Spirulina - ljekovita cijanobakterija

Maleš, Željan; Friščić, Maja; Duka, Ivan; Mišković, Gjuro

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2019, 75, 261 - 282**

Journal article, Published version
Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:878422

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-20**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Spirulina – ljekovita cijanobakterija

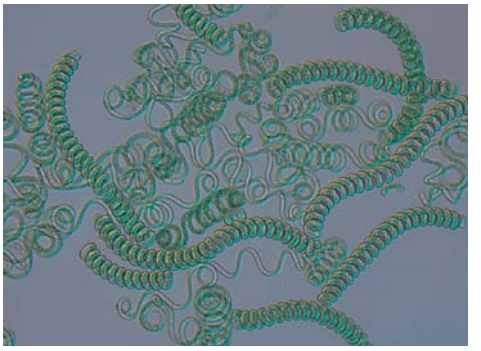
ŽELJAN MALEŠ[1], MAJA FRIŠČIĆ[1], IVAN DUKA[1], GJURO MIŠKOVIĆ[2]

[1]Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zavod za farmaceutsku botaniku, Schrottova 39, 10 000 Zagreb

[2]Tonus Relaxo d.o.o., Stubička 33, 10 000 Zagreb

Uvod

Godine 1940., na području današnje Republike Čad, magistar Creach, francuski ljekarnik, poslao je uzorak kompaktnog »kolača« s lokalne tržnice u Linnéovo društvo u Bordeauxu. »Kolač« se dobivao od plutajućih nanosa cijanobakterija s manjih jezera. Lokalno stanovništvo jelo je neobrađen »kolač« ili ga je koristilo u kulinarstvu. Mikroskopskom analizom identificirana je nitasta cijanobakterija, *Arthrospira platensis* (Nordstedt) Gomont, Microcoleaceae (slika 1.). S druge strane, potencijalno starija tradicija potrošnje biomase cijanobakterija postoji u jednoj drugoj, nepovezanoj kulturi. Na jezeru Texcoco u blizini današnjeg Mexico Citya, za vrijeme nekadašnjeg astečkog grada Tenochtitlána, prikupljala se vrsta *A. maxima* Setchell & N. L. Gardner. Španjolski osvajači, vođeni Hernánom Cortésom, popisivali su neobične stvari na koje su naišli, uključujući trgovanje spirulinom koju su domoroci rabili za izradu kruha (1). Danas se spirulina široko kultivira i dostupna je diljem svijeta. Često se uz nju spominje pojam superhrane. Premda takav pojam nema praktično značenje, zanimljivo je da se spirulinu može naći u prodavaonicama zdrave hrane i ljekarnama. U svjetlu novijih istraživanja spirulina napreduje prema zasluženom statusu ljekovite cijanobakterije.



Slika 1. ▶ Spirulina gledana svjetlosnim mikroskopom; povećanje 200X (2)

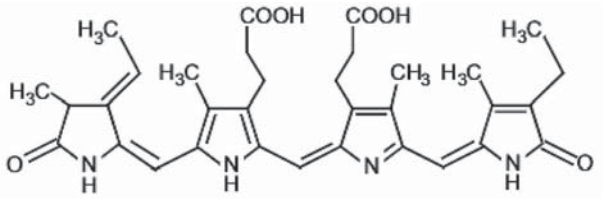
Biologija spiruline

Spirulina je komercijalno ime za pripravke vrste roda *Arthrospira* Stizenberger. Vrste roda *Arthrospira* su nitaste višestanične cijanobakterije (modrozelene alge) karakteristične morfologije. Najčešće uzgajane vrste spiruline u svijetu su vrste *A. platensis* i *A. maxima*. Dijeljenjem stanica u jednom redu nastaje nit (filament, trihom) (slika 2.), dok se razmnožavanje odvija nespecifičnim vegetativnim stanicama koje nastaju fragmentacijom. Trihomi su najčešće zavojiti jer takav oblik organizmu pruža bolja hidrodinamička svojstva. Boja spiruline potječe od kombinacije pigmenata, najviše C-fikocijanina, klorofila a i karotenoida (2, 3).

Slika 2. ▶ Trihom spiruline promatran pretražnom elektronskom mikroskopijom, oznaka predstavlja udaljenost od 10 μm (3)

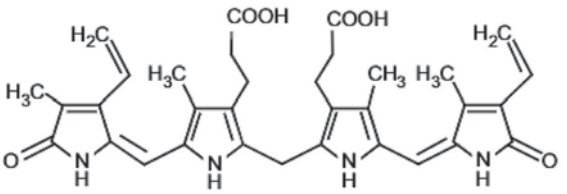
Kemijski sastav

Sadržaj hranjivih tvari u spirulini ovisi o uvjetima uzgoja, a vanjski čimbenici poput slanosti, jačine svjetlosti i temperature određuju biokemijske puteve sinteze metabolita (2). Analiza metabolizma spiruline pokazala je da je većina njezinih gena uključena u biosintezu aminokiselina (4), pa ne iznenađuje činjenica da suha biomasa sadrži čak do 70 % proteina. Udio proteina usporediv je sa sojom i mesom, pri čemu je sastav aminokiselina bliži biljnim proteinima, ali pokriva sve esencijalne aminokiseline (5). Od minerala spirulina sadrži kalij, natrij, fosfor, željezo, magnezij i kalcij, a od vitamina B2, B3, B6, B9, B12 te karotenoide i vitamin E. Od hranjivih tvari sadrži još ugljikohidrate, vlakna te lipide (6). Sadržaj lipida je između 6 i 18 %, a zabilježene količine ovise o načinu uzgoja spiruline i primijenjenim postupcima ekstrakcije. Palmitinska kiselina, zasićena masna kiselina, čini polovinu svih masnih kiselina. Od višestruko nezasićenih masnih kiselina spirulina sadrži esencijalnu linolnu kiselinu (16–18 %) i gama-linolensku kiselinu (17–40 %) (6, 7). U njezine funkcionalne spojeve ubrajaju se fenoli, fikocijanini i polisaharidi (6). Prisutni fenolni sekundarni metaboliti su flavonoidi katehin, epikatehin i pirokatehol te fenolne kiseline klorogenska, sinapinska, salicilna, *trans*-cimetna i kavena kiselina (8, 9). Spirulina je izrazito bogata pigmentima, pri čemu β-karoten čini preko dvije trećine karotenoida (10). Fikocijanini su hidrofilni biliproteinski pigmenti specifični za cijanobakterije, koji apsorbiraju i prenose svjetlosnu energiju na klorofil. C-fikocijanin sastoji se od dvije proteinske podjedinice s kovalentno vezanim fikocijanobilinom (slika 3.), tetrapirolskim kromoforom plave boje (11–13).



Slika 3. ▶ Struktura fikocijanobilina

Pri raspadu crvenog pigmenta ljudske krvi, hemoglobina, nastaje kromofor bilirubin (slika 4.). Već na prvi pogled primjetna je velika sličnost kromofora spiruline, fikocijanobilina, s endogenim bilirubinom. Nadopunu spirulinom moguće je usporediti s blagom hiperbilirubinemijom, bezopasnom medicinsko-biokemijskom pojavom (14). Na primjer, u Gilbertovom sindromu dolazi do povećanja koncentracije slobodnog bilirubina u krvi dok su jetrene i žučne funkcije u potpunosti očuvane. Zapravo, radi se o smanjenom izlučivanju endogenog bilirubina zbog mutacije gena za UDP-glukuronozil-transferazu 1 A 1 (UGT1A1), koja je prisutna u 5–10 % populacije. Ovo je stanje povezano s manjom pojavnošću kardiovaskularnih bolesti, tumora i dijabetesa tipa 2 (15). Smatra se da je zaštitni učinak posljedica antioksidativnog djelovanja tetrapirolskog kromofora. Razgradnjom C-fikocijanina u ljudskom organizmu nastaju fikocijanobilin i biološki aktivni peptidi s vezanim fikocijanobilinom (13, 14).



Slika 4. ▶ Struktura bilirubina

Biomasa spiruline je potpuno prihvatljiv izvor proteina, vitamina B12 i željeza za vegetarijance i vegane. *In vitro* istraživanja ukazuju na to da je dostupnost željeza iz spiruline usporediva s dostupnošću iz mesa zbog čega se spirulina smatra odgovarajućim dijetalnim izvorom željeza (6, 16). Europska agencija za istraživanje svemira izabrala je spirulinu kao primarnog proizvođača kisika u dugoročnim svemirskim istraživanjima te kao dodatak uravnoteženoj prehrani ljudske posade (17).

