – Схема получения концентрата 4 и концентрата 5



**Рисунок 16** – Хроматограммы концентрата 4 (А) (вариант 4) и концентрата 5 при длине волны 280 нм (Б), концентрата 5 при длине волны 620 нм (В)

Для масштабирования и получения опытных партий концентрата фикоцианинов в количестве достаточном для проведения исследований *in vivo* были выбраны две технологические схемы по получению концентрата 2 и концентрата 4, так как именно при получении этих концентратов выход составил 65% и 80%, соответственно.

Таким образом, рациональное использование мембранной технологии (ультра- и микрофльтрации) сделало возможным исключить недостаточно технологичную стадию сульфатно-аммонийного осаждения белка и получить

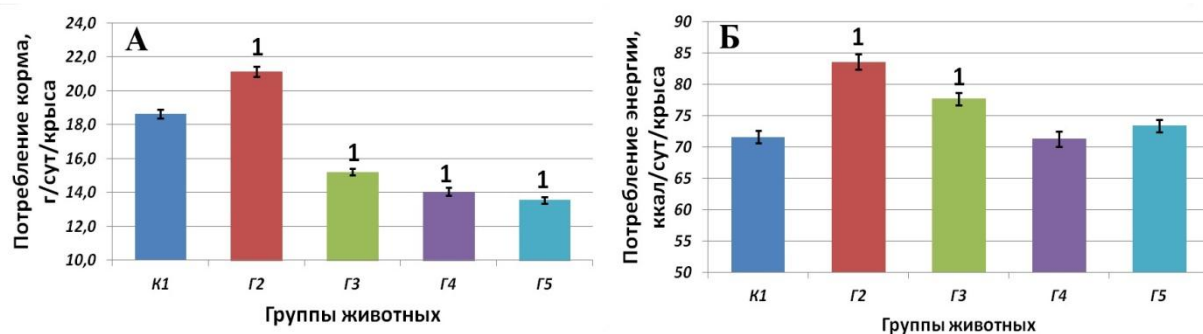
концентраты с очень высоким суммарным содержанием С-фикоцианина и аллофикоцианина. Совокупность методов ультра- и микрофльтрации, позволили в значительной степени интенсифицировать и упростить процесс получения белковых концентратов. Путем последовательных модификаций технологических схем (первый вариант - пятый вариант) удалось повысить степень чистоты и суммарное содержание фикоцианинов в полученных продуктах, соответственно в 3,6 и 2,0 раз.

### 3.2 Моделирование у крыс нарушений углеводного, липидного и холестерина обмена, индуцированных потреблением различных по калорийности рационов (без и с добавлением холестерина)

#### (дизайн эксперимента №1)

Результаты исследования представлены в работе [14, 15]. Общее состояние животных всех групп по внешнему виду и качеству шерстного покрова при ежедневном осмотре на протяжении всего эксперимента было удовлетворительным.

Среднее суточное потребление корма и энергии животными всех групп (в пересчете на весь эксперимент) представлено на рисунке 18.



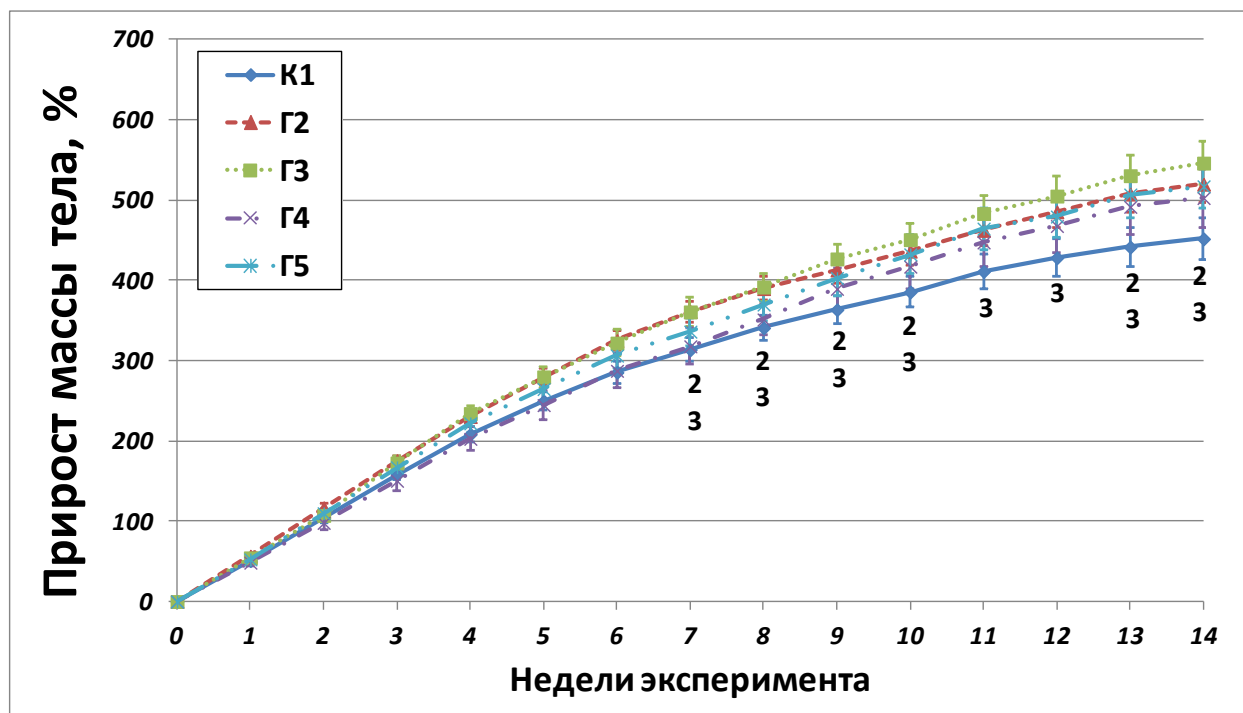
Примечание – 1- различия достоверны по сравнению с группой K1 ( $p < 0,05$ )

**Рисунок 18** – Среднее потребление корма (г/сут/крыса, А) и энергии (ккал/сут/крыса, Б)

На протяжении всего эксперимента животные группы K1, получавшие стандартный ПСР, потребляли достоверно больше корма по сравнению с животными групп G3, G4, G5, получавшими модифицированные высокожировые рационы ( $p < 0,01$ ). Такое различие в потреблении, в первую очередь, связано с большей калорийностью высокожирового рациона. Введение в состав ПСР 2% холестерина привело к достоверному увеличению среднесуточного потребления корма и энергии животными группы G2 по сравнению с животными контрольной группы K1 ( $p < 0,01$ ). Потребление энергии животными группы G3 было достоверно выше по сравнению с контрольной группой K1 ( $p < 0,01$ ).

Среднесуточное потребление энергии статистически достоверно не различалось для животных групп К1, Г4 и Г5 ( $p \geq 0,05$ ). Полученные результаты свидетельствуют, что введение в рацион холестерина приводило к большему потреблению энергии животными.

На рисунке 19 представлена динамика прироста массы тела животных.



Примечание – 2- различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p < 0,05$ ); 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3 ( $p < 0,05$ ).

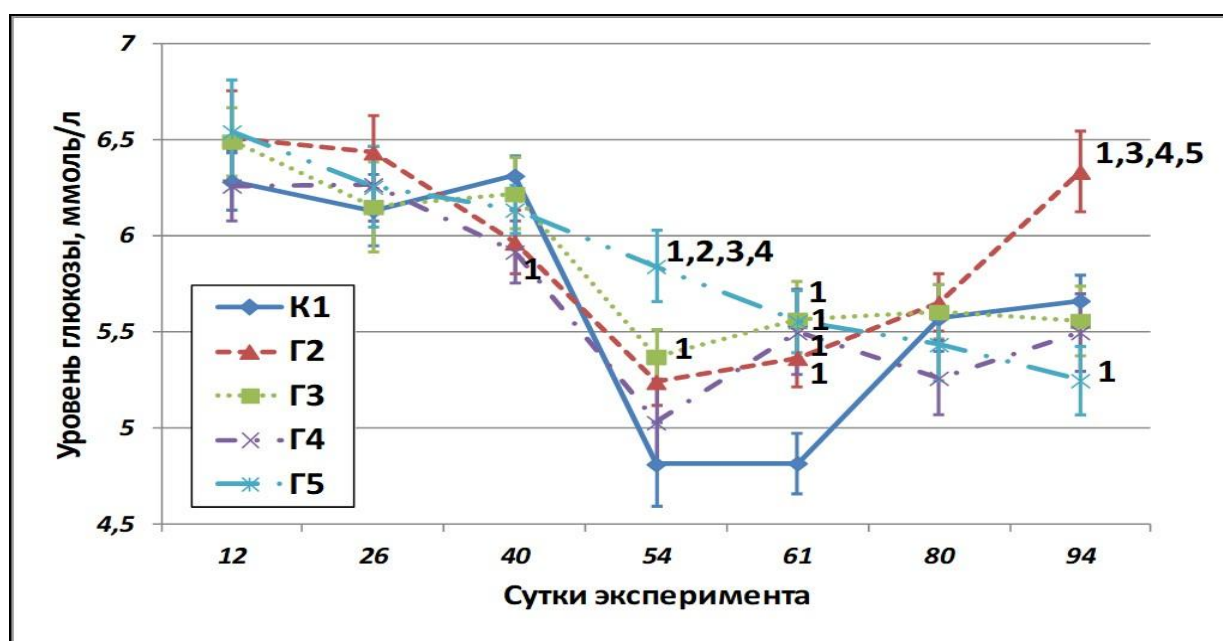
Рисунок 19 – Прирост массы тела животных, %

Прирост массы тела животных группы Г2 (ПСР с добавлением 2% холестерина), начиная с 7 недели кормления и до окончания эксперимента, был достоверно выше по сравнению с приростом животных контрольной группы К1 ( $p < 0,05$ ). Прирост массы тела животных группы Г3, получавших ВЖР с добавлением 2% холестерина, так же был достоверно выше по сравнению с аналогичным показателем для животных контрольной группы К1 ( $p < 0,01$ ). Относительный прирост массы тела животных групп Г4 и Г5 достоверно не различался между собой и от контрольной группы на протяжении всего эксперимента ( $p \geq 0,05$ ). На момент окончания эксперимента средняя абсолютная



масса тела животных группы K1 ( $426 \pm 16$  г) была достоверно ниже средней массы тела крыс групп Г2 ( $475 \pm 12$  г), Г3 ( $505 \pm 19$  г) и Г5 ( $477 \pm 20$  г) ( $p < 0,05$ ). Для группы Г4 ( $458 \pm 23$  г) различия по средней массе животных статистически недостоверны по сравнению с контрольной группой K1 ( $p \geq 0,05$ ). Различия по средней массе тела животных для всех опытных групп между собой статистически недостоверны ( $p \geq 0,05$ ). Введение в рацион холестерина приводило к достоверному приросту массы тела, что может свидетельствовать о начале развития признаков ожирения у этих животных.

Мониторинг уровня глюкозы в крови животных представлен на рисунке 20.

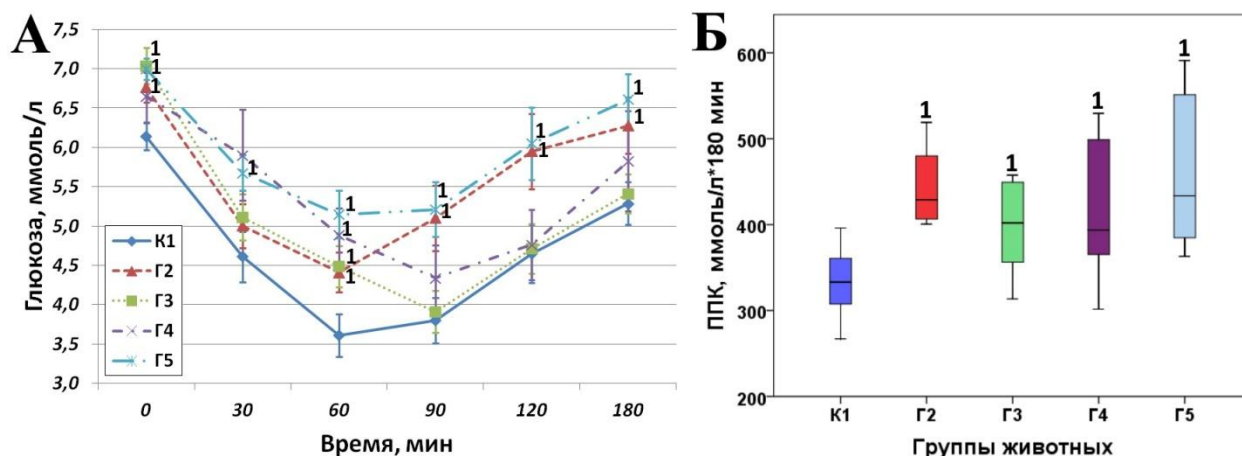


Примечание – 1 – различия достоверны по сравнению с группой K1 ( $p < 0,05$ ); 2 – различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p < 0,05$ ); 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3 ( $p < 0,05$ ); 4 – различия достоверны по сравнению с группой Г4 ( $p < 0,05$ ); 5 – различия достоверны по сравнению с группой Г5 ( $p < 0,05$ ).

**Рисунок 20** – Динамика уровня глюкозы животных, ммоль/л

На протяжении эксперимента с кормлением средние значения концентрации глюкозы в крови варьировали у животных всех групп, не превышая, однако, исходных значений, оставаясь в пределах интервала 4,5–6,5 ммоль/л [145].

На рисунке 21 представлены результаты проведения теста на инсулинорезистентность (92 сутки).

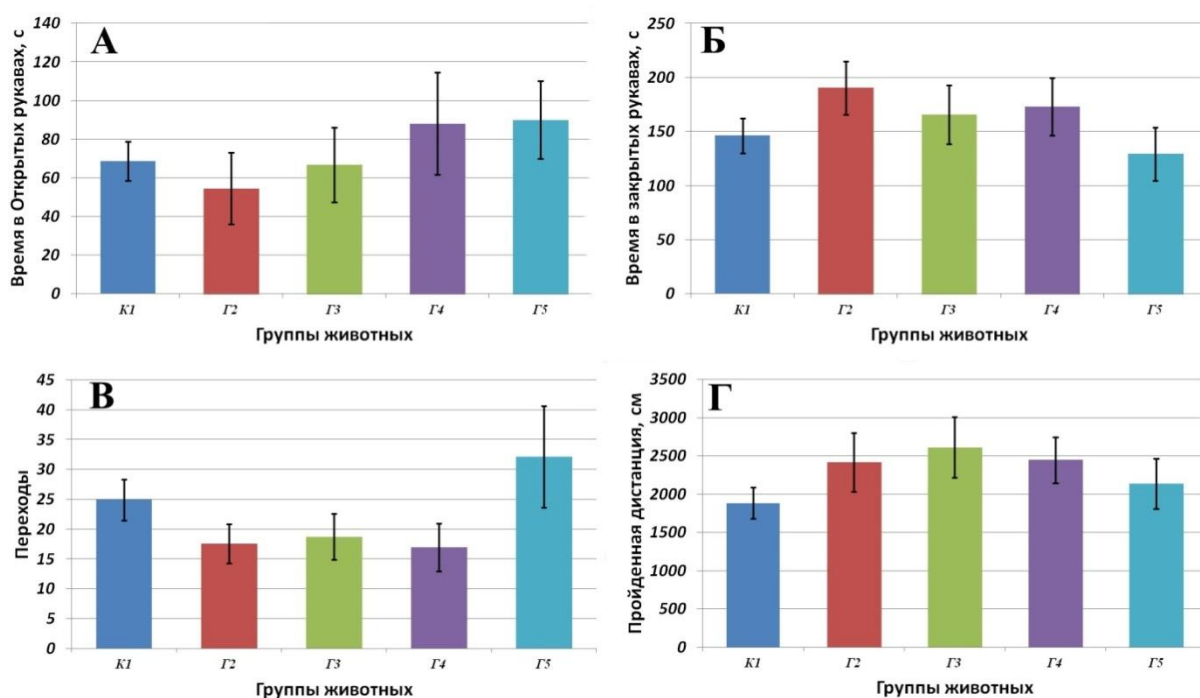


Примечание: А. Динамика изменения уровня глюкозы после введения инсулина с течением времени; Б. ППК - Площадь под кривой, ммоль/л\*180 мин. 1- различия достоверны по сравнению с группой К1 ( $p<0,05$ ); 2- различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p<0,05$ ); 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3 ( $p<0,05$ ); 4 – различия достоверны по сравнению с группой Г4 ( $p<0,05$ ); 5 – различия достоверны по сравнению с группой Г5 ( $p<0,05$ ).

**Рисунок 21** - Результаты инсулинорезистентного теста на 92 сутки

На рисунке 21А видно, что у животных группы Г5, получавших высокожировую рацион 60% по калорийности (ВЖР60), после введения инсулина уровень глюкозы крови оставался достоверно выше по сравнению с группой животных К1 на протяжении 180 минут. Через 60 минут после введения инсулина уровень глюкозы крови был максимальным у животных всех опытных групп и отличался достоверно от контрольных животных; для животных группы Г2, потреблявших ПСР с добавлением 2% холестерина, уровень глюкозы оставался достоверно выше по сравнению с контрольной группой начиная с 60 и до 180 минуты. На рисунке 21Б представлены результаты определения показателя ППК в инсулинорезистентном тесте. Показатель ППК был достоверно выше у животных всех опытных групп, получавших модифицированные рационы, по сравнению с животными группы К1 ( $p<0,05$ ). Полученный результат свидетельствует о развитии инсулинорезистентности в той или иной степени у всех животных опытных групп, т.е. о снижении чувствительности тканей к действию экзогенного инсулина.

На рисунке 22 (А, Б, В, Г) представлены результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» (95 сутки).



**Рисунок 22** - Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт»

При тестировании в ПКЛ не было отмечено достоверных отличий по всем определяемым показателям для животных всех групп ( $p \geq 0,05$ ).

В таблице 13 представлены результаты теста «Условный рефлекс пассивного избегания» (43, 44 и 65 сутки).

**Таблица 13** – Результаты теста «Условный рефлекс пассивного избегания»

Группы	Время пребывания, с					
	Первый тест (выработка УРПИ)		Второе тестирование (через 24 часа) Краткосрочная память		Третье тестирование (2 недели) Долгосрочная память	
	Время входа, с	Выработка УРПИ	Время входа, с	Процент вошедших животных	Время входа, с	Процент вошедших животных
K1	40±9	95%	165±9	16	155±12	16
Г2	56±8	95%	170±10	7	169±11	7
Г3	42±8	100%	168±12	7	150±16	20
Г4	42±8	100%	169±11	7	162±12	13
Г5	31±5	100%	169±11	7	147±16	25

Во время первого тестирования (выработки УРПИ) все животные групп Г3, Г4 и Г5 входили в темный отсек камеры (100% выработка рефлекса). При этом в группе К1 и Г2 по одному животному не вошли в темный отсек (95% выработка рефлекса). Эти животные были исключены из дальнейшего тестирования. На вторые сутки тестирования краткосрочной памяти статистически значимых различий по времени входа в темную камеру животных всех групп не выявлено ( $p \geq 0,05$ ). Через 3 недели при тестировании долгосрочной памяти также не выявлено значимых различий этого показателя для животных всех групп ( $p \geq 0,05$ ). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии влияния модифицированных рационов на обучаемость и память животных в моделируемых условиях.

В таблице 14, 15, 16 представлены результаты определения ряда показателей углеводного и липидного обмена в крови и печени животных всех групп после их выведения из эксперимента.

**Таблица 14** – Биохимические показатели крови (определяемые с использованием биохимического анализатора «Konelab 20i»)

Показатель	Группы животных				
	К1	Г2	Г3	Г4	Г5
Холестерин, ммоль/л	1,26 (1,08-1,49)	<b>2,30</b> <b>(1,56-2,99)<sup>1</sup></b>	1,58 (1,06-1,79)	1,25 (1,12-1,29) <sup>2</sup>	1,09 (1,00-1,19) <sup>2</sup>
ЛПВП, ммоль/л	0,55 (0,53-0,59)	0,54 (0,42-0,59)	<b>0,37</b> <b>(0,28-0,46)<sup>1,2</sup></b>	0,50 (0,49-0,53)	0,50 (0,43-0,54)
ЛПНП, ммоль/л	0,09 (0,06-0,16)	<b>1,36</b> <b>(0,98-1,76)<sup>1</sup></b>	<b>0,78</b> <b>(0,38-1,08)<sup>1</sup></b>	0,25 (0,19-0,36) <sup>2,3</sup>	0,06 (0,04-0,28) <sup>2,3</sup>
Триглицериды, ммоль/л	1,91 (0,93-2,93)	1,31 (0,96-1,71)	<b>0,63</b> <b>(0,59-0,86)<sup>1,2</sup></b>	1,21 (0,92-1,29) <sup>3</sup>	1,01 (0,96-1,30)
АЛТ, Ед/л	65,7 (59,6-68,8)	<b>114,5</b> <b>(74,0-137,2)<sup>1</sup></b>	<b>138,2 (124,5-142,5)<sup>1</sup></b>	78,3 (68,3-96,6) <sup>3</sup>	<b>113,6</b> <b>(81,5-142,5)<sup>1</sup></b>
АСТ, Ед/л	69,7 (51,6-101,8)	181,8 (86,1-242,5)	83,6 (77,2-143,4)	110,7 (82,3-170,2)	71,4 (44,5-96,2)
АСТ/АЛТ (коэфф. де Ритиса)	1,04 (0,77-1,75)	1,18 (0,71-2,65)	0,90 (0,62-1,03)	1,23 (1,00-2,28)	0,61 (0,47-0,72)
Билирубин общий, мкмоль/л	5,4 (5,2-6,3)	<b>4,1 (4,0-4,8)<sup>1</sup></b>	4,4 (3,8-5,6)	<b>4,5 (3,8-4,7)<sup>1</sup></b>	6,3 (4,4-6,8) <sup>2,4</sup>
Щелочная фосфатаза, Ед/л	241,0 (179,0-346,8)	181,3 (153,5-220,0)	<b>130,2 (121,9-157,9)<sup>1</sup></b>	<b>162,7 (117,8-222,7)<sup>1</sup></b>	243,9 (204,6-296,9) <sup>3,4</sup>
Белок общий, г/л	68,8 (67,7-70,9)	69,4 (65,6-75,4)	71,1 (69,6-73,0)	70,6 (68,3-72,9)	70,2 (68,3-73,9)
Глобулин, г/л	40,2±1,2	41,7±2,5	43,7±1,3	41,3±0,8	41,1±1,4

Альбумин, г/л	28,4±0,3	29,4±0,6	27,1±0,7 <sup>2</sup>	29,3±0,4 <sup>3</sup>	29,5±0,6 <sup>3</sup>
Мочевина, ммоль/л	6,56 (5,32-7,22)	6,47 (5,30-7,21)	<b>4,70</b> <b>(4,44-5,05)<sup>1</sup></b>	<b>5,07</b> <b>(4,87-5,68)<sup>1</sup></b>	<b>5,07</b> <b>(4,89-5,66)<sup>1</sup></b>
Мочевая кислота, мкмоль/л	78,0 (70,4-92,3)	72,6 (61,2-83,4)	62,0 (57,1-74,7)	71,7 (68,1-86,4)	67,4 (60,5-78,0)
Креатинин, мкмоль/л	57,3±2,1	49,5±2,2	<b>46,0±1,8<sup>1</sup></b>	<b>47,1±5,4<sup>1</sup></b>	<b>41,4±3,7<sup>1</sup></b>
Фосфор, ммоль/л	2,65±0,10	2,65±0,07	2,73±0,09	2,68±0,06	2,79±0,10
Кальций, ммоль/л	2,26 (2,20-2,34)	<b>2,46</b> <b>(2,34-2,58)<sup>1</sup></b>	2,34 (2,22-2,48)	<b>2,56</b> <b>(2,55-2,63)<sup>1,3</sup></b>	<b>2,76</b> <b>(2,48-2,99)<sup>1,3</sup></b>
Магний, ммоль/л	1,16±0,04	1,04±0,05	<b>1,00±0,05<sup>1</sup></b>	<b>0,93±0,05<sup>1</sup></b>	<b>0,99±0,05<sup>1</sup></b>
Глюкоза, ммоль/л	5,61 (5,50-6,11)	6,74 (5,97-7,38)	<b>4,60</b> <b>(4,54-4,87)<sup>1</sup></b>	6,63 (5,85-7,43)	4,91 (4,23-5,98)
Гликированный гемоглобин крови, %	5,15 (4,83-5,58)	5,25 (4,80-6,65)	5,00 (4,80-5,35)	4,90 (4,80-5,30)	4,95 (4,60-5,23)

Примечание – 1 – различия достоверны по сравнению с группой K1 ( $p<0,05$ ); 2 – различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p<0,05$ ); 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3 ( $p<0,05$ ).

Как следует из данных представленных в таблице 14 у животных опытной группы Г2, получавших ПСР с добавлением 2% холестерина, выявлены нарушения липидного профиля крови, а именно достоверное увеличение общего холестерина и ЛПНП по сравнению с животными контрольной группы K1 ( $p<0,01$ ), также у этих животных зафиксирован достоверный рост АЛТ и снижение общего билирубина ( $p<0,03$ ). Получено достоверное увеличение кальция в крови по сравнению с аналогичным показателем для животных контрольной группы K1.

Потребление животными ВЖР с добавлением 2% холестерина (группа Г3) приводило к достоверному снижению концентрации в крови ЛПВП и повышению ЛПНП ( $p<0,01$ ). Содержание общего холестерина в крови животных группы K1 и группы Г3 достоверно не различалось ( $p\geq 0,05$ ). Содержание триглицеридов в крови животных этой группы было достоверно ниже по сравнению с животными группы K1 ( $p<0,02$ ). Содержание АЛТ в сыворотке крови животных группы Г3 было достоверно выше по сравнению с группой K1 ( $p<0,01$ ). Концентрации щелочной фосфатазы, мочевины, креатинина, глюкозы и магния в сыворотки крови животных группы Г3 были достоверно ниже по сравнению с животными группы K1.

У животных получавших ВЖР50 (группа Г4) и ВЖР60 (группа Г5) не выявлено достоверных изменений липидного обмена в сыворотке крови по сравнению с животными группы К1. У животных группы Г4 показано достоверное снижение общего билирубина, щелочной фосфатазы, мочевины и креатинина. У животных группы Г5 выявлен достоверный рост АЛТ ( $p<0,01$ ) и достоверное снижение мочевины и креатинина. У животных обеих опытных групп выявлены достоверное повышение содержания кальция и достоверное снижение магния в крови.

**Таблица 15** – Биохимические показатели крови (определяемые методом ИФА)

Показатель	Группы животных				
	К1	Г2	Г3	Г4	Г5
Гидроперекиси, нг/мл	0,89 (0,85-0,95)	0,87 (0,84-1,00)	0,84 (0,82-0,88)	1,02 (0,91-1,12) <sup>3</sup>	1,12 (0,92-1,69) <sup>3</sup>
МДА, пг/мл	99,1 (62,7-188,8)	<b>188,0</b> <b>(155,4-203,5)<sup>1</sup></b>	<b>183,0</b> <b>(158,4-299,4)<sup>1</sup></b>	146,4 (131,5-158,1)	150,8 (128,7-186,6)
СОД, нг/мл	0,34 (0,32-0,34)	0,29 (0,29-0,32)	0,32 (0,30-0,37)	0,32 (0,32-0,44)	0,46 (0,35-0,56)
Каталаза, нг/мл	6,7 (5,6-7,6)	7,5 (6,2-7,7)	7,1 (5,9-7,5)	7,5 (7,0-7,9)	7,8 (7,5-7,9)
Грелин, пг/мл	376,1 (360,5-552,5)	<b>596,2</b> <b>(542,3-825,1)<sup>1</sup></b>	<b>607,2</b> <b>(550,4-748,1)<sup>1</sup></b>	495,6 (468,6-616,2)	<b>644,7</b> <b>(532,7-812,7)<sup>1</sup></b>
Лептин, нг/мл	1,6 (1,4-1,8)	<b>0,9 (0,7-1,1)<sup>1</sup></b>	<b>1,0 (0,8-1,4)<sup>1</sup></b>	1,2 (1,1-1,5)	<b>1,1 (1,0-1,3)<sup>1</sup></b>
С-пептид, пг/мл	258,5±28,4	<b>359,9±38,2<sup>1</sup></b>	<b>357,6±21,2<sup>1</sup></b>	<b>346,7±32,7<sup>1</sup></b>	<b>393,8±20,8<sup>1</sup></b>

Примечание – 1 – различия достоверны по сравнению с группой К1 ( $p<0,05$ ); 2 – различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p<0,05$ ).

