

P18-2008-8

Л. М. Мосулишвили<sup>1</sup>, А. И. Белокобыльский<sup>1</sup>,  
Е. И. Киркесали<sup>1</sup>, А. И. Хизанишвили<sup>1</sup>, Э. Н. Гинтури<sup>1</sup>,  
Н. Е. Кучава<sup>1</sup>, М. В. Фронтасьева, С. С. Павлов,  
Н. Г. Аксенова

ОБОСНОВАНИЕ СПОСОБА ИЗГОТОВЛЕНИЯ  
СУБСТАНЦИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ  
НА ОСНОВЕ СИНЕ-ЗЕЛЕННОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ  
*SPIRULINA PLATENSIS*

Направлено в журнал «Current Pharmaceutical Design»

---

<sup>1</sup>Институт физики им. Э.Л. Андроникашвили, Тбилиси

Мосулишвили Л. М. и др.

P18-2008-8

Обоснование способа изготовления субстанций фармацевтических препаратов на основе сине-зеленой микроводоросли *Spirulina platensis*

Биомасса сине-зеленой микроводоросли *S. platensis* использована в качестве основы для создания субстанций фармацевтических препаратов, содержащих такие жизненно важные следовые элементы, как селен, хром и йод. С помощью нейтронного активационного анализа доказана возможность целенаправленного внедрения этих элементов в биокomплексы *S. platensis* с сохранением ее белкового состава и природных полезных свойств. Получены кривые зависимости концентрации внедряемого элемента в биомассе спирулины от его концентрации в питательной среде, позволяющие точно выдерживать необходимые дозы заданного элемента в субстанции. Изучены особенности взаимодействия различных форм хрома (Cr(III) и Cr(VI)) с биомассой *S. platensis*. Установлено, что ее клетки преимущественно аккумулируют из питательной среды жизненно необходимую форму Cr(III) по сравнению с токсичной формой Cr(VI). С использованием методов электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и колориметрии показано, что в субстанции *S. platensis*, обогащенной Cr(III), другие, токсичные формы хрома отсутствуют. Разработанная методика может быть использована в фармацевтической промышленности при изготовлении препаратов, содержащих Se, Cr, I и др., на основе биомассы *S. platensis* с сохранением ее полезных природных свойств и белкового состава.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики им. И. М. Франка ОИЯИ и Институте физики им. Э. Л. Андроникашвили АН Грузии.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2008

Mosulishvili L. M. et al.

P18-2008-8

Development of Pharmaceutical Substances Based on Blue-Green Alga *Spirulina platensis*

A blue-green alga *S. platensis* biomass is used as a basis for the development of pharmaceutical substances containing such vitally important trace elements as selenium, chromium and iodine. Using neutron activation analysis the possibility of target-oriented introduction of these elements into the *S. platensis* biocomplexes retaining its protein composition and natural beneficial properties has been proved. The curves of the dependence of the introduced element accumulation in the *Spirulina* biomass on its concentration in a nutrient medium, which make it possible to accurately measure out the required doses of the specified element in a substance, have been obtained. The peculiarities of interaction of various chromium forms (Cr(III) and Cr(VI)) with the *S. platensis* biomass have been studied. It has been found that from a nutrient medium its cells mainly accumulate the vitally essential form of Cr(III) rather than toxic Cr(VI). Using the EPR technique and colorimetry, it has been demonstrated that the *S. platensis* substance enriched with Cr(III) is free from other toxic chromium forms. The developed technique can be used in pharmaceutical industry for the production of preparations containing Se, Cr, I, etc. on the basis of *S. platensis* biomass with the preservation of its natural beneficial properties and protein composition.

The investigation has been performed at the Frank Laboratory of Neutron Physics, JINR, and the Andronikashvili Institute of Physics of the Georgian Academy of Sciences, Tbilisi.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2008

## ВВЕДЕНИЕ

Современные условия человеческого обитания, определяемые растущей антропогенной нагрузкой на окружающую среду, социально-экономическими факторами, психологическими стрессами и т. д., часто способствуют развитию целого ряда заболеваний или нарушений нормального состояния организма. Одним из существенных факторов риска в настоящее время является недостаток или избыток некоторых элементов, жизненно важных для человека. Этим и объясняется растущая потребность в новых лечебно-профилактических препаратах, содержащих те или иные микроэлементы в необходимых дозах.