Sigurnost spiruline u ljudskoj prehrani

Pojava cvjetanja mora ili slatkih voda, koju uzokuje povećani rast biomase cijanobakterija, najčešće je posljedica promjena u okolišnim uvjetima. Pri nakupljanju biomase osobito su opasni cijanotoksini, sekundarni metaboliti cijanobakterija, u literaturi opisani kao potentni hepatotoksini ili neurotoksini (18). Analizom genetskog materijala utvrđeno je da rod *Arthrospira* ne sadrži gene za proizvodnju cijanotoksina (2). Tržišna analiza pripravaka spiruline upućuje na moguća onečišćenja drugim cijanobakterijama koje su poznati proizvođači cijanotoksina (*Microcystis*, *Nostoc* i *Anabaenopsis* spp.), kao i heterotrofnim bakterijama s patogenim potencijalom (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Fusobacterium* i *Enterococcus* spp.) (19). Za razliku od farmaceutskih pripravaka, onečišćenje dodataka prehrani i hrane koja sadrži spirulinu mikroorganizmima i teškim metalima neizbježno je te se u određenoj mjeri dopušta. Komercijalno dostupna spirulina rijetko prelazi granice koje su dopuštene za hranu. Prema europskom zakonodavstvu spirulina je isključivo hrana te se na njezinu biomasu odnosi zakonodavstvo povezano s hranom. Prema mišljenju Francuske agencije za hranu, okoliš, zdravlje i sigurnost na radu ne postoje dokazi da primjena do 10 g spiruline dnevno uzrokuje negativne učinke na ljudsko zdravlje. Štoviše, na životinjskim modelima nije uočena toksičnost ni pri iznimno visokim dozama. U pojedinim kliničkim istraživanjima korišteno je čak 19 g spiruline dnevno, a prijavljene su samo blaže nuspojave poput glavobolje i probavnih smetnji. Ipak je potrebno istaknuti da spirulina sadrži fenilalanin, zbog čega ju oboljeli od fenilketonurije ne bi trebali primjenjivati. Također, zabilježeni su i slučajevi alergijskih reakcija pa bi osobe iznimno sklone alergijama također trebale izbjegavati spirulinu (20). Američka agencija za hranu i lijekove dodijelila je spirulini status GRAS (engl. *generally recognized as safe*), a stručno vijeće za informacije o dodacima prehrani pri farmakopeji Sjedinjenih Američkih Država najvišu klasu sigurnosti (klasu A) (21).

Kemoprotektivni učinak

Razorno djelovanje reaktivnih kisikovih spojeva često se nalazi u patofiziološkoj pozadini kroničnih degenerativnih bolesti i trovanja ksenobioticima. C-fikocijanin je vrlo učinkoviti antioksidans u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Unutar stanice izravno hvata slobodne radikale i aktivira Nrf2 (engl. *nuclear factor-erythroid* 2-*related factor*-2), transkripcijski čimbenik koji je odgovoran za sintezu brojnih staničnih antioksidativnih enzima (22).

Teški metali velik su ekološki i javnozdravstveni problem. Intenzivna industrija uzrokuje njihovo otpuštanje u okoliš, a živi svijet odgovara bioakumulacijom zbog koje se toksičnost širi duž hranidbenog lanca. Spirulina se pokazala kao izuzetni kemoprotektivni agens kod trovanja teškim metalima. Ona svojim antioksidativnim učinkom smanjuje hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, neurotoksičnost, kardiotoksičnost, genotoksičnost i reproduktivnu toksičnost olova, kadmija i arsena (23–27).

Pesticidi su još jedna skupina opasnih kemikalija s kojima ljudi često dolaze u dodir. Česta su akutna otrovanja relativno visokim dozama kod poljoprivrednika, dok je ostatak stanovništva razvijenog svijeta neprekidno izložen malim dozama ovih toksina kroz voće i povrće koje trošimo. Organofosforni pesticidi toksični su, između ostalog, i za reproduktivni sustav. Istraživanja na životinjama pokazuju da uporaba spiruline štiti od njihovog štetnog djelovanja, što ne iznenađuje budući da je glavnina štete koja nastaje pri kroničnom izlaganju ovim tvarima oksidativnog karaktera (28–30).

Neki se lijekovi primjenjuju unatoč visokoj toksičnosti u slučajevima kada njihov pozitivni učinak nadilazi rizik od nuspojava. Metotreksat je imunosupresivni lijek koji se rabi kod težih oblika autoimunih bolesti koje pacijentima značajno narušavaju kvalitetu života. Uzrokuje ozbiljne nuspojave, a između ostalog: leukocitopeniju, trombocitopeniju, fibrozu, cirozu i masnu jetru uz poremećaje metabolizma (31). Kod štakora s metotreksatom izazvanom hepatotoksičnošću koji su hranjeni spirulinom primijećen je značajan porast broja leukocita, serumskih imunoglobulina i antioksidativnih te jetrenih enzima, kao i smanjenje produkata lipidne peroksidacije, proupalnih citokina, kaspaze 3 i imunosupresije ovisne o Bax proteinu te je ponovno uspostavljena normalna histologija jetre i slezene (32). Oštećenja jetre koja uzrokuju nesteroidni protuupalni lijekovi posljedica su njihovog oksidativnog metabolizma. U eksperimentalnom modelu na štakorima spirulina sprječava diklofenakom posredovanu hepatotoksičnost; učinak je usporediv sa silimarinom (33).

Učinci spiruline na metabolizam

Dislipidemija

Niz kliničkih istraživanja pokazalo je povoljno djelovanje spiruline kod dislipidemija. Najčešće je prijavljivana smanjena razina triglicerida, ukupnog i LDL-kolesterola (engl. *low density lipoprotein* kolesterola) te povećana razina HDL-kolesterola (engl. *high density lipoprotein* kolesterola) u krvi. Korištene su doze od 1 do 8 g spiruline dnevno tijekom 6 do 12 tjedana. Pojedina istraživanja ukazuju na poboljšanje indeksa tjelesne mase (engl. *body mass index*, BMI) i

promjera struka, dok kod drugih nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu (34–40).

Dugoročna primjena brze hrane, koja je karakterizirana prisutnošću visokih koncentracija višestruko prerađenih ugljikohidrata i lipida, vodi k metaboličkim poremećajima poput dislipidemije i inzulinske otpornosti. Nakupljanje lipida u hepatocitima povezano je s porastom reaktivnih kisikovih spojeva i programiranom staničnom smrću te se klinički očituje kao nealkoholna masna jetra. U istraživanju na miševima koji su dobivali hranu s visokim udjelom lipidnih peroksida došlo je do oksidativnog oštećenja tkiva, odnosno do nastanka jetrenih i bubrežnih oštećenja. Dio životinja je tokom cijelog pokusa, uz spomenutu prehranu, dobivao spirulinu u svrhu istraživanja njenog zaštitnog učinka. U dozi koja bi približno odgovarala onoj za ljudsku upotrebu, spirulina je učinkovito spriječila patološki porast biokemijskih parametara kao i nastanak oštećenja (41, 42).

Pri istraživanju mehanizma djelovanja otkriveno je da ekstrakt spiruline, u *in vitro* uvjetima, uzrokuje inhibiciju lipaze koja traje najmanje pola sata. Ova spoznaja upućuje na mogućnost da spirulina smanjuje probavu i apsorpciju lipida duž probavnog trakta (43). Fenolni spojevi iz spiruline smanjuju *de novo* sintezu kolesterola na način da, poput statina, inhibiraju 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A reduktazu kod zečeva (44). Vodeni ekstrakt spiruline aktivira enzim lecitin kolesterol aciltransferazu, povećavajući mogućnost preuzimanja kolesterola iz stanica u HDL čestice i prijenos u jetru, gdje kolesterol povratnom spregom smanjuje svoju *de novo* sintezu (45). Životinje s hiperkolesterolemijom, hranjene spirulinom, izmetom izlučuju značajno više kolesterola i žučnih kiselina od kontrolne skupine životinja. Pretpostavlja se da C-fikocijanin veže žučne kiseline, smanjujući topljivost i apsorpciju egzogenog kolesterola, a gubitak žučnih kiselina potiče jetru na trošenje zaliha kolesterola za njihovu sintezu (46). Spirulina kod miševa uzrokuje povećanu ekspresiju PPAR-α nuklearnog receptora, ključnog pokretača razgradnje masti (47). Drugim riječima, za nadopunu spirulinom dokazani su gotovo svi poznati mehanizmi djelovanja sintetskih hipolipemika. Važno je spomenuti da nisu primijećene ozbiljne nuspojave pojedinih skupina ovih lijekova.