Как следует из данных, представленных в таблице 15 у животных обеих опытных групп Г2 и Г3, получавших рационы с добавлением 2% холестерина, выявлено достоверное накопление МДА в сыворотке крови, что свидетельствует о повышенном перекисном окислении липидов. В сыворотке крови животных групп Г2, Г3 и Г5 показано достоверное увеличение уровня грелина и С-пептида ( $p<0,03$ ) при одновременном достоверном снижении содержания лептина ( $p<0,03$ ). Для животных группы Г4, получавших ВЖР50, имело место только достоверное увеличение С-пептида.

**Таблица 16** - Биохимические показатели печени

Показатель	Группы животных				
	K1	Г2	Г3	Г4	Г5
Относительная масса печени, %	2,6 (2,4-2,8)	<b>4,8</b> <b>(4,7-5,1)<sup>1</sup></b>	<b>5,0</b> <b>(4,3-5,3)<sup>1</sup></b>	<b>2,7</b> <b>(2,5-3,0)<sup>2,3</sup></b>	<b>2,8</b> <b>(2,7-3,2)<sup>1,2,3</sup></b>
Содержание жира в печени, мг/г	64,2 (54,1-71,2)	<b>335,9</b> <b>(292,6-350,6)<sup>1</sup></b>	<b>328,6</b> <b>(301,5-378,9)<sup>1</sup></b>	<b>155,1</b> <b>(124,9-199,0)<sup>1,2,3</sup></b>	<b>240,4</b> <b>(176,8-280,6)<sup>1,2,3</sup></b>
Холестерин, мг/г печени	4,1 (3,1-4,7)	<b>60,2</b> <b>(55,1-66,3)<sup>1</sup></b>	<b>61,4</b> <b>(56,1-74,9)<sup>1</sup></b>	<b>7,2</b> <b>(6,6-8,7)<sup>1,2,3</sup></b>	<b>8,6</b> <b>(4,8-11,7)<sup>1,2,3</sup></b>
Триглицериды, мг/г печени	3,8 (3,3-5,4)	<b>76,5</b> <b>(66,1-105,8)<sup>1</sup></b>	<b>99,1</b> <b>(94,0-113,8)<sup>1</sup></b>	<b>50,7</b> <b>(30,7-99,0)<sup>1</sup></b>	<b>127,4</b> <b>(69,2-160,6)<sup>1</sup></b>

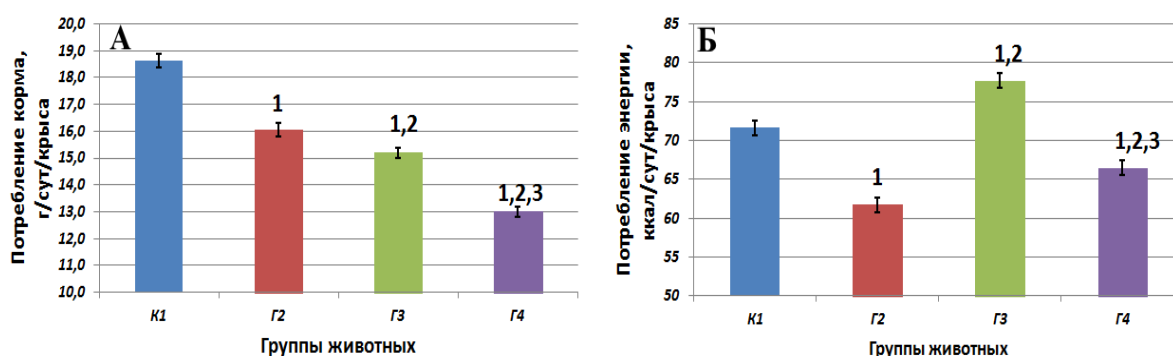
Примечание: 1 – различия достоверны по сравнению с контрольной группой Г1 ( $p < 0,05$ ); 2- различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p < 0,05$ ); 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3 ( $p < 0,05$ ).

В печени животных группы Г4 и Г5, потреблявших высокожировую рацион с различной калорийностью, установлено достоверное увеличение содержание жира, холестерина и триглицеридов по сравнению с животными контрольной группы K1 ( $p < 0,01$ ), и одновременно достоверно сниженное значение этих показателей по сравнению с животными групп Г2 и Г3, потреблявших рационы с добавлением холестерина ( $p < 0,01$ ). Полученные результаты демонстрируют, что введение в рацион экзогенного холестерина приводило к накоплению экстремально высокого количества жира и холестерина во влажной ткани печени по сравнению с группами животных, в рацион которых холестерин не вводился.

### 3.3 Моделирование у крыс нарушений углеводного, липидного и холестерина обмена, индуцированных потреблением высокожирового рациона, содержащего холестерин, и хронической принудительной иммобилизацией (дизайн эксперимента №2)

Результаты исследования представлены в работе [33]. Общее состояние животных всех групп по внешнему виду и качеству шерстного покрова при ежедневном осмотре на протяжении всего эксперимента было удовлетворительным.

На рисунке 23 представлены данные о среднесуточном потреблении корма и энергии на протяжении всего эксперимента.



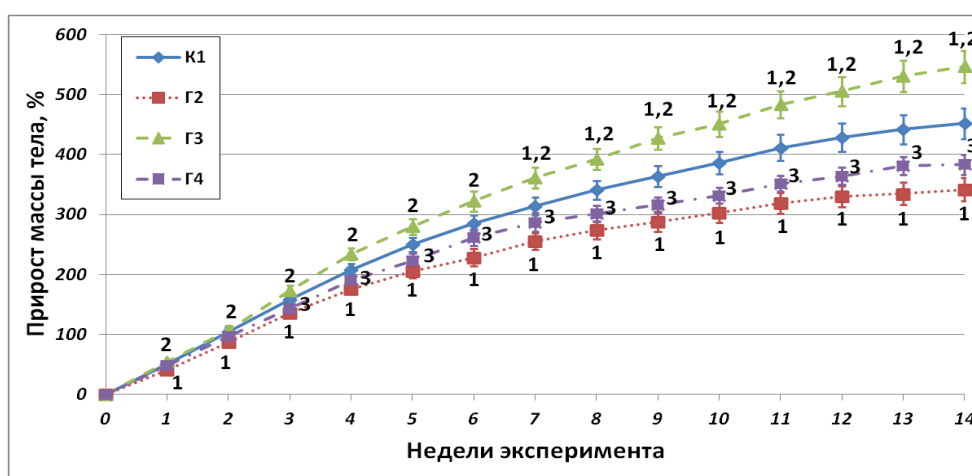
Примечание: 1 – различия достоверны относительно K1 ( $p < 0,05$ ); 2 – различия достоверны относительно G2 ( $p < 0,05$ ); 3 – различия достоверны относительно G3 ( $p < 0,05$ ).

**Рисунок 23** – Среднее потребление корма (г/сут/крыса, А) и энергии (ккал/сут/крыса, Б)

Животные группы K1, получавшие ПСР, в среднем ежесуточно на протяжении всего эксперимента потребляли достоверно больше корма и энергии по сравнению с животными группы G2, также получавшими ПСР, но подверженными ежедневной иммобилизации ( $p < 0,01$ ). Высокая калорийность высокожирового рациона достоверно снизила среднесуточное потребление корма животными группы G3, получавшими ВЖР с добавлением 2% холестерина, и тем не менее, увеличила среднесуточное потребление энергии этими животными по сравнению с животными группы K1 ( $p < 0,01$ ). Сочетанное воздействие



принудительной иммобилизации и высокожирового рациона привело к достоверному снижению среднесуточного потребления корма и энергии крысами группы Г4 по сравнению с животными групп К1 и группы Г3 ( $p < 0,01$ ). На протяжении всего эксперимента животные группы Г2 потребляли достоверно больше корма, но достоверно меньше энергии по сравнению с животными групп Г3 и Г4.



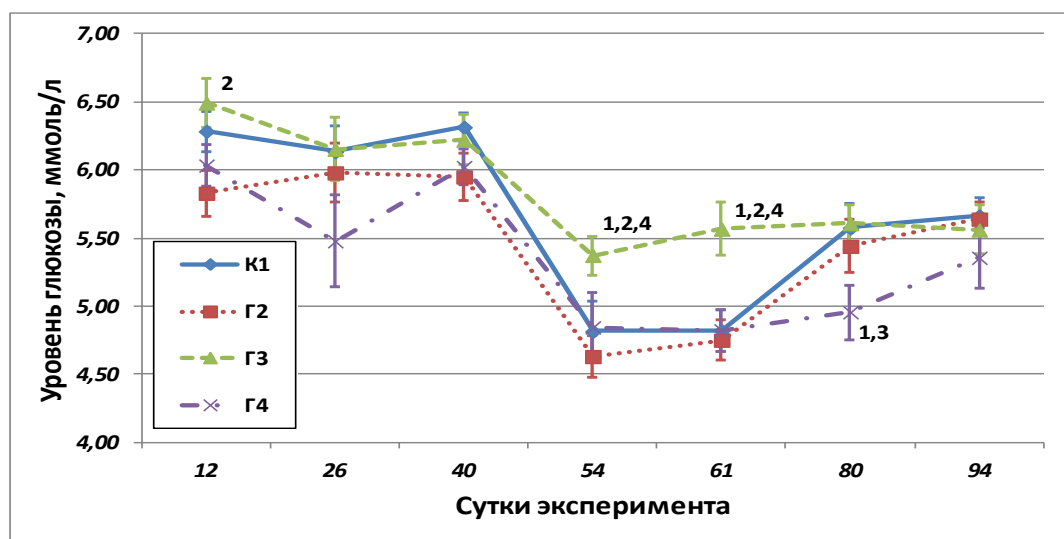
Примечание: 1 – различия достоверны относительно К1 ( $p < 0,05$ ); 2- различия достоверны относительно Г2 ( $p < 0,05$ ); 3 – различия достоверны относительно Г3 ( $p < 0,05$ ).

**Рисунок 24** - Прирост массы тела животных, %

Прирост массы тела животных группы Г2 был достоверно ниже, чем прирост массы тела животных группы К1 на протяжении всего эксперимента ( $p < 0,01$ ). Начиная с 7 недели кормления и до завершения эксперимента прирост массы тела животных группы Г3, получавших ВЖР с добавлением 2% холестерина, был достоверно выше по сравнению с приростом массы тела животных группы К1 ( $p < 0,01$ ). Прирост массы тела животных группы Г4 был достоверно ниже, чем прирост массы тела животных группы Г3 начиная с 3 недели эксперимента ( $p < 0,01$ ) и достоверно не отличался от группы К1 на протяжении всего эксперимента ( $p \geq 0,05$ ). По завершении эксперимента массы тела животных группы К1 ( $426 \pm 16$ г) и группы Г3 ( $505 \pm 19$ г) были достоверно

выше по сравнению с массой тела животных группы Г2 ( $346 \pm 14$ г) и группы Г4 ( $378 \pm 8$ г), подвергавшихся вследствие ежедневной иммобилизации стрессу, приводящему к снижению аппетита ( $p < 0,04$ ).

Мониторинг уровня глюкозы в крови животных представлен на рисунке 25.

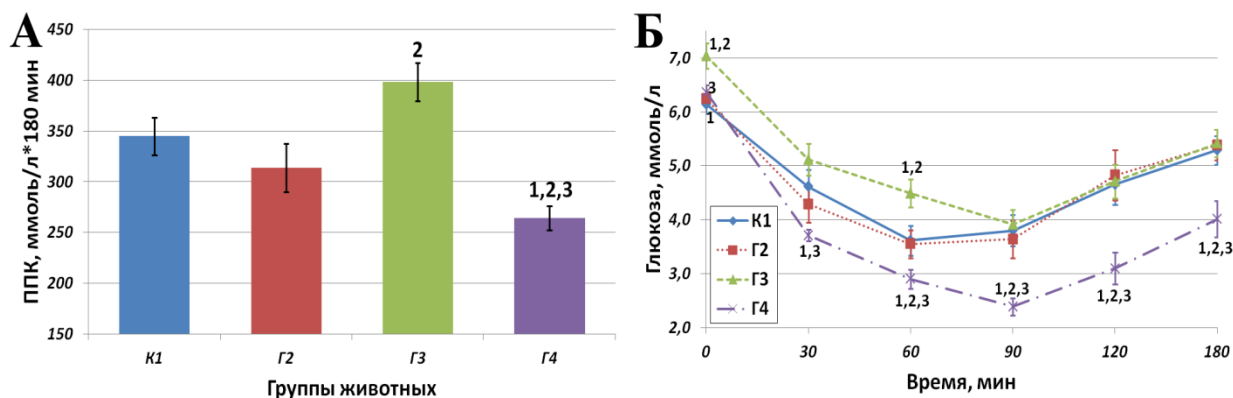


Примечание – 1 – различия достоверны по сравнению с группой К1 ( $p < 0,05$ ); 2 – различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p < 0,05$ ); 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3 ( $p < 0,05$ ); 4 – различия достоверны по сравнению с группой Г4 ( $p < 0,05$ ).

**Рисунок 25** – Динамика уровня глюкозы животных, ммоль/л

На протяжении эксперимента с кормлением средние значения концентрации глюкозы в крови варьировали у животных всех групп, не превышая, однако исходных значений и достоверно не отличались между группами на момент окончания эксперимента ( $p \geq 0,05$ ).

На рисунке 26 представлены результаты проведения теста на инсулинорезистентность (92 сутки).

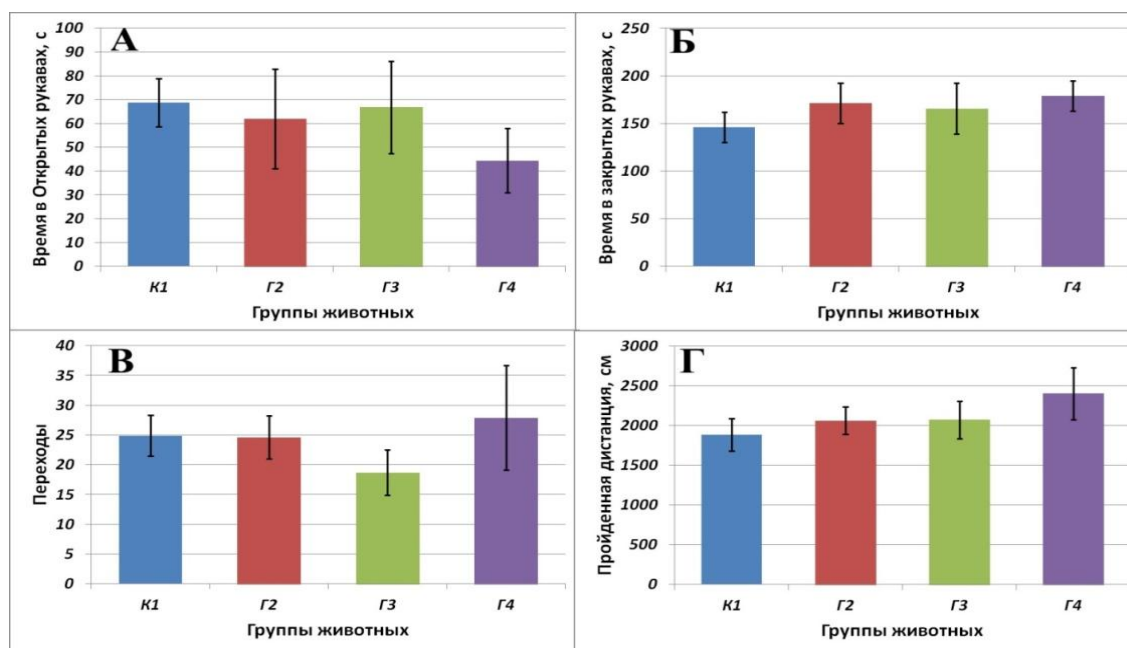


Примечание: 1 – различия достоверны относительно K1 ( $p < 0,05$ ); 2 – различия достоверны относительно G2 ( $p < 0,05$ ); 3 – различия достоверны относительно G3 ( $p < 0,05$ ).

**Рисунок 26** – Инсулинорезистентный тест. Площадь под кривой, ммоль/л\*180 мин (А), уровень глюкозы, ммоль/л (Б)

Инсулинорезистентность, характеризуемая показателем ППК, была достоверно выше у животных группы G3, получавших ВЖР с добавлением 2% холестерина и имевших наибольшую массу тела по окончании эксперимента ( $p < 0,01$ ). При этом у животных группы G4, получавших ВЖР в условиях принудительной иммобилизации, показатель ППК был напротив достоверно ниже по сравнению с показателем для животных других групп ( $p < 0,04$ ). Принудительная иммобилизация животных группы G2, потреблявших ПСР, не приводила к достоверным изменениям инсулинорезистентности по сравнению с животными группы K1 ( $p \geq 0,05$ ).

На рисунке 27 (А, Б, В, Г) представлены результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» (95 сутки).



**Рисунок 27** - Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт»

При тестировании в ПКЛ не было отмечено достоверных отличий между животными всех групп по показателям тревожности и исследовательской активности ( $p \geq 0,05$ ).

В таблице 17 представлены результаты оценки когнитивных функций и памяти лабораторных животных в тесте «Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ).

**Таблица 17** – Результаты теста «Условный рефлекс пассивного избегания»

Группы	Время пребывания, с			
	Первый тест (выработка УРПИ)		Второе тестирование (через 24 часа) Краткосрочная память	Третье тестирование (2 недели) Долгосрочная память
	Время входа, с	Выработка УРПИ	Время входа, с	Время входа, с
K1	40±9	95%	165±9	155±12
Г2	66±15	100%	180	180
Г3	42±8	95%	168±12	150±16
Г4	40±7	95%	180	180

Во время первого тестирования (выработки УРПИ) все животные группы Г2 входили в темный отсек камеры (100% выработка рефлекса). При этом в группе К1, Г3, Г4 было по одному животному, которые не вошли в темный отсек (95% выработка рефлекса). Эти животные были исключены из дальнейшего тестирования. На вторые сутки тестирования краткосрочной памяти статистически значимых различий по времени входа в темную камеру животных всех групп не выявлено ( $p \geq 0,05$ ). Через 3 недели при тестировании долгосрочной памяти также не выявлено значимых различий между группами ( $p \geq 0,05$ ). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии влияния как высокожирового рациона с добавлением холестерина, так и иммобилизации на краткосрочную и долгосрочную память животных.

В таблице №18 представлены результаты определения биохимических показателей в крови и печени животных всех групп после их выведения из эксперимента.

**Таблица 18** – Биохимические показатели крови и печени

Показатель	Группы животных			
	К1	Г2	Г3	Г4
Сыворотка крови				
Холестерин, ммоль/л	1,26 (1,08-1,49)	1,23 (1,13-1,40)	1,58 (1,06-1,79)	1,45 (1,26-1,52)
ЛПВП, ммоль/л	0,55 (0,53-0,59)	0,53 (0,52-0,62)	<b>0,37 (0,28-0,46)<sup>1,2</sup></b>	0,48 (0,42-0,55)
ЛПНП, ммоль/л	0,09 (0,06-0,16)	0,28 (0,10-0,32)	<b>0,78 (0,38-1,08)<sup>1,2</sup></b>	<b>0,54 (0,45-0,67)<sup>1,2</sup></b>
Триглицериды, ммоль/л	1,91 (0,93-2,93)	1,15 (1,01-1,49)	<b>0,63 (0,59-0,86)<sup>1,2</sup></b>	0,86 (0,67-1,08)
АСТ, Ед/л	69,7 (51,6-101,8)	88,9 (73,7- 125,7)	83,6 (77,1-143,4)	60,9 (45,6-95,3)
АЛТ, Ед/л	65,7 (59,5-68,8)	<b>87,5 (81,5-102,0)<sup>1</sup></b>	<b>138,2 (124,5-142,5)<sup>1,2</sup></b>	<b>135,1 (129,7-179,9)<sup>1,2</sup></b>
АСТ/АЛТ (коэфф. де Ритиса)	1,04 (0,77-1,75)	1,05 (0,81-1,53)	0,90 (0,62-1,03)	<b>0,39 (0,27-0,82)<sup>1,2</sup></b>
Билирубин общий, мкмоль/л	5,43 (5,24-6,25)	5,55 (5,26-6,04)	4,43 (3,84-5,59)	4,28 (3,95-5,21)

Щелочная фосфатаза, Ед/л	241 (179-347)	215 (174-323)	<b>130 (122-158)<sup>1,2</sup></b>	<b>234 (194-345)<sup>3</sup></b>
Белок общий, г/л	68,6±1,1	68,6±1,4	70,8±1,3	69,9±2,1
Альбумин, г/л	28,4±0,3	28,3±0,6	27,1±0,7	<b>29,2±0,9<sup>3</sup></b>
Глобулин, г/л	40,2±1,2	40,4±1,3	43,7±1,4	40,7±1,7
Креатинин, мкмоль/л	57,3±2,1	58,1±2,8	<b>46,0±1,9<sup>1,2</sup></b>	<b>45,1±3,0<sup>1,2</sup></b>
Мочевая кислота, мкмоль/л	78 (70-92)	78 (75-84)	62 (57-75)	67 (53-94)
Мочевина, ммоль/л	6,5±0,4	6,5±0,3	<b>5,1±0,5<sup>1,2</sup></b>	<b>5,0±0,2<sup>1,2</sup></b>
Фосфор, ммоль/л	2,72 (2,48-2,79)	2,78 (2,52-3,10)	2,58 (2,55-2,85)	2,61 (2,35-2,78)
Кальций, ммоль/л	2,26 (2,20-2,34)	2,25 (2,23-2,34)	2,34 (2,22-2,48)	2,43 (2,12-2,53)
Магний, ммоль/л	1,16±0,04	1,12±0,04	1,00±0,05	0,99±0,08
Глюкоза, ммоль/л	5,6 (5,5-6,1)	5,6 (5,4-6,5)	<b>4,6 (4,5-4,9)<sup>1,2</sup></b>	<b>5,3 (4,8-6,1)<sup>3</sup></b>
Гликированный гемоглобин крови, %	5,15 (4,83-5,58)	4,85 (4,70-5,83)	5,00 (4,80-5,35)	5,05 (4,90-6,70)
Биохимические показатели печени (влажной ткани печени)				
Относительная масса печени, %	2,6 (2,4-2,8)	2,7 (2,4-2,8)	<b>5,0 (4,3-5,3)<sup>1,2</sup></b>	<b>4,3 (4,2-4,7)<sup>1,2,3</sup></b>
Содержание жира, мг/г	64,2 (54,1-71,2)	50,7 (47,5-54,1)	<b>328,6 (301,5-378,9)<sup>1,2</sup></b>	<b>296,7 (283,5-306,2)<sup>1,2</sup></b>
Холестерин, мг/г	4,1 (3,1-4,7)	3,4 (2,8-3,8)	<b>61,4 (56,1-74,9)<sup>1,2</sup></b>	<b>63,6 (56,3-65,4)<sup>1,2</sup></b>
Триглицериды, мг/г	4,2 (3,3-8,7)	2,8 (2,3-3,7)	<b>99,1 (94,0-113,8)<sup>1,2</sup></b>	<b>103,3 (88,8-114,6)<sup>1,2</sup></b>

Примечание: 1 – различия достоверны по сравнению с контрольной группой К1; 2- различия достоверны по сравнению с группой Г2; 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3; (p<0,05).

Достоверные нарушения липидного и холестеринового обмена выявлены в крови и печени животных группы Г3 и группы Г4, получавших ВЖР с добавкой 2% холестерина, по сравнению с животными группы К1. В крови животных этих групп достоверно повышены уровни ЛПНП и снижены концентрации ЛПВП (p<0,01). В печени этих животных имел место выраженный жировой гепатоз, характеризуемый экстремально высоким содержанием жира, холестерина и

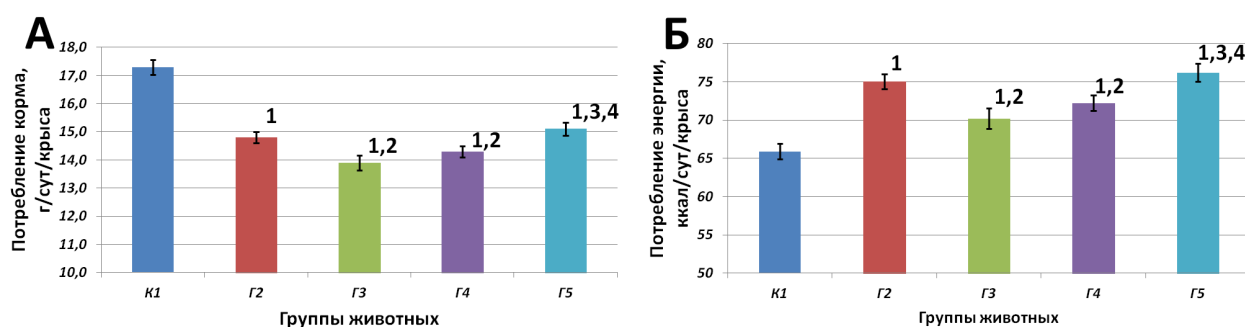
триглицеридов, и отмечено достоверное повышение уровня АЛТ по сравнению с крысами контрольной группы К1 ( $p < 0,01$ ). При этом коэффициент де Ритиса был достоверно ниже для животных группы Г4 ( $p < 0,03$ ). Полученные значения выходят за интервалы физиологической нормы для крыс, что свидетельствует о нарушении функционирования печени у животных групп Г3 и Г4.

### 3.4 Моделирование у крыс нарушений жирового, холестеринового и углеводного обмена, индуцированных потреблением высокожировых рационов с различным содержанием экзогенного холестерина

#### (дизайн эксперимента №3)

Результаты исследования представлены в работе [13, 10]. Общее состояние животных всех групп по внешнему виду и качеству шерстного покрова при ежедневном осмотре на протяжении всего эксперимента было удовлетворительным.

На рисунке 28 представлено среднее суточное потребление корма и энергии животными (с учетом кумулятивного потребления за весь эксперимент).



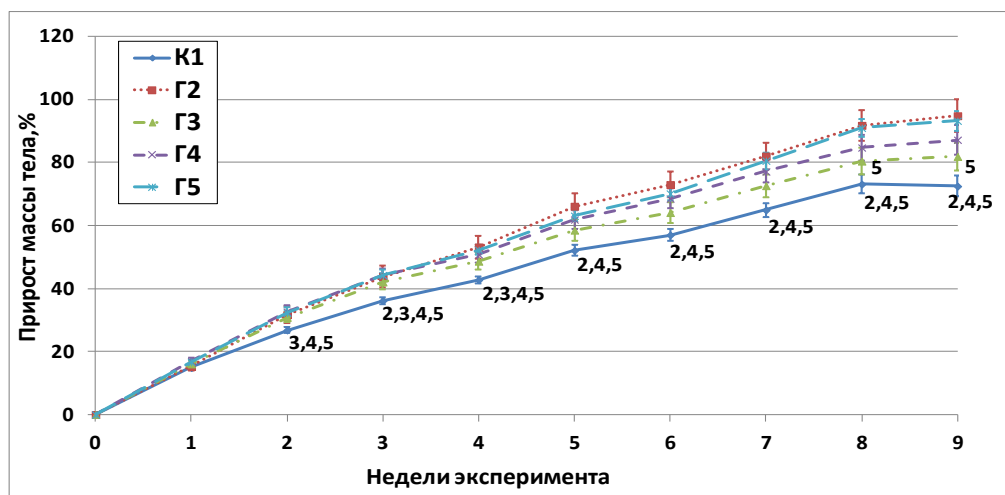
Примечание – 1 - различия достоверны по сравнению с контрольной группой K1; 2 – различия достоверны по сравнению с группой G2; 3 – различия достоверны по сравнению с группой G3; 4 – различия достоверны по сравнению с группой G4;  $p < 0,05$ .