Исследование роли микроэлементов в живых системах с использованием современных биохимических и аналитических методов является одним из перспективных направлений наук о жизни (Life Science). Результаты этих исследований могут служить для научно обоснованного подхода к разработке новых лечебно-профилактических препаратов, содержащих те или иные необходимые элементы, такие как Se, Cr, I, Zn и др.

В соответствии с известной диаграммой Бертрона [1] существует определенный интервал концентраций положительного воздействия на организм человека для каждого конкретного микроэлемента, причем как избыточные, так и недостаточные концентрации могут быть вредными. Таким образом, очевидно, что точный выбор необходимых доз в зависимости от предназначения фармацевтических препаратов является самой главной задачей при создании их субстанций.

В процессах метаболизма и обмена микроэлементы, как правило, лучше усваиваются организмом в биологически доступной форме, т.е. когда они входят в состав биомакромолекул. Отсюда следует, что в качестве основы для субстанции желательно использовать биологически активную биомассу, способную усваивать необходимые элементы в заданных количествах. И, конечно, выбор биомассы должен быть обусловлен ее собственными полезными лечебно-профилактическими свойствами, а также отсутствием вредных примесей в концентрациях, превышающих допустимый уровень.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С учетом этих требований Институтом физики им. Э. Л. Андроникашвили (Тбилиси) совместно с Объединенным институтом ядерных исследований (ОИЯИ, Дубна) была разработана методика создания субстанций для лечебно-профилактических препаратов на основе сине-зеленой микроводоросли *Spirulina platensis* (*S. platensis*) [2, 3]. Целесообразность применения спирулины в фармацевтической промышленности достаточно хорошо доказана в течение последнего десятилетия. Благодаря легкой усвояемости (85–95 %), высокому содержанию белка (60–70 %) и других биологически активных веществ *S. platensis* на сегодняшний день оценивается экспертами Всемирной организации здравоохранения как один из лучших оздоровительных и лечебных препаратов [4, 5]. Так как спирулина является эффективным иммуностимулятором и обладает антивирусными и антиканцерогенными свойствами, она часто используется до или одновременно с приемом медикаментов для очистки организма от вредных веществ и внесения в него целого ряда полезных биологически активных соединений. При этом нормализуются обменные процессы, укрепляется иммунная система и тем самым создается благоприятный фон для воздействия лечебных препаратов [6].

Будучи живым микроорганизмом, спирулина способна в процессе культивации клеток в определенных количествах усваивать из питательной среды те или иные микроэлементы, включая их в состав биомакромолекул. Аналитический контроль этого процесса позволяет установить однозначную зависимость между концентрацией заданного элемента в питательной среде и его содержанием в полученной биомассе *S. platensis*. Эта зависимость служит для обоснования биотехнологии получения субстанций для фармацевтических препаратов с необходимыми дозами заданного элемента. Очень важно, чтобы при этом концентрации соединений, добавляемых в питательную среду в качестве нагрузки, не влияли бы на условия, при которых клетки спирулины нормально растут и сохраняют свои полезные природные свойства. Поэтому одновременно с аналитическим контролем исследовался белковый состав полученной биомассы методом гель-электрофореза.

В качестве аналитического метода использовался нейтронный активационный анализ (НАА) на эпитепловых нейтронах, хорошо апробированный для определения элементного состава биологических объектов. Благодаря активации резонансными нейтронами метод дает возможность сводить к минимуму эффекты матрицы биологических образцов и одновременно определять концентрации более 30 макро-, микро- и следовых элементов.

Биохимические исследования по обоснованию методики получения субстанций на основе биомассы *S. platensis* проводились в Институте физики (Тбилиси). Аналитические исследования выполнялись на быстром импульсном реакторе ИБР-2 Лаборатории нейтронной физики им. И. М. Франка

ОИЯИ (Дубна). Методика экспериментов и обработки аналитической информации описана в [7, 8].

Предварительно методом НАА исследовали многоэлементный состав биомассы *S. platensis* и проводили сравнение концентраций отдельных элементов с соответствующими значениями допустимого уровня (рис. 1) [2]. Результаты исследований показали, что концентрации таких токсичных элементов, как As, Hg, Cd, Pb и др., не превосходят значений, допустимых для человеческого организма по данным на сайте <http://www.spirulina.com/SPBNutrition.html>.