Hiperglikemija

U dozama od 1 do 2 g dnevno tijekom 2 do 3 mjeseca nadopuna spirulinom kod osoba s dijagnozom dijabetesa tipa 2 uzrokuje značajno smanjenje glukoze u krvi, natašte i nakon obroka (36, 48, 49). Pokazalo se da ne dolazi do pada koncentracije glukoze kod zdrave populacije dok se kod oboljelih, uz glukozu, sma-

njuje i glikirani hemoglobin, što upućuje na dugoročnu kontrolu glikemije (36, 48). Dijabetes je bolest koju prati niz metaboličkih poremećaja. Prvenstveno je u plazmi vidljiva povišena koncentracija glukoze, a zatim promjene u lipidnom statusu, porast metabolita oksidativnog stresa, jetrenih enzima i proupalnih citokina. Spirulina pozitivno utječe smanjujući sve navedene parametre kod dijabetičkih štakora. Štakori nakon obrade spirulinom imaju značajno viši antioksidativni kapacitet i koncentracije bakra, cinka, selena i željeza u plazmi (50, 51).

Stanje predijabetesa, koje prethodi razvoju dijabetesa tipa 2, karakterizira otpornost staničja na djelovanje inzulina što rezultira hiperglikemijom. Nadomjestak spirulinom povisuje razine adiponektina, cirkulatornog regulatora metabolizma glukoze, čiji je manjak u plazmi povezan s inzulinskom otpornošću perifernih staničja (52). C-fikocijanin pokazao se kao obećavajuća molekula za kontrolu glikemije. Kod stanica HepG2 s induciranom otpornošću na inzulin ovaj spoj utječe na metabolizam inhibirajući enzime glukoneogeneze i stimulirajući sintezu glikogena. Posljedično dolazi do povećanog unosa glukoze u hepatocite, odnosno do povećane osjetljivosti na djelovanje inzulina i normoglikemije (53). Kronična hiperglikemija i proupalni citokini kod dijabetesa tipa 1 dovode do povećane proizvodnje oksidativnih spojeva na koje su β-stanice gušterače izrazito osjetljive. Primjena spiruline, odnosno C-fikocijanina poništava nakupljanje reaktivnih kisikovih spojeva, sprječava programiranu staničnu smrt β-stanica gušterače i održava normalnu razinu otpuštanja inzulina (22, 54, 55).

Metabolički sindrom

Ustanovljeno je da spirulina pozitivno utječe na metaboličke promjene, pa se razmatra njezina upotreba u metaboličkom sindromu. Ova bolest suvremenog doba podrazumijeva specifičnu pretilost; masno tkivo nakuplja se u području trbuha što uzrokuje ili dislipidemiju i/ili povišen krvni tlak i/ili inzulinsku rezistenciju. Vidljivo je da se radi o skupu simptoma kojima je metabolizam zajednički nazivnik (56).

Povišeni krvni tlak čimbenik je rizika za kardiovaskularne bolesti. S vremenom dolazi do oštećenja endotela krvnih žila zbog kronično povišenog tlaka, što vodi do razvoja aterosklerotskih promjena. Pritom, negativno promijenjeni profil lipida u krvi pogoduje patološkom procesu nastanka aterosklerotskog plaka (57). Utjecaj spiruline na povišeni krvni tlak klinički je ispitan. Proturječni rezultati istraživanja mogu se donekle objasniti činjenicom da je nastanak hipertenzije izrazito složen proces čije se podrijetlo ne može nužno pripisati samo jednom organskom sustavu. Spirulina se pokazala učinkovitom u dozi od 2 do

4,5 g tijekom 6 do 12 tjedana kod pretilih pacijenata s dislipidemijom uz hipertenziju. Kod njih je došlo do značajnog smanjenja sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka (35, 38, 40). Istraživanje koje je provedeno samo s C-fikocijaninom (58), kao i istraživanja na pacijentima koji nemaju hipertenziju (37), nisu pokazala učinak na krvni tlak. Spirulina na krvni tlak vjerojatno utječe povećavajući ekspresiju endogenih vazodilatatora uz inhibiciju stvaranja o ciklooksigenazi ovisnih vazokonstrikotora (59). Na životinjskim modelima ateroskleroze, kod miševa i zečeva s hiperkolesterolemijom, nadomjesno uzimanje spiruline značajno smanjuje površinu aterosklerotskog plaka u odnosu na kontrolu (60, 61). Pretpostavlja se da C-fikocijanin regulira proliferaciju i programiranu staničnu smrt endotelnih stanica i na taj način sprječava razvoj aterosklerotskih promjena (62).

Učinci spiruline na imunološki sustav

Temeljni učinci na imunološke stanice

Spirulina je modulator imunološkog sustava. Prirodno prisutni (lipo)polisaharidi iz membrane ove cijanobakterije stimuliraju urođeni imunološki sustav (63, 64). Na početku dolazi do poticanja imunološkog sustava, a s vremenom do imunotolerancije (65). Kod makrofaga koji su prethodno bili izloženi spirulini uočeno je smanjeno stvaranje proupalnih citokina pri podražaju lipopolisaharidima (66). Ekstrakt spiruline sprječava stanične signale koji vode k upali, nadzire proces na razini prepisivanja gena i to vjerojatno epigenetskim promjenama nasljednog materijala (67). Primjerice, C-fikocijanin izravno inhibira ciklooksigenazu tipa 2 (COX-2), enzim čija ekspresija ovisi o podražaju, dok neizravno smanjuje daljnju proizvodnju tog enzima (68). Ostale tvari u spirulini inhibiraju lipooksigenazu, drugi enzim važan za stvaranje proupalnih metabolita arahidonske kiseline (69).

Neurodegenerativne bolesti

Sve kronične neurološke degenerativne bolesti povezane su s upalnim procesom. Multipla skleroza je autoimuna bolest u kojoj protutijela na mijelin zajedno s elektorskim imunološkim stanicama uzrokuju oštećenja u moždanom tkivu pa klinička slika ovisi o zahvaćenom području. Taj se proces odvija uz veliku količinu reaktivnih kisikovih spojeva pa uz demijelinizaciju, kao glavno obilježje multiple skleroze, dolazi do razaranja aksona i okolnog staničja. Nažalost, suvremena terapija ograničena je na imunomodulaciju, dok za proces remijelinizacije još uvijek ne postoji odgovarajuće rješenje. Takva je terapija učinkovita u održa-

vanju remisije, ali ne postiže mnogo po pitanju štete nastale pri povratku bolesti. Na modelu bolesti kod miševa i štakora C-fikocijanin i fikocijanobilin dovode do značajnog smanjenja štete na aksonima, budući da prelaze krvno-moždanu barijeru te djeluju neuroprotektivno putem antioksidativnog učinka (70). Ekspresija COX-2 u aktivnim oštećenjima pogoršava stanje stvarajući kemokine i održavajući upalu, a C-fikocijanin je potentniji i selektivniji inhibitor COX-2 od celekoksiba i rofekoksiba. Znanstvenici su usporedili učinak interferona beta, standardne terapije za relapsni oblik multiple skleroze (71), s učinkom C-fikocijanina na ekspresiju gena na modelu te bolesti kod miševa. Pronađeno je da C-fikocijanin značajno povećava ekspresiju 536, a smanjuje ekspresiju 382 gena (72). S interferonom dijeli utjecaj na 20 % tih gena, a razlika je obećavajuća jer se radi o genima koji su uključeni u remijelinizaciju, gliogenezu i interakciju između glija stanica i aksona. Isti mehanizam istraživan je kod ishemijskog moždanog udara na miševima. Pri primjeni fikocijanobilina smanjio se volumen zahvaćenog područja i ubrzan je oporavak životinja od neuroloških oštećenja (72). Upalni proces dio je i patogeneze Parkinsonove bolesti. Dopaminski neuroni osjetljivi su na oksidativni stres, a njihovo propadanje aktivira mikroglija stanice, rezidentne makrofage koji proizvode reaktivne kisikove i dušikove spojeve (73). Na životinjskim modelima Parkinsonove bolesti, štakorima i vinskim mušicama, nadopuna spirulinom pokazala je neuroprotektivni učinak na moždano staničje i poboljšanje bihevioralnih čimbenika (74, 75).

Učinci kod infekcija

Spirulina poput drugih prokariota izlučuje tvari koje ometaju strane mikroorganizme u rastu i razvoju. Evolucijskim procesom došlo je do stvaranja molekula koje će u datom trenutku omogućiti selektivnu prednost spirulini u okruženju u kojem su prisutni drugi mikroorganizmi. Jednom takvom izoliranom izvanstaničnom metabolitu, vrlo vjerojatno alkaloidu, određena je antimikrobna aktivnost. Kvasci, plijesni, Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije bile su osjetljive na taj spoj (76). Dakako, široki spektar antimikrobnog učinka spiruline ne ovisi samo o jednom spoju; ekstrakcija metanolom obuhvatila je veći broj spojeva s antimikrobnim učinkom (77). Uzročnik malarije, *Plasmodium falciparum* Welch, također pokazuje osjetljivost na spirulinu, a pretpostavlja se da su aktivne tvari alkaloidi, saponini i steroli (78).