**Рисунок 28** - Среднее потребление корма (г/сут/крыса, А) и энергии (ккал/сут/крыса, Б)

На протяжении всего эксперимента крысы опытной группы G2, получавшие ВЖР, и крысы групп G3 (ВЖР+0,5% хол), G4 (ВЖР+1% холл) и G5 (ВЖР+2%хол) потребляли достоверно меньше корма по сравнению с животными контрольной группы K1 ( $p < 0,01$ ). Такое различие в потреблении связано с большей калорийностью высокожирового рациона. При этом потребление энергии животными групп G2-G5 было тем не менее достоверно выше по сравнению с контрольной группой K1 ( $p < 0,01$ ).



На рисунке 29 представлены результаты мониторинга прироста массы тела животных на протяжении всего эксперимента.



Примечание: 2- различия достоверны по сравнению с группой Г2; 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3; 4 – различия достоверны по сравнению с группой Г4; 5 – различия достоверны по сравнению с группой Г5;  $p < 0,05$ .

**Рисунок 29** - Прирост массы тела животных, %

Прирост массы тела животных опытных групп Г2, Г4 и Г5 начиная с 3 недели кормления и до окончания эксперимента, был достоверно выше по сравнению с приростом животных контрольной группы К1. Прирост массы тела крыс групп Г2, Г4 и Г5 достоверно между группами не отличался на протяжении всего эксперимента ( $p \geq 0,05$ ). На момент окончания эксперимента средняя масса тела животных группы К1 ( $408 \pm 15$  г) была достоверно ниже средней массы тела крыс групп Г2 ( $456 \pm 14$  г) и Г5 ( $448 \pm 12$  г). Для животных групп Г3 ( $426 \pm 23$  г) и Г4 ( $440 \pm 14$  г) различия по средней массе тела недостоверны по сравнению с контрольной группой К1 ( $p \geq 0,05$ ).

В таблице 19 представлены результаты изучения состава тела животных.

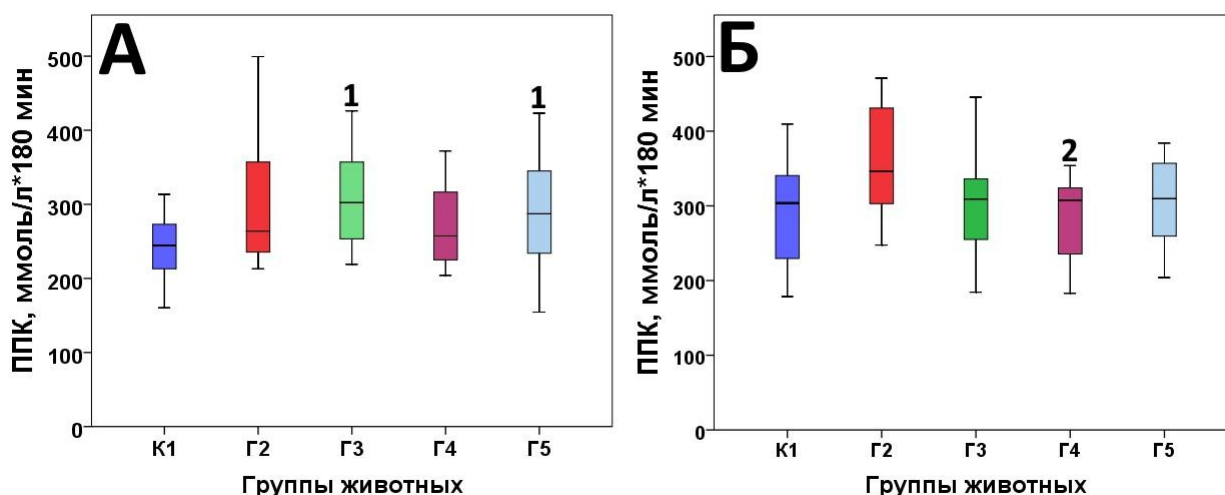
**Таблица 19** - Состав тела животных

Показатель	Группы животных				
	К1	Г2	Г3	Г4	Г5
<b>57 сутки</b>					
Жировая масса, %	7,1 (6,1-8,4)	<b>11,6</b> <b>(10,6-15,1)<sup>1</sup></b>	<b>10,7</b> <b>(8,3-12,5)<sup>1</sup></b>	<b>11,2</b> <b>(9,5-14,7)<sup>1</sup></b>	<b>11,4</b> <b>(10,4-12,9)<sup>1</sup></b>
Тошная масса, %	88,0 (87-89,2)	<b>83,0</b> <b>(80,2-84,6)<sup>1</sup></b>	<b>84,5</b> <b>(82,5-86,9)<sup>1</sup></b>	<b>84,8</b> <b>(80,6-85,8)<sup>1</sup></b>	<b>83,8</b> <b>(81,8-85,1)<sup>1</sup></b>
Свободная вода, %	0,47 (0,22-0,94)	0,36 (0,18-0,54)	<b>0,24</b> <b>(0,13-0,28)<sup>1</sup></b>	<b>0,19</b> <b>(0,08-0,26)<sup>1,2</sup></b>	<b>0,20</b> <b>(0,14-0,30)<sup>1</sup></b>
Общая вода, %	73,8 (73,1-75,2)	<b>70,8</b> <b>(68,2-72,1)<sup>1</sup></b>	<b>71,4</b> <b>(69,5-73,7)<sup>1</sup></b>	<b>71,5</b> <b>(67,8-72,5)<sup>1</sup></b>	<b>71,1</b> <b>(69,8-72,1)<sup>1</sup></b>
<b>82 сутки</b>					
Жировая масса, %	10,1 (8,0-12,1) *	<b>16,3</b> <b>(12,4-19,5)<sup>1*</sup></b>	11,9 (9,1-17,8)	<b>14,4</b> <b>(12,4-16,5)<sup>1</sup></b>	<b>14,9</b> <b>(13,5-16,6)<sup>1*</sup></b>
Тошная масса, %	84,7 (82,7-86,2) *	<b>78,0</b> <b>(74,7-81,6)<sup>1*</sup></b>	83,4 (76,6-85,3)	<b>80,5</b> <b>(78,1-82,6)<sup>1*</sup></b>	<b>80,3</b> <b>(78,0-81,4)<sup>1*</sup></b>
Свободная вода, %	0,29 (0,21-0,44)	<b>0,16</b> <b>(0,09-0,20)<sup>1*</sup></b>	<b>0,17</b> <b>(0,15-0,22)<sup>1</sup></b>	<b>0,22</b> <b>(0,20-0,29)<sup>2,3</sup></b>	<b>0,22</b> <b>(0,19-0,25)<sup>2</sup></b>
Общая вода, %	70,8 (69,6-71,9) *	<b>65,9</b> <b>(62,9-68,9)<sup>1*</sup></b>	69,7 (64,7-72,8)	<b>67,9</b> <b>(66,1-69,4)<sup>1*</sup></b>	<b>67,9</b> <b>(66,2-68,6)<sup>1*</sup></b>

Примечание – 1- различия достоверны по сравнению с группой К1 ( $p < 0,05$ ); \* - различия достоверны по сравнению с тестом на 57 сутки ( $p < 0,05$ ).

На 57 сутки эксперимента состав тела животных всех опытных групп, получавших высокожировые рационы (без и с добавлением холестерина), изменился достоверно по сравнению с животными контрольной группы К1: процентное содержание жира у этих животных стало достоверно выше, при одновременном достоверном снижении содержания мышечной массы тела и общей воды ( $p < 0,01$ ). При этом не было отмечено достоверных отличий между животными опытных групп по данным показателям ( $p \geq 0,05$ ). На 82 сутки эксперимента накопление жировой массы тела у животных групп Г2, Г4 и Г5 продолжилось и было достоверно выше как по сравнению с данным показателем на 57 сутки, так и по сравнению с контрольной группой К1 ( $p < 0,01$ ). Содержание жировой, тощей массы и общей воды у животных опытной группы Г3, получавших ВЖР+ 0,5% холестерина, не отличалось от данных показателей для контрольной группы К1 и от показателей, определенных на 57 сутки ( $p \geq 0,05$ ).

На рисунке 30 (А, Б) приведены результаты теста на инсулинорезистентность на 58 и 85 сутки эксперимента.



Примечание – 1- различия достоверны по сравнению с группой K1 ( $p < 0,05$ ); 2- различия достоверны по сравнению с группой G2 ( $p < 0,05$ ); А – ППК на 58 сутки; Б - ППК на 85 сутки.

**Рисунок 30** - Результаты инсулинорезистентного теста

На 58 сутки эксперимента установлено увеличение показателя ППК для всех опытных групп по сравнению с контрольной группой, при этом достоверное отличие выявлено для животных групп Г3 и Г5 ( $p < 0,02$ ). При втором тестировании на 85 сутки эксперимента показатель ППК достоверно не отличался у всех опытных групп от соответствующего показателя для контрольной группы животных K1 ( $p \geq 0,05$ ), что вероятно связано с возрастным увеличением показателя ППК для интактных животных (группа K1).

В таблице 20 представлены результаты общего анализа крови животных.

**Таблица 20** – Общий анализ крови

Показатель	Группа животных				
	K1	G2	G3	G4	G5
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	9,8 (8,9-10,9)	10,5 (9,6-11,2)	11,0 (8,9-12,2)	12,0 (10,3-13,6)	9,8 (8,0-10,8)
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	6,9 (6,2-7,7)	7,5 (6,4-8,1)	8,1 (6,2-9,3)	8,2 (7,1-9,7)	6,6 (5,6-7,6)
Лимфоциты, %	70,4 (67,4-73,9)	70,8 (67,6-74,3)	73,3 (67,3-76,2)	70,9 (67,0-74,9)	68,9 (67,1-70,0)
Моноциты, $10^9/\text{л}$	0,60 (0,60-0,70)	0,60 (0,50-0,68)	0,60 (0,45-0,70)	0,60 (0,40-0,75)	0,40 (0,30-0,50)
Моноциты, %	6,2 (5,6-7,5)	6,4 (4,8-7,1)	6,3 (4,4-6,9)	5,4 (4,2-5,7) <sup>1</sup>	4,5 (3,8-6,6) <sup>1</sup>
Гранулоциты, $10^9/\text{л}$	2,2 (1,9-2,5)	2,5 (1,9-2,9)	2,4 (2,2-2,7)	2,8 (2,2-3,2)	2,5 (2,0-2,9)
Гранулоциты, %	22,4 (20,6-24,9)	24,5 (20,0-26,2)	22,1 (19,0-25,6)	23,3 (19,5-28,8)	25,6 (24,5-28,1)

Гемоглобин, г/л	158,5±2,4	152,4±1,8	152,0±2,0	153,1±1,7	<b>149,1±2,7<sup>1</sup></b>
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	18,2 (17,8-18,6)	18,5 (17,9-18,9)	18,4 (18,1-18,5)	<b>17,7 (17,2-18,3)<sup>2</sup></b>	<b>17,8 (17,6-18,1)<sup>2</sup></b>
Средняя концентрация клеточного гемоглобина в эритроцитах, г/л	372,0 (356,0-377,0)	376,5 (372,0-379,8)	378,0 (372,5-380,5)	<b>378,0 (376,5-379,0)<sup>1</sup></b>	<b>380,0 (377,3-384,3)<sup>1,2</sup></b>
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	8,8 (8,4-9,4)	<b>8,2 (7,9-8,7)<sup>1</sup></b>	<b>8,3 (8,2-8,4)<sup>1</sup></b>	8,7 (8,4-8,8)	8,5 (8,0-8,8)
Средний объем эритроцита, fl	49,7 (47,6-50,6)	49,0 (47,6-50,4)	48,3 (48,0-49,3)	<b>46,9 (45,3-48,5)<sup>1,2,3</sup></b>	<b>46,7 (46,2-47,5)<sup>1,2,3</sup></b>
Ширина распределения эритроцитов по объему, относительная, %	15,1 (14,6-16,4)	15,0 (14,4-15,6)	14,3 (14,0-15,5)	14,9 (14,1-17,0)	15,5 (14,8-16,3) <sup>3</sup>
Ширина распределения эритроцитов по объему, абсолютная, fl	31,7 (31,6-33,7)	31,8 (31,4-32,5)	31,2 (30,8-31,8)	<b>30,9 (30,3-31,9)<sup>1,2</sup></b>	<b>30,8 (30,1-31,4)<sup>1,2</sup></b>
Гематокрит, %	43,2±0,7	<b>40,6±0,5<sup>1</sup></b>	<b>40,4±0,5<sup>1</sup></b>	<b>40,6±0,5<sup>1</sup></b>	<b>39,2±0,7<sup>1</sup></b>
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	1061,0 (677,0-1969,0)	826,5 (775,3-961,0)	940,0 (757,5-974,0)	821,0 (720,0-908,8)	871,0 (715,8-981,5)
Средний объем тромбоцита, fl	6,05±0,14	6,03±0,05	5,95±0,10	5,83±0,07	5,94±0,05

Примечание – fl – фемтолитр ( $1 \cdot 10^{-15}$ ); 1 – различия достоверны по сравнению с группой К1; 2 – различия достоверны по сравнению с группой Г2; 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3.

У животных всех опытных групп, можно отметить достоверное снижение гематокрита по сравнению с животными контрольной группы К1. При этом у животных групп Г2 и Г3 выявлено достоверное снижение эритроцитов в крови. Тогда как у животных групп Г4 и Г5, получавших рационы, содержащие 1% и 2% холестерина, отмечено снижение моноцитов, среднего объема эритроцита, среднего содержания гемоглобина в эритроците и абсолютного значения ширины распределения эритроцитов по объему и повышение средней концентрации клеточного гемоглобина в эритроцитах по сравнению с животными контрольной группы К1 и опытной группы Г2. У животных группы Г5 дополнительно достоверно снизился уровень гемоглобина.

В таблицах 21, 22 и 23 представлены результаты определения ряда показателей углеводного и липидного обмена в крови и печени животных всех групп после их выведения из эксперимента.

**Таблица 21** - Биохимические показатели крови (определяемые с использованием биохимического анализатора «Konelab 20i»)

Показатель	Группы животных				
	K1	Г2	Г3	Г4	Г5
Холестерин, ммоль/л	1,54±0,07	<b>1,87±0,09<sup>1</sup></b>	<b>2,09±0,08<sup>1</sup></b>	<b>2,11±0,14<sup>1</sup></b>	<b>2,16±0,11<sup>1,2</sup></b>
ЛПВП, ммоль/л	0,84±0,04	<b>1,05±0,05<sup>1</sup></b>	0,91±0,03	0,96±0,14	0,88±0,07
Триглицериды, ммоль/л	1,28 (1,20-1,49)	<b>2,09 (1,74-2,37)<sup>1</sup></b>	1,53 (1,32-1,88)	<b>1,24 (1,16-1,42)<sup>2</sup></b>	<b>1,27 (1,00-1,42)<sup>2</sup></b>
АЛТ, Ед./л	61,9 (59,0-71,4)	71,4 (60,1-83,9)	73,3 (67,3-87,4)	87,8 (73,3-107,4)	<b>97,8 (86,7-117,3)<sup>1,2</sup></b>
Билирубин общий, мкмоль/л	4,70 (4,52-4,88)	<b>3,98 (3,93-4,09)<sup>1</sup></b>	<b>3,64 (3,46-3,90)<sup>1</sup></b>	<b>3,72 (3,64-3,90)<sup>1</sup></b>	<b>3,56 (3,47-4,08)<sup>1</sup></b>
Щелочная фосфатаза, Ед/л	168 (126-194)	153 (131-175)	182 (153-197)	171 (133-214)	176 (130-216)
Общий белок, г/л	60,6±1,0	59,7±0,8	<b>63,7±0,7<sup>1,2</sup></b>	<b>64,5±1,4<sup>1,2</sup></b>	<b>65,2±1,0<sup>1,2</sup></b>
Альбумин, г/л	32,7±0,4	32,2±0,6	32,6±0,3	33,5±0,4	<b>34,0±0,4<sup>2,3</sup></b>
Глобулины, г/л	27,9±1,1	27,5±0,5	<b>31,2±0,5<sup>1,2</sup></b>	<b>31,0±1,0<sup>1,2</sup></b>	<b>31,2±1,0<sup>1,2</sup></b>
Креатинин, мкмоль/л	49,2±1,5	50,9±1,5	48,8±1,0	47,5±0,7	51,3±1,0
Мочевая кислота, мкмоль/л	116,5±4,8	117,2±6,4	104,1±7,7	104,9±5,7	100,5±5,8
Мочевина, ммоль/л	4,9 (4,0-5,3)	4,9 (4,8-5,2)	5,0 (4,8-5,2)	4,6 (4,4-5,6)	4,4 (4,3-4,7)
Фосфор, ммоль/л	2,40 (2,38-2,57)	2,36 (2,27-2,50)	2,43 (2,28-2,61)	2,71 (2,65-2,77) <sup>1,2,3</sup>	2,59 (2,43-2,73)
Кальций, ммоль/л	2,76±0,04	2,83±0,05	2,89±0,03 <sup>1</sup>	3,02±0,04 <sup>1,2,3</sup>	3,07±0,03 <sup>1,2,3</sup>
Магний, ммоль/л	0,87±0,02	0,82±0,04	0,82±0,02	0,80±0,04	0,79±0,03
Глюкоза, ммоль/л	4,3±0,2	4,4±0,2	4,4±0,2	4,2±0,2	4,5±0,1

Примечание – 1- различия достоверны по сравнению с группой K1 (p<0,05); 2- различия достоверны по сравнению с группой Г2 (p<0,05); 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3.

У животных групп Г3, Г4 и Г5, получавших ВЖР с добавлением холестерина, показан достоверный рост общего белка и глобулинов в сыворотке крови по сравнению с этими показателями для животных группы K1 (p<0,04). У животных всех опытных групп выявлено достоверное увеличение общего холестерина в сыворотке крови по сравнению с животными контрольной группы. Содержание холестерина в сыворотке крови животных группы Г5 (ВЖР+2%хол)

было также достоверно выше по сравнению с животными группы Г2 (ВЖР) ( $p < 0,05$ ). Рост в 1,5 раза абсолютного значения АЛТ и снижение уровня общего билирубина в крови указывает на повреждения клеток печени животных опытной группы Г5 [29].

**Таблица 22** - Биохимические показатели крови, определяемые методом ИФА

Показатель	Группы животных				
	К1	Г2	Г3	Г4	Г5
Глутатион пероксидаза, пг/мл	110,7 (105,2-134,4)	119,3 (102,0-150,8)	114,6 (109,7-126,5)	86,0 (83,7-128,8)	148,1 (94,4-165,6)
МДА, нг/мл	482,7 (435,5-999,8)	728,2 (428,5-1684,4)	505,2 (485,5-808,6)	519,1 (391,3-1151,0)	439,7 (367,1-509,7)
СОД, нг/мл	4,5 (3,6-23,6)	13,6 (3,3-37,9)	5,4 (3,1-25,4)	3,0 (2,4-29,1)	3,5 (3,0-4,7)
Грелин, нг/мл	2,2 (1,9-16,7)	6,1 (2,9-28,5)	3,9 (2,5-19,2)	2,0 (1,9-20,6)	2,6 (2,2-3,7)
Лептин, нг/мл	4,7 (4,4-4,8)	5,1 (4,8-5,9)	5,2 (4,7-5,9)	5,3 (4,6-5,9)	<b>5,7 (5,5-7,6)<sup>1</sup></b>
Инсулин, пг/мл	15,3 (13,7-27,6)	26,9 (18,8-46,4)	18,3 (15,5-21,2)	20,5 (15,5-24,3)	25,8 (22,1-33,2)
С-пептид, пг/мл	22,6 (17,7-100,2)	208,6 (89,9-223,3)	57,1 (17,3-88,8)	46,0 (35,0-98,0)	148,5 (39,0-205,5)

Примечание – 1- различия достоверны по сравнению с группой К1 ( $p < 0,05$ ).

Для животных группы Г5, получавших ВЖР+2% холестерина, установлено достоверное более высокое содержание уровня лептина в сыворотке крови по сравнению с данным показателем для животных контрольной группы ( $p < 0,01$ ).

**Таблица 23** - Биохимические показатели печени

Показатель	Группы животных				
	К1	Г2	Г3	Г4	Г5
Относительная масса печени, %	2,19 (2,11-2,47)	2,33 (2,08-2,56)	<b>3,29</b> (2,58-3,84) <sup>1,2</sup>	<b>3,29</b> (3,11-3,81) <sup>1,2</sup>	<b>3,99</b> (3,40-4,47) <sup>1,2,3</sup>
Содержание жира, мг/г	65,9 (56,7-75,1)	<b>108,5</b> (84,9-115,9) <sup>1</sup>	<b>226,3</b> (149,0-260,4) <sup>1,2</sup>	<b>216,9</b> (203,5-235,0) <sup>1,2</sup>	<b>270,9</b> (253,4-329,3) <sup>1,2,3,4</sup>
Холестерин, мг/г	4,0 (3,3-5,0)	<b>15,1</b> (11,7-18,0) <sup>1</sup>	<b>36,0</b> (24,8-43,0) <sup>1,2</sup>	<b>39,5</b> (31,2-45,0) <sup>1,2</sup>	<b>60,1</b> (49,9-75,1) <sup>1,2,3,4</sup>
Триглицериды, мг/г	19,1 (6,6-27,2)	<b>62,6</b> (43,6-71,3) <sup>1</sup>	<b>108,6</b> (82,0-138,1) <sup>1,2</sup>	<b>99,5</b> (91,1-134,2) <sup>1,2</sup>	<b>139,6</b> (112,1-176,2) <sup>1,2</sup>

Примечание – 1- различия достоверны по сравнению с группой К1 ( $p < 0,05$ ); 2- различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p < 0,05$ ); 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3; 4 – различия достоверны по сравнению с группой Г4 ( $p < 0,05$ ).

Для животных группы Г2, потреблявших ВЖР, установлено достоверное увеличение содержания жира, холестерина и триглицеридов в печени по сравнению с животными контрольной группы К1, и одновременно достоверно сниженное значение всех этих показателей по сравнению с животными групп Г3, Г4, Г5, потреблявших ВЖР с добавлением холестерина. Для животных группы Г5, получавших ВЖР+2% холестерина, содержание жира и холестерина во влажной ткани печени было достоверно выше по сравнению с аналогичными показателями для всех других групп животных.

Основное содержание исследований, результаты которых представлены в данном разделе, составило моделирование нарушений жирового, холестеринового и углеводного обмена у грызунов-крыс-самцов линии Вистар 3х недельного и 8ми недельного возраста, индуцированных путем повышения в составе рациона животных квот жирового компонента, внесения различных доз экзогенного холестерина и снижения двигательной активности путем хронической принудительной иммобилизации.

Потребление высокожировых рационов с 50%-ным и 60%-ным содержанием жира по калорийности растущими крысами-самцами линии Вистар (возрастом 3 недели) с исходной массой тела ( $45 \pm 5$ ) вызывало статистически значимые изменения 12 и 15 показателей соответственно из 39 определяемых показателей по сравнению с контрольной группой животных (ПСР). Потребление животными высокожирового рациона с 50%-ным содержанием жира вызывало развитие инсулинорезистентности (показатель ППК вырос в 1,2 раза), увеличение концентрации в крови С-пептида в 1,3 раза, оказывало статистически достоверное влияние на показатели, характеризующие изменения состояния печени: увеличение содержания жира в 2,4 раза, холестерина в 1,8 раза и триглицеридов в 13,3 раза, снижение в крови билирубина в 1,2 раза и увеличение щелочной фосфатазы в 1,5 раза. При потреблении животными высокожирового рациона с 60%-ным содержанием жира по калорийности также было дополнительно отмечено увеличение в крови уровня АЛТ и грелина в 1,7 раза и снижение уровня лептина в 1,5 раза.

Потребление половозрелыми крысами-самцами линии Вистар (возрастом 8 недель) с исходной массой тела ( $235 \pm 5$ ) г высокожирового рациона с 50% содержанием жира по калорийности вызывало статистически значимые изменения 17 показателей из 53 определяемых показателей по сравнению с контрольной группой животных (ПСР), оказывая неблагоприятное влияние на состав тела: увеличение процентного содержания жира в 1,6 раза с одновременным снижением мышечной массы тела в 1,1 раза, увеличение массы тела животных в 1,1 раза; на липидный обмен: увеличение в крови холестерина в 1,2 раза, ЛПВП в 1,3 раза, триглицеридов в 1,6 раза; на состояние печени: увеличение содержания жира в 1,6 раза, холестерина в 3,8 раза и триглицеридов в 3,3 раза и снижение в крови билирубина в 1,2 раза; и на уровень гематокрита, сниженный на 10%.

Введение 2% холестерина в состав стандартного полусинтетического рациона оказывало статистически значимое влияние на 18 из 39 определяемых показателей, вызывая увеличение потребления корма и массы тела, развитие инсулинорезистентности (показатель ППК вырос в 1,2 раза), увеличение концентрации МДА в 1,9 раза, С-пептида в 1,4 раза и грелина в 1,6 раза и снижение лептина в 1,8 раза, увеличение содержания в крови холестерина в 1,8 раза, ЛПНП в 15 раз. Имело место увеличение относительной массы печени в 1,8 раза, содержания жира в 5,2 раза, холестерина в 14,7 раза и триглицеридов в 20,1 раза в печени, а также увеличения в крови АЛТ в 1,7 и снижения билирубина в 1,3 раза.

Введение 2% холестерина в состав 50% высокожирового рациона растущим крысам-самцам линии Вистар оказывало статистически значимое влияние на 22 показателя из 39 определяемых показателей по сравнению с контрольной группой животных (ПСР) и на 9 показателей по сравнению с группой, получавшей 50% высокожировой рацион без добавления холестерина. Введение 2% холестерина в состав 50% высокожирового рациона по сравнению с 50% высокожировым рационом без добавления холестерина усилило неблагоприятное действие на показатели липидного и холестеринового обмена, увеличив содержание в крови в



3,1 раза ЛПНП и снизив в 1,9 раза содержание триглицеридов; а так же увеличив массу печени в 1,9 раза, содержание жира в 2,1 раза, и холестерина в 8,5 раз, увеличив содержание в крови АЛТ в 1,8 раза и снизив содержание альбумина в 1,1 раза.

Введение 2% холестерина в состав 50% высокожирового рациона половозрелых крыс-самцов линии Вистар вызывало по сравнению с животными контрольной группы (ПСР) достоверное изменение 26 показателей из 53 определяемых показателей и 16 показателей по сравнению с группой животных, получавших 50% высокожировой рацион без добавления холестерина. Введение 2% холестерина в состав 50% высокожирового рациона по сравнению с 50% высокожировым рационом без добавления холестерина увеличило содержание в крови холестерина в 1,2 раза, общего белка, альбуминов и глобулинов в 1,1 раза и снизило в 1,6 раза содержание триглицеридов. Масса печени увеличилась в 1,7 раза, содержание в ней жира возросло в 2,5 раза, холестерина в 4,0 раза и триглицеридов в 2,2 раза и в 1,4 раза содержание АЛТ в крови; Среднее содержание гемоглобина в эритроците, средний объем эритроцитов и ширина распределения эритроцитов по объему снизились на 10 %.