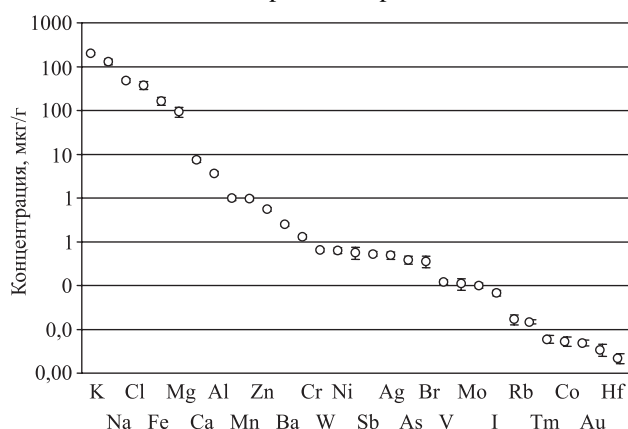


Рис. 1. Фоновый уровень концентраций макро- и микроэлементов в биомассе спирулины

Биотехнология целенаправленного внедрения определенных элементов в состав биомассы *S. platensis* в процессе культивации была разработана на примере таких жизненно важных элементов, как Se, Cr и I.

**Селен.** Изучение влияния селена на человеческий организм в течение последних 20 лет показало его столь важную роль, что на 7-м Международном симпозиуме «Selenium-2000» (Венеция, октябрь 2000 г.) он был назван элементом века. Селен является нормальным компонентом некоторых ферментов, белков и аминокислот. Его низкий уровень в организме повышает риск таких заболеваний, как кардиомиопатия, рак, эндемическая остеоартропатия, анемия и др. [9, 10]. Функции селена тесно связаны с витамином E и бета-каротином (содержащимися в биомассе *S. platensis*), поэтому иногда при лечении их используют совместно. Селен способствует уменьшению вредного воздействия свободных радикалов и детоксикации организма от таких элементов, как As, Hg, Cd, Bi и др. Он участвует в фотохимических реакциях, связанных со зрением, обладает способностью воздействия на иммунную и эндокринную системы и т.д. Добавление селена в диету в определенных дозах замедляет процессы старения, способствует лечению кардиологических больных, снижению риска заболевания раком и СПИД [11, 12].

*Йод.* Другой, не менее важный элемент — йод — входит в состав всех живых организмов и растений и является жизненно необходимым для их развития, роста и функционирования. Поступление йода в организм сильно зависит от состояния окружающей среды, и его дефицит часто носит эндемический характер. Влияя на обмен веществ и окислительно-восстановительные процессы, дефицит йода может менять физическое, умственное и эмоциональное состояние организма. Среди серьезных симптомов и результатов йодной недостаточности наблюдаются: кардиологические (атеросклероз, деформация сосудов и т. д.), иммунодефицитные (подверженность инфекциям и простудам), эмоциональные (раздражительность, сонливость и др.), умственные (ухудшение памяти, низкий уровень умственного развития — коэффициента IQ, кретинизм и др.) [13].

Неблагоприятная экологическая обстановка и снижение жизненного уровня населения во многих странах мира, а также исследования по оценке влияния йод-дефицита на уровне популяций поставили эту проблему в число приоритетов ООН в области здоровья человека.

*Хром.* Особый интерес представляет взаимодействие хрома с биомассой *S. platensis*. Как известно, хром является жизненно необходимым следовым элементом, обладающим одновременно и существенными токсическими эффектами. Характеризуясь различной валентностью (от +2 до +6), он образует многочисленные комплексные соединения, из которых наиболее устойчивы формы Cr(III) и Cr(VI). Кинетически стабильный, нетоксичный Cr(III) более распространен в окружающей среде. Токсичная форма Cr(VI) легче проникает в клетки, чем Cr(III), участвует внутри них в окислительно-восстановительных процессах, восстанавливаясь до стабильного Cr(III). Эти процессы обуславливают повреждения генетического материала клеток, окислительные разрушения, образование поперечных связей и тем самым создают канцерогенный, генотоксический и мутагенный эффекты [14].

С другой стороны, хром является необходимым химическим элементом, без которого невозможно нормальное функционирование организма. Самой важной его функцией является регуляция сахара, так называемый фактор глюкозной толерантности. Хром способствует участию инсулина в метаболизме углеводов (белков, липидов, нуклеиновых кислот) и в эффективном переносе глюкозы в клетки тканей. Он также влияет на синтез макромолекул, активацию ряда ферментов и метаболизм холестерина [15, 16].