S obzirom na dobru antifungalnu aktivnost i nisku toksičnost, razmatra se upotreba spiruline kod vulvovaginalne kandidijaze. Djelovanje vodenog ekstrakta spiruline ispitano je na 22 soja roda *Candida* Berkh. od kojih je 19 izolirano iz briseva pacijentica. Ekstrakt je pokazao fungicidno djelovanje na svim ispitanim

sojevima. Pritom nije došlo do narušavanja vaginalne flore. Spirulina nema negativni utjecaj na protektivne sojeve roda *Lactobacillus* Beijerinck izolirane iz vaginalne flore (79).

Posebna skupina polisaharida iz spiruline skupno je nazvana spirulan. Riječ je o sulfatiranom polimeru koji sadrži kisele monomere poput glukuronske i galakturonske kiseline pa dolazi u obliku kalcijevog ili natrijevog spirulinata. Ovi spojevi imaju antivirusno djelovanje; sprječavaju umnažanje virusnih čestica u *in vitro* uvjetima. Takav je učinak zabilježen na humani citomegalovirus, Epstein-Barrov virus, humani herpes virus 6, herpes simplex virus 1, virus gripe A, virus stečene imunodeficijencije 1 (HIV 1), virus ospica i virus zaušnjaka (80). Pretpostavlja se da postoji više mehanizama djelovanja kalcijevog spirulana, a potencijalne mete su sljedeće: sprječavanje ulaska virusa u stanice, ometanje sinteze i stvaranja virusnih čestica te sprječavanje izlaska iz zaraženih stanica (80, 81). Zbog svoje kemijske prirode, ovi spojevi ograničeni su na lokalno djelovanje. Na primjer, kalcijev spirulan sprječava prianjanje i ulazak herpes simplex virusa 1 u stanice, a na kliničkom modelu pokazao se boljim u sprječavanju nastanka virusnih mjehurića od aciklovira (82). Zanimljivo je da je oralna primjena ekstrakta spiruline umanjila smrtnost miševa zaraženih virusom gripe (83). To je moguće objasniti činjenicom da su gornji dišni putevi izloženi kalcijevom spirulanu pri oralnoj primjeni. Isti je ekstrakt pokazao antivirusno djelovanje na nizu serotipova virusa gripe u *in vitro* uvjetima. Pretpostavlja se da kalcijev spirulan u ranoj fazi infekcije sprječava prianjanje i ulazak virusa gripe u stanicu (83).

Učinkovitost nadomjesne primjene spiruline klinički je ispitana kod sindroma stečene imunodeficijencije, no nisu dobiveni jednoznačni rezultati. U jednom je istraživanju nakon 12 mjeseci primjene spiruline u dozi od 10 g došlo do značajnog povećanja CD4+ limfocita i smanjenja virusnih čestica u plazmi (84). U drugom istraživanju nije došlo do promjena u imunološkim parametrima nakon primjene 5 g spiruline dnevno kroz period od 3 mjeseca, ali je došlo do smanjenja popratnih infekcija (85). Poboljšanje imunoloških parametara nije primijećeno ni u istraživanju s pacijentima koji su već uzimali terapiju, ali je došlo do poboljšanja otpornosti tkiva na inzulin, koja se javlja kao jedna od mogućih posljedica infekcije HIV-om i antiretrovirusne terapije (86). Sva ova istraživanja provedena su u područjima Afrike gdje je, nažalost, glavnina pacijenata u stanju pothranjenosti, koja uzrokuje slabljenje imunološkog sustava pa zajedno s HIV-om dovodi do učestalih infekcija i brzog propadanja organizma. U istraživanjima u kojima su sudjelovali HIV pozitivna pothranjena djeca i odrasli došlo je do značajnog poboljšanja njihovog zdravstvenog stanja (84–88).

Premda kalcijev spirulan i specifični peptid izoliran iz spiruline, u *in vitro* uvjetima, sprječavaju ulazak virusnih čestica HIV-a u T-limfocite, nije poznato koliko je to značajno u *in vivo* uvjetima (89, 90).

Imunostimulatorni učinci i mikrobiom

Pročišćeni lipopolisaharidi spiruline kod ljudi povećavaju učinkovitost prirodnih stanica ubojica, što ukazuje na poticajni utjecaj spiruline na urođenu imunost (91). Također, istraživanje na stanicama zdravih dobrovoljaca pokazalo je da lipopolisaharidi spiruline uzrokuju prolaznu pojačanu aktivnost stečene imunosti pri susretu s antigenom (92). Premda spirulina, zahvaljujući utjecaju C-fikocijanina, smanjuje upalu, istodobno dolazi do aktivacije urođenog imunološkog sustava u crijevima što rezultira sustavnim promjenama imunološkog sustava (93). Veza između pojedinih stanica definira fenotip cjelokupnog imunološkog sustava. Riječ je o osjetljivoj ravnoteži koja raspoređuje obrambena sredstva prema »prijetnji najviše opasnosti«. Spirulina potiče usmjerenost prema staničnoj imunosti, zaduženoj za unutarstanične parazite i tumorski promijenjene stanice (94). Ostvaruje to putem imunosnih stanica koje otkrivaju za mikroorganizme karakteristične molekularne uzorke. Takva usmjerenost je očita kod miševa s tumorskim transplantatima, gdje spirulina aktivira citotoksične T-limfocite i prirodne stanice ubojice što dovodi do smanjenja volumena tumora (63, 95).

Primjer promijenjene ravnoteže u komunikaciji stanica imunološkog sustava su alergije, kod kojih se imunološki sustav usmjerava k protutijelima posredovanoj (humoralnoj) imunosti. Nakon primjene lipopolisaharida spiruline dolazi do značajnog smanjenja signala koji usmjeravaju imunološki sustav k alergijskim reakcijama posredovanim imunoglobulinom E. Prethodno spomenuta istraživanja, koja se odnose na pročišćene lipopolisaharide, premašuju količinu dostupnu u cjelovitim pripravcima biomase spiruline (96, 97). S druge strane, nadopuna cjelovitom spirulinom uzrokuje promjenu imunološkog sustava nakon intenzivnog napora. Istraživanje provedeno na veslačima pokazalo je zaštitni učinak spiruline na urođenu imunost. Kod njih, za razliku od kontrolne skupine, nije došlo do smanjenja stanične imunosti, odnosno do povećane osjetljivosti na infekcije nakon napornog vježbanja (98).

Interakcija stanica imunološkog sustava s crijevnom mikroflorom još je jedan dio slagalice u komunikaciji stanica imunološkog sustava. Kako su nam bakterije neophodne za preživljavanje vrlo je važno da se održava zdrava i raznovrsna populacija mikroorganizama koju imunološki sustav podnosi. Novija istraživanja povezuju skup gena crijevne flore, mikrobiom, s metaboličkim, neurološkim i imunološkim poremećajima (99). Kako je spirulina cijanobakterija,

postoje neke sličnosti između njezine uporabe s uporabom probiotičkih bakterija koje se koriste za liječenje poremećaja u crijevnoj flori. Štoviše, spirulina potiče rast i utječe na preživljavanje bakterija mliječnog vrenja, koje su jedne od najčešćih sastojaka probiotičkih formula poput rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Smatra se da bi istodobno uzimanje moglo pojačati učinak probiotika (6, 100). Kod miševa je primjena spiruline uzrokovala promjene u relativnim odnosima pojedinih rodova bakterija. Unatoč tome, približno 70 % flore ostalo je usporedivo s kontrolnom skupinom (101). Pretpostavlja se da je to posljedica djelovanja antibakterijskih spojeva koje spirulina sadrži u sprezi s povećanim izlučivanjem antimikrobnih peptida urođene imunosti koje izaziva. Nije poznato koliko su promjene u mikrobiomu zaslužne za djelovanje spiruline. One su vrlo vjerojatno dio regulacije imunološkog sustava kroz os crijeva-jetra (102).