У половозрелых крыс, потреблявших 50% высокожировой рацион с 2% холестерина, в пересчете на единицу массы тела происходило накопление большего количества жира и триглицеридов в печени на фоне снижения их содержания в крови по сравнению с растущими крысами, потреблявшими 50% высокожировой рацион с 2% холестерина. При этом у растущих крыс по сравнению с половозрелыми животными содержание в печени холестерина было в два раза выше и содержание АЛТ в крови в 1,3 раза выше. У половозрелых крыс было зафиксировано накопление холестерина, как в печени, так и в сыворотке крови. Достоверно более высокое содержание жира, увеличение массы печени, высокие уровни триглицеридов и холестерина в печени, рост абсолютного значения АЛТ и изменение гематологических показателей в крови животных при добавление в их рацион 2% холестерина приводило к выраженному развитию стеатоза печени этих животных.

Также у растущих крыс, потреблявших полусинтетический и высокожировой рационы с добавлением 2% холестерина, происходило снижение в крови уровня лептина в 1,6 раза на фоне роста грелина в 1,7 раза и повышение уровня С- пептида в 1,4 раза по сравнению с животными контрольной группы (ПСР). При этом у половозрелых крыс потребление 2% холестерина приводило к накоплению в сыворотке крови лептина без изменения уровня грелина и С-пептида.

Потребление 2% холестерина в составе полусинтетического и высокожирового рационов приводило к увеличению в крови растущих крыс уровня МДА в 1,9 раза и развитию инсулинорезистентности (показатель ППК был в 1,2 раза выше по сравнению с контрольными животными). У половозрелых животных данные эффекты не наблюдались.

Отмечено отсутствие влияния всех модифицированных рационов на обучаемость, память, показатели тревожности и исследовательской активности животных.

Принудительная субхроническая иммобилизация растущих крыс-самцов Вистар, получавших полусинтетический рацион, достоверно снижала потребление корма, массу тела и повышала уровень АЛТ в крови, не оказывая достоверного влияния на тестируемые показатели жирового и холестеринового обмена. Сочетание иммобилизации и 50% высокожирового рациона с добавкой 2% холестерина вызывало у растущих животных, достоверное изменение 13 показателей по сравнению с животными контрольной группы (ПСР) и 9 показателей по сравнению с животными, получавшими 50% высокожировой рацион с 2% холестерина, но не подвергавшихся иммобилизации. Принудительная иммобилизация снижала потребление корма и массу тела животных, препятствуя развитию инсулинорезистентности.

Добавление 1% холестерина в состав 50% высокожирового рациона вызывало у половозрелых крыс достоверное изменение 22 из 53 определяемых показателей по сравнению с животными контрольной группы (ПСР) и 16 показателей по сравнению с животными, получавшими 50% высокожировой

рацион без добавления холестерина. Введение 1% холестерина в состав 50% высокожирового рациона по сравнению с 50% высокожировым рационом без добавления холестерина снижало в крови уровень триглицеридов в 1,7 раза, повышало содержание общего белка и глобулинов в 1,1 раза; оказывало неблагоприятное влияние на печень, увеличивая ее массу в 1,5 раза, содержание жира в 2,0 раза, холестерина в 2,6 раза и триглицеридов в 1,6 раза. Среднее содержание гемоглобина в эритроците, средний объем эритроцитов и ширина распределения эритроцитов по объему снизились на 10 %.

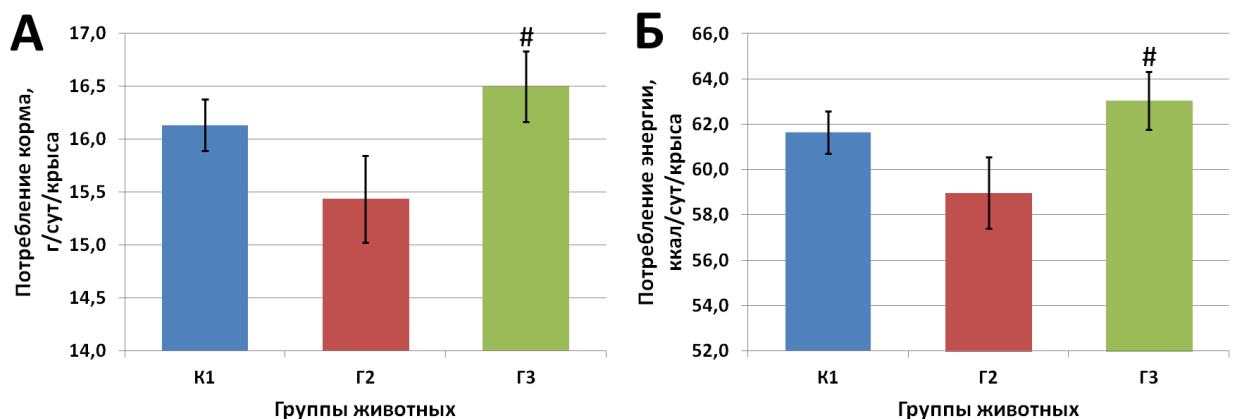
Введение 0,5% холестерина в состав 50% высокожирового рациона половозрелым крысам приводило к изменению 14 показателей из 53 определяемых по сравнению с контрольной группой (ПСР) и 7 показателей по сравнению с животными, получавшими 50% высокожировой рацион без добавления холестерина. Потребление 50% высокожирового рациона с добавлением 0,5% холестерина по сравнению с 50% высокожировым рационом без добавления холестерина повышало содержание в крови общего белка и глобулинов в 1,1 раза и увеличивало массу печени в 1,5 раза, содержание жира в 2,0 раза, холестерина в 2,4 раза и триглицеридов в 1,7 раза.

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что потребление в составе высокожировых рационов 1% экзогенного холестерина половозрелыми крысами и 2% экзогенного холестерина растущими крысами оказывало наиболее значимое обратимое воздействие на организм животных, сочетая максимальное число изменений тестируемых показателей, характеризующих углеводный, жировой и холестериновый обмен.

### 3.5 Физиолого-биохимическая оценка влияния потребления концентрата фикоцианинов (концентрат 4) на нарушения у половозрелых крыс углеводного, липидного и холестерина обмена, индуцированные потреблением животными высокожирового рациона с добавлением 1% холестерина (дизайн эксперимента №4)

Результаты исследования представлены в работе [24]. Общее состояние животных всех групп по внешнему виду и качеству шерстного покрова при ежедневном осмотре на протяжении всего эксперимента было удовлетворительным.

На рисунках 31 представлены данные среднее суточного потребления корма и энергии животными с 1 по 24 сутки до начала введения высокожирового рациона (три группы: контроль К1 (ПСР), Г2 (ПСР+ КФЦ 30 мг/кг м.т.), Г3 (ПСР +КФЦ 100 мг/кг м.т.)).



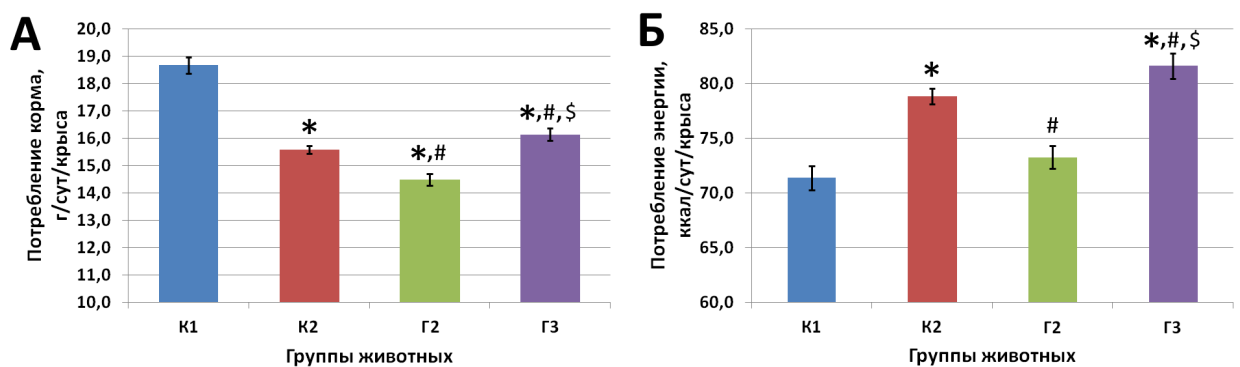
Примечание – #- различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p < 0,05$ ).

**Рисунок 31** - Среднее потребление корма (г/сут/крыса, А) и энергии (ккал/сут/крыса, Б) 1-24 стуки эксперимента

На протяжении первых 24 суток эксперимента животные группы Г3, получавшие ПСР с концентратом фикоцианинов в дозе 100 мг/кг м.т., потребляли достоверно больше корма и энергии по сравнению с животными группы Г2,

получавшей ПСР с фикоцианином в дозе 30 мг/кг м.т ( $p < 0,01$ ). Достоверных различий в потреблении корма и энергии между группами К1 и Г2 выявлено не было ( $p \geq 0,05$ ).

На рисунках 32 представлено среднее суточное потребление корма и энергии животными с 24 по 94 сутки после перевода на ВЖ рацион (четыре группы: контроль К1 (ПСР), второй контроль К2 (ВЖ+1%хол), Г2 (ВЖ+1%хол + КФЦ 30 мг/кг м.т., Г3 (ВЖ+1%хол + КФЦ 100 мг/кг м.т.)).

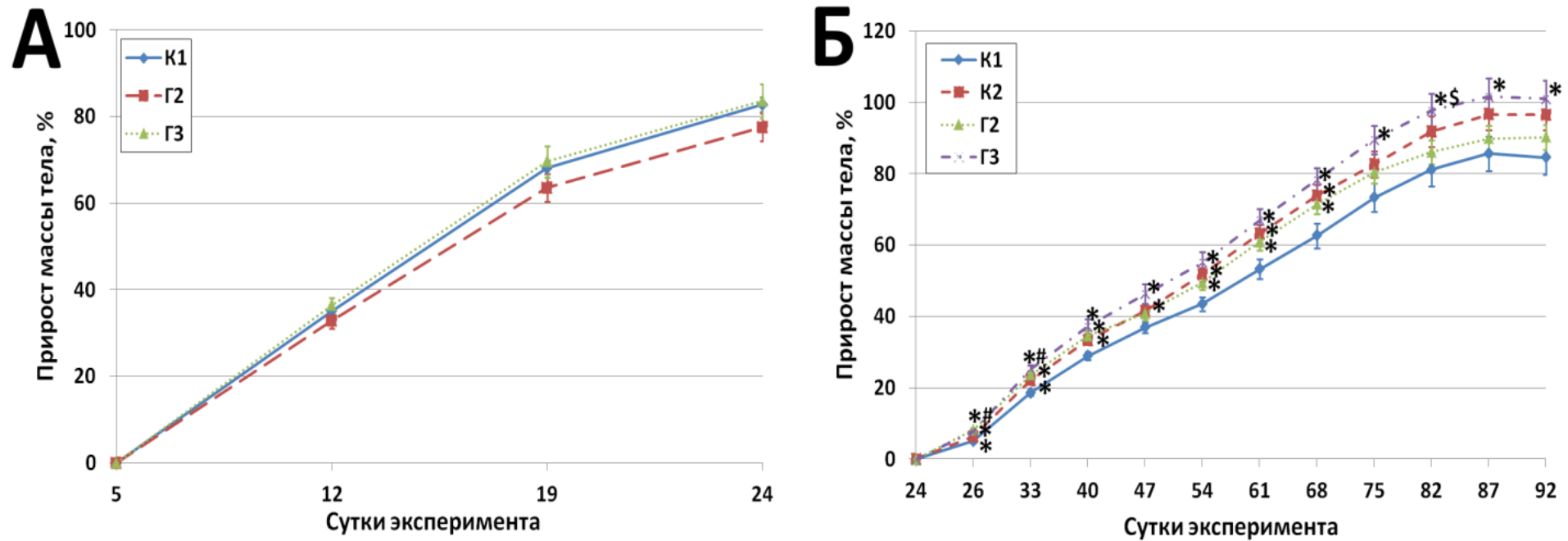


Примечание – \*- различия достоверны по сравнению с контрольной группой К1 ( $p < 0,05$ ); #- различия достоверны по сравнению с контрольной группой К2 ( $p < 0,05$ ); \$- различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p < 0,05$ ).

**Рисунок 32** - Среднее потребление корма (г/сут/крыса, А) и энергии (ккал/сут/крыса, Б) 24-94 сутки эксперимента

С 24 по 94 сутки животные трех групп (К2, Г2, Г3), получавшие высокожировые рационы, потребляли достоверно меньше корма по сравнению с животными контрольной группы К1, получавшими стандартный полусинтетический рацион. Потребление энергии животными второй контрольной группы К2 и группы Г3 было достоверно выше по сравнению с контрольной группой К1 ( $p < 0,01$ ). Достоверных различий в потреблении энергии между животными контрольной группы К1 и группы Г2 выявлено не было ( $p \geq 0,05$ ).

На рисунке 33 (А, Б) представлены результаты мониторинга прироста массы тела животных на протяжении всего эксперимента (средние значения по группам).



Примечание – \*- различия достоверны по сравнению с контрольной группой K1 ( $p < 0,05$ ); #- различия достоверны по сравнению с контрольной группой K2 ( $p < 0,05$ ); \$ – различия достоверны по сравнению с группой G2 ( $p < 0,05$ ). А – 1-24 сутки эксперимента (ПСП); Б – 24-92 сутки (ВЖР).

**Рисунок 33** - Прирост массы тела животных, %

В первые 24 сутки прирост массы тела животных опытных групп, потреблявших концентрат фикоцианина в обеих дозировках в составе полусинтетического рациона, статистически значимо не отличался от показателя для контрольной группы K1 ( $p \geq 0,05$ ) (рис. 33А).

Начиная с 26 суток и до 68 суток эксперимента прирост массы тела животных опытных групп K2, Г2, Г3, получавших ВЖ рацион с добавлением 1% холестерина, был статистически выше по сравнению с контрольной группой K1 (рис. 33Б) ( $p < 0,05$ ). Начиная с 75 суток и до окончания эксперимента достоверных различий между второй контрольной группой K2, опытной группой Г2 и контрольной группой K1 выявлено не было ( $p \geq 0,05$ ). Прирост массы тела животных группы Г3 (дозировка концентрата фикоцианинов 100 мг/кг м.т.) был достоверно выше по сравнению с приростом животных контрольной группы K1, на протяжении всего эксперимента ( $p < 0,02$ ). Прирост массы тела животных групп Г2 и Г3 достоверно не отличался от прироста массы тела животных второй контрольной группы K2 на протяжении всего эксперимента ( $p \geq 0,05$ ).

На момент окончания эксперимента средняя масса тела животных группы K1 ( $476 \pm 15$ г) была достоверно ниже средней массы тела крыс второй контрольной группы K2 ( $520 \pm 17$ г) и группы Г3 ( $527 \pm 18$ г) ( $p < 0,05$ ). Средняя масса животных группы Г2 ( $487 \pm 16$ г) не отличалась от контрольной группы животных K1 ( $p \geq 0,05$ ). Для групп K2, Г2 и Г3 различия по средней массе тела недостоверны ( $p \geq 0,05$ ).

В таблице 24 представлены данные по составу тела животных (51 и 87 сутки).

**Таблица 24** – Состав тела животных

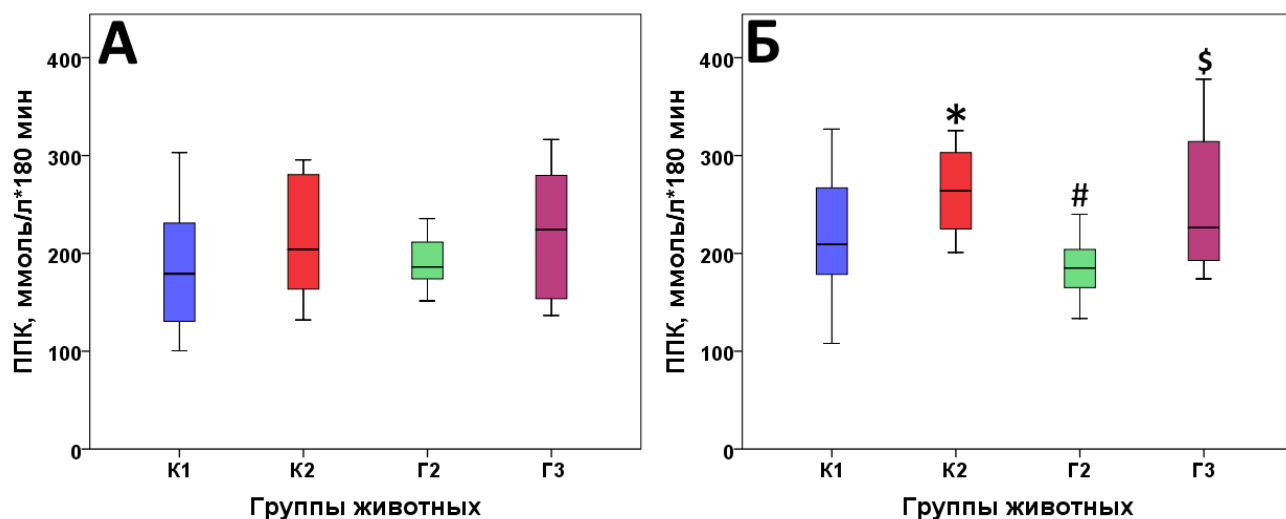
Показатель	Группы животных			
	K1	K2	Г2	Г3
51 сутки				
Жировая масса, %	10,0 (9,7-10,5)	<b>13,5</b> <b>(12,6-13,9)*</b>	12,2 (11,6-12,9)	<b>15,7</b> <b>(15,4-16,0)*,\$</b>
Тощая масса, %	84,9 (83,3-85,7)	<b>80,9</b> <b>(79,0-83,5)*</b>	82,4 (81,8-83,4)	<b>80,0</b> <b>(75,7-82,4)*</b>
Свободная вода, %	0,24 (0,21-0,28)	0,24 (0,19-0,30)	0,23 (0,21-0,27)	<b>0,18</b> <b>(0,14-0,21)*</b>
Общая вода, %	71,3 (69,5-72,4)	68,6 (67,0-70,9)	70,1 (69,3-70,9)	<b>68,4</b> <b>(64,3-70,1)*</b>

87 сутки				
Жировая масса, %	12,6 (9,4-16,8)	<b>14,7</b> <b>(13,9-19,5)*</b>	13,9 (12,5-15,1)	<b>17,6</b> <b>(15,1-21,4)*,\$</b>
Тощая масса, %	80,9 (76,5-84,6)	<b>79,1</b> <b>(73,5-79,7)*</b>	79,9 (79,7-81,2)	<b>77,3</b> <b>(73,0-80,3)*</b>
Свободная вода, %	0,22 (0,19-0,26)	0,25 (0,18-0,31)	0,28 (0,25-0,31)	0,22 (0,18-0,29)
Общая вода, %	67,9 (64,5-71,3)	66,2 (62,0-67,7)	67,9 (66,9-69,1)	65,8 (61,6-67,6)

Примечание – \*- различия достоверны по сравнению с контрольной группой К1 ( $p<0,05$ ); \$ – различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p<0,05$ ).

Как на 51 так и на 87 сутки эксперимента состав тела животных второй контрольной группы К2 и животных группы Г3, получавших концентрат фикоцианинов в дозе 100 мг/кг м.т., отличался достоверно по сравнению с животными контрольной группы К1: процентное содержание жира у этих животных было достоверно выше, при одновременном достоверном снижении содержания мышечной массы тела ( $p<0,01$ ). По данным показателям не было отмечено достоверных отличий между животными контрольной группы К1 и животными группы Г2, получавшими концентрат фикоцианинов в дозе 30 мг/кг м.т ( $p\geq 0,05$ ). На 51 сутки эксперимента процентное содержание жира у животных группы Г3 было достоверно выше по сравнению с животными группы Г2.

На рисунке 34 приведены результаты определения инсулинорезистентности на 47 и 89 сутки эксперимента.





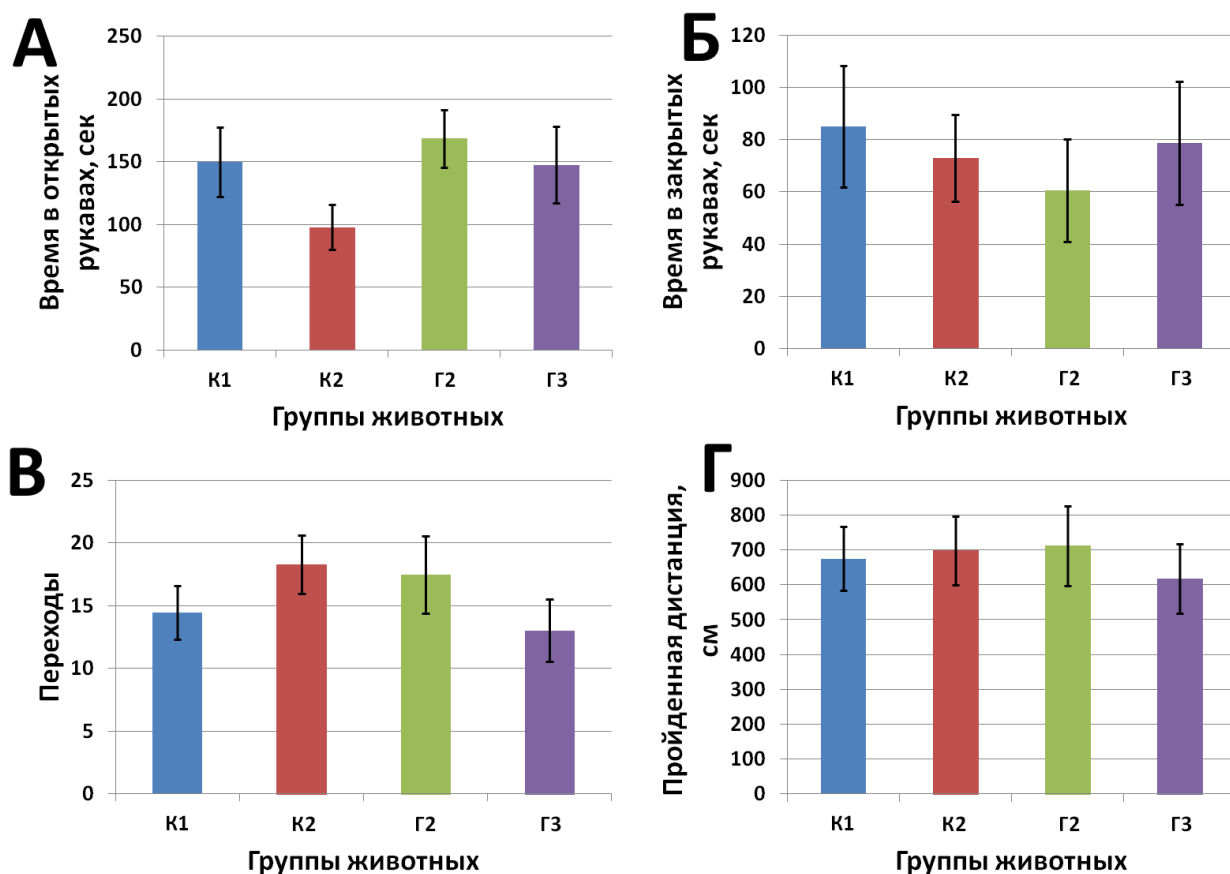
Примечание – \*- различия достоверны по сравнению с группой K1 ( $p < 0,05$ ); # - различия достоверны по сравнению с контрольной группой K2 ( $p < 0,05$ ); \$- различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p < 0,05$ ).

А – ППК на 47 сутки; Б - ППК на 89 сутки. ППК- площадь под кривой.

**Рисунок 34 - Результаты инсулинорезистентного теста**

Достоверных различий по показателю ППК на 47 сутки эксперимента (рис. 34А) между сравниваемыми животными всех групп выявлено не было ( $p \geq 0,05$ ). Показатель ППК на 89 сутки эксперимента (рис. 34Б) был достоверно выше у животных второй контрольной группы K2, получавших ВЖ рацион с 1% холестерина, по сравнению с контрольной группой животных K1, что свидетельствовало о развитии инсулинорезистентности под влиянием экзогенного холестерина. Крысы групп Г2 и Г3 сохраняли чувствительность тканей к действию экзогенного инсулина, при этом животные группы Г2, получавшие концентрат фикоцианинов в дозе 30мг/кг массы тела, были достоверно более чувствительны к внутри брошенному введению этого гормона по сравнению с животными контрольной группы K2 и животными группы Г3 (концентрат фикоцианинов в дозе 100 мг/кг м.т.).

На рисунке 35 представлены результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт».



**Рисунок 35** - Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт»

При тестировании поведения животных в ПКЛ не было отмечено достоверных отличий между животными всех групп по показателям тревожности и исследовательской активности ( $p \geq 0,05$ ). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии влияния на определяемые физиологические показатели, использованных в работе рационов.

В таблице 25 представлены результаты теста УРПИ на 52, 53 и 72-е сутки эксперимента.

**Таблица 25** – Результаты теста «Условный рефлекс пассивного избегания»

Показатель / Группы	Время пребывания, с		
	Первый тест (52 сутки, выработка УРПИ)	Второе тестирование (через 24 часа, 53 сутки) Краткосрочная память	Третье тестирование (через 3 недели, 72 сутки) Долгосрочная память
	Время входа, с	Время входа, с	Время входа, с
K1	49,4±14,0	180,0±0,0	165,0±12,5
K2	70,4±13,6	167,6±12,4	167,5±12,5
Г2	49,0±12,7	180,0±0,0	168,6±11,4
Г3	49,1±12,4	154,3±17,3	159,5±11,8

Во время первого тестирования (выработки УРПИ) животные всех групп входили в темный отсек камеры (100% выработка рефлекса). На вторые сутки тестирования краткосрочной памяти статистически значимых различий во времени латентного входа в темную камеру животных всех групп не выявлено ( $p \geq 0,05$ ). Через 3 недели при тестировании долгосрочной памяти также не выявлено значимых различий между группами ( $p \geq 0,05$ ). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии влияния ВЖ рациона с добавлением 1% холестерина, так и концентрата фикоцианинов в обеих дозировках на обучаемость и память животных.

В таблицах 26, 27, 28 и 29 представлены результаты определения ряда показателей углеводного, липидного и холестеринового обмена в крови и печени животных всех групп после их выведения из эксперимента.

В таблице 26 представлены результаты общего анализа крови животных.