Недостаток хрома в организме человека ведет к нарушению обмена липидов и жиров, уменьшению роста и веса, уменьшению продолжительности жизни и нарушению координации движений. С недостатком хрома иногда связаны высокий уровень холестерина, утомляемость, непереносимость алкоголя и т. д. Особенно часто дефицит хрома проявляется в детском и юношеском возрасте в нарушении белкового обмена. Во всех перечисленных случаях добавление хрома в диету способствует лечению заболеваний. Таким образом,

задача создания хромсодержащих фармацевтических препаратов, предназначенных для устранения дефицита хрома, является весьма актуальной.

Следует отметить, что для хромсодержащих препаратов, так же как и для субстанций с другими рассматриваемыми элементами, очень важна точность выдержки заданных концентраций хрома, однако дополнительно в этом случае необходимо обеспечить преимущественное усвоение Cr(III) по сравнению с токсичной формой Cr(VI). Именно такую возможность и предоставляет биомасса *S. platensis*, используемая в качестве основы для фармацевтических субстанций.

## ЭКСПЕРИМЕНТ

В экспериментах использовался штамм *S. platensis* IPPAS B-256 Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН. Для стимулирования роста культура спирулины подвергалась предварительной легкой обработке в гомогенизаторе Поттера с целью частичного укорачивания ее нитей. Культивация клеток проводилась в стандартной щелочной водно-солевой среде Заруха при pH 8,5–11, температуре +32–34 °C, постоянном перемешивании и освещении натриевой лампой с освещенностью около 5000 лк.

Питательная среда готовилась в два этапа: в первую часть раствора, содержащую  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , при pH < 10 добавлялось соответствующее химическое соединение, включающее внедряемый элемент (Se, Cr, I) в качестве нагрузки, а затем этот раствор смешивался со второй частью раствора, содержащей все остальные компоненты [17, 18]. Такой способ обеспечивал интенсивное включение необходимого элемента в биокомплексы спирулины при сохранении ее природных полезных свойств.

Исследование динамики накопления биомассы *S. platensis* в выбранном режиме показало, что максимальный прирост обеспечивается через 5–6 сут (рис. 2). В предварительных экспериментах определялся также интервал допустимых концентраций нагрузки в питательной среде, при которых достигалась необходимая доза заданного элемента в биомассе при сохранении ее качества.

В каждом эксперименте урожай биомассы *S. platensis* через пять дней культивации отделялся от питательной среды путем фильтрации, промывки и центрифугирования, после чего полученная субстанция лиофильно высушивалась в специальном адсорбционно-конденсационном лиофилизаторе оригинальной конструкции [19].

Образцы для НАА готовились в виде небольших таблеток с помощью специальной титановой пресс-формы.

Одновременно в полученной биомассе определялось содержание белков (по методу Лоури) [20], которое составляло около 65 %, что соответствовало

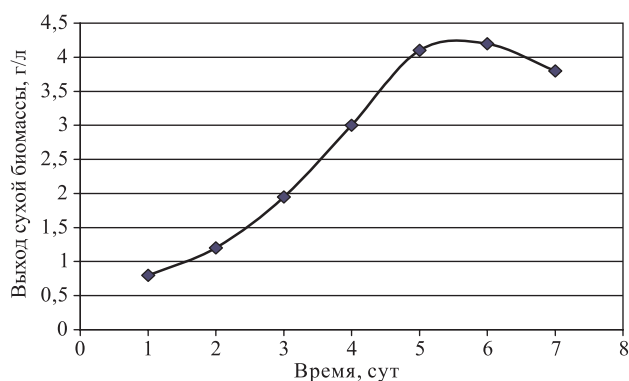


Рис. 2. Кривая роста биомассы спирулины

нормальному уровню, характерному для естественной биомассы *S. platensis*. Качество биомассы подтверждалось также и путем сравнения электрофореграмм, полученных методом гель-электрофореза, для образцов, выращенных с нагрузкой и без нее.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Селен.* Для получения селенсодержащей биомассы *S. platensis* в качестве нагрузки питательной среды использовалась селенистая кислота  $\text{H}_2\text{SeO}_3$  в различных концентрациях в интервале 0,016–2770 мкг/л.