Učinci spiruline na tumore

Učinci spiruline na tumore dosad nisu ispitani na ljudima, ali pretklinička ispitivanja na stanicama i životinjama daju obećavajuće rezultate. *In vivo* model, miševi kojima su presađene stanice humanog karcinoma gušterače, pokazao je da C-fikocijanin uzrokuje o vremenu i dozi ovisno smanjenje mase tumora. Vrlo je zanimljivo da je najviša proučavana doza bila usporediva s cisplatinom, citostatikom koji je bio pozitivna kontrola, uz značajnu razliku u vidu nuspojava terapije. Miševi su pri terapiji s cisplatinom gubili na tjelesnoj masi, dok kod C-fikocijanina nije bilo razlike u tjelesnoj masi u odnosu na kontrolnu skupinu (103). Zanimljivi dokazi dolaze od molekularne analize stanične linije karcinoma jajnika SKOV-3; C-fikocijanin značajno utječe na prepisivanje 2031 gena, od čega ih je 1056 bilo barem trostruko više, a 966 barem trostruko manje prepisivano (104).

Antitumorski učinci spiruline proučavani su na staničnoj liniji karcinoma pluća A549. Pokazano je kako vodeni ekstrakt spiruline mijenja morfologiju, smanjuje preživljavanje i bujanje tumorskih stanica, dok citotoksičan učinak ekstrakta izostaje na ljudskim fibroblastima. Ekstrakt spiruline utječe na ekspresiju regulatora staničnog ciklusa, zaustavlja stanični ciklus u G1 fazi, a posljedično i rast stanica. Povećanjem omjera koncentracije Bax i Bcl-2 proteina, koji su zaduženi za regulaciju staničnog preživljavanja pri oksidativnom stresu, ekstrakt izaziva programiranu staničnu smrt (105). C-fikocijanin izaziva citotoksični učinak na staničnu liniju tumora dojke MDA-MB-231. Povećanje ekspresije proteina koji zaustavljaju napredovanje staničnog ciklusa ovisno je o dozi. Stanicama se promijenila morfologija, primijećena je upola manja mogućnost njihove migracije te je pokazana o dozi ovisna smanjena sposobnost stvaranja

kolonija. C-fikocijaninom uzrokovana programirana stanična smrt posredovana je povećanom ekspresijom staničnih receptora smrti i enzima zaduženih za razgradnju unutarstaničnog sadržaja (106). Proteinski ekstrakt koji sadrži C-fikocijanin uzrokuje smanjenje ekspresije i aktivnosti matriksnih metaloproteinaza 2 i 9, ključnih enzima za širenje tumorskog tkiva i proces nastajanja metastaza, u staničnim linijama hepatocelularnog karcinoma HepG2 (107). U slučaju HepG2 stanica otpornih na doksorubicin, C-fikocijanin uzrokuje povećanu osjetljivost na ovaj DNA-interkalirajući citostatik (108). Ovo bi moglo biti posljedica selektivne inhibicije inducibilne ciklooksigenaze 2 (COX-2) bez čijih metabolita dolazi do značajno manje ekspresije P-glikoproteina 1, membranskog prijenosnika lijekova koji uklanja lijek iz stanica (109). U prethodnom istraživanju također je primijećena ranije spomenuta povećana ekspresija proapoptotskog Bax proteina uz smanjenu ekspresiju antiapoptoskog Bcl-2 proteina, što dovodi do aktivacije programirane stanične smrti (108). Uz ranije spomenute tumorske stanice, C-fikocijanin je pokazao antitumorski učinak smanjenjem proliferacije i izazivanjem stanične smrti na staničnim linijama ne-sitnostaničnog karcinoma pluća (110) i karcinoma debelog crijeva (111). Pritom je zabilježeno da C-fikocijanin gotovo ni nema učinak na proliferaciju nemalignih ljudskih stanica, čak ni pri visokim dozama (110).

Zaključak

Unatoč višestaničnoj organizaciji u plutajućim nitima, spirulina je ipak jednostanični organizam kod kojeg svaka stanica samostalno obnaša ulogu čitavog organizma. Stvaranje hrane u pojedinoj stanici ovisno je o fotosintezi pa je spirulina izrazito bogata pigmentima. Preko 10 % njezine suhe biomase otpada na plavi pigment C-fikocijanin. Fiziološka uloga pigmenata je stabilizacija elektrona pobuđenih svjetlošću, što čini te elektronima guste molekule idealnim kandidatima koji bi mogli pokazati antioksidativni učinak kod ljudi. Svjedoci smo sve većih spoznaja o povećanim oksidativnim oštećenjima koja nastaju zbog suvremenog načina života i intenzivnih promjena okoliša. Premda se životni vijek čovjeka produljuje, sve je više kroničnih i degenerativnih bolesti koje smanjuju kvalitetu života i financijski opterećuju zdravstveni sustav. Sistemski dostupni antioksidansi iz spiruline, osim izravnog stabiliziranja slobodnih radikala, potiču organizam na proizvodnju vlastite antioksidativne obrane. Sukladno tome, spirulina je idealni odabir za nadomjesnu terapiju u čitavom nizu kroničnih i degenerativnih bolesti. Dokazana je njezina učinkovitost u smanjenju znakova dislipidemije i masne jetre, predijabetesa, dijabetesa tipa 2 i povezanih komorbiditeta, hipertenzije povezane s metaboličkim sindromom te

zaraza. Kako bi se spirulina primjenjivala ne samo kao hrana, već i kao nadomjesna terapija, potrebno je odrediti kvalitetu ishodišnog materijala. S obzirom da je riječ o prokariotskom organizmu, razlike sadržaja ljekovitih tvari ovisne o uvjetima proizvodnje zaista su velike. U svakom slučaju, pripravci spiruline trebali bi prije dolaska na tržište ispuniti barem zahtjeve mikrobiološke čistoće i odsutnosti teških metala.

4
2019

Spirulina – medicinal cyanobacteria

Ž. Maleš, M. Friščić, I. Duka, Gj. Mišković

Abstract Species of the genus Arthrospira are multicellular filamentous cyanobacteria (blue-green algae). They are commonly known as spirulina. Addition of these microalgae to human diet is an emerging trend. High protein content that reaches up to 70 % of dried biomass along with fiber, carotenoids, minerals and vitamins is a reason why spirulina is considered as a superfood. Consumption of algal biomass has a long tradition dating back to indigenous people of Africa and Mexico area. Spirulina is very rich in pigments. In particular, C-phycocyanin accounts for more than 10 % of dried biomass. This pigment is being widely studied for its anti-inflammatory and antioxidant properties. Spirulina biomass and C-phycocyanin have a very good safety profile. This article is a review on biomedical applications of spirulina biomass as a chemoprotective agent, lipid lowering agent and metabolic modulator, anti-inflammatory, immunostimulatory, and anti-cancer agent.

Literatura – References

1. Ciferri O. Spirulina, the edible microorganism. Microbiol Rev. 1983; 47:551–578.
2. Furmaniak MA, Misztak AE, Franczuk MD, Wilmotte A, Waleron M, Waleron KF. Edible cyanobacterial genus *Arthrospira*: actual state of the art in cultivation methods, genetics, and application in medicine. Front Microbiol. 2017; 8:2541.
3. Vonshak A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis Ltd, 1997.
4. Kumaresan V, Sannasimuthu A, Arasu MV, Al-Dhabi NA, Arockiaraj J. Molecular insight into the metabolic activities of a protein-rich micro alga, *Arthrospira platensis* by *de novo* transcriptome analysis. Mol Biol Rep. 2018; 45:829–838.
5. Lupatini AL, Colla LM, Canan C, Colla E. Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. J Sci Food Agric. 2017; 97:724–732.

6. 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; 2017:3247528.

7. Ambrozova JV, Misurcova L, Vicha R, Machu L, Samek D, Baron M, Mlcek J, Sochor J, Jurikova T. Influence of extractive solvents on lipid and fatty acids content of edible freshwater algal and seaweed products, the green microalga *Chlorella kessleri* and the cyanobacterium *Spirulina platensis*. Molecules. 2014; 19:2344–2360.

8. Machu L, Misurcova L, Ambrozova JV, Orsavova J, Mlcek J, Sochor J, Jurikova T. Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. Molecules. 2015; 20:1118–1133.

9. Miranda MS, Cintra RG, Barros SBM, Mancini-Filho J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. Braz J Med Biol Res. 1998; 31:1075–1079.

10. Ranga Rao A, Raghunath Reddy RL, Baskaran V, Sarada R, Ravishankar GA. Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. J Agric Food Chem. 2010; 58:8553–8559.

11. Park WS, Kim HJ, Li M, Lim DH, Kim J, Kwak SS, Kang CM, Ferruzzi MG, Ahn MJ. Two classes of pigments, carotenoids and C-phycocyanin, in *Spirulina* powder and their antioxidant activities. Molecules. 2018; 23:2065. doi: 10.3390/molecules23082065.

12. Liu Q, Huang Y, Zhang R, Cai T, Cai Y. Medical application of *Spirulina platensis* derived C-phycocyanin. Evid Based Complement Alternat Med. 2016; 7803846.

