

УДК 599:539.1.047

© 1997 г. М.В. Залашко, И.Ф. Королева,  
Г.А. Салохина, А.А. Чиркин

**ПРОТИВОЛУЧЕВЫЕ СВОЙСТВА ЛИПОКАРОТИНОИДНОГО  
ЭКСТРАКТА ИЗ ДРОЖЖЕЙ *Rhodotorula glutinis***

Изучены динамика образования дрожжами *Rh. glutinis* липидов и каротиноидов и влияние возраста культуры на их состав. Приведен состав липокаротиноидного комплекса, выделенного из дрожжей, находящихся в стационарной стадии роста. Показано, что комплексный липокаротиноидный препарат оказывает нормализующее воздействие на показатели липидтранспортной системы и перекисного окисления липидов сыворотки крови облученных крыс.

*Дрожжи, липиды, каротиноиды, облучение, противолучевые свойства, сыворотка крови, крысы.*

Поиск стабильных нетоксичных и эффективных радиопротекторов приобретает в настоящее время особо важное значение в связи с широким использованием ионизирующих излучений в науке, технике, медицине, сельском хозяйстве, а также в связи с повышением радиационности биосферы. В связи с этим возникла новая проблема – поиск и исследование средств защиты от хронического природно-техногенного облучения. Невозможность использования в этих условиях традиционных химических радиопротекторов привела к необходимости принципиально нового подхода к поискам средств защиты от хронического облучения в природных условиях.

Для решения этой задачи есть основания обратиться к биологически активным веществам природного происхождения, которые в отличие от классических радиопротекторов усиливают свою активность по мере снижения мощности дозы облучения на фоне действия природных факторов загрязнения.

В Институте микробиологии АН Белоруссии изучали комплексные соединения липидной природы дрожжей с целью определения возможности их использования в качестве средства защиты от различных патологий, возникающих на фоне облучения в средних и малых дозах.

В настоящей работе приведены данные о составе комплексного препарата липид-каротиноидной природы и радиозащитном действии этого препарата на лабораторных животных<sup>1</sup>.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА**

Объектом исследования служили дрожжи *Rhodotorula glutinis*, культивирование которых проводили на среде, содержащей в качестве источника углеродного питания сахарную мелассу, в лабораторных соплоконусных ферментерах при  $28 \pm 1^\circ \text{C}$  и pH

<sup>1</sup> Биохимическая часть работы выполнена на кафедре биохимии Гродненского мединститута.

$5,0 \pm 0,1$ . Экстракцию липокаротиноидного комплекса проводили из предварительно дезинтегрированных клеток дрожжей смесью гидрофильного и гидрофобного растворителей (хлороформ – метанол) [1]. Жирно-кислотный состав липидов дрожжей изучали газохроматографическим методом [1], каротиноиды выделяли из сырой биомассы [2], качественный состав каротиноидных пигментов определяли спектрофотометрически [3].

В опытах на животных препарат использовали в виде эмульсии в 1%-ном водном растворе желатины в количестве 1,25–2,5 мл через зонд в желудок (75, 150 и 300 мкг на одно животное). Однократное облучение крыс (белые беспородные крысы-самцы) проводили на  $\gamma$ -установке УГУ-420 с мощностью дозы  $2,7 \cdot 10^{-4}$  Гр/с и фокусным расстоянием 3 м в дозе 1,0 Гр. Всего в опыте использовали 40 животных (по 10 крыс в каждой из четырех групп): крысы, облученные в дозе 1,0 Гр, и три группы крыс, которым после облучения вводили три дозы препарата. Препарат вводили 1 раз в сутки в течение 7 сут, начиная с 10-х сут после облучения. Период 10–17-е сут является периодом развития транзиторной радиационной дислипидотеинемии. Через 24 ч после седьмого введения препарата животных забивали декапитацией под эфирным наркозом и в сыворотке крови, полученной из шейных сосудов, определяли следующие показатели липидтранспортной системы: общие липиды (г/л), триацилглицерины (ммоль/л) с помощью наборов фирмы "Лахема", содержание общего холестерина (ммоль/л) по Абелью, а также холестерин липидов высокой плотности (ЛПВП) и холестерин липидов низкой плотности (ЛПНП) (все в ммоль/л) по методам, рекомендованным НИИ профилактической медицины АМН СССР [5]. Индекс атерогенности рассчитывали как соотношение (общий холестерин – холестерин ЛПВП): холестерин ЛПВП. Содержание (г/л) белков в основных классах липопротеинов оценивали спектрофотометрически, а липидов – с помощью наборов фирмы "Лахема" [6]. Содержание диеновых конъюгатов (ммоль/мг липидов), ТБК-положительных продуктов или малонового диальдегида (соответственно ммоль/л, ммоль/мг липидов) определяли по методам, изложенным в работах [4, 7]. Антиоксидантную активность (%) оценивали по методу, изложенному в работе [8]. Статистическую обработку результатов проводили после анализа вариационных рядов на нормальность распределения с использованием критерия Стьюдента.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование биосинтетических особенностей дрожжей в процессе роста в течение 72 ч (табл. 1) показало, что наиболее активный синтез липидов и каротиноидов отмечается в стационарной фазе роста. В спектре каротиноидов происходит снижение относительной доли  $\beta$ -каротина и увеличение турулародина. Анализ жирно-кислотного состава внутриклеточных липидов дрожжей показал, что с переходом в логарифмическую фазу роста (6–12 ч) повышается относительное содержание полиненасыщенных кислот – линолевой и линоленовой (табл. 2). По мере роста культуры отмечается постепенное увеличение содержания пальмитиновой и олеиновой кислот, в то время как содержание полиеновых кислот относительно стабильно. Таким образом, максимальное количество липидов и каротиноидов в дрожжевой биомассе накапливается к моменту полного использования источника углерода в среде.