Результаты определения концентрации селена методом НАА показаны на рис. 3. Как видно из рисунка, кривая зависимости содержания селена в биомассе от его концентрации в питательной среде хорошо аппроксимируется полиномом второго порядка  $y = -0,00008x^2 + 0,3x - 1$ . Начиная с концентрации селена 100 мкг/л, наблюдается интенсивный рост его аккумуляции клетками с возможным максимумом в области 1100–1200 мкг/л. Для фармацевтических целей область 100–1000 мкг/л представляется наиболее выгодной: при высокой степени усвояемости селена существенная крутизна кривой предоставляет возможность достаточно точно определять дозы в полученной субстанции.

Визуальное микроскопическое наблюдение за состоянием культуры, определение общего содержания белков в биомассе, а также исследование ее электрофореграмм выявили естественные качества полученной селенсодержащей биомассы. Таким образом, включая селен в состав биомакромолекул, *S. platensis* сохраняет свои полезные свойства и этим выгодно отличается от других подобных препаратов, которые либо представляют собой механи-



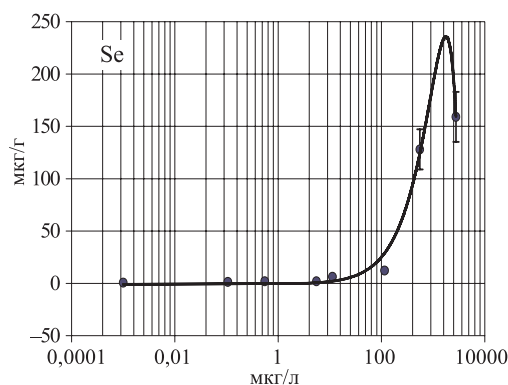


Рис. 3. Зависимость концентрации селена в биомассе спирулины от его концентрации в питательной среде

ческую смесь соединений селена с порошком спирулины [21], либо получены при столь высоких его концентрациях в среде, что рост клеток идет на фоне борьбы за выживание и нормальное качество биомассы не может сохраняться [22].

**Хром.** Хромосодержащая биомасса *S. platensis* с жизненно необходимой формой Cr(III) культивировалась при нагрузке питательной среды уксуснокислым хромом  $\text{Cr}(\text{CH}_3\text{COOH})_3$  в концентрациях от 0,5 до 15 мг/л (рис. 4). Исследовалось также накопление спирулиной токсичной формы Cr(VI) при нагрузке питательной среды бихроматом калия  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  в аналогичном интервале концентраций (рис. 4). Как видно из полученных кривых, спирулина преимущественно усваивает Cr(III), тогда как степень связывания Cr(VI) примерно втрое ниже. В противоположность другим микроорганизмам, таким как, например, *Arthrobacter oxydans*, *S. platensis* предпочитает нетоксичную форму хрома токсичной, даже если обе формы присутствуют в растворе.

В связи с тем, что некоторые микроорганизмы в процессе метаболизма способны взаимодействовать с рядом элементов, меняя их валентность, необходимо было проверить, не образуется ли при нагрузке питательной среды соединениями Cr(III) токсичная форма Cr(VI) в возможной цепи изменения его валентности  $\text{Cr(III)} \rightarrow \text{Cr(V)} \rightarrow \text{Cr(VI)}$ . С этой целью использовалась методика колориметрического определения Cr(VI) с помощью дифенилкарбогидразида  $(\text{C}_6\text{H}_5\text{NHNH})_2\text{CO}$ , который в присутствии Cr(VI) в концентрациях 0,1–10 мкг/л окрашивается в красно-фиолетовый цвет и дает фотометрический пик 540 нм [23]. Исследования показали, что во всех случаях культивации *S. platensis* с нагрузкой Cr(III) шестивалентная форма хрома отсутствовала.