13. Minic SL, Stanic-Vucinic D, Mihailovic J, Krstic M, Nikolic MR, Cirkovic Velickovic T. Digestion by pepsin releases biologically active chromopeptides from C-phycocyanin, a blue-colored biliprotein of microalga *Spirulina*. J Proteomics. 2016; 147:132–139.

14. Zheng J, Inoguchi T, Sasaki S, Maeda Y, McCarty MF, Fujii M, Ikeda N, Kobayashi K, Sonoda N, Takayanagi R. Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2013; 304:R110–120.

15. Wagner KH, Shiels RG, Lang CA, Seyed Khoei N, Bulmer AC. Diagnostic criteria and contributors to Gilbert's syndrome. Crit Rev Clin Lab Sci. 2018; 55:129–139.

16. Puyfoulhoux G, Rouanet JM, Besançon P, Baroux B, Baccou JC, Caporiccio B. Iron availability from iron-fortified spirulina by an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. J Agric Food Chem. 2001; 49:1625–1629.

17. Matallana-Surget S, Derock J, Leroy B, Badri H, Deschoenmaeker F, Wattiez R. Proteome-wide analysis and diel proteomic profiling of the cyanobacterium *Arthrospira platensis* PCC 8005. PLoS ONE. 2014; 9:e99076.

18. Znanstvenici istrazuju toksicne cijanobakterije; /https://www.irb.hr/, datum pristupa: 23.10.2018.

19. Vardaka E, Kormas KA, Katsiapi M, Genitsaris S, Moustaka-Gouni M. Molecular diversity of bacteria in commercially available »Spirulina« food supplements. PeerJ. 2016; 4:e1610.

20. Opinion of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety on the »risks associated with the consumption of food supplements containing spirulina«; www.anses.fr/, datum pristupa: 23.10.2018.

21. Marles RJ, Barrett ML, Barnes J, Chavez ML, Gardiner P, Ko R, Mahady GB, Low Dog T, Sarma ND, Giancaspro GI, Sharaf M, Griffiths J. United States pharmacopeia safety evaluation of spirulina. Crit Rev Food Sci Nutr. 2011; 51:593–604.

22. Gao Y, Liu C, Wan G, Wang X, Cheng X, Ou Y. Phycocyanin prevents methylglyoxal-induced mitochondrial-dependent apoptosis in INS-1 cells by Nrf2. Food Funct. 2016; 7:1129–1137.

23. Gargouri M, Soussi A, Akrouti A, Magné C, El Feki A. Potential protective effects of the edible algae *Arthrospira platensis* against lead-induced oxidative stress, anemia, kidney variables and histopathological changes in adult rats. Appl Physiol Nutr Metab. 2018; doi:10.1139/apnm-2018-0428.

24. Khalil SR, Khalifa HA, Abdel-Motal SM, Mohammed HH, Elewa YHA, Mahmoud HA. *Spirulina platensis* attenuates the associated neurobehavioral and inflammatory response impairments in rats exposed to lead acetate. Ecotoxicol Environ Saf. 2018; 157:255–265.

25. Aly FM, Kotb AM, Hammad S. Effects of *Spirulina platensis* on DNA damage and chromosomal aberration against cadmium chloride-induced genotoxicity in rats. Environ Sci Pollut Res Int. 2018; 25:10829–10836.

26. Farag MR, Abd El-Aziz RM, Ali HA, Ahmed SA. Evaluating the ameliorative efficacy of *Spirulina platensis* on spermatogenesis and steroidogenesis in cadmium-intoxicated rats. Environ Sci Pollut Res Int. 2016; 23:2454–2466.

27. Bashandy SAE, El Awdan SA, Ebaid H, Alhazza IM. Antioxidant potential of *Spirulina platensis* mitigates oxidative stress and reprotoxicity induced by sodium arsenite in male rats. Oxid Med Cell Longev. 2016; 7174351.

28. Abdel-Daim MM, Abushouk AI, Alkhalf MI, Toraih EA, Fawzy MS, Ijaz H, Aleya L, Bungau SG. Antagonistic effects of *Spirulina platensis* on diazinon-induced hemato-biochemical alterations and oxidative stress in rats. Environ Sci Pollut Res Int. 2018; 25:27463–27470.

29. Afkhami-Ardakani M, Hasanzadeh S, Shahrooz R, Delirezh N, Malekinejad H. Antioxidant effects of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats. Vet Res Forum. 2018; 9:35–41.

30. Abdel-Daim M, El-Bialy BE, Rahman HG, Radi AM, Hefny HA, Hassan AM. Antagonistic effects of *Spirulina platensis* against sub-acute deltamethrin toxicity in mice: biochemical and histopathological studies. Biomed Pharmacother. 2016; 77:79–85.

31. Ebetrexat 20 mg/mL otopina za injekciju u napunjenoj štrcaljki; http://www.halmed.hr/, datum pristupa: 23.10.2018.

32. Khafaga AF, El-Sayed YS. Spirulina ameliorates methotrexate hepatotoxicity via antioxidant, immune stimulation, and proinflammatory cytokines and apoptotic proteins modulation. Life Sci. 2018; 196:9–17.

33. Sangeetha LAR, Samixaben Patel D, Pandanaboina CS. Hepato-protective effects of blue-green alga *Spirulina platensis* on diclofenac-induced liver injury in rats. Mal J Nutr. 2016; 22:289–299.

34. Zeinalian R, Farhangi MA, Shariat A, Saghafi-Asl M. The effects of *Spirulina platensis* on anthropometric indices, appetite, lipid profile and serum vascular endothelial

growth factor (VEGF) in obese individuals: a randomized double blinded placebo controlled trial. BMC Complement Altern Med. 2017; 17:225.

35. Torres-Duran PV, Ferreira-Hermosillo A, Juarez-Oropeza MA. Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina maxima* in an open sample of mexican population: a preliminary report. Lipids Health Dis. 2007; 6:33.

36. Parikh P, Mani U, Iyer U. Role of *Spirulina* in the control of glycemia and lipidemia in type 2 diabetes mellitus. J Med Food. 2001; 4:193–199.

37. Mazokopakis EE, Starakis IK, Papadomanolaki MG, Mavroeidi NG, Ganotakis ES The hypolipidaemic effects of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) supplementation in a Cretan population: a prospective study. J Sci Food Agric. 2014; 94:432–437.

38. Miczke A, Szulińska M, Hansdorfer-Korzon R, Kręgielska-Narożna M, Suliburska J, Walkowiak J, Bogdański P. Effects of spirulina consumption on body weight, blood pressure, and endothelial function in overweight hypertensive Caucasians: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016; 20:150–156.

39. Szulinska M, Gibas-Dorna M, Miller-Kasprzak E, Suliburska J, Miczke A, Walczak-Gałezewska M, Stelmach-Mardas M, Walkowiak J, Bogdanski P. *Spirulina maxima* improves insulin sensitivity, lipid profile, and total antioxidant status in obese patients with well-treated hypertension: a randomized double-blind placebo-controlled study. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2017; 21:2473–2481.

40. Lee EH, Park JE, Choi YJ, Huh KB, Kim WY. A randomized study to establish the effects of spirulina in type 2 diabetes mellitus patients. Nutr Res Pract. 2008; 2:295–300.

41. Ould Amara-Leffad L, Ramdane H, Nekhoul K, Ouznadji A, Koceir E A. *Spirulina* effect on modulation of toxins provided by food, impact on hepatic and renal functions. Arch Physiol Biochem. 2018; 27:1–11.

42. Yigit F, Gurel-Gurevin E, Isbilen-Basok B, Esener OB, Bilal T, Keser O, Altiner A, Yilmazer N, Ikitimur-Armutak EI. Protective effect of *Spirulina platensis* against cell damage and apoptosis in hepatic tissue caused by high fat diet. Biotech Histochem. 2016; 91:182–194.

43. Kishibuchi R, Nishibori N, Sagara T, Morita K. Putative effect of *Spirulina* extract on enzyme activities participating in lipid and carbohydrate digestion processes. J Diet Suppl. 2018; doi:10.1080/19390211.2018.1472166.

44. Kata FS, Athbi AM, Manwar EQ, Al-Ashoor A, Abdel-Daim MM, Aleya L. Therapeutic effect of the alkaloid extract of the cyanobacterium *Spirulina platensis* on the lipid profile of hypercholesterolemic male rabbits. Environ Sci Pollut Res Int. 2018; 25:19635–19642.