**Таблица 26 – Общий анализ крови**

Показатель	Группа животных			
	К1	К2	Г2	Г3
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	8,6 (7,6-9,9)	9,2 (7,6-11,6)	10,1 (8,3-10,7)	9,2 (8,5-9,9)
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	6,3 (5,3-6,7)	5,9 (4,6-6,9)	6,4 (5,7-6,5)	6,1 (5,8-6,9)
Лимфоциты, %	69,2 (66,4-74,0)	60,7 (57,3-67,3)	64,8 (63,7-71,3)	65,9 (62,3-70,5)
Моноциты, $10^9/\text{л}$	0,3 (0,2-0,4)	<b>0,6</b> <b>(0,5-0,7)*</b>	<b>0,3</b> <b>(0,3-0,4)<sup>#</sup></b>	<b>0,4</b> <b>(0,3-0,6)*</b>
Моноциты, %	4,0 (3,1-7,0)	<b>7,3</b> <b>(5,9-8,7)*</b>	<b>3,5</b> <b>(3,1-6,0)<sup>#</sup></b>	4,4 (3,2-7,8)
Гранулоциты, $10^9/\text{л}$	2,2 $\pm$ 0,2	<b>3,0<math>\pm</math>0,2*</b>	<b>2,8<math>\pm</math>0,2*</b>	2,7 $\pm$ 0,3
Гранулоциты, %	26,6 (22,2-28,4)	<b>31,1</b> <b>(26,7-35,4)*</b>	28,7 (24,9-32,8)	29,1 (25,3-31,2)
Гемоглобин, г/л	152,0 $\pm$ 1,0	<b>138,9<math>\pm</math>1,4*</b>	<b>141,1<math>\pm</math>1,5*</b>	<b>144,3<math>\pm</math>1,4*</b>
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	19,1 (19,0-19,3)	<b>17,8</b> <b>(17,5-18,0)*</b>	<b>17,7</b> <b>(17,3-18,4)*</b>	<b>18,1</b> <b>(17,7-18,2)*</b>
Средняя концентрация клеточного гемоглобина в эритроцитах, г/л	381,5 (379,3-382,0)	377,0 (375,0-382,8)	385,0 (380,0-387,0)	378,0 (377,5-385,5)
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	8,0 (7,8-8,1)	7,8 (7,5-8,0)	8,1 (7,6-8,2)	8,0 (7,9-8,2)

Средний объем эритроцита, fl	50,1 (49,9-50,7)	<b>46,8</b> <b>(46,1-47,4)*</b>	<b>46,1</b> <b>(45,1-47,5)*</b>	47,9 (46,0-48,3)
Гематокрит, %	40,3 (39,2-41,0)	<b>36,7</b> <b>(35,5-37,4)*</b>	<b>37,3</b> <b>(35,2-38,2)*</b>	<b>38,1</b> <b>(37,0-38,9)*</b>
Ширина распределения эритроцитов по объему, относительная, %	14,2±0,1	<b>15,7±0,3*</b>	<b>16,0±0,2*</b>	<b>15,9±0,3*</b>
Ширина распределения эритроцитов по объему, абсолютная, fl	32,7±0,2	<b>31,1±0,3*</b>	<b>30,9±0,3*</b>	<b>31,8±0,4\$</b>
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	729,5±23,0	821,2±37,7	767,8±39,5	756,7±44,1
Средний объем тромбоцита, fl	6,2 (5,9-6,7)	6,1 (6,0-6,4)	6,2 (5,9-6,4)	5,9 (5,8-6,3)

Примечание: \*- различия достоверны по сравнению с контрольной группой K1 (p<0,05); # - различия достоверны по сравнению с контрольной группой K2 (p<0,05); \$- различия достоверны по сравнению с группой Г2 (p<0,05).

У животных второй контрольной группы K2 и у всех опытных животных можно отметить достоверное снижение гемоглобина, среднего содержания гемоглобина в эритроците, гематокрита, относительного значения ширины распределения эритроцитов по объему по сравнению с животными контрольной группы K1. Также у животных группы K2 отмечен абсолютный и процентный рост моноцитов по сравнению с этими показателями для животных контрольной группы K1 и опытной группы Г2.

**Таблица 27** - Биохимические показатели крови

Показатель	Группы животных			
	K1	K2	Г2	Г3
Холестерин, ммоль/л	1,81 (1,62-2,00)	1,89 (1,83-2,03)	1,83 (1,69-2,05)	1,84 (1,66-2,59)
ЛПВП, ммоль/л	1,19 (1,10-1,35)	1,17 (1,11-1,23)	1,15 (1,00-1,25)	1,13 (1,06-1,34)
ЛПНП, ммоль/л	0,22 (0,16-0,30)	<b>0,46</b> <b>(0,43-0,50)*</b>	<b>0,48</b> <b>(0,45-0,55)*</b>	<b>0,65</b> <b>(0,44-0,81)*</b>
Триглицериды, ммоль/л	1,65 (1,00-2,31)	<b>0,69</b> <b>(0,59-0,76)*</b>	<b>0,53</b> <b>(0,52-0,59)*, #</b>	<b>0,75</b> <b>(0,63-0,93)*, \$</b>
АЛТ, Ед/л	65,6 (55,6-76,7)	<b>111,9</b> <b>(105,1-126,6)*</b>	<b>91,8</b> <b>(87,5-102,5)*</b>	<b>98,5</b> <b>(82,2-134,5)*</b>
АСТ, Ед/л	89,5 (68,3-189,9)	219,8 (89,6-227,3)	112,1 (87,5-231,4)	<b>71,2</b> <b>(56,8-79,8)#</b>
АСТ/АЛТ (коэфф. де Ритиса)	1,2 (0,9-3,2)	1,8 (0,7-2,4)	1,4 (1,0-2,2)	<b>0,6</b> <b>(0,4-0,9)*</b>
Билирубин общий, мкмоль/л	6,8 (6,6-7,0)	<b>6,4</b> <b>(6,3-6,5)*</b>	6,6 (6,3-6,8)	<b>6,7</b> <b>(6,4-7,1)#</b>

Щелочная фосфатаза, Ед/л	113,6±10,4	<b>192,0±16,1*</b>	<b>173,2±11,0*</b>	<b>170,1±8,1*</b>
Белок общий, г/л	73,9±1,0	<b>82,7±1,4*</b>	<b>81,7±1,2*</b>	<b>79,7±1,2*</b>
Глобулин, г/л	40,5 (38,7-41,9)	<b>46,8 (44,4-49,0)*</b>	<b>45,7 (45,5-46,2)*</b>	<b>44,6 (40,8-47,7)*</b>
Альбумин, г/л	33,6 (32,9-34,0)	<b>36,6 (35,1-36,9)*</b>	<b>35,3 (34,6-37,7)<sup>1</sup></b>	35,8 (34,7-36,2)
Креатинин, мкмоль/л	55,4 (52,8-62,1)	58,4 (57,3-60,6)	60,0 (58,9-61,0)	58,4 (57,7-59,0)
Мочевая кислота, мкмоль/л	132,7±9,6	140,1±8,0	131,7±6,5	130,0±4,5
Мочевина, ммоль/л	5,7 (5,1-6,7)	<b>4,5 (4,3-5,9)*</b>	<b>4,7 (4,5-5,0)*</b>	<b>4,1 (3,8-4,6)*<sup>#</sup></b>
Глюкоза, ммоль/л	5,8±0,2	5,8±0,2	5,7±0,3	5,7±0,1

Примечание: \*- различия достоверны по сравнению с контрольной группой K1 ( $p<0,05$ ); # - различия достоверны по сравнению с контрольной группой K2 ( $p<0,05$ ); \$- различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p<0,05$ ).

Потребление животными высокожирового рациона с добавлением 1% холестерина привело к достоверному росту общего белка, глобулинов, ЛПНП, АЛТ и щелочной фосфатазы и снижению триглицеридов, мочевины ( $p<0,05$ ). У животных группы Г3, потреблявших концентрат фикоцианинов в дозе 100 мг/кг массы тела, показано достоверное снижение показателя АСТ ( $p<0,02$ ) и рост уровня билирубина ( $p<0,04$ ) в сыворотке крови по сравнению с животными второй контрольной группы K2 и снижение коэффициента де Ритиса по сравнению с контрольной группой животных K1 ( $p<0,01$ ).

**Таблица 28** - Биохимические показатели крови

Показатель	Группы животных			
	K1	K2	Г2	Г3
СОД, нг/мл	0,7 (0,5-1,1)	0,8 (0,7-1,2)	0,8 (0,6-1,3)	1,8 (0,5-3,2)
МДА, нг/мл	273,8 (253,2-283,8)	<b>409,4 (350,4-540,3)*</b>	<b>304,8 (274,3-362,2)<sup>#</sup></b>	<b>370,9 (287,1-608,2)*</b>
Грелин, нг/мл	21,5 (10,3-23,6)	<b>9,7 (7,0-12,9)*</b>	<b>8,5 (4,5-10,6)*</b>	10,7 (6,4-17,6)
Лептин, нг/мл	2,5 (1,9-3,3)	3,5 (2,3-4,0)	<b>1,6 (1,3-2,5)<sup>#</sup></b>	<b>1,9 (1,4-2,4)<sup>#</sup></b>
Инсулин, пг/мл	188,0 (95,2-356,5)	130,7 (103,8-304,6)	177,0 (122,4-356,0)	228,3 (80,9-400,3)

Примечание: \*- различия достоверны по сравнению с контрольной группой K1 ( $p<0,05$ ); # - различия достоверны по сравнению с контрольной группой K2 ( $p<0,05$ ).

Как следует из данных представленных в таблице 28 введение в высокожировой рацион половозрелых животных групп К2 ( $p<0,05$ ) и Г3 ( $p<0,04$ ) 1% холестерина приводило к накоплению в сыворотке крови МДА. Добавление в рацион крыс группы Г2 концентрата фикоцианинов в дозировке 30 мг/кг м.т. снижало содержание МДА до уровня определяемого у животных контрольной группы К1 и достоверно снижало его концентрацию, по сравнению с животными второй контрольной группы К2.

У животных групп К2 и Г2 также показано достоверное снижение концентрации грелина в сыворотке крови по сравнению с животными контрольной группы К1 ( $p<0,05$ ). Введение в рацион животных группы Г3 концентрата фикоцианинов в дозе 100 мг/кг м.т. не снижало концентрацию грелина в сыворотке крови ( $p\geq 0,05$ ).

Концентраты фикоцианинов в дозе 30 мг/кг массы тела и 100 мг/кг массы тела (Г2 и Г3) снижали содержание лептина в сыворотке крови крыс до уровня животных контрольной группы К1. Содержание лептина в сыворотке крови животных групп Г2 и Г3 было достоверно ниже по сравнению с животными второй контрольной группы К2, потреблявшими высокожировой рацион с 1% холестерина ( $p<0,04$ ).

**Таблица 29** - Биохимические показатели печени

Показатель	Группы животных			
	К1	К2	Г2	Г3
Масса животных, г	487,0 (418,5-518,5)	516,5 (474,3-541,0)	489,0 (459,0-517,0)	513,5 (495,5-543,3)
Масса печени, %	2,4 (2,3-2,6)	<b>4,7</b> <b>(4,3-4,9)*</b>	<b>4,3</b> <b>(3,8-4,7)*,#</b>	<b>4,1</b> <b>(3,9-4,3)*,#</b>
Содержание жира, мг/г	77,4 (69,5-100,2)	<b>389,9</b> <b>(366,8-418,4)*</b>	<b>390,0</b> <b>(371,7-421,9)*</b>	<b>365,5</b> <b>(346,9-401,5)*</b>
Холестерин, мг/г	5,4 (5,0-6,8)	<b>90,9</b> <b>(79,8-103,9)*</b>	<b>85,3</b> <b>(75,6-89,4)*</b>	<b>79,7</b> <b>(75,4-90,1)*</b>
Триглицериды, мг/г	21,5 (13,6-44,7)	<b>182,9</b> <b>(159,8-213,0)*</b>	<b>171,0</b> <b>(163,2-177,2)*</b>	<b>150,0</b> <b>(122,7-182,9)*,#</b>

Примечание: \*- различия достоверны по сравнению с контрольной группой К1 ( $p<0,05$ ); # - различия достоверны по сравнению с контрольной группой К2 ( $p<0,05$ ).

Для животных второй контрольной группы K2 и животных обеих опытных групп (Г2 и Г3) установлено достоверное увеличение содержания жира, холестерина и триглицеридов в печени крыс по сравнению с животными контрольной группы K1 ( $p < 0,01$ ). При этом у животных групп Г2 и Г3, потреблявших в составе рационов концентрат фикоцианинов, относительная масса печени была достоверно ниже по сравнению с животными второй контрольной группы K2 ( $p < 0,02$ ). Животные группы Г3 накапливали меньше триглицеридов в печени по сравнению со второй контрольной группой K2 ( $p < 0,04$ ).

Таким образом, потребление половозрелыми крысами самцами Вистар высокожирового рациона с добавлением 1% холестерина (как и с добавлением 2% холестерина) оказывало неблагоприятное влияние на углеводный, жировой и холестериновый обмен, а также состояние антиоксидантной системы. У этих животных соотношение жир/ мышечная масса по окончании эксперимента было в 1,5 раза выше по сравнению со значением для животных, получавших стандартный рацион. Имело место развитие инсулинорезистентности: среднее значение ППК выросло в 1,3 раза. Крысы накапливали большее количество жира, холестерина и триглицеридов в печени по сравнению с животными, получавшими стандартный рацион. О развитии оксидативного стресса свидетельствует повышение в крови уровня МДА в 1,5 раза. У этих животных отмечены нарушения гормонального статуса (снижение уровня грелина в 2,2 раза).

Концентрат фикоцианинов в дозировке 30 мг/кг массы тела в рационе оказывал гипогликемическое и гиполипидемическое действие: препятствовал развитию у половозрелых животных инсулинорезистентности и снижал концентрацию лептина ( $p = 0,019$ ). В сыворотке крови этих животных была достоверно снижена концентрация МДА по сравнению с животными ( $p = 0,040$ ), получавшими только высокожировой рацион с добавлением 1% холестерина. Добавление в рацион половозрелых крыс концентрата фикоцианинов в дозе 30 мг/кг м.т. препятствовало увеличению процентного содержания жира и снижению мышечной массы.

Концентрат фикоцианинов в дозировке 100 мг/кг массы тела в рационе половозрелых животных (ГЗ) снижал относительную массу печени ( $p=0,003$ ) и уровень в ней триглицеридов ( $p=0,037$ ) по сравнению с этими показателями для животных группы К2, потреблявших высокожировую рацион с добавлением 1% холестерина. Гиполипидемическое и гипогликемическое действие концентрата фикоцианинов проявилось снижением концентрации лептина ( $p=0,040$ ) в сыворотке крови и сохранением чувствительности к инсулину половозрелых животных группы ГЗ по сравнению с животными второй контрольной группы.

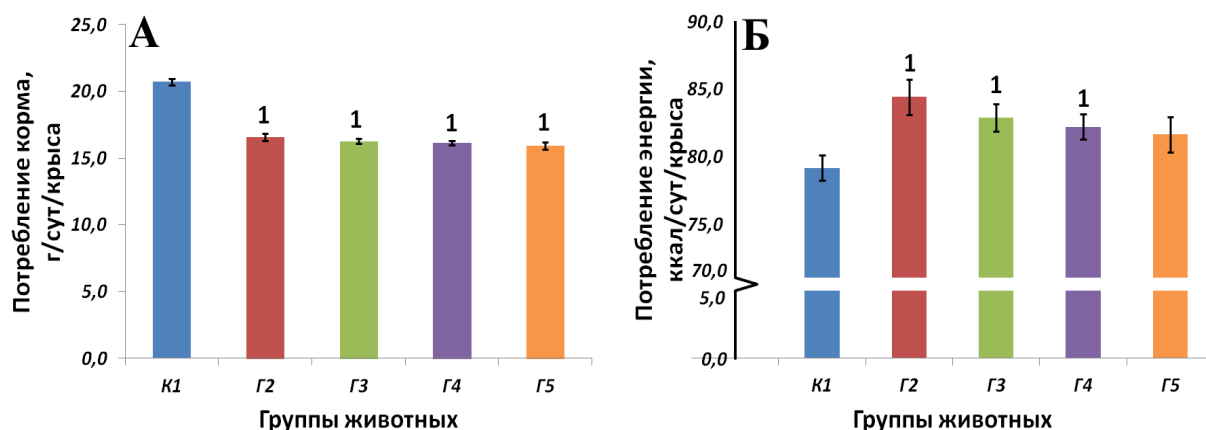
Добавление в рацион половозрелых животных концентрата фикоцианинов в обеих дозировках не препятствовало накоплению экстремально высоких количеств жира и холестерина в печени животных опытных групп.



### 3.6 Сравнительная физиолого-биохимическая оценка влияния потребления концентрата фикоцианинов (концентрат 2) на нарушения у растущих крыс углеводного, липидного и холестерина обмена, индуцированные потреблением высокожирового рациона с добавлением 2% холестерина (дизайн эксперимента №5)

Результаты исследования представлены в работе [12, 11]. Общее состояние животных контрольной группы К1 и опытных групп Г3 (ВЖР+2% холестерина+ соевый белок), Г4 (ВЖР+2% холестерина+соевый белок +КФЦ 30 мг/кг м.т.), Г5 (ВЖР+2%холестерина+ соевый белок+ КФЦ 300 мг/кг м.т.) по внешнему виду и качеству шерстного покрова при ежедневном осмотре на протяжении всего эксперимента было удовлетворительным. У животных группы Г2 (ВЖР+2% холестерина) шерсть была жирная и взъерошенная.

На рисунке 36 представлены данные по среднесуточному потреблению корма и энергии животными (с учетом кумулятивного потребления за весь эксперимент).



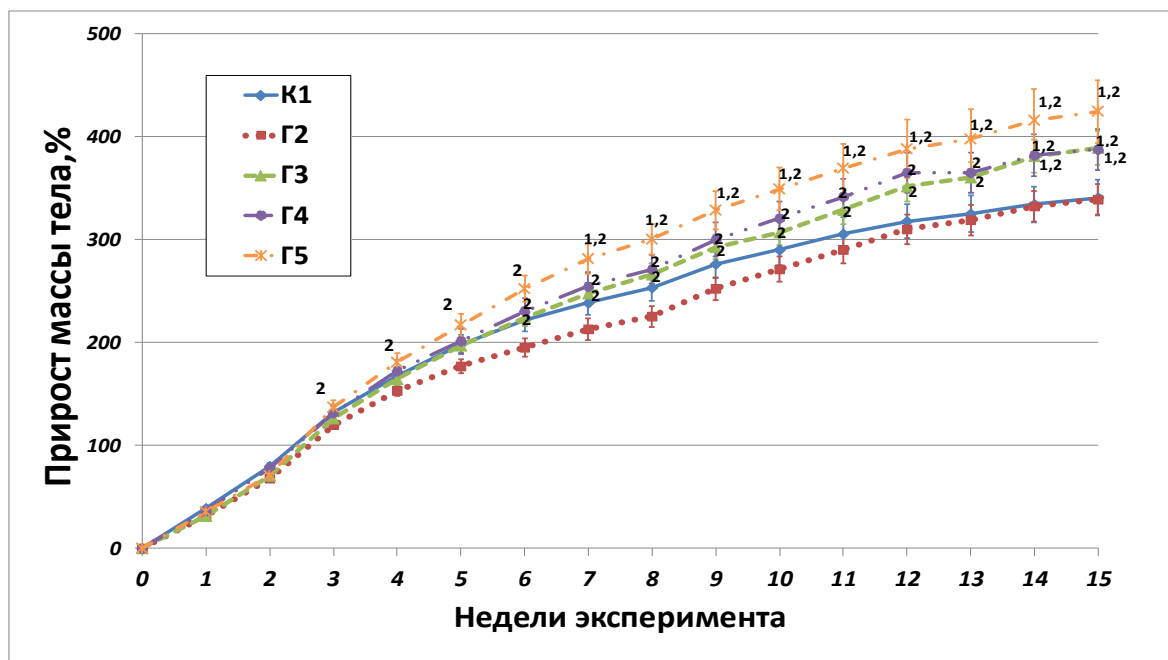
Примечание: 1- различия достоверны по сравнению с группой К1 ( $p < 0,05$ )

**Рисунок 36** - Среднее потребление корма (г/сут/крыса, А) и энергии (ккал/сут/крыса, Б)

На протяжении эксперимента по сравнению с животными контрольной группы К1 крысы опытных групп, получавшие ВЖ рацион с добавлением 2%

холестерина, потребляли достоверно меньше корма, что связано с большей калорийностью этих рационов. При этом потребление энергии животными групп Г2, Г3, Г4 было достоверно выше по сравнению с потреблением энергии животными контрольной группы К1 ( $p < 0,01$ ). Различия в потреблении энергии между крысами группы К1 и крысами группы Г5, получавшими с рационом концентрат фикоцианинов в дозе 300 мг/кг м.т., были статистически не значимы ( $p \geq 0,05$ ).

На рисунке 37 представлены результаты мониторинга прироста массы тела животных на протяжении всего эксперимента (средние значения по группам).



Примечание: 1- различия достоверны по сравнению с группой К1 ( $p < 0,05$ ); 2 – различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p < 0,05$ )

**Рисунок 37** - Прирост массы тела животных, %

На протяжении всего эксперимента достоверных различий между приростом массы тела крыс группы Г2 и животных контрольной группы К1 выявлено не было. Прирост массы тела животных групп Г3 и Г4, начиная с 6 недели кормления был достоверно выше по сравнению с приростом массы тела крыс группы Г2 и только с 14 недели стал достоверно выше по сравнению с

животными группы К1 ( $p<0,04$ ). Прирост массы тела животных группы Г5, уже начиная с 3 недели кормления был достоверно выше по сравнению с крысами группы Г2 и с 7 недели достоверно выше по сравнению с животными контрольной группы К1, оставаясь достоверно выше до окончания эксперимента ( $p<0,02$ ).

На момент окончания эксперимента средняя масса тела животных группы К1 ( $489\pm13$  г) и группы Г2 ( $488\pm17$  г) была достоверно ниже средней массы тела крыс групп Г3 ( $541\pm19$  г), Г4 ( $544\pm21$ г) и Г5 ( $591\pm43$ г) ( $p<0,04$ ). Для группы Г2 различия по средней массе животных статистически недостоверны по сравнению с контрольной группой К1 ( $p\geq0,05$ ). Различия по средней массе тела животных для крыс опытных групп Г3, Г4 и Г5 между собой статистически недостоверны ( $p\geq0,05$ ).

В таблице 30 представлены данные по массе и составу тела животных на 102 сутки эксперимента.

**Таблица 30** – Состав тела животных

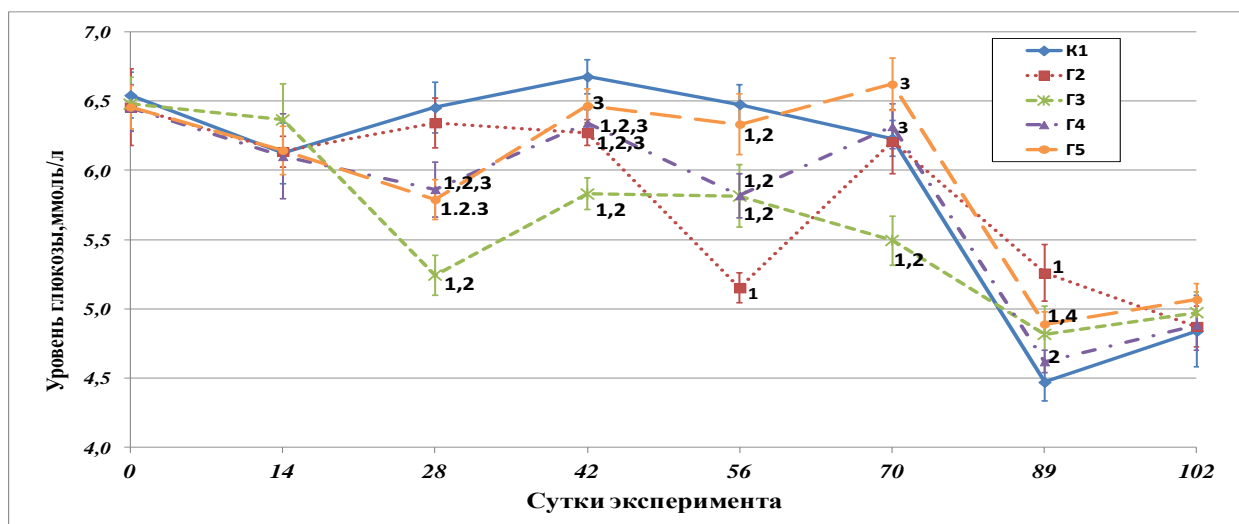
Показатель	Группы животных				
	К1	Г2	Г3	Г4	Г5
Масса тела, г	472 (430-502)	467 (425-501)	<b>528</b> <b>(462-587)</b> <sup>1,2</sup>	<b>522</b> <b>(505-568)</b> <sup>1,2</sup>	<b>596</b> <b>(438-671)</b> <sup>1,2</sup>
Жировая масса, %	11,1 (8,9-12,2)	<b>17,3</b> <b>(16,9-20,3)</b> <sup>1</sup>	<b>16,9</b> <b>(12,4-22,2)</b> <sup>1</sup>	<b>16,6</b> <b>(12,6-20,7)</b> <sup>1</sup>	<b>21,6</b> <b>(18,8-31,5)</b> <sup>1,3,4</sup>
Мышечная масса, %,	80,5 (79,8-83,6)	<b>75,1</b> <b>(73,2-76,5)</b> <sup>1</sup>	<b>75,1</b> <b>(70,2-79,7)</b> <sup>1</sup>	<b>75,5</b> <b>(71,6-80,0)</b> <sup>1</sup>	<b>71,0</b> <b>(61,3-73,4)</b> <sup>1,2,3,4</sup>
Свободная вода, %	0,23 (0,18-0,28)	0,19 (0,14-0,26)	0,18 (0,17-0,21)	0,19 (0,17-0,26)	0,21 (0,19-0,24)
Общая вода, %	68,3 (67,5-70,2)	<b>64,0</b> <b>(62,2-65,0)</b> <sup>1</sup>	<b>64,1</b> <b>(59,9-67,9)</b> <sup>1</sup>	<b>63,9</b> <b>(61,4-67,9)</b> <sup>1</sup>	<b>60,5</b> <b>(52,3-62,5)</b> <sup>1,2,3,4</sup>

Примечание: 1- различия достоверны по сравнению с группой К1 ( $p<0,05$ ); 2- различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p<0,05$ ); 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3 ( $p<0,05$ ) 4- различия достоверны по сравнению с группой Г4 ( $p<0,05$ ).

Средние значения массы тела на 102 сутки эксперимента у животных группы Г2 и группы К1 не различались и были достоверно ниже по сравнению с этим показателем для групп Г3, Г4 и Г5. При этом процентное содержание жировой массы тела у крыс всех четырех опытных групп было выше по

сравнению с животными контрольной группы К1 ( $p < 0,01$ ). Процентное содержание жировой массы у крыс группы Г5 было достоверно и значительно выше по сравнению с животными групп Г3 и Г4 ( $p < 0,02$ ). Процентное содержание мышечной массы и процентное содержание общей воды у животных группы Г5 было статистически значимо ниже по сравнению с крысами всех других опытных групп ( $p < 0,04$ ).

На рисунке 38 представлены данные мониторинга уровня глюкозы в крови животных на протяжении всего эксперимента.

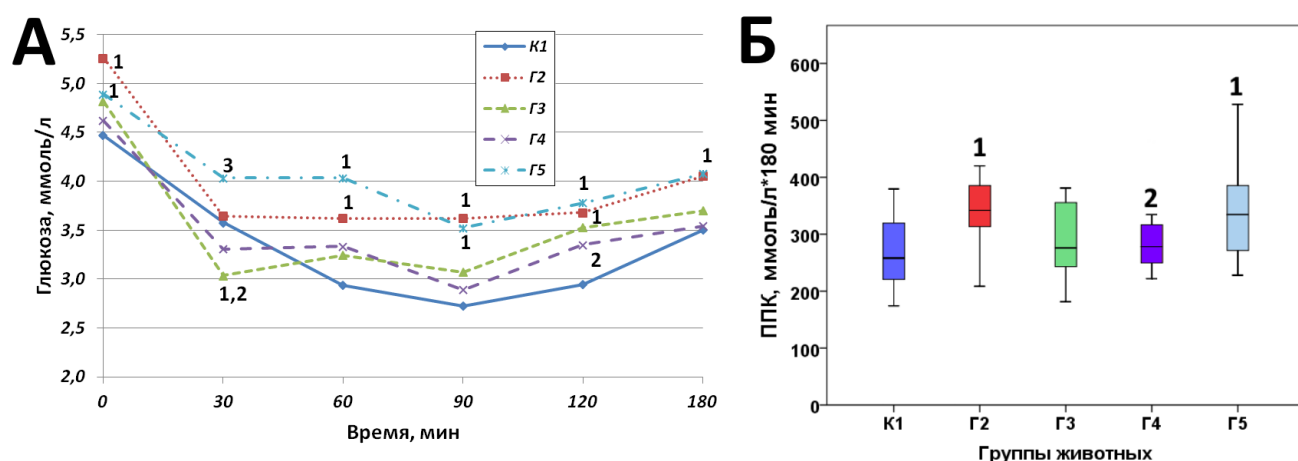


Примечание: 1- различия достоверны по сравнению с группой К1 ( $p < 0,05$ ); 2- различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p < 0,05$ ); 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3 ( $p < 0,05$ ); 4- различия достоверны по сравнению с группой Г4 ( $p < 0,05$ ).

