

С. Е. Фоменко, Н. Ф. Кушнерова, Л. Н. Лесникова

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕПАРАЦИИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ЭКСТРАКТОМ ИЗ ТУНИКИ АСЦИДИИ ПУРПУРНОЙ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ЧЕТЫРЕХХЛОРИСТЫМ УГЛЕРОДОМ

Учреждение Российской академии наук Тихоокеанский океанологический институт  
им. В. И. Ильичева ДВО РАН, Владивосток, Россия

Приведены данные по изучению физиологических характеристик и липидной составляющей мембран эритроцитов при интоксикации четыреххлористым углеродом ( $CCl_4$ ) и коррекции наблюдаемых отклонений с помощью водно-спиртового экстракта из туники (оболочки) асцидии пурпурной (*Halocynthia aurantium*). Показано, что интоксикация  $CCl_4$  сопровождалась увеличением среднего объема и диаметра эритроцитов, нарушением в соотношении фракций фосфо- и нейтральных липидов, а также жирно-кислотного состава их мембран. В период депривации большинство изученных показателей оставалось на уровне, который был зафиксирован после интоксикации  $CCl_4$ . Введение экстракта из туники асцидии расширяет порог устойчивости эритроцитов к гемолизу, способствует сохранению соотношения липидных компонентов в мембране эритроцитов, а также их физиологических характеристик. Сочетание высокой биологической активности и низкой токсичности экстракта позволяет говорить о перспективе создания новых эффективных лекарственных средств из морских гидробионтов при токсических повреждениях организма.

**Ключевые слова:** экстракт из туники асцидии пурпурной; четыреххлористый углерод; эритроциты; липиды.

Сегодня внимание ученых привлекают гидробионты морского происхождения, богатые биологически активными веществами, такими как полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), «морские» фосфолипиды, антиоксиданты, простагландины и др. для разработки новых лекарственных средств и препаратов. В ранее проведенных исследованиях показано, что экстракт из туники асцидии проявлял выраженный гепатопротекторный эффект при интоксикации этиловым спиртом [1], а при токсическом гепатите, вызванном введением четыреххлористого углерода, стимулировал антиоксидантную функцию печени и препятствовал развитию цитолиза гепатоцитов [2].

Известно, что при токсических поражениях печени значительную роль в развитии патологии играют свободнорадикальные процессы с участием активных форм кислорода. Последние вызывают перекисидацию липидов клеточных мембран и, как следствие, нарушение их мембранной функции [3]. Установлено, что повреждения в клетках печени коррелируют с биохимическими и биофизическими нарушениями в мембранах эритроцитов [4], которые проявляются изменением липидного состава их мембран, увеличением в них соотношения холестерина/фосфолипиды (ХЛ/ФЛ) и изменением активности мембраносвязанных ферментов. Более того, как отмечается в [5], изменения в эритроцитах могут служить доступным и надежным маркером печеночных повреждений при циррозе, токсическом гепатите, вызванных введением токсиканта. Применение препаратов, осуществляющих репарацию мембранных структур (фосфолипидные средства, жирные кислоты и др.), способствует эффективному восстановлению функционального состояния органа, нарушенного воздействием повреждающих факторов.

Интерес к асцидии пурпурной (*Halocynthia aurantium*) возник после проведенного скрининга наиболее массовых видов морских беспозвоночных Японского моря на стресс-протективное действие, который показал, что этот вид асцидии является наиболее перспективным для дальнейшего фармакологического исследования [6]. Особенностью данного объекта является высокое содержание в его тунике «морских» фосфолипидов (фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, дифосфатидилглицерин и др.), имеющих в своем составе ПНЖК семейства n-3 [7, 8]. В связи с этим мы исследовали влияние полученного экстракта на липидную составляющую мембран эритроцитов крыс при интоксикации четыреххлористым углеродом.

Целью работы явилось изучение физиологических характеристик и липидной составляющей мембран эритроцитов при экспериментальном токсическом гепатите и возможности коррекции наблюдаемых отклонений с помощью водно-спиртового экстракта из туники (оболочки) асцидии пурпурной (*Halocynthia aurantium*).