45. Moor VJA, Biapa PCN, Njinkio BLN, Moukette BM, Sando Z, Kenfack C, Ateba B, Matip MEN, Pieme CA, Ngogang J. Hypolipidemic effect and activation of Lecithin Cholesterol Acyl Transferase (LCAT) by aqueous extract of *Spirulina platensis* during toxicological investigation. BMC Nutrition 2017; 3:25.

46. Nagaoka S, Shimizu K, Kaneko H, Shibayama F, Morikawa K, Kanamaru Y, Otsuka A, Hirahashi T, Kato T. A novel protein C-phycocyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. J Nutr. 2005; 135:2425–2430.

47. Bigagli E, Cinci L, Niccolai A, Tredici MR, Biondi N, Rodolfi L, Lodovici M, D'Ambrosio M, Mori G, Luceri C. Safety evaluations and lipid-lowering activity of an *Arthrospira platensis* enriched diet: A 1-month study in rats. Food Res Int. 2017; 102:380–386.

48. Anitha L, Chandralekha K. Effect of supplementation of *Spirulina* on blood glucose, glycosylated hemoglobin and lipid profile of male non-insulin dependent diabetics. Asian J Exp Biol Sci. 2010; 1:36–46.

49. Kaur K, Sachdeva R, Grover K. Effect of supplementation of spirulina on blood glucose and lipid profile of the non-insulin dependent diabetic male subjects J Dairy Foods Home Sci. 2008; 27:202–208.

50. 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; 11:375–380.

51. Gargouri M, Hamed H, Akrouti A, Dauvergne X, Magné C, El Feki A. Effects of *Spirulina platensis* on lipid peroxidation, antioxidant defenses, and tissue damage in kidney of alloxan-induced diabetic rats. Appl Physiol Nutr Metab. 2018; 43:345–354.

52. Hozayen WG, Mahmoud AM, Soliman HA, Mostafa SR. *Spirulina versicolor* improves insulin sensitivity and attenuates hyperglycemia-mediated oxidative stress in fructose-fed rats. J Intercult Ethnopharmacol. 2016; 5:57–64.

53. Ren Z, Xie Z, Cao D, Gong M, Yang L, Zhou Z, Ou Y. C-Phycocyanin inhibits hepatic gluconeogenesis and increases glycogen synthesis via activating Akt and AMPK in insulin resistance hepatocytes. Food Funct. 2018; 9:2829–2839.

54. Lee J, Park A, Kim MJ, Lim HJ, Rha YA, Kang HG. *Spirulina* extract enhanced a protective effect in type 1 diabetes by anti-apoptosis and anti-ROS production. Nutrients. 2017; 9:1363.

55. Sadek KM, Lebda MA, Nasr SM, Shoukry M. *Spirulina platensis* prevents hyperglycemia in rats by modulating gluconeogenesis and apoptosis via modification of oxidative stress and MAPK-pathways. Biomed Pharmacother. 2017; 92:1085–1094.

56. Metabolički sindrom; http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/, datum pristupa: 23.10.2018.

57. Pepine CJ, Handberg EM. The vascular biology of hypertension and atherosclerosis and intervention with calcium antagonists and angiotensin-converting enzyme inhibitors. Clin Cardiol. 2001; 24:V1–5.

58. Jensen GS, Drapeau C, Lenninger M, Benson KF. Clinical safety of a high dose of phycocyanin-enriched aqueous extract from *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled study with a focus on anticoagulant activity and platelet activation. J Med Food. 2016; 19:645–653.

59. Mascher D, Paredes-Carbajal MC, Torres-Durán PV, Zamora-González J, Díaz-Zagoya JC, Juárez-Oropeza MA. Ethanolic extract of *Spirulina maxima* alters the vasomotor reactivity of aortic rings from obese rats. Arch Med Res. 2006; 37:50–57.

60. Cheong SH, Kim MY, Sok DE, Hwang SY, Kim JH, Kim HR, Lee JH, Kim YB, Kim MR. Spirulina prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2010; 56:34–40.

61. Ku CS, Kim B, Pham TX, Yang Y, Wegner CJ, Park YK, Balunas M, Lee JY. Blue-green algae inhibit the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. J Med Food. 2015; 18:1299–1306.

62. Li B, Chu XM, Xu YJ, Yang F, Lv CY, Nie SM. CD59 underlines the antiatherosclerotic effects of C-phycocyanin on mice. Biomed Res Int. 2013; 729413.

63. Okuyama H, Tominaga A, Fukuoka S, Taguchi T, Kusumoto Y, Ono S. *Spirulina* lipopolysaccharides inhibit tumor growth in a Toll-like receptor 4-dependent manner by altering the cytokine milieu from interleukin-17/interleukin-23 to interferon-γ. Oncol Rep. 2017; 37:684–694.

64. Pugh N, Ross SA, ElSohly HN, ElSohly MA, Pasco DS. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. Planta Med. 2001; 67:737–742.

65. Pham TX, Park YK, Bae M, Lee JY. The potential role of an endotoxin tolerance-like mechanism for the anti-inflammatory effect of *Spirulina platensis* organic extract in macrophages. J Med Food. 2017; 20:201–210.

66. Ku CS, Pham TX, Park Y, Kim B, Shin MS, Kang I, Lee J. Edible blue-green algae reduce the production of pro-inflammatory cytokines by inhibiting NF-κB pathway in macrophages and splenocytes. Biochim Biophys Acta. 2013; 1830:2981–2988.

67. Pham TX, Park YK, Lee JY. Anti-inflammatory effects of *Spirulina platensis* extract via the modulation of histone deacetylases. Nutrients. 2016; 8:381.

68. Reddy CM, Bhat VB, Kiranmai G, Reddy MN, Reddanna P, Madyastha KM. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycocyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. Biochem Biophys Res Commun. 2000; 277:599–603.

69. Jensen GS, Attridge VL, Beaman JL, Guthrie J, Ehmann A, Benson KF. Antioxidant and anti-inflammatory properties of an aqueous cyanophyta extract derived from *Arthrospira platensis*: contribution to bioactivities by the non-phycocyanin aqueous fraction. J Med Food. 2015; 18:535–541.

70. Cervantes-Llanos M, Lagumersindez-Denis N, Marín-Prida J, Pavón-Fuentes N, Falcon-Cama V, Piniella-Matamoros B, Camacho-Rodríguez H, Fernández-Massó JR, Valenzuela-Silva C, Raíces-Cruz I, Pentón-Arias E, Teixeira MM, Pentón-Rol G. Beneficial effects of oral administration of C-Phycocyanin and Phycocyanobilin in rodent models of experimental autoimmune encephalomyelitis. Life Sci. 2018; 194:130–138.

71. Rebif, INN-Interferon beta-1a – European Medicines Agency; https://www.ema.europa.eu/, datum pristupa: 23.10.2018

72. Pentón-Rol G, Marín-Prida J, Falcón-Cama V. C-Phycocyanin and phycocyanobilin as remyelination therapies for enhancing recovery in multiple sclerosis and ischemic stroke: a preclinical perspective. Behav Sci (Basel). 2018; 8:15.

73. McCarty MF, Barroso-Aranda J, Contreras F. Oral phycocyanobilin may diminish the pathogenicity of activated brain microglia in neurodegenerative disorders. Med Hypotheses. 2010; 74:601–605.

74. Lima FAV, Joventino IP, Joventino FP, de Almeida AC, Neves KRT, do Carmo MR, Leal LKAM, de Andrade GM, de Barros Viana GS. Neuroprotective activities of

Spirulina platensis in the 6-OHDA model of Parkinson's disease are related to its anti-inflammatory effects. Neurochem Res. 2017; 42:3390–3400.

75. Kumar A, Christian PK, Panchal K, Guruprasad BR, Tiwari AK. Supplementation of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) improves lifespan and locomotor activity in paraquat-sensitive *DJ-1β*$^{\Delta 93}$ flies, a Parkinson's disease model in *Drosophila melanogaster*. J Diet Suppl. 2017; 14:573–588.

76. El-Sheekh MM, Daboor SM, Swelim MA, Mohamed S. Production and characterization of antimicrobial active substance from *Spirulina platensis*. Iran J Microbiol. 2014; 6:112–119.

77. Kaushik P, Chauhan A. *In vitro* antibacterial activity of laboratory grown culture of *Spirulina platensis*. Indian J Microbiol. 2008; 48:348–352.

78. Wulandari DA, Sidhartha E, Setyaningsih I, Marbun JM, Syafruddin D, Asih PBS. Evaluation of antiplasmodial properties of a cyanobacterium, *Spirulina platensis* and its mechanism of action. Nat Prod Res. 2018; 32:2067–2070.