**Рисунок 38** - Динамика уровня глюкозы животных, ммоль/л

На протяжении эксперимента с кормлением средние значения концентрации глюкозы в крови варьировали у животных всех групп, не превышая, однако исходных значений и достоверно не отличались между группами на момент окончания эксперимента ( $p \geq 0,05$ ).

На рисунке 39 представлены результаты определения инсулинорезистентности (89 сутки)



Примечание: А. Динамика изменения уровня глюкозы после введения инсулина с течением времени

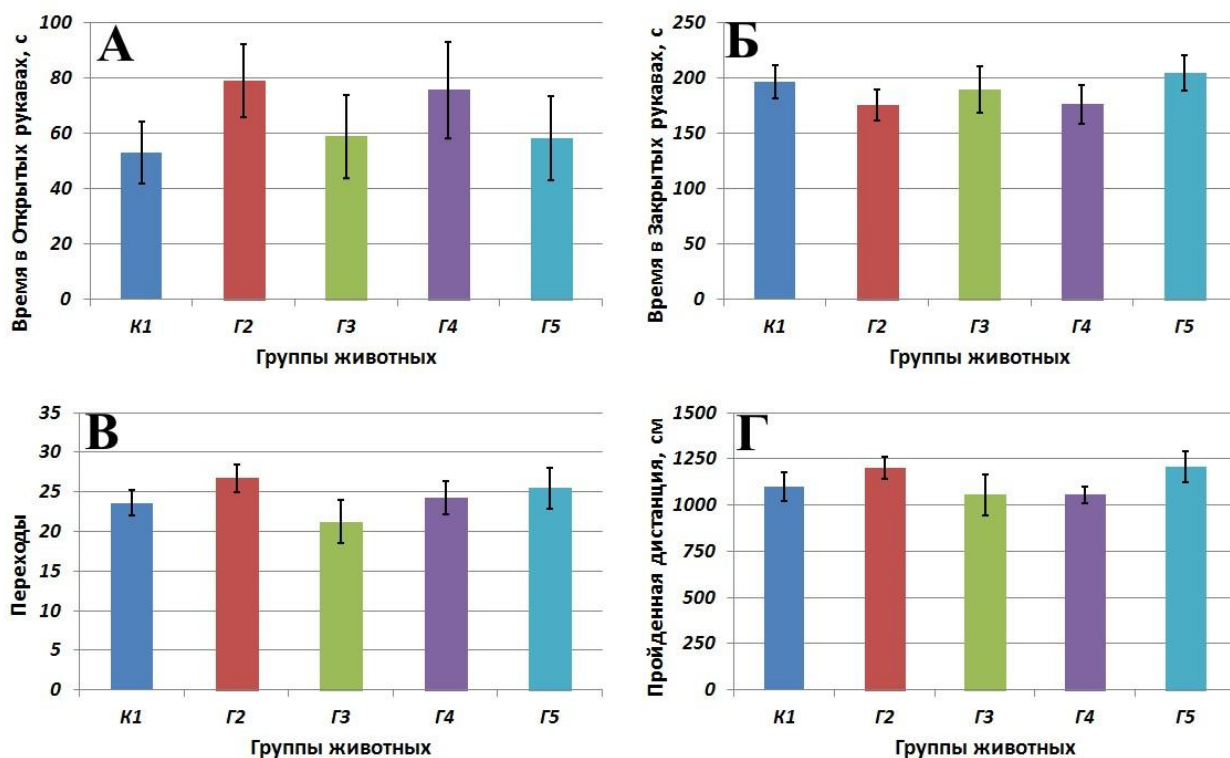
Б. ППК - Площадь под кривой, ммоль/л\*180 мин

1- различия достоверны по сравнению с группой К1 ( $p < 0,05$ ); 2- различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p < 0,05$ ).

**Рисунок 39** - Результаты инсулинорезистентного теста на 89 сутки

У животных группы Г2 и группы Г5 имело место развитие инсулинорезистентности: после введения инсулина уровень глюкозы крови на протяжении 180 минут оставался достоверно выше по сравнению с этим показателем для животных контрольной группы К1. На протяжении этого же временного интервала после введения инсулина уровни глюкозы крови для животных групп Г3, Г4 и контрольной группы К1 достоверно не различались (рис. 39А). Полученные значения показателей ППК (рис. 39 Б) наглядно подтверждают развитие состояния инсулинорезистентности у крыс группы Г2 и Г5 и сохранения чувствительности тканей к действию экзогенного инсулина у крыс групп Г3 и Г4, как и у животных контрольной группы К1. Для животных опытной группы Г4, получавших 30 мг/кг концентрата фикоцианинов, различия достоверны относительно животных группы Г2.

На рисунке 40 (А, Б, В, Г) представлены результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» (85 сутки).



**Рисунок 40** - Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт»

При тестировании поведения животных в ПКЛ не было отмечено достоверных отличий между животными всех групп по показателям тревожности и исследовательской активности ( $p \geq 0,05$ ). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии влияния на определяемые физиологические показатели, использованных в работе рационов.

В таблицах 31, 32 и 33 представлены результаты определения ряда показателей углеводного, липидного и холестеринового обмена в крови и печени животных всех групп после выведения из эксперимента.

**Таблица 31** - Биохимические показатели крови

Показатель	Группы животных				
	K1	Г2	Г3	Г4	Г5
Холестерин, ммоль/л	1,58 (1,52-1,70)	<b>2,04</b> <b>(1,89-20,6)<sup>1</sup></b>	1,80 (1,70-1,80)	1,84 (1,73-1,97)	<b>1,60</b> <b>(1,40-1,77)<sup>2</sup></b>
ЛПВП, ммоль/л	1,05±0,04	0,96±0,06	0,92±0,03	<b>0,88±0,04<sup>1</sup></b>	<b>0,88±0,06<sup>1</sup></b>
ЛПНП, ммоль/л	0,09 (0,06-0,12)	0,11 (0,09-0,16)	0,12 (0,08-0,12)	0,14 (0,10-0,19)	0,14 (0,0,9-0,19)
Триглицериды, ммоль/л	1,71 (1,51-1,99)	<b>0,88</b> <b>(0,77-1,10)<sup>1</sup></b>	<b>0,95</b> <b>(0,93-1,08)<sup>1</sup></b>	<b>1,00</b> <b>(0,95-1,12)<sup>1</sup></b>	<b>1,45</b> <b>(1,19-1,60)<sup>2</sup></b>

АЛТ, Ед/л	69,5 (62,0-76,3)	<b>188,7</b> <b>(168,4-192,3)<sup>1</sup></b>	<b>161,1</b> <b>(148,9-192,4)<sup>1</sup></b>	<b>134,5</b> <b>(113,3-161,1)<sup>1</sup></b>	<b>120,6</b> <b>(101,8-169,3)<sup>1,2</sup></b>
АСТ, Ед/л	51,6±3,9	53,2±6,2	50,5±5,9	54,0±6,7	49,5±8,4
АСТ/АЛТ (коэфф. де Ритиса)	0,85 (0,57-0,90)	<b>0,29</b> <b>(0,21-0,38)<sup>1</sup></b>	<b>0,29</b> <b>(0,25-0,31)<sup>1</sup></b>	<b>0,40</b> <b>(0,29-0,52)<sup>1</sup></b>	<b>0,37</b> <b>(0,22-0,57)<sup>1</sup></b>
Билирубин общий, мкмоль/л	8,1±0,2	<b>7,5±0,1<sup>1</sup></b>	<b>7,6±0,1<sup>1</sup></b>	<b>7,6±0,1<sup>1</sup></b>	<b>7,2±0,1<sup>1,3,4</sup></b>
Белок общий, г/л	70,8±1,0	<b>74,4±0,8<sup>1</sup></b>	<b>73,8±0,9<sup>1</sup></b>	<b>74,1±0,9<sup>1</sup></b>	73,1±1,0
Глобулин, г/л	34,3±0,8	<b>37,2±0,6<sup>1</sup></b>	36,3±0,9	36,5±0,8	36,3±1,2
Альбумин, г/л	36,5±0,4	37,2±0,3	37,4±0,4	37,6±0,5	36,8±0,3
Щелочная фосфатаза, Ед/л	216,0±23,7	233,2±17,7	212,6±10,6	255,4±13,5	201,0±18,3 <sup>4</sup>
Мочевина, ммоль/л	5,55 (5,14-5,62)	4,89 (4,76-5,09)	5,01 (4,58-5,54)	5,18 (4,74-5,45)	5,28 (4,23-5,60)
Мочевая кислота, мкмоль/л	90,4±5,7	95,9±3,9	91,2±2,5	94,1±4,5	77,3±5,6 <sup>2,4</sup>
Глюкоза, ммоль/л	5,94 (5,82-6,60)	6,47 (5,79-6,61)	5,60 (5,31-6,76)	<b>5,55</b> <b>(5,35-5,66)<sup>1,2</sup></b>	6,67 (6,25-7,10) <sup>3,4</sup>
Гликированный гемоглобин крови, %	4,50 (4,50-4,70)	4,55 (4,30-4,85)	4,60 (4,55-4,93)	4,75 (4,50-4,90)	4,75 (4,65-4,85)

Примечание: 1 – различия достоверны по сравнению с контрольной группой К1 ( $p<0,05$ ); 2- различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p<0,05$ ); 3- различия достоверны по сравнению с группой Г3 ( $p<0,05$ ); 4- различия достоверны по сравнению с группой Г4 ( $p<0,05$ ).

В сыворотке крови животных группы Г2 достоверно увеличился уровень общего холестерина при статистически значимом снижении концентрации триглицеридов ( $p<0,01$ ). У животных групп Г4 и Г5 концентрация ЛПВП в сыворотке крови была достоверно ниже по сравнению с этим показателем для животных контрольной группы ( $p<0,02$ ). Содержание ЛПВП в крови животных группы Г3 достоверно не отличалось в сравнении с контролем. У животных групп Г3 и Г4 выявлено достоверное снижение концентрации триглицеридов в сравнении с животными контрольной группы ( $p<0,01$ ). Уровень общего билирубина крови является перспективным биомаркером оценки ввиду его влияния на процессы ингибирования окисления ЛПНП [112, 140]. Потребление ВЖ рациона с добавлением 2% холестерина, не зависимо от потребления концентрата фикоцианинов, приводило к достоверному снижению уровня общего билирубина ( $p<0,01$ ). Полученный результат свидетельствует о влиянии ВЖ

рациона и холестерина на метаболизм билирубина, при этом введение в рацион концентрата фикоцианинов, не смотря на гомологичность структуры с билирубином, не оказывало влияния на нормализацию значения данного показателя, а в высокой концентрации способствовало еще большему его снижению.

У животных опытных групп выявлено достоверное увеличение активности АЛТ в сыворотке крови, которое при отсутствии изменения активности АСТ соответственно приводило к снижению коэффициента де Ритиса. Активность АЛТ отображает уровень анаболизма, активность АСТ, наоборот, интенсивность катаболизма, при этом в здоровом организме катаболизм преобладает над анаболизмом. Полученное в нашем исследовании понижение величины коэффициента де Ритиса указывает на усиление процессов анаболизма [29] на фоне потребления высокожирового рациона и холестерина независимо от добавления в рацион концентратов фикоцианинов. При этом добавление в рацион концентрата фикоцианинов в дозе 300 мг/кг массы тела приводило к достоверному снижению активности АЛТ по сравнению с показателем животных группы Г2 ( $p < 0,03$ ).

Уровень общего белка в сыворотке крови был достоверно выше у животных групп Г2, Г3 и Г4 по сравнению с контролем ( $p < 0,04$ ). Полученный результат может также являться следствием потребления высокожирового рациона и холестерина животными и свидетельствовать о различных патофизиологических процессах, таких как воспаление, нарушения работы печени или почек. При этом добавление в рацион фикоцианинов в дозе 300 мг/кг массы тела приводило к нормализации общего белка до уровня контрольных животных.

Уровень глюкозы в крови животных группы Г4 был достоверно ниже по сравнению с показателем животных контрольной группы К1 и опытной группы Г2 ( $p < 0,03$ ), а у животных группы Г5 концентрация глюкозы была достоверно выше по сравнению с уровнем у крыс групп Г3 и Г4 ( $p < 0,02$ ).



**Таблица 32** - Биохимические показатели крови

Показатель	Группы животных				
	К1	Г2	Г3	Г4	Г5
СОД, нг/мл	2,2 (1,7-3,3)	<b>7,3</b> <b>(5,7-10,8)<sup>1</sup></b>	<b>4,7</b> <b>(2,5-9,3)<sup>1</sup></b>	<b>3,5</b> <b>(3,1-4,2)<sup>2</sup></b>	<b>8,3</b> <b>(3,2-20,8)<sup>1</sup></b>
Глутатион пероксидаза, пг/мл	139,7 (110,4- 179,7)	163,1 (129,6-194,5)	116,4 (97,2-130,7)	122,7 (102,5-320,4)	113,5 (88,2-115,9)
МДА, нг/мл	934,8 (524,4- 1055,2)	<b>1838,1</b> <b>(1604,6- 2580,2)<sup>1</sup></b>	<b>1781,7</b> <b>(963,0- 3028,4)<sup>1</sup></b>	<b>1195,3</b> <b>(992,6- 1452,0)<sup>2</sup></b>	<b>3252,5</b> <b>(1062,4- 5019,3)<sup>1</sup></b>
Гидроперекиси липидов, нг/мл	92,6 (85,7-103,3)	<b>252,8</b> <b>(250,6-254,2)<sup>1</sup></b>	<b>241,0</b> <b>(238,4- 244,2)<sup>1,2</sup></b>	<b>246,1</b> <b>(232,7- 247,7)<sup>1,2</sup></b>	<b>236,3</b> <b>(231,4-242,0)<sup>1,2</sup></b>
Грелин, нг/мл	3,5 (2,1-4,6)	<b>11,4</b> <b>(8,4-16,0)<sup>1</sup></b>	<b>7,3</b> <b>(4,5-19,2)<sup>1</sup></b>	<b>5,3</b> <b>(4,8-7,8)<sup>2</sup></b>	<b>10,6</b> <b>(4,4-34,9)<sup>1</sup></b>
Лептин, нг/мл	47,8 (37,3-51,3)	<b>183,8</b> <b>(112,7-243,0)<sup>1</sup></b>	<b>189,6</b> <b>(122,9-267,2)<sup>1</sup></b>	<b>86,8</b> <b>(61,1-112,2)<sup>2</sup></b>	<b>113,0</b> <b>(75,2-180,7)<sup>1</sup></b>
Инсулин, пг/мл	20,9 (16,2-79,5)	15,8 (10,0-19,4)	29,9 (13,1-102,7)	44,9 (20,9-75,1)	16,5 (13,3-34,2)
С-пептид, пг/мл	61,3 (36,4-296,7)	33,0 (20,5-45,1)	94,6 (28,9-360,8)	83,8 (34,4-158,2)	33,3 (27,7-95,8)

Примечание: 1 – различия достоверны по сравнению с контрольной группой К1 ( $p < 0,05$ ); 2- различия достоверны по сравнению с группой Г2 ( $p < 0,05$ ).

У животных групп Г2, Г3 и Г5 выявлено накопление в сыворотке крови лептина ( $p < 0,03$ ), который регулирует массу тела, снижая аппетит и увеличивая расход энергии, тем самым модулируя термогенез [111]. Ожирение тесно связано с повышением уровня лептина и с последующим развитием резистентности, которая в первую очередь связана с дефектами транспорта лептина и сигнального пути рецептора лептина (клеточная резистентность к лептину) [90]. Лептин увеличивает чувствительность периферических тканей к инсулину и снижает его секрецию бета-клетками поджелудочной железы, в связи с этим при наличии резистентности к лептину часто развивается и инсулинорезистентность [58]. Добавление в рацион животных группы Г4 концентрата фикоцианинов в дозировке 30 мг/кг массы тела сдерживало рост лептина на уровне, статистически значимо не отличающемся от контроля.

У животных групп Г2, Г3 и Г5 концентрация грелина в сыворотке крови также была достоверно выше по сравнению с показателем животных контрольной

группы ( $p < 0,02$ ), при этом у крыс, получавших концентрат фикоцианинов в дозе 30 мг/кг массы тела, такого роста не произошло. Гиперсекреция грелина приводит к снижению утилизации жира и способствует развитию ожирения (стимулирует липогенез и тормозит липолиз), а также активирует синтез липидов печенью [18].

В сыворотке крови всех животных, получавших высокожировую рацион с добавкой холестерина, показано достоверное накопление гидроперекисей липидов и МДА в сыворотке крови животных групп Г2, Г3 и Г5, по сравнению с контролем ( $p < 0,03$ ). Активные формы кислорода атакуют полиненасыщенные жирные кислоты и инициируют перекисное окисление липидов внутри клетки, что приводит к образованию побочных продуктов альдегидов, таких как МДА и гидроперекиси липидов [138]. В норме этот процесс физиологически сбалансирован за счет активности эндогенных антиоксидантных систем, которые способны увеличивать активность в ответ на возрастание прооксидантных воздействий, о чем свидетельствует повышение у животных групп Г2, Г3 и Г5 уровня супероксиддисмутазы, антиоксидантного фермента, который обеспечивает естественную защиту клеток от воздействия свободных радикалов. Введение в рацион животных концентрата фикоцианинов в дозе 30 мг/кг массы тела снижало содержание МДА в сыворотке крови до уровня контрольных животных. Также у этих животных не выявлено накопления в сыворотке крови фермента супероксиддисмутазы, что свидетельствует о нормализующем действии концентрата фикоцианинов в дозе 30 мг/кг массы тела на систему антиоксидантной защиты организма.

**Таблица 33** - Биохимические показатели печени

Показатель	Группы животных				
	К1	Г2	Г3	Г4	Г5
Относительная масса печени, %	2,4 (2,4-2,6)	4,9 (4,5-5,3) <sup>1</sup>	4,3 (4,0-4,8) <sup>1</sup>	4,6 (4,1-5,2) <sup>1</sup>	4,6 (4,2-4,7) <sup>1</sup>
Содержание жира, мг/г влажной ткани печени	101,4 (84,5-112,1)	424,4 (388,4-447,6) <sup>1</sup>	406,7 (381,9-440,9) <sup>1</sup>	397,8 (342,3-426,7) <sup>1</sup>	379,6 (369,6-401,9) <sup>1</sup>
Триглицериды, мг/г влажной ткани печени	8,3 (5,4-20,1)	112,6 (102,8-156,0) <sup>1</sup>	148,3 (120,8-166,4) <sup>1</sup>	124,8 (91,3-139,1) <sup>1</sup>	154,52 (98,1-187,4) <sup>1</sup>

Холестерин, мг/г влажной ткани печени	4,9 (3,9-5,8)	45,2 (31,6-58,3) <sup>1</sup>	45,0 (35,2-53,1) <sup>1</sup>	43,8 (33,0-47,5) <sup>1</sup>	45,3 (41,9-48,9) <sup>1</sup>
---	------------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------

Примечание: 1- различия достоверны по сравнению с группой K1 ( $p < 0,01$ ).

У животных всех групп, получавших ВЖ рацион с 2% холестерином, показано достоверное увеличение относительной массы печени, накопление в этом органе жира (более чем в 3,5 раза), холестерина (более чем в 9 раз) и триглицеридов (более чем в 12 раз) по сравнению с животными контрольной группы.

Потребление животными группы высокожирового рациона с добавлением 2% холестерина оказывало, как и следовало ожидать на основании результатов по биомоделированию, неблагоприятное влияние на показатели, характеризующие углеводный, жировой и холестериновый обмен. Увеличилось в 1,8 раза процентное содержание жира с одновременным снижением мышечной массы тела животных. О развитии ожирения и сопутствующих нарушений метаболизма свидетельствовало накопление в крови животных лептина и грелина (более чем в 3 раза). Имело место развитие инсулинорезистентности: среднее значение ПИК выросло в 1,3 раза. Уровень холестерина в крови вырос в 1,3 раза. О развитии оксидативного стресса свидетельствуют повышение в крови уровней гидроперекисей в 2,7 раза, МДА в 2 раза и в 3,3 раза активности супероксиддисмутаза. Снижение более чем в два раза коэффициента де Ритиса и рост в 2,7 раз абсолютного значения АЛТ в крови указывает на повреждения клеток печени и преобладание анаболических процессов в организме.

Замена 50% казеина в составе высокожирового рациона белком сои оказалось мало эффективным, только достоверно снизив в сыворотке крови крыс группы ГЗ содержание гидроперекисей липидов ( $p=0,011$ ) и сохранив чувствительность тканей к действию экзогенного инсулина.

Введение фикоцианинов в дозировке 300 мг/кг массы тела в состав высокожирового рациона оказалось также недостаточно эффективным. Имели место только достоверные снижения концентрации АЛТ ( $p=0,032$ ) и

гидроперекиси липидов ( $p=0,001$ ) в сыворотке крови. При этом статистически значимо были повышены жировая масса тела, уровень глюкозы и снижены мышечная масса тела и концентрация билирубина по сравнению с показателями животных групп Г3 и Г4. Сохранялись нарушения гормонального статуса (рост уровня лептина и грелина) и антиоксидантного статуса (увеличение концентрации МДА и СОД), развивалась инсулинорезистентность.

Введение в рацион животных фикоцианинов в дозе 30 мг/кг массы тела оказалось значительно более эффективным и в определенной степени препятствовало развитию нарушений углеводного и жирового обмена: препятствуя развитию инсулинорезистентности ( $p=0,049$ ), снижая уровень глюкозы в сыворотке крови ( $p=0,025$ ); оказывая антиоксидантное действие, нормализуя концентрацию гидроперекисей липидов ( $p=0,047$ ), МДА ( $p=0,015$ ) и СОД ( $p=0,038$ ) в сыворотке крови. Гиполипидемическое действие фикоцианинов в дозе 30 мг/кг массы тела выражалось также достоверным снижением концентрации лептина ( $p=0,037$ ) и грелина ( $p=0,028$ ).

Добавление в рацион животных, как соевого белка, так и в сочетании с концентратом фикоцианинов в обеих дозировках не препятствовало накоплению экстремально высоких количеств жира, холестерина и триглицеридов в печени животных опытных групп и не оказывало, сколько-нибудь благоприятного влияния на состав тела (увеличение процентного содержания жира с одновременным снижением мышечной массы тела).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование, связанное с физиолого-биохимической оценкой влияния фикоцианинов биомассы пищевой цианобактерии *A. platensis* на состояние у крыс-самцов линии Вистар липидного, холестеринового и углеводного обмена при потреблении животными высокожировых рационов, содержащих экзогенный холестерин, включало на первом этапе работы, получение в лабораторных условиях высокоочищенных концентратов фикоцианинов биомассы *A. platensis*. Использование мембранной технологии (ультра- и микрофльтрации) сделало возможным исключить традиционно применяемую стадию сульфатно-аммонийного осаждения белка и получить концентраты с высоким суммарным содержанием С-фикоцианина и аллофикоцианина. Совокупность методов ультра- и микрофльтрации, использованных в нашем исследовании, значительно интенсифицировала и упростила процесс получения концентратов фикоцианинов. Получение высокоочищенных концентратов фикоцианинов аналитической степени чистоты требует сочетания стадий экстракции и очистки с дальнейшим выделением белка с помощью ионообменной и гель-хроматографии, а также с использованием гидрофобных сорбентов [78, 82, 87, 135]. Соответственно, заключительная модификация технологической схемы предусматривала дополнительное использование ионно-обменной колоночной хроматографии на ДЕАЕ-сефарозе и обессоливания ультрафльтрацией. В результате был получен концентрат с аналитической степенью чистоты 4,0 и суммарным содержанием фикоцианинов  $(86,9 \pm 1,3)\%$ . Модифицированные методы позволили получить с минимальными потерями концентраты с высоким содержанием фикоцианинов биомассы *A. platensis* и аналитической степенью чистоты. Таким образом, в рамках выполнения диссертационной работы путем последовательных модификаций технологических схем получены и физико-химически охарактеризованы концентраты фикоцианинов биомассы *A. platensis*, со степенью чистоты, позволяющей их использование в качестве ингредиентов специализированной пищевой продукции.

Второй этап включал сравнительную характеристику и выбор модели нарушений метаболизма, индуцированных потреблением рационов различных по калорийности и содержанию экзогенного холестерина у крыс-самцов линии Вистар. Для этих целей при проведении экспериментов *in vivo* всего было использовано 6 моделей нарушений углеводного, липидного и холестеринового обмена у грызунов, индуцированных потреблением: полусинтетического рациона с добавлением 2% холестерина, модифицированного изоазотистого высокожирового рациона с содержанием жира 50% по калорийности, модифицированного изоазотистого высокожирового рациона с содержанием жира 60% по калорийности, модифицированного изоазотистого высокожирового рациона с добавлением 0,5%, 1% и 2% холестерина. Результаты проведенного нами исследования свидетельствовали, что увеличение в высокожировых рационах растущих крыс-самцов Вистар содержания жира на 10% (от 50% до 60%) не приводило к избыточному набору массы тела, увеличению потребления энергии и не оказывало влияния на такие показатели липидного обмена в крови, как общий холестерин, ЛПНП, ЛПВП и триглицериды. Потребление половозрелыми крысами-самцами Вистар высокожирового рациона с 50% содержанием жира по калорийности в отличие от растущих животных не приводило к изменениям уровня лептина, грелина и С-пептида и накоплению в печени жира и триглицеридов.

Добавление 2% холестерина в высокожировой рацион (с 50% содержанием жира по калорийности) как растущих, так и половозрелых крыс оказывало выраженное негативное воздействие на основные биомаркеры липидного, углеводного и холестеринового обмена, вызывая схожие нарушения в крови и в печени животных, связанные с жировой болезнью печени, накоплением жировой массы тела. При этом у растущих крыс были также отмечены нарушения гормональной регуляции, развитие оксидативного стресса и инсулинорезистентности. При сравнении влияния различных доз введенного холестерина (0,5%, 1% и 2%) половозрелым крысам самцам Вистар наиболее выраженное избыточное повышение содержания в печени крыс жира и

холестерина установлено при введении в 50% высокожировой рацион 2% холестерина. Введение 0,5% холестерина в состав 50% высокожирового рациона половозрелым крысам не оказывало влияния на прирост массы тела и его состав.

Проведенный сравнительный анализ нарушений метаболизма, индуцированных высокожировыми рационами с добавлением экзогенного холестерина, у лабораторных грызунов - растущих и половозрелых крыс-самцов линии Вистар позволил выбрать две модели нарушений, характеризующиеся наиболее значимыми обратимыми воздействиями на организм животных, сочетающими максимальное число изменений тестируемых показателей метаболических нарушений. Для оценки эффективности профилактического влияния концентратов фикоцианинов биомассы *A. platensis* на нарушения углеводного, липидного, холестеринового обмена у половозрелых и растущих крыс, использованы высокожировой рацион с добавлением 1% холестерина и высокожировой рацион с добавлением 2% холестерина.

Соответственно, эти модели были использованы нами для оценки влияния концентратов фикоцианинов биомассы *A. platensis* на метаболические нарушения метаболизма у крыс-самцов Вистар.

Добавление в высокожировой рацион с 1% холестерина концентрата фикоцианинов в дозе 30 мг/кг м.т. препятствовало увеличению процентного содержания жира и снижению мышечной массы половозрелых крыс-самцов Вистар. В этой дозировке концентрат фикоцианинов оказывал гипогликемическое и гипополипидемическое действие: препятствовал развитию у половозрелых животных инсулинорезистентности и снижал концентрацию лептина. В сыворотке крови этих крыс была достоверно снижена концентрация МДА по сравнению с животными, получавшими высокожировый рацион с добавлением 1% холестерина.