**Химический состав экстракта.** Вещества, отвечающие за биологическое действие извлечений из асцидии, сконцентрированы преимущественно в ее тунике [6]. В свежесобранных экземплярах асцидии пурпурной оболочку освобождали от внутренностей и подошвы, затем высушивали при заданных параметрах температуры ( $< 50^\circ C$ ), измельчали. Экстракт из туники асцидии пурпурной получали методом реперколяции на 40 % этиловом спирте при соотношении сырья к экстрагенту 1:1 (по объему) в соответствии с требованиями ТУ 9169-007-20783642-96 и санитарно-эпидемиологическим заключением № 77.99.03.919.Б.946.10.07. Способ получения запатентован (патент № 1522487). В условиях однократно-

го введения экстракта в брюшную полость ЛД<sub>50</sub> составила для крыс 32 мл/кг (2,24 г сухого остатка на кг массы). В соответствии с классификацией К. К. Сидорова [9], данное средство относится к 4 классу малотоксичных веществ. Экстракт из туники асцидии представляет собой опалесцирующую жидкость светло-коричневого цвета со специфическим запахом и солоновато-горьковатым вкусом. Сухой остаток экстракта составлял 6 – 7 %. Согласно литературным данным [7], состав экстракта представлен различными классами веществ: липиды, простагландины, аминокислоты, микроэлементы, витамин С и др. Методом колоночной хроматографии из экстракта были выделены простагландины ПГА<sub>1</sub> и ПГФ<sub>2</sub> (599 ± 21 и 777 ± 29 пг/мл соответственно). В состав экстракта из туники асцидии также входит 15 аминокислот, 7 из которых являются незаменимыми. Суммарное содержание свободных аминокислот составляет 0,15 мг/мл, при этом доля незаменимых аминокислот соответствует 43 % от суммы всех аминокислот. В наибольших количествах представлены глутаминовая кислота (0,40 ± 0,002 ммоль/л), лизин (0,24 ± 0,004 ммоль/л), валин (0,21 ± 0,02 ммоль/л), аспаргиновая кислота (0,19 ± 0,001 ммоль/л), метионин (0,06 ± 0,005 ммоль/л). Из микроэлементов обнаружены медь, кобальт, никель, алюминий, кремний, марганец и др. (0,10 – 14,3 мкг/мл) [7].

Нами проведены исследования липидного состава экстракта из туники асцидии. Липидную составляющую выделяли по методу [10], предварительно освободив экстракт от спирта на ротонном испарителе. Для разделения фосфолипидных фракций применяли метод двухмерной хроматографии [11]. Хроматографическое распределение нейтральных липидов и их количественное определение проводили методом одномер-

ной тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе растворителей [12]. Определение жирно-кислотного состава общих липидов проводили методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) [13], предварительно липиды подвергали метанолизу с хлористым ацетилом [14].

Проведенные исследования липидной составляющей экстракта показали (табл. 1) наличие в его составе 8 фракций фосфолипидов (ФЛ), 8 фракций нейтральных липидов (НЛ) и жирные кислоты (ЖК). Среди фосфолипидных фракций в процентном отношении от суммы всех фракций преобладали фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилсерин (ФС), дифосфатидилглицерин (ДФГ); среди нейтральных липидов — триацилглицерины (ТАГ), воск и свободные жирные кислоты (СЖК). В общих липидах экстракта были выделены ЖК с длиной углеродной цепи от 12 до 22 атомов. Из индивидуальных ЖК наибольший удельный вес приходится на пальмитиновую (16:0), стеариновую (18:0) и α-линоленовую (18:3 n-3) кислоты. Важно отметить присутствие в экстракте достаточно большого количества ПНЖК, среди которых отмечается высокое содержание кислот семейства n-3: α-линоленовая (18:3), эйкозапентаеновая (20:5) и докозагексаеновая (22:6). Анализируя химический состав, можно с определенностью говорить о том, что экстракт из туники асцидии является источником биологически активных веществ для восстановления мембранных структур и, в перспективе, может быть использован для получения эффективных лекарственных препаратов.

#### Экспериментальная часть

В эксперименте использовали белых крыс-самцов линии Вистар массой 180 – 200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Крысам внутрижелудочно вводили 50 % масляный раствор четыреххлори-

Таблица 1  
Количественный состав нейтральных липидов, фосфолипидов и жирных кислот общих липидов в водно-спиртовом экстракте туники асцидии пурпурной ( $M \pm m$ , в % от общей суммы)