79. Marangoni A, Foschi C, Micucci M, Nahui Palomino RA, Gallina Toschi T, Vitali B, Camarda L, Mandrioli M, De Giorgio M, Aldini R, Corazza I, Chiarini A, Cevenini R, Budriesi R. *In vitro* activity of *Spirulina platensis* water extract against different *Candida* species isolated from vulvo-vaginal candidiasis cases. PLoS One. 2017; 12:e0188567.

80. Hayashi T, Hayashi K, Maeda M, Kojima I. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. J Nat Prod. 1996; 59:83–87.

81. Rechter S, König T, Auerochs S, Thulke S, Walter H, Dörnenburg H, Walter C, Marschall M. Antiviral activity of *Arthrospira*-derived spirulan-like substances. Antiviral Res. 2006; 72:197–206.

82. Mader J, Gallo A, Schommartz T, Handke W, Nagel CH, Günther P, Brune W, Reich K. Calcium spirulan derived from *Spirulina platensis* inhibits herpes simplex virus 1 attachment to human keratinocytes and protects against herpes labialis. J Allergy Clin Immunol. 2016; 137:197–203.

83. Chen YH, Chang GK, Kuo SM, Huang SY, Hu IC, Lo YL, Shih SR. Well-tolerated *Spirulina* extract inhibits influenza virus replication and reduces virus-induced mortality. Sci Rep. 2016; 6:24253.

84. Ngo-Matip ME, Pieme CA, Azabji-Kenfack M, Moukette BM, Korosky E, Stefanini P, Ngogang JY, Mbofung CM. Impact of daily supplementation of *Spirulina platensis* on the immune system of naïve HIV-1 patients in Cameroon: a 12-months single blind, randomized, multicenter trial. Nutr J. 2015; 14:70.

85. Winter FS, Emakam F, Kfutwah A, Hermann J, Azabji-Kenfack M, Krawinkel MB. The effect of *Arthrospira platensis* capsules on CD4 T-cells and antioxidative capacity in a randomized pilot study of adult women infected with human immunodeficiency virus not under HAART in Yaoundé, Cameroon. Nutrients. 2014; 6:2973–2986.

86. Marcel AK, Ekali LG, Eugene S, Arnold OE, Sandrine ED, von der Weid D, Gbaguidi E, Ngogang J, Mbanya JC. The effect of *Spirulina platensis* versus soybean on insulin resistance in HIV-infected patients: a randomized pilot study. Nutrients. 2011; 3:712–724.

87. Simpore J, Zongo F, Kabore F, Dansou D, Bere A, Nikiema JB, Pignatelli S, Biondi DM, Ruberto G, Musumeci S. Nutrition rehabilitation of HIV-infected and HIV-negative undernourished children utilizing *Spirulina*. Ann Nutr Metab. 2005; 49:373–380.

88. Azabji-Kenfack M, Dikosso SE, Loni EG, Onana EA, Sobngwi E, Gbaguidi E. Potential of *Spirulina platensis* as a nutritional supplement in malnourished HIV-infected adults in Sub-Saharan Africa: a randomised, single-blind study. Nutr Metab Insights. 2011; 4:29–37.

89. Jang IS, Park SJ. A *Spirulina maxima*-derived peptide inhibits HIV-1 infection in a human T cell line MT4. Fish Aquatic Sci. 2016; 19:37.

90. Ayehunie S, Belay A, Baba TW, Ruprecht RM. Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1998; 8:7–12.

91. Nielsen CH, Balachandran P, Christensen O, Pugh ND, Tamta H, Sufka KJ, Wu X, Walsted A, Schjørring-Thyssen M, Enevold C, Pasco DS. Enhancement of natural killer cell activity in healthy subjects by Immulina®, a *Spirulina* extract enriched for Braun-type lipoproteins. Planta Med. 2010; 76:1802–1808.

92. Løbner M, Walsted A, Larsen R, Bendtzen K, Nielsen CH. Enhancement of human adaptive immune responses by administration of a high-molecular-weight polysaccharide extract from the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. J Med Food. 2008; 11:313–322.

93. Balachandran P, Pugh ND, Ma G, Pasco DS. Toll-like receptor 2-dependent activation of monocytes by *Spirulina* polysaccharide and its immune enhancing action in mice. Int Immunopharmacol. 2006; 6:1808–1814.

94. Mao TK, Van de Water J, Gershwin ME. Effect of spirulina on the secretion of cytokines from peripheral blood mononuclear cells. J Med Food. 2000; 3:135–140.

95. Akao Y, Ebihara T, Masuda H, Saeki Y, Akazawa T, Hazeki K, Hazeki O, Matsumoto M, Seya T. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered *Spirulina* extract in mice. Cancer Sci. 2009; 100:1494–1501.

96. Mao TK, Van de Water J, Gershwin ME. Effects of a *Spirulina*-based dietary supplement on cytokine production from allergic rhinitis patients. J Med Food. 2005; 8:27–30.

97. Appel K, Munoz E, Navarrete C, Cruz-Teno C, Biller A, Thiemann E. Immunomodulatory and inhibitory effect of Immulina®, and Immunloges® in the Ig-E mediated activation of RBL-2H3 cells. A new role in allergic inflammatory responses. Plants. 2018; 7:13.

98. Juszkiewicz A, Basta P, Petriczko E, Machaliński B, Trzeciak J, Łuczkowska K, Skarpańska-Stejnborn A. An attempt to induce an immunomodulatory effect in rowers with spirulina extract. J Int Soc Sports Nutr. 2018; 15:9.

99. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. Microb Ecol Health Dis. 2015; 26; doi:10.3402/mehd.v26.26191.

100. Parada JL, Zulpa de Caire G, Zaccaro de Mulé MC, Storni de Cano MM. Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. Int J Food Microbiol. 1998; 45:225–228.

101. Rasmussen HE, Martínez I, Lee JY, Walter JJ. Alteration of the gastrointestinal microbiota of mice by edible blue-green algae. Appl Microbiol. 2009; 107:1108–1118.

102. Neyrinck AM, Taminiau B, Walgrave H, Daube G, Cani PD, Bindels LB, Delzenne NM. Spirulina protects against hepatic inflammation in aging: an effect related to the modulation of the gut microbiota? Nutrients. 2017; 9:633.

103. Liao G, Gao B, Gao Y, Yang X, Cheng X, Ou Y. Phycocyanin inhibits tumorigenic potential of pancreatic cancer cells: role of apoptosis and autophagy. Sci Rep. 2016; 6:34564.

104. Ying J, Wang J, Ji H, Lin C, Pan R, Zhou L, Song Y, Zhang E, Ren P, Chen J, Liu Q, Xu T, Yi H, Li J, Bao Q, Hu Y, Li P. Transcriptome analysis of phycocyanin inhibitory effects on SKOV-3 cell proliferation. Gene. 2016; 585:58–64.

105. Czerwonka A, Kaławaj K, Sławińska-Brych A, Lemieszek MK, Bartnik M, Wojtanowski KK, Zdzisińska B, Rzeski W. Anticancer effect of the water extract of a commercial *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) product on the human lung cancer A549 cell line. Biomed Pharmacother. 2018; 106:292–302.

106. Jiang L, Wang Y, Liu G, Liu H, Zhu F, Ji H, Li B. C-Phycocyanin exerts anti-cancer effects via the MAPK signaling pathay in MDA-MB-231 cells. Cancer Cell Int. 2018; 18:12.

107. Kunte M, Desai K. The inhibitory effect of C-phycocyanin containing protein extract (C-PC extract) on human matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in hepatocellular cancer cell line (HepG2). Protein J. 2017; 36:186–195.

108. Roy KR, Arunasree KM, Reddy NP, Dheeraj B, Reddy GV, Reddanna P. Alteration of mitochondrial membrane potential by *Spirulina platensis* C-phycocyanin induces apoptosis in the doxorubicin resistant human hepatocellular-carcinoma cell line HepG2. Biotechnol Appl Biochem. 2007; 47:159–167.

109. Nishanth RP, Ramakrishna BS, Jyotsna RG, Roy KR, Reddy GV, Reddy PK, Reddanna P. C-Phycocyanin inhibits MDR1 through reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 mediated pathways in human hepatocellular carcinoma cell line. Eur J Pharmacol. 2010; 649:74–83.

110. Hao S, Yan Y, Li S, Zhao L, Zhang C, Liu L, Wang C. The *in vitro* anti-tumor activity of phycocyanin against non-small cell lung cancer cells. Mar Drugs. 2018; 16:178.

111. Śmieszek A, Giezek E, Chrapiec M, Murat M, Mucha A, Michalak I, Marycz K. Influence of *Spirulina platensis* filtrates on Caco-2 proliferative activity and expression of apoptosis-related microRNAs and mRNA. Mar Drugs. 2017; 15:E65.

Primljeno 24. listopada 2018.