Наличие промежуточной формы Cr(V) проверялось методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с чувствительностью порядка  $5 \cdot 10^{-10}$  г

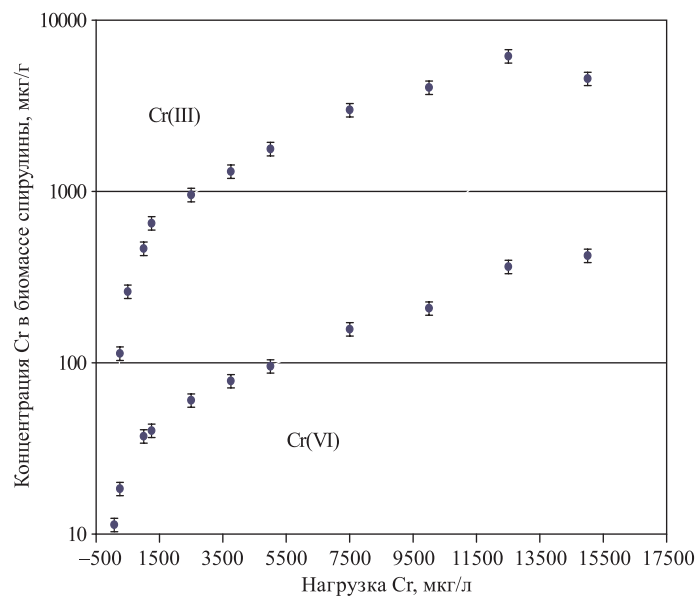


Рис. 4. Зависимость концентрации хрома в биомассе *Spirulina platensis* от его концентрации в питательной среде

Cr(V). Полученные результаты показали отсутствие во всех исследуемых пробах резонансного сигнала, характерного для Cr(V).

Из рис. 4 видно, что при концентрациях нагрузки в пределах 5–12 мг/л кривая накопления Cr(III) в биомассе *S. platensis* не выходит на насыщение. Это позволяет достаточно точно выдерживать оптимальные дозы хрома в полученной биомассе и рекомендовать 30–100 мкг/г для пищевых добавок и 200–250 мкг/г для лечебно-профилактических целей [18].

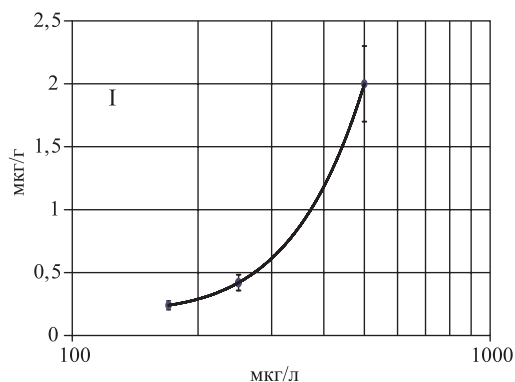


Рис. 5. Кривая зависимости концентрации йода в биомассе от его концентрации в питательной среде

*Йод.* Йодсодержащая биомасса *S. platensis* культивировалась в питательной среде с нагрузкой йодистым калием KI в пределах концентраций  $10^{-8}$  –  $10^{-4}$  г/л. Кривая зависимости концентрации йода в биомассе от его концентрации в питательной среде (рис. 5) также аппроксимируется полиномом второго порядка  $y = 0,00001x^2 - 0,003x + 0,4$ .

Коэффициент обогащения биомассы можно определить как отношение концентрации в ней йода (или другого элемента) к его концентрации в питательной среде в соответствии с полученной кривой. Этот коэффициент служит исходным технологическим параметром, определяющим дозировку элемента и выбор массы таблеток данной субстанции. В случае йода можно получить таблетки диаметром 5 мм, массой 0,5 г и содержанием йода порядка 100–200 мкг.

Микроскопический контроль цитологического состояния культуры, а также белкового состава полученной биомассы во всех случаях показал, что нормальное состояние *S. platensis*, а значит, и ее естественные полезные свойства сохраняются.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненные исследования показали, что культивация клеток *S. platensis* в выбранных условиях позволяет целенаправленно внедрять необходимые элементы (Se, Cr, I и др.) в состав биомакромолекул, сохраняя белковый состав и естественные свойства биомассы. С применением НАА получены кривые зависимости концентрации необходимых элементов в полученной субстанции *S. platensis* от концентрации этих элементов в питательной среде. Показана возможность точного определения лечебных и профилактических доз каждого элемента в соответствии с этими кривыми.

Результаты НАА многоэлементного состава биомассы *S. platensis* и их сравнение с допустимым уровнем показали, что содержание в ней таких токсичных элементов, как Hg, Cd, As и др., не превышает допустимого уровня, принятого во многих странах мира.