Соединения	Содержание, %	Соединения	Содержание, %
<b>Нейтральные липиды</b>		<b>Жирные кислоты</b>	
Триацилглицерины	26,97 ± 1,45	Лауриновая (12:0)	1,10 ± 0,01
Диацилглицерины	9,10 ± 0,92	Миристиновая (14:0)	4,63 ± 0,99
Воска	23,89 ± 2,60	Пальмитиновая (16:0)	23,80 ± 2,10
Холестерин	4,35 ± 0,70	Стеариновая (18:0)	17,37 ± 2,00
Эфиры холестерина	5,71 ± 0,12	Пальмит-олеиновая (16:1 n-9)	5,70 ± 1,30
Свободные жирные кислоты	16,98 ± 1,20	Олеиновая (18:1 n-9)	4,89 ± 0,40
Жирные альдегиды	5,74 ± 1,10	Линолевая (18:2 n-6)	1,13 ± 0,10
Эфиры жирных кислот	7,26 ± 0,95	Эйкозатриеновая (20:3 n-6)	1,20 ± 0,40
<b>Фосфолипиды</b>		Арахидоновая (20:4 n-6)	4,69 ± 0,55
Фосфатидилхолин	52,03 ± 1,34	Докозатетраеновая (22:4 n-6)	2,90 ± 0,60
Лизофосфатидилхолин	4,81 ± 0,50	α-Линоленовая (18:3 n-3)	15,85 ± 0,20
Фосфатидилэтаноламин	5,26 ± 0,74	Эйкозапентаеновая (20:5 n-3)	10,98 ± 0,55
Лизофосфатидилэтаноламин	5,27 ± 0,69	Докозагексаеновая (22:6 n-3)	5,76 ± 0,54
Фосфатидилинозит	4,79 ± 0,52	Сумма насыщенных	46,90
Фосфатидилсерин	11,73 ± 2,41	Сумма ненасыщенных	53,10
Сфингомиелин	6,11 ± 0,40	Сумма моноеновых	10,59
Дифосфатидилглицерин	10,00 ± 1,95	Сумма полиеновых	42,51

стого углерода (CCl<sub>4</sub>) из расчета 1,25 мл/кг в течение 4 дней [15]. Контрольным животным вводили оливковое масло в сопоставимой дозе. Предварительно освобожденный от спирта экстракт животным вводили внутривенно через зонд в виде водного раствора в объеме 4 мл на 1 кг массы, что соответствует дозе 80 мг общих липидов на 1 кг массы животного. Это известная терапевтическая доза для препарата липидной природы “Эссенциале”<sup>TM</sup> [16], который был использован в качестве препарата сравнения. “Эссенциале”<sup>TM</sup> — известный гепатопротектор, изготовленный на основе фосфатидилхолина соевых бобов (производства компании “Рон-Пуленк Рорер”, Германия), вводили тем же способом и в таком же количестве (доза введения составляла 80 мг/кг в водном растворе).

Животные были разделены на 4 группы по 10 крыс в каждой: 1-я — контроль (оливковое масло); 2-я группа — введение CCl<sub>4</sub>; 3-я — введение CCl<sub>4</sub> с последующей отменой (депривация) в течение 7 дней; 4-я группа — введение CCl<sub>4</sub> в течение 4 дней с последующей отменой и введением экстракта в течение 7 дней. Крыс выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Исследование одобрено Комиссией по вопросам этики Тихоокеанского океанологического института им. В. И. Ильичева ДВО РАН.

Выделение эритроцитов из крови и получение эритроцитарных мембран проводили по традиционной методике. Средний объем (СОЭ) и средний диаметр эритроцитов (СДЭр) крови определяли на гематологическом анализаторе “Abacus” (Diatron, Австрия). Ос-

мотическую резистентность эритроцитов (ОРЭ) к изменению концентрации NaCl рассчитывали по общепринятому методу. Экстракты общих липидов из мембран эритроцитов готовили традиционным методом [10]. Определение общих фосфолипидов в экстрактах проводили спектрофотометрически с помощью молибдатного реактива [17]. Фракционное разделение фосфолипидов осуществляли методом двухмерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле [11], а их количественное определение — по методу [17]. Использовали следующие системы растворителей [18]: в первом направлении — хлороформ — метанол — аммиак (28 %-ный) (65:25:5 или 65:35:5, по объему), во втором — хлороформ — ацетон — метанол — ледяная уксусная кислота — вода (30:40:10:10:5 или 50:20:10:10:5, по объему). Для обнаружения холинсодержащих фосфолипидов (фосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин, сфингомиелин) использовали реактив Драгендорфа [19], липиды проявлялись в виде оранжевых пятен на желтом фоне. Для обнаружения фосфолипидов, содержащих аминогруппу (фосфатидилэтанолламин, лизофосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин), пластинки опрыскивали 5 % раствором нингидрина в ацетоне [18] с последующим нагреванием в течение 2 — 3 мин над парами воды до появления розовых пятен на белом фоне. Фосфолипиды, содержащие гидроксильную группу (фосфатидилинозит), обнаруживали с помощью периодатного реактива Шиффа [14], пятна липидов имели розово-сиреневый цвет. Для проявления всех фосфолипидных фракций применяли молибдатный реактив [17] и реагент на основе малахитового зеленого [20]. При этом липиды проявлялись в виде синих или зеленых пятен на белом фоне. Хроматографическое распределение нейтраль-