Введение концентрата фикоцианинов в дозировке 100 мг/кг массы тела в высокожировой рацион с добавлением 1% холестерина препятствовало развитию инсулинорезистентности и оказало определенное гипогликемическое и гипополипидемическое действие. Имело место снижение относительной массы

печени, уровня в ней триглицеридов и снижение концентрации лептина в сыворотке крови половозрелых животных по сравнению с этими показателями для крыс, потреблявших такой же высокожировой рацион, но не содержащий концентрат фикоцианинов. Добавление в рацион половозрелых животных концентрата фикоцианинов в обеих дозировках, однако, не препятствовало накоплению экстремально высоких количеств жира и холестерина в печени животных.

Потребление растущими крысами-самцами Вистар высокожирового рациона с добавлением 2% холестерина, содержащего концентрат фикоцианинов в дозировке 30 мг/кг м.т. в определенной степени препятствовало развитию нарушений углеводного обмена у этих животных: сохраняя чувствительность к действию экзогенного инсулина, снижая уровень глюкозы в сыворотке крови. Данная дозировка фикоцианинов оказывало гиполипидемическое и антиоксидантное действие: снижая концентрации лептина и грелина, нормализуя концентрации гидроперекисей липидов, МДА и СОД в сыворотке крови по сравнению с животными, получавшими высокожировой рацион с добавлением 2% холестерина, но не содержащий концентрат фикоцианинов, что свидетельствует о проявлении антиоксидантной активности фикоцианинов при использовании в невысокой дозировке.

Положительное влияние потребления фикоцианинов установленное в нашем исследовании согласуется на качественном уровне с данными представленными в обзоре научной литературы свидетельствующими о снижении у грызунов развития нарушений липидного и углеводного обмена [88,108].

Потребление растущими животными концентрата фикоцианинов в дозировке 300 мг/кг массы тела в составе высокожирового рациона с холестерином оказалось не эффективным. Сохранялись нарушения гормонального (повышенный уровень лептина и грелина) и антиоксидантного статуса (возросшая концентрация МДА и супероксиддисмутазы) и развивалась инсулинорезистентность, что может быть обусловлено возможным прооксидантным действием высокой дозировки фикоцианина. Добавление в



рацион животных концентрата фикоцианинов в обеих дозировках не оказывало благоприятного эффекта на показатели, характеризующие состояние печени и состав тела (увеличение процентного содержания жира с одновременным снижением мышечной массы тела).

Можно предположить, что неадекватно высокое потребление фикоцианинов *A. platensis* (300 мг/ кг массы тела животных/сутки) может чрезмерно повысить уровень в крови фикоцианорубина (гомологичного билирубина), неблагоприятно повлияв на организм грызунов, аналогично хорошо известному токсическому воздействию избыточного уровня свободного несвязанного фикоцианобилина. Неблагоприятный эффект потребления животными высокой дозы *A. platensis* был специально учтен нами при разработке специализированного диетического пищевого продукта для профилактики нарушений углеводного и/или липидного обмена.

Проведена сравнительная физиолого-биохимическая оценка влияния потребления различных доз концентратов фикоцианинов биомассы *A. platensis* на нарушения липидного, холестеринового и углеводного обмена у растущих и половозрелых крыс-самцов линии Вистар. Установлено благоприятное влияние фикоцианинов в дозе 30 мг/кг массы тела и фикоцианинов в дозе 100 мг/кг массы тела на липидный и углеводный обмен растущих и половозрелых крыс-самцов линии Вистар.

Таким образом, можно резюмировать, что в результате проведенного исследования, получены данные, связанные, во-первых, с решением важной практической задачи совершенствования методов технологии концентратов фикоцианинов биомассы *A. platensis* их масштабирования и производства новых ингредиентов специализированной пищевой профилактической продукции. Во-вторых, результаты диссертационной работы имеют значение и должны быть учтены для развития фундаментального направления доклинической нутрициологии – разработки и обоснования биомоделей, позволяющих с позиций доказательной медицины характеризовать эффективность биологически активных веществ пищи. Полученные результаты указывают на перспективность

использования в дальнейших клинических исследованиях концентратов фикоцианинов биомассы *A. platensis* в качестве ингредиентов специализированной пищевой продукции для оптимизации рационов лиц с нарушениями углеводного и жирового обмена.

## ВЫВОДЫ

1. Для оценки эффективности БАВ (концентратов фикоцианинов) при профилактике нарушений углеводного и липидного обмена разработаны модели, основанные на добавлении 2% холестерина и 1% холестерина в высокожировые рационы растущих и половозрелых крыс-самцов Вистар.
2. Высокожировой рацион с добавлением 1% холестерина индуцировал нарушения углеводного и липидного обмена у половозрелых крыс самцов Вистар: развитие состояния инсулинорезистентности, увеличение содержания жира более чем на 20% с одновременным снижением мышечной массы на 10%. Накопление жира, холестерина и триглицеридов в печени увеличилось более чем на 400%. В крови животных выросли уровни МДА на 50%, ЛПНП на 100% и АЛТ на 70% соответственно.
3. Высокожировой рацион с добавлением 2% холестерина индуцировал нарушения углеводного и липидного обмена у растущих крыс самцов Вистар: развитие состояния инсулинорезистентности, увеличение содержания жира более чем на 55% с одновременным снижением мышечной массы на 10%. Накопление жира, холестерина и триглицеридов в печени увеличилось более чем на 300%. В крови растущих животных повысилось содержание лептина на 285% и грелина на 225%, уровни холестерина и АЛТ на 30% и на 170% соответственно. Концентрация гидроперекисей возросла на 170%, МДА на 90% и СОД на 230%.
4. Модифицированы препаративные методы выделения и очистки концентратов фикоцианинов биомассы *A. platensis*, получены концентраты с суммарным содержанием фикоцианинов 37%, 43%, 49%, 68%, 87% и степенью чистоты 1.0, 1.1, 2.0, 2.7, 4.0 соответственно.
5. На модели индуцирования нарушений углеводного, липидного и холестеринового обмена у половозрелых крыс установлено антиоксидантное, гипогликемическое и гиполипидемическое действие перорального введения высокоочищенного концентрата, содержащего 68% фикоцианинов, в дозах 30 мг/кг массы тела и 100 мг/кг массы тела. Потребление фикоцианинов способствовало сохранению чувствительности к инсулину, препятствовало

увеличению жировой массы тела и снижению мышечной массы, снижало относительную массу печени на 15% и уровень в ней триглицеридов на 20%, снижало в сыворотке в крови уровень лептина на 54%, концентрацию МДА на 25%.

6. На модели индуцирования нарушений углеводного, липидного и холестеринового обмена у растущих крыс продемонстрировано антиоксидантное, гипогликемическое и гиполипидемическое действие перорального введения высокоочищенного концентрата, содержащего 37% фикоцианинов, в дозе 30 мг/кг массы тела. Установлено сохранение чувствительности к инсулину, снижение в сыворотке крови концентрации МДА на 35% и СОД на 55%, уровней лептина и грелина на 52% и 53%.

7. На основании серии экспериментов *in vivo* выбраны и количественно охарактеризованы модели для оценки эффективности БАВ пищи (фикоцианинов) при профилактике нарушений углеводного, липидного и холестеринового обмена. Экспериментально определены эффективные профилактические дозы высокоочищенных концентратов фикоцианинов для растущих и половозрелых крыс-самцов Вистар, составляющие 30 мг/кг массы тела и 100 мг/кг массы тела, соответственно.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Апрытин С.А., Мжельская К.В., Трусков Н.В., Балакина А.С., Кулакова С.Н., Сото Х.С., Макаренко М.А., Ригер Н.А., Тутельян В.А. Сравнительная характеристика *in vivo* моделей гиперлипидемии у крыс линии Вистар и мышей линии C57BL/6 // Вопросы питания. - 2016.- Т. 85, № 6. - С. 14-23.
2. Апрытин С.А., Мжельская К.В., Трусков Н.В., Балакина А.С., Сото Х.С., Бекетова Н.А., Кошелева О.В., Гмошинский И.В., Никитюк Д.Б. Биохимические и морфологические показатели инбредных/аутбредных линий и тетрагибрида DBCB мышей в высокосахарозной *in vivo* модели метаболического синдрома // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 166, № 7. – С. 107-113.
3. Апрытин С.А., Мжельская К.В., Трусков Н.В., Балакина А.С., Сото С.Х., Вржесинская О.А., Гусева Г.В., Аксенов И.В., Бекетова Н.А., Кошелева О.В., Коденцова В.М., Гмошинский И.В. Сравнительная оценка витаминного статуса и биохимических маркеров развития метаболического синдрома на моделях грызунов, получающих рационы с высокими квотами различных легкоусвояемых углеводов // Вопросы питания. - 2017. - Т. 86. № 6. - С. 42–55.
4. Апрытин С.А., Трусков Н.В., Горбачев А.Ю., Наумов В.А., Балакина А.С., Мжельская К.В., Гмошинский И.В. Сравнительный анализ полнотранскриптомного профиля печени крыс Wistar, получавших рационы с различным содержанием жира, фруктозы и холестерина // Биохимия. – 2019. – Т. 84, № 9. – С. 1344-1358. doi 10.1134/S0320972519090124.
5. Бирюлина Н.А., Зорин С.Н., Мазо В.К. Концентраты фикоцианинов из биомассы *Arthrospira platensis*: технология и характеристика состава // Актуальная биотехнология.- 2022. - № 1. -С. 187-189.
6. Бирюлина Н. А, Зорин С. Н., Мазо В. К. Концентрат фикоцианинов *Arthrospira platensis*: получение, физикохимическая характеристика // Пищевая промышленность. - 2025. - № 5. - С. 136–139. doi: 10.52653/PPI.2025.5.5.025.
7. Бирюлина Н. А., Зорин С. Н., Мазо В. К. Модифицированный метод получения концентрата с высоким суммарным содержанием фикоцианинов из

биомассы *Arthrospira platensis* // Наука, питание и здоровье. Беларуская навука, - 2024. - С. 91-95.

8. Бирюлина Н.А., Зорин С.Н., Никитюк Д.Б., Мазо В.К. Модифицированный метод получения фикоцианинового концентрата биомассы *Arthrospira platensis* // Вопросы питания. - 2023. -Т. 92, № 5. - С. 110–116. doi:10.33029/0042-8833-2023-92-5-110-116.

9. Бирюлина Н.А., Мазо В.К., Багрянцева О.В. Фикоцианины *Arthrospira platensis*: перспективы использования в специализированной пищевой продукции (краткий обзор) // Вопросы питания. - 2022. - Т. 91, № 6. - С. 30–36. doi: [10.33029/0042-8833-2022-91-6-30-36](https://doi.org/10.33029/0042-8833-2022-91-6-30-36).

10. Бирюлина Н.А., Мазо В.К., Петров Н.А., Сидорова Ю.С., Кочеткова А.А. Алиментарные нарушения холестеринового и жирового обменов у крыс самцов линии Вистар: исследование *in vivo* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2025. - Том 179, № 4 – С. 523-528. doi:10.47056/0365-9615-2025-179-4-523-528.

11. Бирюлина Н.А., Петров Н.А., Сидорова Ю.С. Оценка эффективности ФПИ при нарушениях жирового обмена у крыс-самцов линии Вистар // Международная научно-практическая конференция молодых учёных и специалистов отделения сельскохозяйственных наук Российской академии наук. - 2023. - № 1. - С. 27-31.

12. Бирюлина Н.А., Сидорова Ю.С., Зорин С.Н., Петров Н.А., Гусева Г.В., Мазо В.К., Кочеткова А.А. Оценка сочетанного влияния концентрата фикоцианинов биомассы *Arthrospira platensis* и белка сои на крыс-самцов линии Вистар, потребляющих высокожировую рацион с добавлением холестерина // Вопросы питания. - 2025. - Т. 94, № 2. - С. 73–84. doi:10.33029/0042-8833-2025-94-2-73-84

13. Бирюлина Н.А., Сидорова Ю.С., Мазо В.К., Кочеткова А.А. Нарушения холестеринового и липидного обмена у крыс-самцов линии Вистар, индуцированные экзогенной гиперхолестеринемией // Актуальные проблемы общей и клинической биохимии. - 2024. - С. 150-153.

14. Бирюлина Н.А., Сидорова Ю.С., Петров Н.А., Гусева Г.В., Мазо В.К. Влияние полусинтетического и высокожирового высокоуглеводного рационов,

содержащих холестерин, на показатели липидного и холестеринового обмена у самцов крыс Вистар // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2023. - Т. 175, № 4. - С. 451–456. doi: 10.47056/0365-9615-2023-175-4-451-456

15.Бирюлина Н. А., Сидорова Ю. С., Петров Н. А., Зорин С. Н., Мазо В. К. Верификация модели ожирения у крыс – самцов линии Вистар // Наука, питание и здоровье. Беларуская навука. - 2023. - С. 520-525.

16.Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В. Количественное определение массовой доли С фикоцианина и аллофикоцианина в сухой биомассе *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. Холодная экстракция // РАН, ИМБИ - 2017. – С. 21.

17.Голивец Т.П., Дубоносова Д.Г., Ликризон С.В. Ожирение и ассоциированные с ним заболевания – проблемные вопросы патогенеза и современные стратегии диагностики и лечения // Актуальные проблемы медицины. – 2023. - Т. 46, №2. – С.123–143. doi: 10.52575/2687- 0940-2023-46-2-123-143.

18.Груздева О.В., Бородкина Д.А., Белик Е.В., Акбашева О.Е., Паличева Е.И., Барбараш О.Л. Грелин – физиология и патофизиология: в центре внимания сердечно-сосудистая система // Кардиология. - 2019. - Т. 59, № 3. - С. 60-67. doi:10.18087/cardio.2019.3.10220.

19.Драпкина О.М., Кравченко А.Я., Будневский А.В., Концевая А.В., Ряскина М.С., Черник Т.А. Билирубин и сердечно-сосудистый риск. // Российский кардиологический журнал. - 2021. - Т. 26, № 9. - С. 4511. doi: 10.15829/1560-4071-2021-4511.

20.Драпкина О.М., Мартынов А.И., Арутюнов Г.П., Бакулин И.Г., Ливзан М.А., Маев И.В., Егоров И.В. Новые терапевтические горизонты НАЖБП // Терапевтический архив. – 2024. – Т.96, № 2. – С. 186–193. doi: 10.26442/00403660.2024.02.202648.

21.Кокшарова О.А. Вторичные метаболиты и фотосинтез цианобактерий // Вестник Башкирского государственного педагогического университета им. М. Акмуллы. – 2022. – Т.52, № 63. - С. 82-89.

22.Мазо В.К., Бирюлина Н.А., Зорин С.Н., Сидорова Ю.С., Петров Н.А. Концентрат фикоцианинов *A. platensis*: получение, влияние на развитие метаболических нарушений у крыс-самцов Вистар // Вопросы питания. - 2023. - Т. 92. № S5 (549). - С. 40-41. doi: 10.33029/0042-8833-2023-92-5s-024.

23.Мазо В.К., Бирюлина Н.А., Сидорова Ю.С. *Arthrospira platensis*: антиоксидантные, гипогликемические и гиполипидемические эффекты *in vitro* и *in vivo* (краткий обзор) // Вопросы питания. - 2022. - Т. 91, № 4. - С. 19-25. doi:10.33029/0042-8833-2022- 91-4-19-25.

24.Мазо В.К., Бирюлина Н.А., Сидорова Ю.С., Кочеткова А.А. Фикоцианины *Arthrospira platensis*: тестирование *in vivo* и перспективы использования в составе инновационной специализированной пищевой продукции // Наука, питание и здоровье. Беларуская навука. - 2024. - С. 302-306.

25.Мазо В.К., Сидорова Ю.С., Зорин С.Н., Кочеткова А.А. Стрептозотоциновые модели сахарного диабета // Вопросы питания. - 2016. - № 4. - С. 14-21.

26.Манжелей О.А., Устинова Е.А., Сухинов Д.В., Сергеева Я.Э. Исследование термостабильности фикоцианина цианобактерии *Arthrospira platensis* // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2021. – Т. 17, № 2. – С. 47-54.

27.Пастухов П.О. Исследование антиоксидантных и противовоспалительных свойств спирулины и их применение в профилактике заболеваний // Медицина. Прикладные исследования. – 2024. – № 5. – С. 38-43.

28.Пиневиц А.В. Парадоксы биоразнообразия, филогении и систематики цианобактерий // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. – 2008. -№1.- С. 23-27.

29.Рослый И.М. Правила чтения биохимического анализа: Руководство для врача / Рослый И.М., Водолажская М.Г. – 2-изд., испр. и доп. – М.: ООО Медицинское информационное агентство, 2014. – 100 с.

30.Ригер Н.А., Шипелин В.А., Апрятин С.А., Гмошинский И.В. Иммунологические маркеры алиментарно- индуцированной гиперлипидемии у



крыс линии Вистар // Вопросы питания. – 2019. – Т. 88, № 3. – С. 44-52. doi 10.24411/0042-8833-2019-10028.

31.Светлакова К.В., Безяева А.Д., Красноштанова А.А. Получение фикоцианина и белковых веществ из биомассы цианобактерий *Spirulina platensis* // Бутлеровские сообщения. – 2024. – Т. 80, № 10. – С. 85-94. – doi 10.37952/ROI-jbc-01/24-80-10-85.

32.Светлакова К.В., Красноштанова А.А. Подбор эффективных условий экстракции белков из биомассы цианобактерий *Spirulina platensis* // Успехи в химии и химической технологии. – 2023. – Т. 37, № 12(274). – С. 149-151.

33.Сидорова Ю.С., Бирюлина Н.А., Петров Н.А., Мазо В.К. Влияние хронической принудительной иммобилизации и потребления высокожирового и высокоуглеводного рациона, содержащего холестерин, на жировой и холестериновый обмен у крыс-самцов Вистар // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2023. - Т.176, №12. - С.692-697. doi 10.47056/0365-9615-2023-176-12-692-697.

34.Степанов А.В., Аксенова А.А., Полякова Е.А., Федосеева И.В., Грабельных О.И., Геворгиз Р.Г. Эффекты действия фикобилипротеинов *arthrospira platensis* (nordstedt) gomont в растительных тканях: антиоксидантная активность в глюкозооксидазной тест-системе и разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях // Journal of Life Sciences and Agriculture – 2021. – Т. 13, № 2. – С. 202-224.

35.Сухинов Д.В., Сергеева Я.Э. Влияние условий культивирования на рост цианобактерии *Arthrospira platensis* и выход фикоцианина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2020. – Т. 16, № 2. – С. 61-65.

36.Тармаева И.Ю., Сошина М.С., Богданова О.Г., Батурин А.К. Ожирение и ключевые предикторы его риска // Вопросы питания. - 2024. - Т. 93, № 6. - С. 6–15. doi: 10.33029/0042-8833-2024-93-6-6-15.

37.Труфанова, А.С., Бабиченко Н.П., Сергеева Я.Э. Оптимизация процесса выделения фикоцианина из цианобактерии *Arthrospira platensis* // Вестник

биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2019. – Т. 15, № 4. – С. 11-16.

38.Тутельян В.А. Пищевые ингредиенты в создании современных продуктов питания / А.П. Нечаев, О.В. Багрянцева, В.А.Тутельян. - М: изд. ДеЛи плюс, 2013.- 520 с.

39.Тутельян В.А., Никитюк Д.Б. Ключевые проблемы в структуре потребления пищевой продукции и прорывные технологии оптимизации питания для здоровьесбережения населения России // Вопросы питания. - 2024. - Т. 93, № 1. - С. 6-21. doi: 10.33029/0042-8833-2024-93-1-6-21.

40.Тутельян В.А. Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи / В.А. Тутельян, К.И.Эллер – М.: Издательство «Династия», 2010. – 160 с.

41.Шабанов К. А., Панов А. В., Суслов В. В., Кедик С. А. Фикоцианин из *Spirulina platensis*: таксономия, структура и свойства, медицинское применение // Гербариум. – 2025. – Т. 2, №1. – С. 9–22. doi:10.33380/3034-3925-2025-2-1-13.

42.Abdel-Daim M.M., Farouk S.M., Madkour F.F., Azab S.S. Antiinflammatory and immunomodulatory effects of *Spirulina platensis* in comparison to *Dunaliella salina* in acetic acid-induced rat experimental colitis // Immunopharmacol. Immunotoxicol. - 2015. - V. 37, N 2. - P. 126–139. doi: 10.3109/08923973.2014.998368.

43.Abdel-Daim M.M., Shaaban Ali M., Madkour F.F., Elgendy H. Oral *Spirulina platensis* attenuates hyperglycemia and exhibits antinociceptive effect in streptozotocin-induced diabetic neuropathy rat model // J. Pain Res. - 2020. - V. 13. - P. 2289–2296. doi:10.2147/ JPR.S267347.

44.Abdelkhalek N.K., Ghazy E.W., Abdel-Daim M.M. Pharmacodynamic interaction of *Spirulina platensis* and deltamethrin in freshwater fish Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: impact on lipid peroxidation and oxidative stress // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. - 2015. - V. 22.

45.Ashaolu T.J., Samborska K., Lee C.C., Tomas M., Capanoglu E., Tarhan Ö., Taze B., Jafari SM. Phycocyanin, a super functional ingredient from algae; properties,

purification characterization, and applications // *Int J Biol Macromol.* - 2021 – V. 193. - P. 2320-2331. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.11.064.

46.Bagheri S., Khorramabadi R.M., Assadollahi V., Khosravi P., Cheraghi Venol A., Veiskerami S., Ahmadvand H. The effects of pomegranate peel extract on the gene expressions of antioxidant enzymes in a rat model of alloxan-induced diabetes // *Arch. Physiol. Biochem.* - 2023. - V. 129, N 4. - P. 870-878. doi: 10.1080/13813455.2021.1877308.

47.Bhaskar S.U., Gopalaswamy G., Raghu R. A simple method for efficient extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* Geitler // *Indian J Exp Biol.* – 2005. – V. 43, N 3. - P.277-9.

48.Binayi F., Moslemi M., Khodagholi F., Hedayati M., Zardooz H. Long-term high-fat diet disrupts lipid metabolism and causes inflammation in adult male rats: possible intervention of endoplasmic reticulum stress // *Arch. Physiol. Biochem.* - 2023. - V. 129, N 1. - P. 204-212. doi: 10.1080/13813455.2020.1808997.

49.Biryulina N. , Zorin S., Mazo V., Nikityuk D. Modified method for obtaining a concentrate with a high total content of phycocyanins from *A. platensis* // *BIO Web of Conferences.* – 2024. – V. 126, N 01019. - P. 1019. doi:[10.1051/bioconf/202412601019](https://doi.org/10.1051/bioconf/202412601019).

50.Buettner R., Parhofer K.G., Woenckhaus M., Wrede C.E., Kunz-Schughart L.A., Schölmerich J., Bollheimer L.C. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types // *J Mol Endocrinol.* – 2006. – V. 36, N 3. – P. 485-501. doi: 10.1677/jme.1.01909.

51.Cacciola N.A., De Cicco P., Milanović M., Milovanović I., Mišan A., Kojić D. Role of *Arthrospira Platensis* in Preventing and Treating High-Fat Diet-Induced Hypercholesterolemia in Adult Rats // *Nutrients.* - 2024. - V. 16, N 12. - P. 1827. doi: [10.3390/nu16121827](https://doi.org/10.3390/nu16121827).

52.Cassier-Chauvat C., Dive V., Chauvat F. Cyanobacteria: photosynthetic factories combining biodiversity, radiation resistance, and genetics to facilitate drug discovery // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2017. - V. 101, N. 4. - P.1359-1364. doi:[10.1007/s00253-017-8105-z](https://doi.org/10.1007/s00253-017-8105-z).

53.Chai Z., Yan Y., Zan S., Meng X., Zhang F. Probiotic-fermented blueberry pomace alleviates obesity and hyperlipidemia in high-fat diet C57BL/6J mice // Food Res. Int. – 2022. – V.157. - P. 111396. doi:10.1016/j.foodres.2022.111396.

54.Chaiklahan R., Chirasuwan N., Loha V., Tia S., Bunnag B. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process // Bioresour Technol. – 2011. - V. 102, N. 14. - P.7159-64. doi: 10.1016/j.biortech.2011.04.067.

55.Chen Y.H., Chang G.K., Kuo S.M., Huang S.Y, Hu I.C., Lo Y.L. Well-tolerated *Spirulina* extract inhibits influenza virus replication and reduces virus-induced mortality // Sci Rep. - 2016. - V. 6, N 1. - P.24253. doi:10.1038/srep24253

56.Cherdkiatikul T., Suwanwong Y. Production of the  $\alpha$  and  $\beta$  Subunits of *Spirulina* Allophycocyanin and C-Phycocyanin in *Escherichia coli*: A Comparative Study of Their Antioxidant Activities // Journal of Biomolecular Screening. - 2014. - V. 19, N 6. - P. 959–965. doi:10.1177/1087057113520565

57.Chew N.W.S., Ng C.H., Tan D.J.H., Kong G., Lin C., Chin Y.H. The global burden of metabolic disease: Data from 2000 to 2019 // Cell Metab. - 2023. - V. 35, N 3. - P. 414-428 doi: 10.1016/j.cmet.2023.02.003

58.Cochrane V., Shyng S.L. Leptin-induced Trafficking of KATP Channels: A Mechanism to Regulate Pancreatic  $\beta$ -cell Excitability and Insulin Secretion // Int J Mol Sci. - 2019. - V. 20, N 11. - P. 2660. doi: 10.3390/ijms20112660

59.Dissard R., Klein J., Caubet C., Breuil B., Siwy J., Hoffman J., Sicard L., Ducassé L., Rascalou S., Payre B., Buléon M., Mullen W., Mischak H., Tack I., Bascands J.L., Buffin-Meyer B., Schanstra J.P.. Long term metabolic syndrome induced by a high fat high fructose diet leads to minimal renal injury in C57BL/6 mice // PLoS One. – 2013. – V. 8, N 10. – P.e76703. doi: 10.1371/journal.pone.0076703

60.Dumay J., Morançais M. Seaweed in Health and Disease Prevention // Proteins and Pigments. - 2016. - P. 275–318. doi:10.1016/b978-0-12-802772-1.00009-9

61.El-Sayed E.M., Hikal M.S., Khair B.E., El-Ghobashy R.E., El-Assar A.M. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Spirulina platensis*, phycocyanin, phycocyanopeptide and phycocyanobilin on male diabetic rats // Arab Universities Journal of Agricultural Sciences. - 2018. – V. 26, N2A. – P.1121-1134.

62.Elshazly M.O., Abd El-Rahman S.S., Morgan A.M., Ali M.E. The remedial efficacy of *Spirulina platensis* versus chromium-induced nephrotoxicity in male Sprague-Dawley rats // PLoS One. - 2015. - V. 10, N 6.

63.El-Tantawy W.H. Antioxidant effects of *Spirulina* supplement against lead acetate-induced hepatic injury in rats // J. Tradit. Complement. Med. - 2015. - V. 6, N 4. - P. 327–331. doi: [10.1016/j.jtcme.2015.02.001](https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2015.02.001).

64.Eriksen N.T. Production of phycocyanin - a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2008. - V. 80. - P. 1-14.

65.Evaluation of certain food additives: eighty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2019 (WHO technical report series; no. 1014). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

66.Feingold M.D., Kenneth R. Obesity and Dyslipidemia // South Dartmouth (MA). - 2023. – P. 2020.

67.Finamore A., Palmery M., Bensehaila S., Peluso I. Antioxidant, immunomodulating, and microbial-modulating activities of the sustainable and ecofriendly *Spirulina* // Oxid. Med. Cell. Longev. - 2017. - V. 69. - P. 157–171. doi: <https://doi.org/10.1155/2017/3247528>.

68.Fuentes N., Falcon-Cama V., Piniella-Matamoros B. Beneficial effects of oral administration of C-Phycocyanin and Phycocyanobilin in rodent models of experimental autoimmune encephalomyelitis // Life Sci. - 2018. - V. 194. - P. 130–138. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.032>.