Разработанная методика может быть использована для получения субстанций с внедрением и других жизненно важных элементов, таких как Zn, Cu, Fe и др.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mertz W. The essential trace elements // Science. 1981. V. 213. P. 1332.
2. Mosulishvili L. M. et al. Experimental substantiation of the possibility of developing selenium — and iodine — containing pharmaceuticals based on blue-green algae *Spirulina platensis* // J. Pharm. Biomed. Anal. 2002. V. 30(1). P 87.

3. *Mosulishvili L.M. et al.* Neutron activation analysis for studying Cr uptake in the blue-green microalgae *Spirulina platensis* // J. Neutron. Res. 2007. V. 15(1). P. 49–54.
4. *Fox D.* Health Benefits of *Spirulina*, Algae of Life. Bulletin No. 12. Monaco: Institute of Oceanography, 1993.
5. *Belay A. et al.* Current Knowledge on Potential Health Benefits of *Spirulina* // J. Appl. Phycol. 1993. No. 5. P. 235–241.
6. *Evets L. et al.* Means to normalize the level of immunoglobuline E using the food supplements *Spirulina*. 1994, Grodnenski State Medical Univ. Russian Federation Committee of Patents and Trade. Patent (19)RV(11)2005486. Jan. 15, 1994, Russia.
7. *Frontasyeva M.V., Pavlov S.S.* Analytical Investigations at the IBR-2 Reactor in Dubna. JINR Preprint E14-2000-177. Dubna, 2000.
8. *Ostrovnyaya T.M.* Software for INAA on the basis of relative and absolute methods using nuclear data base // Activation analysis in environmental protection. D-14-93-325. Dubna, 1993. P. 319–326.
9. *Combs G.F., Jr.* Chemopreventive mechanisms of selenium // Med. Klin. 1999. V. 94, Suppl. 3. P. 18–24.
10. *Schumacher K.* Effect of selenium on the side effect profile of adjuvant chemotherapy/ radiotherapy in patients with breast carcinoma. Design for a clinical study // Ibid. P. 45–48.
11. *Hobben D.H., Smith A.M.* The divers role of selenium within selenoproteins: a review // J. An. Diet. Assoc. 1999. V. 99(7). P. 836–843.
12. *Clark L. C., Cantor K. P., Allaway W. H.* Selenium in forage crops and cancer mortality in US countries // Arch. Environ. Health. 1991. V. 46. P. 37–42.
13. *Войнар А.И.* Микроэлементы в живой природе. М., 1962. С. 74–92.
14. *Liu K. J. et al.* On the mechanism of Cr(VI)-induced carcino-genesis: dose dependence of uptake and cellular responds // Mol. Cell. Biochem. 2001. V. 222. P. 221.
15. *Anderson R.A.* Recent advances in the role of chromium in human health and diseases // Essential and toxic trace elements in human health diseases / Ed. A. S. Prasad. New York: Alan R. Liss, 1988. P. 189–197.
16. *Mertz W. et al.* Chromium — an overview // Chromium in nutrition and metabolism / Eds.: D. Shapcott, Y. Hubert. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1979. P. 1–14.
17. *Мосулишвили Л.М. и др.* Способ получения селеносодержащего препарата биомассы спирулины. Патент РФ № 2209077, приоритет от 15.03.2001 г.

18. *Мосулишвили Л. М. и др.* Способ получения препарата спирулины, содержащего хром. Патент РФ № 2230560, приоритет от 11.06.2002 г.
19. *Mosulishvili L. M. et al.* Facility for lyophilization of biological preparations. Patent USSR No. 779765. Bull. 42, 1980.
20. Практикум по биохимии / Ред. М. П. Мешкова, С. Е. Северин. М.: Изд-во МГУ, 1979. С. 90.
21. *Hann M., Stemgel H.* Diätetische Zusammensetzung. Patent DE3421644. 12.12.85.
22. *Тамбиев А. Х. и др.* Способ получения селеносодержащего препарата биомассы спирулины. Патент RU2096037. 20.11.97.
23. *Urone P. F.* Stability of colorimetric reagent for chromium determination by s-diphenylcarbazide in various solvents // Anal. Chem. 1955. V 27(13). P. 1355.

Получено 29 января 2008 г.

Редактор *Е. В. Сабеева*

Подписано в печать 29.04.2008.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 0,87. Уч.-изд. л. 1,06. Тираж 275 экз. Заказ № 56155.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований  
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: [publish@jinr.ru](mailto:publish@jinr.ru)

[www.jinr.ru/publish/](http://www.jinr.ru/publish/)