Таблица 2

Содержание нейтральных липидов и фосфолипидов в эритроцитах крыс при интоксикации CCl<sub>4</sub> в период депривации и введения экстракта из туники асцидии (в % от суммы всех фракций,  $M \pm m$ )

Соединения	1-я группа Контроль	2-я группа CCl <sub>4</sub>	3-я группа Депривация	4-я группа Депривация + экстракт
<b>Нейтральные липиды</b>				
Триацилглицерины	17,54 ± 0,71	20,75 ± 0,84*	19,21 ± 0,72	18,00 ± 0,61
Свободные жирные кислоты	13,73 ± 0,57	15,92 ± 0,58*	14,63 ± 0,69	12,54 ± 0,46 <sup>1</sup>
Эфиры жирных кислот	17,17 ± 0,44	14,27 ± 0,61**	15,77 ± 0,71	17,44 ± 0,82
Холестерин	22,25 ± 0,78	26,24 ± 0,76**	25,33 ± 0,83*	22,97 ± 0,66 <sup>1</sup>
Эфиры холестерина	16,87 ± 0,67	12,22 ± 0,59***	13,13 ± 0,42***	16,23 ± 0,51 <sup>3</sup>
Остаточная фракция НЛ	12,44 ± 1,53	10,61 ± 1,21	11,93 ± 1,64	12,82 ± 1,79 <sup>2</sup>
<b>Фосфолипиды</b>				
Фосфатидилхолин	42,89 ± 0,75	37,86 ± 0,78***	38,90 ± 0,93**	41,87 ± 1,0 <sup>1</sup>
Лизофосфатидилхолин	6,62 ± 0,13	10,80 ± 0,14***	9,87 ± 0,38***	7,0 ± 0,06 <sup>3</sup>
Сфингомиелин	11,73 ± 0,32	17,39 ± 0,31***	16,20 ± 0,62***	13,15 ± 0,66 <sup>2</sup>
Фосфатидилэтанолламин	22,17 ± 0,56	16,88 ± 0,32***	18,51 ± 0,44***	21,55 ± 0,41 <sup>3</sup>
Лизофосфатидилэтанолламин	1,50 ± 0,02	2,74 ± 0,10***	1,85 ± 0,03***	1,42 ± 0,03 <sup>3</sup>
Фосфатидилсерин	6,94 ± 0,14	8,76 ± 0,12***	7,40 ± 0,15*	7,0 ± 0,14
Фосфатидилинозит	6,28 ± 0,22	4,50 ± 0,20***	5,82 ± 0,13	6,16 ± 0,12
Общие фосфолипиды	60,73 ± 1,94	45,61 ± 1,88***	51,62 ± 0,79***	58,55 ± 1,65
Коэффициент ХС/ФЛ	0,37 ± 0,03	0,58 ± 0,03***	0,49 ± 0,02***	0,39 ± 0,02 <sup>2</sup>

Здесь и в табл. 3 различия статистически значимы по сравнению с контролем: \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ ; по сравнению с 3-й группой: <sup>1</sup> —  $p < 0,05$ ; <sup>2</sup> —  $p < 0,01$ ; <sup>3</sup> —  $p < 0,001$ . НЛ — нейтральные липиды, ХС/ФЛ — холестерин/ фосфолипиды.