Изучение фракционного состава липидов на разных стадиях роста культуры показало, что период логарифмической фазы роста характеризуется самым высоким содержанием фосфолипидов и наименьшим содержанием триацилглицеринов. С переходом культуры в стационарную фазу роста возрастает относительное содержание свободных жирных кислот, моно-, ди- и триацилглицеринов. С увеличением количества липидов в стационарной фазе в их составе увеличивается относительное содержание олеиновой кислоты (до 81,6%) при одновременном снижении линолевой.

Следовательно, биосинтетическая активность дрожжей в процессе культивирования претерпевает определенные изменения. В связи с этим, учитывая общий уровень синтезируемых дрожжами липидов и каротиноидов, а также их состав, культивиру-

Т а б л и ц а 1

Динамика синтеза липидов и каротиноидов в процессе культивирования *Rh. glutinis*

Время культивирования, ч	Фаза роста	Липиды, % от сухой биомассы	Каротиноиды, мкг/г сухой биомассы	Состав каротиноидов, %		
				β-каротин	торулин	торулародин
12	Логарифмическая	10,0	32,3	42,0	25,1	32,9
24	Ранняя стационарная	17,6	75,1	50,8	15,2	35,0
60	Стационарная	28,7	225,4	28,5	27,9	43,6

Т а б л и ц а 2

Динамика жирно-кислотного состава липидов дрожжей *Rh. glutinis*

Время культивирования, ч	Жирные кислоты, %					
	C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:3</sub>
12	9,8	2,9	1,7	66,8	16,6	2,2
24	11,8	1,8	2,3	72,4	9,8	1,9
60	16,5	Следы	Следы	81,6	1,4	0

Т а б л и ц а 3

Характеристика липокаротиноидного препарата из дрожжей *Rh. glutinis*

Показатель	Величина
Кислотное число	Не более 1,5
Йодное число	Не менее 51
Жирные кислоты липидов:	
C <sub>16:0</sub>	15,4 ± 4,9
C <sub>18:0</sub>	5,0 ± 1,3
C <sub>18:1</sub>	43,4 ± 8,2
C <sub>18:2</sub>	36,1 ± 4,8
Каротиноиды, мкг/мл	280,0 ± 21,8
В том числе	
фитоин	120,0 ± 8,5
торулин	45,5 ± 3,4
торулародин	66,0 ± 7,8
β-каротин	48,5 ± 2,1

Т а б л и ц а 4

Влияние липокаротиноидного препарата на показатели липидтранспортной системы и перекисного окисления липидов в сыворотке крови облученных крыс ( $X \pm \sigma$ )

Показатель	Интактные крысы	Облучение 1 Гр	Облучение + липокаротиноидный препарат		
			75 мкг	150 мкг	300 мкг
Общий холестерин	2,04 ± 0,2	2,35 ± 0,2	2,38 ± 0,4	1,80 ± 0,1	1,94 ± 0,1
Холестерин ЛПВП	1,40 ± 0,1	0,87 ± 0,1	1,09 ± 0,3	1,08 ± 0,2	1,19 ± 0,1
Холестерин ЛПНП	0,19 ± 0,1	0,84 ± 0,1	0,84 ± 0,2	0,30 ± 0,2	0,39 ± 0,2
Белки ЛПВП	118,8 ± 23,5	71,6 ± 33,4	73,4 ± 14,3	96,7 ± 18,1	99,7 ± 13,6
Липиды ЛПВП	3,89 ± 0,3	4,56 ± 0,3	4,53 ± 0,5	3,58 ± 0,3	4,82 ± 0,5
Липиды апо-В-ЛП	1,64 ± 0,5	3,1 ± 0,7	2,13 ± 0,8	3,08 ± 0,6	3,24 ± 0,8
Белки апо-В-ЛП	3,28 ± 0,4	4,12 ± 0,8	4,96 ± 1,2	4,45 ± 1,0	4,78 ± 1,3
Индекс атерогенности	0,45 ± 0,1	1,68 ± 0,4	1,28 ± 0,3	0,76 ± 0,3	0,66 ± 0,2
Триацилглицерины	1,13 ± 0,1	1,37 ± 0,2	1,08 ± 0,1	0,99 ± 0,2	0,85 ± 0,2
Общие липиды	2,42 ± 0,2	3,08 ± 0,1	2,87 ± 0,2	2,12 ± 0,1	2,29 ± 0,1
Диеновые конъюгаты	2,84 ± 0,2	7,40 ± 0,9	1,59 ± 0,3	2,33 ± 0,9	2,22 ± 0,6
МДА, мкмоль/г	3,50 ± 0,3	8,06 ± 1,4	4,30 ± 0,5	5,77 ± 0,5	4,31 ± 1,1
АОА, %	62,6 ± 4,5	165,8 ± 20,5	127,1 ± 10,4	96,6 ± 9,3	83,2 ± 21,9