69.Furman B.L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats // Curr. Protoc. - 2021. - V. 1, N 4. - P. e78. doi: [10.1002/cpz1.78](https://doi.org/10.1002/cpz1.78).

70.Gancheva S., Galunska B., Zhelyazkova-Savova M. Diets rich in saturated fat and fructose induce anxiety and depression-like behaviours in the rat: is there a role for lipid peroxidation // Int J Exp Pathol. – 2017. – V. 98, N 5. – P. 296-306. doi: [10.1111/iep.12254](https://doi.org/10.1111/iep.12254).

71.Gdara N.B., Belgacem A., Khemiri I., Mannai S., Bitri L. Protective effects of phycocyanin on ischemia/reperfusion liver injuries // Biomed. Pharmacother. - 2018. - V. 102. - P. 196–202. doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.025.

72.Grover P., Bhatnagar A., Kumari N. C-Phycocyanin-a novel protein from *Spirulina platensis*- In vivo toxicity, antioxidant and immunomodulatory studies // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2021. - V. 28, N 3. – P. 1853–1859. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.12.037.

73.Güroy B., Karadal O., Mantoğlu S., Cebeci O. Effects of different drying methods on C-phycocyanin content of *Spirulina platensis* powder // Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. - 2017. - V. 34, N 2. - P. 129–132. doi: [10.12714/egejfas.2017.34.2.0211](https://doi.org/10.12714/egejfas.2017.34.2.0211).

74.Ilter I., Akyıl S., Demirel Z., Koç M., Conk-Dalay M., Kaymak-Ertekin F. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques // Journal of Food Composition and Analysis. - 2018. - V. 70. - P. 78–88. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.04.007>.

75.Jang S., Lee M.S., Kang S.A., Kim C.T., Kim Y. *Portulaca oleracea* L. Extract Regulates Hepatic Cholesterol Metabolism via the AMPK/MicroRNA-33/34a Pathway in Rats Fed a High-Cholesterol Diet // Nutrients. – 2022. – V. 14, N 16. – P. 3330. Doi: 10.3390/nu14163330 <https://doi.org/10.3390/nu14163330>.

76.Khazi M.I., Demirel Z., Liaqat F., Dalay M.C. Analytical Grade Purification of Phycocyanin from Cyanobacteria // Methods in Molecular Biology. - 2020. - P. 173-179. doi: [10.1007/7651\\_2018\\_202](https://doi.org/10.1007/7651_2018_202).

77.Kim S.Y., Park S.C. Physiological antioxidative network of the bilirubin system in aging and age-related diseases // Front Pharmacol. - 2012. - V. 3. - P. 45. doi: [10.3389/fphar.2012.00045](https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00045).

78.Kissoudi M., Sarakatsianos I., Samanidou V. Isolation and purification of food-grade C-phycocyanin from *Arthrospira platensis* and its determination in confectionery by HPLC with diode array detection // Journal of Separation Science. - 2018. - V. 41, N 4. - P. 975-981. doi: [10.1002/jssc.201701151](https://doi.org/10.1002/jssc.201701151).

- 79.Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., Johansen J.R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach // *Preslia*. - 2014. - V. 86, N 4. - P. 295-335.
- 80.Komatsu G., Nonomura T., Sasaki M., Ishida Y., Arai S., Miyazaki T. AIM-deficient mouse fed a high-trans fat, high-cholesterol diet: a new animal model for nonalcoholic fatty liver disease // *Exp Anim.* – 2019. – V. 8, N 68. – P. 147-158. doi: 10.1538/expanim.18-0108
- 81.Ku C.S., Yang Y., Park Y., Lee J. Health benefits of blue-green algae: prevention of cardiovascular disease and nonalcoholic fatty liver disease // *J. Med. Food.* - 2013. - V. 16, N 2. - P. 103–111. doi: 10.1089/ jmf.2012.2468
- 82.Kumar D., Dhar D., Pabbi S., Kumar N., Walia S. Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (CCC540) // *Indian Journal of Plant Physiology*. - 2014. - Vol. 19, N 2. - P. 184–188. doi: [10.1007/s40502-014-0094-7](https://doi.org/10.1007/s40502-014-0094-7).
- 83.Lapphanichayakool P., Sutheerawattananonda M., Limpeanchob N. Hypocholesterolemic effect of sericinderived oligopeptides in high-cholesterol fed rats // *J. Nat. Med.* - 2017. - V. 71, N 1. - P. 208–215. doi: 10.1007/ s11418-016-1050-9
- 84.Li T.T., Huang Z.R., Jia R.B., Lv X.C., Zhao C., Liu B. *Spirulina platensis* polysaccharides attenuate lipid and carbohydrate metabolism disorder in high-sucrose and high-fat diet-fed rats in association with intestinal microbiota // *Food Res. Int.* - 2021. - V. 147. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110530
- 85.Liang S.X.T., Djearmane S., Tanislaus Antony Dhanapal A.C., Wong L.S. Impact of silver nanoparticles on the nutritional properties of *Arthrospira platensis* // *PeerJ*. – 2022. – V.10. – P.e13972. doi: 10.7717/peerj.13972.
- 86.Liang X., Zhang Z., Zhou X., Lu Y., Li R., Yu Z., Tong L., Gong P., Yi H., Liu T., Zhang L. Probiotics improved hyperlipidemia in mice induced by a high cholesterol diet via downregulating FXR // *Food Funct.* - 2020. - V. 11, N 11. - P. 9903–9911. doi: 10.1039/d0fo02255a/
- 87.Liao X., Zhang B., Wang X. Purification of C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* by Single-Step Ion-Exchange Chromatography // *Chromatographia*. - 2011. - V. 73, - P. 291–296. doi: [10.1007/s10337-010-1874-5/](https://doi.org/10.1007/s10337-010-1874-5/)

88.Liu J., Wu H., Zhang Y., Hu C., Zhen D., Fu P. Phycobiliprotein Peptide Extracts from *Arthrospira platensis* Ameliorate Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Modulating Hepatic Lipid Profile and Strengthening Fat Mobilization // *Nutrients*. - 2023. - V. 15, N 21. - P. 4573. doi: [10.3390/nu15214573/](https://doi.org/10.3390/nu15214573/)

89.Liu L., Zhang M., Jiang F., Luo D., Liu S., Su Y., Guan Q., Yu C. High cholesterol diet-induced testicular dysfunction in rats // *Hormones*. – 2023. - V. 22, N 4. - P. 685–694. doi: [10.1007/s42000-023-00472-4/](https://doi.org/10.1007/s42000-023-00472-4/)

90.Li X., Wu Z., Chen Y., Cai R., Wang Z. Effect of Acupuncture on Simple Obesity and Serum Levels of Prostaglandin E and Leptin in Sprague-Dawley Rats // *Comput Math Methods Med*. - 2021. - V. 2021. - P. 6730274. doi: [10.1155/2021/6730274/](https://doi.org/10.1155/2021/6730274/)

91.Li Y., Zhang Z., Paciulli M., Abbaspourrad A. Extraction of phycocyanin-A natural blue colorant from dried spirulina biomass: Influence of processing parameters and extraction techniques // *Journal of Food Sciences*. - 2020. - V. 85, N 3. - P. 727-735. doi: [10.1111/1750-3841.14842](https://doi.org/10.1111/1750-3841.14842).

92.Liu Q., Huang Y., Zhang R., Cai T., Cai Y. Medical application of *Spirulina platensis* derived C-phycocyanin // *Evid. Based Complement. Alternat. Med*. - 2016. - V. 2016. - P. 7803846. doi: [10.1155/2016/7803846](https://doi.org/10.1155/2016/7803846).

93.Mahmoud A.A., Elshazly S.M. Ursodeoxycholic acid ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats // *PLoS One*. – 2014. – V. 9, N 9. – P. 106993. doi: [10.1371/journal.pone.0106993](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106993).

94.Mamikutty N., Thent Z.C., Sapri S.R., Sahrudin N.N., Mohd Yusof M.R., Haji Suhaimi F. The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats // *Biomed Res Int*. – 2014. – V. 2014. – P.263897. doi: [10.1155/2014/263897](https://doi.org/10.1155/2014/263897).

95.Manirafasha E., Murwanashyaka T., Ndikubwimana T., Yue Q., Zeng X., Jing K et.al. Ammonium chloride: a novel effective and inexpensive salt solution for phycocyanin extraction from *Arthrospira Spirulina platensis* // *Journal of Applied Phycology*. - 2017. -V. 29, N 3. – P. 1261. doi: [10.1007/s10811-016-0989-y](https://doi.org/10.1007/s10811-016-0989-y).



96.Marschall M.J.M., Grundmann S.M., Gessner D.K., Wen G., Most E., Eder K., Ringseis R. Feeding of *Hermetia illucens* Larvae Meal Attenuates Hepatic Lipid Synthesis and Fatty Liver Development in Obese Zucker Rats // *Nutrients*. – 2023. - V. 15, N 2. - P. 287. doi: [10.3390/nu15020287](https://doi.org/10.3390/nu15020287).

97.Martínez J., Luengo E., Saldaña G., Álvarez I., Raso J. C-phycoerythrin extraction assisted by pulsed electric field from *Arthrospira platensis* // *Food Research International*. - 2017. - V. 99, N 3. - P. 1042-1047. doi: [10.1016/j.foodres.2016.09.029](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.029).

98.McCarty M.F., DiNicolantonio J.J. Nutraceuticals have potential for boosting the type 1 interferon response to RNA viruses including influenza and coronavirus // *Prog. Cardiovasc. Dis.* - 2020. - V. 63, N 3. - P. 383–385. doi: [10.1016/j.pcad.2020.02.007](https://doi.org/10.1016/j.pcad.2020.02.007).

99.McCarty M.F., Iloki-Assanga S. Co-administration of phycocyanobilin and/or phase 2-inducer nutraceuticals for prevention of opiate tolerance // *Curr. Pharm. Des.* - 2018. - V. 24, N 20. - P. 2250–2254. doi: [10.2174/1381612824666180723162730](https://doi.org/10.2174/1381612824666180723162730).

100. McCarty M.F., Kerna N.A. Spirulina rising: microalgae, phytonutrients, and oxidative stress // *EC Microbiol.* - 2021. - V. 17, N 7. - P. 121–128. doi: [10.31080/ecmi.2021.17.01135](https://doi.org/10.31080/ecmi.2021.17.01135).

101. Milutinović D.V., Brkljačić J., Teofilović A., Bursać B., Nikolić M., Gligorovska L., Kovačević S., Djordjevic A., Preitner F., Tappy L., Matić G., Veličković N. Chronic Stress Potentiates High Fructose-Induced Lipogenesis in Rat Liver and Kidney // *Mol Nutr Food Res.* – 2020. – V. 64, N 13. – P.e1901141. doi: [10.1002/mnfr.201901141](https://doi.org/10.1002/mnfr.201901141).

102. Minniti M.E., Ahmed O., Pedrelli M. Enzymatic Quantification of Liver Lipids After Folch Extraction // *Methods Mol Biol.* - 2020. - V. 2164. - P. 101-108. doi: [10.1007/978-1-0716-0704-6\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0704-6_11).

103. Mishra A., Mirzaei H., Guidi N., Vinciguerra M., Mouton A., Linardic M., Rappa F., Barone R., Navarrete G., Wei M., Brandhorst S., Di Biase S., Morgan T.E., Ram Kumar S., Conti P.S., Pellegrini M., Bernier M., de Cabo R., Longo V.D. Fasting-mimicking diet prevents high-fat diet effect on cardiometabolic risk and lifespan // *Nat Metab.* – 2021. – V. 3, N 10. – P. 1342-1356. doi: [10.1038/s42255-021-00469-6](https://doi.org/10.1038/s42255-021-00469-6).

104. Moraes C.C., Burkert J.F.D., Kalil S.J. C-phycocyanin extraction process for large-scale use // *J Food Biochem.* -2010. V. 34. – P.133–148.
105. Moraes C.C., Luisa S. , Cerveira G.P., Kalil S.J. C-phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass // *Brazilian Journal of Chemical Engineering.* – 2011. – V. 28. – P. 45 – 49.
106. Moreno-Fernández S., Garcés-Rimón M., Vera G., Astier J., Landrier J.F., Miguel M. High fat/high glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model // *Nutrients.* - 2018. - V. 10, N 10. – P. 1502. doi: 10.3390/nu1010150.
107. Mulugeta L., Drach A., Erdemir A., Hunt C.A., Horner M., Ku J.P., Myers J.G.Jr, Vadigepalli R., Lytton W.W. Credibility, replicability, and reproducibility in simulation for biomedicine and clinical applications in neuroscience // *Front. Neuroinform.* - 2018. - V. 12. - P. 18. doi: 10.3389/fninf.2018.00018.
108. Nagaoka S., Shimizu K., Kaneko H., Shibayama F., Morikawa K., Kanamaru Y. et al. A novel protein C-phycocyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats // *J. Nutr.* - 2005. - V. 135, N 10. - P. 2425–2430. doi: 10.1093/ jn/135.10.2425.
109. Nasirian F., Dadkhah M., Moradi-Kor N., Obeidavi Z. Effects of *Spirulina platensis* microalgae on antioxidant and anti-inflammatory factors in diabetic rats // *Diabetes Metab Syndr Obes.* - 2018. - V. 11. - P. 375-380. doi: 10.2147/DMSO.S172104.
110. Obeid S., Rida H., Peydecastaing J., Takache H., Ismail A., Pontalier P.Y. Coupling ultrasound and membrane filtration for the fractionation of *Spirulina platensis* sp. and the recovery of phycocyanin and pigment-free proteins // *Biotechnol Lett.* – 2024. – V. 47, N 1. - P.8 . doi: 10.1007/s10529-024-03541-9.
111. Obradovic M., Sudar-Milovanovic E., Soskic S., Essack M., Arya S., Stewart A.J. Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication // *Front Endocrinol (Lausanne).* - 2021. - V. 12. - P. 585887. doi: 10.3389/fendo.2021.585887.
112. Oda E. A decrease in total bilirubin predicted hyper-LDL cholesterolemia in a health screening population // *Atherosclerosis.* - 2014. - V. 235, N 2. - P. 334-338. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.05.927.

113. Ou Y., Lin L., Yang X., Pan Q., Cheng X. Antidiabetic potential of phycocyanin: effects on KKAY mice // *Pharm. Biol.* - 2013. - V. 51, N 5. - P. 539–544. doi: [10.3109/13880209.2012.747545](https://doi.org/10.3109/13880209.2012.747545).
114. Pagels F., Guedes A.C., Amaro H.M., Kijjoa A., Vasconcelos V. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications // *Biotechnology Advances.* - 2019. - V. 37, N 3. - P. 422-443. doi:10.1016/j.biotechadv.2019.02.010
115. Paiva I.H.R., Maciel L.M., Silva R.S.D., Mendonça I.P, Souza J.R.B., Peixoto C.A. Prebiotics modulate the microbiota-gut-brain axis and ameliorate anxiety and depression-like behavior in HFD-fed mice // *Food Res Int.* – 2024. – V. 182. - P. 114153. doi: 10.1016/j.foodres.2024.
116. Patel A., Sandhya M., Richa P., Ghosh P.K. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat // *Protein Expression and Purification.* – 2005. – V. 40. - P. 248–255.
117. Patil G., Chethana S., Madhusudhan MC., Raghavarao K. Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis* // *Bioresource technology.* - 2008. – V. 99, N 15, - P. 7393-7396.
118. Pentón-Rol G., Marín-Prida J., McCarty M. C-Phycocyanin-derived Phycocyanobilin as a Potential Nutraceutical Approach for Major Neurodegenerative Disorders and COVID-19- induced Damage to the Nervous System // *Curr Neuroparmacol.* – 2021. – V. 19, N 12. – P. 2250-2275. doi: 10.2174/1570159X19666210408123807.
119. Petrovic S., Mouskeftara T., Paunovic M., Deda O., Vucic V., Milosevic M., Gika H. Unveiling Lipidomic Alterations in Metabolic Syndrome: A Study of Plasma, Liver, and Adipose Tissues in a Dietary-Induced Rat Model // *Nutrients.* – 2024. – V. 16, N20. – P. 3466. doi: 10.3390/nu16203466.
120. Piché M.E.; Tchernof A.; Després J.P. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases // *Circ. Res.* – 2020. – V. 126, N 11. – P. 1477–1500. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.316101.

121. Pott R.W. The release of the blue biological pigment C-phyococyanin through calcium-aided cytolysis of live *Spirulina* sp // *Coloration Technology*. - 2018. - V. 135, N 1. - P. 17-21. doi: [10.1111/COTE.12373](https://doi.org/10.1111/COTE.12373).
122. Prete V., Abate A.C., Di Pietro P., De Lucia M., Vecchione C., Carrizzo A. Beneficial Effects of *Spirulina* Supplementation in the Management of Cardiovascular Diseases // *Nutrients*. – 2024. – V. 16. – P. 642. <https://doi.org/10.3390/nu16050642>.
123. Rajbanshi S.L.A., Patel D.S., Pandanaboina C.S. Hepato-protective effects of blue-green alga *Spirulina platensis* on diclofenac-induced liver injury in rats // *Mal. J. Nutr.* - 2016. - V. 22, N 2. - P. 289–299.
124. Ratha S.K., Renuka N., Rawat I., Bux F. Prospective options of algae-derived nutraceuticals as supplements to combat COVID-19 and human coronavirus diseases // *Nutrition*. - 2021. - V. 83. - P. 111089. doi:10.1016/j.nut.2020.111089.
125. Rotllan N., Zhang X., Canfrán-Duque A., Goedeke L., Griñán R., Ramírez C.M., Suárez Y., Fernández-Hernando C. Antagonism of miR-148a attenuates atherosclerosis progression in APOB TG Apobec<sup>-/-</sup> Ldlr<sup>+/-</sup> mice: A brief report // *Biomed Pharmacother.* – 2022. – V. 153. – P. 113419. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113419.
126. Sadek K.M., Lebda M.A., Nasr S.M., Shoukry M. *Spirulina platensis* prevents hyperglycemia in rats by modulating gluconeogenesis and apoptosis via modification of oxidative stress and MAPK-pathways // *Biomed. Pharmacother.* - 2017. - V. 92. - P. 1085–1094. doi: [10.1016/j.biopha.2017.06.023](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.023).
127. Saigo Y., Sasase T., Tohma M., Uno K., Shinozaki Y., Maekawa T., Sano R., Miyajima K., Ohta T. High-Cholesterol Diet in Combination With Hydroxypropyl- $\beta$  Cyclodextrin Induces NASH-Like Disorders in the Liver of Rats // *Physiol. Res.* – 2023. – V. 72, N 3. doi:10.33549/physiolres.934981.
128. Sala L., Moraes C., Kalil S. Cell pretreatment with ethylenediaminetetraacetic acid for selective extraction of C-phyococyanin with food grade purity // *Biotechnology Progress*. - 2018. - Vol. 34, N 5. - P. 1261-1268. doi: [10.1002/btpr.2713](https://doi.org/10.1002/btpr.2713).

129. Saran S., Puri N., Jasuja N., Kumar M., Sharma G. Optimization, Purification and characterization of Phycocyanin from *Spirulina platensis* // International Journal of Applied and Agriculture. - 2016. - V. 2, N 3.
130. Senaphan K., Kukongviriyapan U., Sangartit W., Pakdeechote P., Pannangpetch P., Prachaney P., Greenwald S.E., Kukongviriyapan V. Ferulic Acid Alleviates Changes in a Rat Model of Metabolic Syndrome Induced by High-Carbohydrate, High-Fat Diet // Nutrients. – 2015. - V. 7, N 8. – P. 6446-6464. doi:10.3390/nu7085283.
131. Shabani M., Hosseini H., Tajik M.H., Meshkani R., Sadeghi A. Resveratrol relieves HFD-induced insulin resistance in skeletal muscle tissue through antioxidant capacity enhancement and the Nrf2-Keap1 signaling pathway // Mol Biol Rep. – 2024. - V.51, N 1. – P. 516. doi: 10.1007/s11033-024-09434-4.
132. Sidorova Y., Petrov N., Biryulina N., Sokolov I., Balakina A., Trusov N., Kochetkova, A. The Study of Approaches to Modeling Oxidative Stress in Male Wistar Rats: The Comparative Analysis of Diet-Induced, Chemically Induced, and Physiologically Induced Models // IJMS. – 2025. – V. 26, N 14. – P. 6872. doi: 10.3390/ijms26146872.
133. Sidorova Y., Sarkisyan V., Petrov N., Frolova Y., Kochetkova A. Determination and Comparison of Soybean Lecithin and Bovine Brain Plasmalogens Effects in Healthy Male Wistar Rats // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24, N 8. – P. 7643. doi:10.3390/ijms24087643
134. Silveira S.T., Burkert J.F.M., Costa J.A.V., Burkert C.A.V., Kalil S.J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design // Bioresource Technology. – 2007. – V. 98, N 8. – P. 1629-34.
135. Song W., Zhao C., Wang S. A Large-Scale Preparation Method of High Purity C-Phycocyanin // International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics. - 2013. - V. 3, N 4. - P. 293-297.
136. Spínola M.P., Mendes A.R., Prates J.A.M. Chemical Composition, Bioactivities, and Applications of *Spirulina* (*Limnospira platensis*) in Food, Feed, and Medicine // Foods. – 2024. – V. 13, N22. – P.3656. doi: 10.3390/foods13223656.

137. Strasky Z., Zemankova L., Nemeckova I., Rathouska J., Wong R.J., Muchova L. et al. *Spirulina platensis* and phycocyanobilin activate atheroprotective heme oxygenase-1: a possible implication for atherogenesis // *Food Funct.* - 2013. - V. 4, N 11. - P. 1586–1594. doi: [10.1039/c3fo60230c](https://doi.org/10.1039/c3fo60230c).
138. Su L.J., Zhang J.H., Gomez H., Murugan R., Hong X., Xu D. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis // *Oxid Med Cell Longev.* - 2019. - V. 2019. - P. 5080843. doi: [10.1155/2019/5080843](https://doi.org/10.1155/2019/5080843).
139. Sulistyowati E., Handayani D., Soeharto S., Rudijanto A. A high-fat and high-fructose diet lowers the cecal digesta's weight and short-chain fatty acid level of a Sprague-Dawley rat model // *Turk J Med Sci.* – 2022. – V. 52, N 1. - P. 268-275. doi: [10.3906/sag-1911-14](https://doi.org/10.3906/sag-1911-14).
140. Su Q., Chen H., Du S., Dai Y., Chen C., He T., et al. Association Between Serum Bilirubin, Lipid Levels, and Prevalence of Femoral and Carotid Atherosclerosis: A Population-Based Cross-Sectional Study // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* - 2023. - V. 43, N 1. - P. 136-145. doi: [10.1161/ATVBAHA.122.318086](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.318086).
141. Lee S.G., Kang H. Anti-Obesity and Lipid Metabolism Effects of *Ulmus davidiana* var. *japonica* in Mice Fed a High-Fat Diet // *J Microbiol Biotechnol.* – 2021. – V. 31, N 7. – P. 1011-1021. doi: [10.4014/jmb.2102.02015](https://doi.org/10.4014/jmb.2102.02015).
142. Tavanandi H., Mittal R., Chandrasekhar J. Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthospira platensis* // *Algal Research.* - 2018. - V. 31, - P. 239–251. doi: [10.1016/j.algal.2018.02.008](https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.008).
143. Tuzcu Z., Orhan C., Sahin N., Juturu V., Sahin K. Cinnamon Polyphenol Extract Inhibits Hyperlipidemia and Inflammation by Modulation of Transcription Factors in High-Fat Diet-Fed Rats // *Oxid Med Cell Longev.* – 2017. - V. 2017. – P.1583098. doi: [10.1155/2017/1583098](https://doi.org/10.1155/2017/1583098).
144. Vali Aftari R., Rezaei K., Mortazavi A., Bandani A. The Optimized Concentration and Purity of *Spirulina platensis* C-Phycocyanin: A Comparative Study on Microwave-Assisted and Ultrasound-Assisted Extraction Methods // *Journal of Food Processing and Preservation.* - 2015. - V. 39. N 6. - P. 3080–3091. doi: [10.1111/jfpp.12573](https://doi.org/10.1111/jfpp.12573).

145. Wang Z., Yang Y., Xiang X., Zhu Y., Men J., He M. Estimation of the normal range of blood glucose in rats // *Wei Sheng Yan Jiu.* – 2010. – V. 39, N 2. - P. 133-7, 142.
146. Wollina U., Voicu C., Gianfaldoni S., Lotti T., França K., Tchernev G. *Arthrospira Platensis* – Potential in Dermatology and Beyond // *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences.* – 2018. - V. 6, N 1. - P. 176-180. doi:10.3889/oamjms.2018.033.
147. Wu Q., Liu L., Miron A., Klimova B., Wan D., Kuca K. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview // *Arch. Toxicol.* - 2016. - V. 90, N 8. - P. 1817–1840. doi: [10.1007/s00204-016-1744-5](https://doi.org/10.1007/s00204-016-1744-5).
148. Xu L., Li D., Zhu Y., Cai S., Liang X., Tang Y., Jin S., Ding C. Swertiamarin supplementation prevents obesity-related chronic inflammation and insulin resistance in mice fed a high-fat diet // *Adipocyte.* – 2021. – V. 10, N 1. – P.160-173. doi: [10.1080/21623945.2021.1906510](https://doi.org/10.1080/21623945.2021.1906510).
149. Yan S., Zhu L., Su H., Zhang X., Chen X., Zhou B., Zhang, Y. Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycocyanin and allophycocyanin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis* // *J. Appl. Phycol.* - 2011. - V. 23. - P. 1–6.
150. Yoo J., Park J.E., Han J.S. HMC Ameliorates Hyperglycemia via Acting PI3K/AKT Pathway and Improving FOXO1 Pathway in ob/ob Mice // *Nutrients.* – 2023. – V. 15, N 9. doi: [10.3390/nu15092023](https://doi.org/10.3390/nu15092023).
151. Yousefi R., Saidpour A., Mottaghi A. The effects of *Spirulina* supplementation on metabolic syndrome components, its liver manifestation and related inflammatory markers: A systematic review // *Complement Ther Med.* – 2019. – V. 42. – P.137-144. doi: [10.1016/j.ctim.2018.11.013](https://doi.org/10.1016/j.ctim.2018.11.013).
152. Yustisia I., Tandiari D., Cangara M.H., Hamid F., Daud N.A. A high-fat, high-fructose diet induced hepatic steatosis, renal lesions, dyslipidemia, and hyperuricemia in non-obese rats // *Heliyon.* - 2022. - V.8, N 10. – P. e10896. doi: [10.1016/j.heliyon.2022.e10896](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10896).

153. Zafar H., Ain N., ul; Alshammari A., Alghamdi S., Raja H., Ali A., Siddique A., Tahir S. D., Akbar S., Arif M., Alharbi M., Rahman A. Lacticaseibacillus rhamnosus FM9 and Limosilactobacillus fermentum Y57 Are as Effective as Statins at Improving Blood Lipid Profile in High Cholesterol, High-Fat Diet Model in Male Wistar Rats // *Nutrients*. – 2022. – V. 14, N 8. – P. 1654.
154. Zhang H., Léveillé M., Courty E., Gunes A., Nguyen B., Estall J.L. Differences in metabolic and liver pathobiology induced by two dietary mouse models of nonalcoholic fatty liver disease // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. – 2020. – V. 319, N 5. – P. E863-E876. doi: 10.1152/ajpendo.00321.2020
155. Zhang F.Y., Yu J.W., Zhang L., Sheng J.M., Yuan M.Y., Lu Y.N. UV-Vis Spectrum Characteristics of Phycocyanin Purification in Water from Chao Lake // *Journal of clinical otorhinolaryngology*. - 2017. - V. 37, N 3. - P. 806-10. doi: 10.3964/j.issn.10000593(2017)03-0806-05