вание дрожжей в целях создания на их основе относительно стабильного биологически активного препарата целесообразно заканчивать на ранней стационарной фазе.

Для проверки эффективности липокаротиноидного препарата из дрожжевой биомассы экстрагировали липиды, содержащие каротиноиды и богатые ненасыщенными жирными кислотами. Липидный экстракт смешивали с рафинированным подсолнечным маслом в таком соотношении, чтобы готовый продукт характеризовался показателями, указанными в табл. 3.

Результаты опытов зафиксированы в табл. 4, из которой видно, что в сыворотке крови облученных крыс увеличиваются общее содержание холестерина, количество общих липидов, значительно возрастает содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида, что в свою очередь свидетельствует об усилении процессов перекисного окисления липидов.

Введение препарата способствовало снижению содержания общего холестерина крови при дозах 150 и 300 мкг до уровня интактных крыс. Если при облучении уменьшается содержание холестерина ЛПВП и возрастает более чем в 4 раза содержание в сыворотке крови холестерина и ЛПНП, то введение препарата оказывает нормализующее действие на содержание этих фракций, в первом случае увеличивая и во втором значительно снижая их количество. Липокаротиноидный препарат оказал также нормализующее влияние на содержание общих липидов и особенно первичных продуктов перекисного окисления – диеновых конъюгатов, количество которых после облучения возросло в 2,6 раза, и возвратилось к норме при применении препарата во всех использованных концентрациях. Содержание более поздних продуктов перекисного окисления липидов (МДА) введение препарата снижает почти вдвое, однако уровня, характерного для интактных крыс, не достигает.

С увеличением дозы вводимого препарата значительно снижается интенсивность окисления липопротеинов, из чего следует, что липокаротиноидный препарат обладает антиоксидантным действием, особенно в дозе 300 мкг.

Таким образом, липокаротиноидный препарат из дрожжей *Rhodotorula glutinis*, получивший название «липоглутин», способен нормализовать целый ряд показателей липидтранспортной системы сыворотки крови, нарушенных при облучении, таких, как содержание общего холестерина, общих липидов, первичных и более поздних продуктов перекисного окисления липидов, а также обладает относительно высокой антиокислительной активностью.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кеймс М. // Техника липидологии. М.: Мир, 1975. С. 150–188.
2. Wittman H. // Arch. Microbiol. 1957. V. 25. № 4. P. 373.
3. Вечер А.С., Куликова А.Н. // Физиолого-биохимические исследования растений. Минск: Наука и техника, 1967. С. 46–52.
4. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. // Лаб. дело. 1988. № 2. С. 60–64.
5. Совершенные методы исследования липопротеидов высокой плотности (методические рекомендации) / Под ред. Н.В. Перовой. М.: Медицина, 1983. С. 3–7, 21–23.
6. Антонов М.П., Тофило А.П., Богданова К.П. // Метод определения количества и состава пре-бета и бета-липопротеидов в сыворотке крови. М., 1986. – Деп. в ВИНТИ, № 11344.
7. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. // Лаб. дело. 1988. № 11. С. 41–43.
8. Мартынюк В.Б., Ковальчук С.Н., Тымочко М.Ф. и др. // Лаб. дело. 1991. № 3. С. 19–22.

Институт микробиологии АН  
Республики Беларусь, Минск

Поступила в редакцию  
16.03.95

**M.V. Zalashko, I.F. Koroleva, G.A. Salokhina, A.A. Chirkin**

#### **RADIOPROTECTIVE PROPERTIES OF THE LIPOCAROTENOID EXTRACT OF THE RHODOTORULA GLUTINIS YEAST**

*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

The dynamics of formation of lipids and carotinoids by the Rh. glutinis yeast and the influence of the culture's age on the composition of the product were studied. The composition of a lipocarotenoid complex isolated from the yeast (at a stage of its stationary growth) was determined. It was shown that this complex lipocarotenoid preparation produces a normalizing effect on the parameters of the lipid-transport system and peroxide oxidation of blood serum lipids of irradiated rats.