ных липидов и их количественное определение проводили методом одномерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле в системе растворителей гексан – серный эфир – уксусная кислота в соотношении 90:10:1 (по объему) [12]. Обнаружение пятен нейтральных липидов осуществляли с помощью паров йода. Количественное содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы нейтральных липидов и фосфолипидов соответственно. Для определения жирно-кислотного спектра экстракты подвергали метанолизу с хлористым ацетилом [14]. Эфиры жирных кислот анализировали на хроматографе “Биохром” с пламенно-ионизационным детектором. Жирные кислоты идентифицировали 2 способами: путем сравнения удерживаемых объемов в исследуемой смеси [13] и с помощью стандартных препаратов метиловых эфиров жирных кислот ( $C_{16} - C_{24}$ ). Результаты выражали в процентах от суммы всех фракций (табл. 1). Полученные данные обрабатывали с помощью параметрического критерия Стьюдента ( $t$ ), используя статистическую программу Instat (Graph Pad Software Inc. USA, 2005).

### Результаты и их обсуждение

Исследование размерных характеристик эритроцитов крыс после интоксикации  $CCl_4$  показало увеличение СДЭ на 30 % ( $8,37 \pm 0,05$  против  $6,45 \pm 0,03$  мкм в контроле;  $p < 0,001$ ) и СОЭр в 2 раза ( $117,28 \pm 2,34$  против  $53,67 \pm 1,72$  мкм<sup>3</sup> в контроле;  $p < 0,001$ ). Резко снизилась ОПЭ к гемолизирующему агенту, при этом начало и окончание гемолиза эритроцитов происходило раньше, чем у контрольных крыс (начало при концентрации NaCl  $0,61 \pm 0,03$  %, а завершение — при  $0,45 \pm 0,02$  %). В контроле начало гемолиза происходило при  $0,43 \pm 0,01$  %, а завершение при  $0,38 \pm 0,01$  % NaCl.

Количество общих фосфолипидов (ОФЛ) в мембранах эритроцитов животных 2-й группы относительно контроля снизилось на 25 % ( $p < 0,001$ ) при одновременном увеличении уровня холестерина (ХС) на 18 % ( $p < 0,01$ ) (табл. 2). Это обусловило повышение коэффициента ХС/ФЛ в 1,5 раза, что является характерным признаком повреждения мембран при токсическом гепатите [5]. Известно, что при интоксикации  $CCl_4$  в печени активируются реакции липолиза, что сопровождается интенсивным окислением жирных кислот до ацетил-КоА, который из-за блокирования реакций цикла Кребса не успевает утилизироваться и конденсируется с образованием ХС [21]. Избыток образовавшегося ХС переносится липопротеинами низкой плотности в кровь, где происходит его встраивание в мембраны эритроцитов. В составе НЛ мембран эритроцитов после интоксикации  $CCl_4$  отмечалось также достоверное увеличение уровня ТАГ на 18 % ( $p < 0,05$ ) и СЖК на 16 % ( $p < 0,05$ ). Согласно данным [22], СЖК в мембране эритроцитов формируют локальные домены и неспецифические ионные каналы, через которые в клетку избыточно втекают натрий и кальций, а из клетки оттекают калий и магний. Это пассивная диффузия по градиенту концентрации, которая обуславливает увеличение размеров клеток. Одновременно происходило снижение содержания эфиров жирных кислот (ЭЖК) и эфиров холестерина (ЭХС) на 17 % ( $p < 0,01$ ) и 28 % ( $p < 0,001$ ) соответственно. Данные факты свидетельствуют, с одной стороны, об активации в мембране эритроцитов адаптационных процессов, направленных на стабилизацию за счет увеличения содержания в них ХС, а с другой — о нарушении этерифицирующей функции печени и, как следствие, липидного состава липопротеинов, являющихся источником липидов для мембран эритроцитов.

Изменения в фосфолипидном спектре эритроцитов свидетельствовали о нарушении проницаемости их

Таблица 3  
Содержание жирных кислот в общих липидах эритроцитов крыс при интоксикации  $CCl_4$ , в период депривации и введении экстракта из туники асидии (в % от суммы всех жирных кислот;  $M \pm m$ )

Жирные кислоты	1-я группа Контроль	2-я группа $CCl_4$	3-я группа Депривация	4-я группа Депривация + экстракт
Миристиновая 14:0	$1,12 \pm 0,10$	$2,69 \pm 0,13^{***}$	$2,18 \pm 0,13^{***}$	$1,24 \pm 0,06^{(3)}$
Пальмитиновая 16:0	$24,93 \pm 0,95$	$34,07 \pm 1,34^{***}$	$30,22 \pm 1,18^{**}$	$26,89 \pm 1,20^{(1)}$
Пальмит-олеиновая 16:1 n-9	$1,97 \pm 0,06$	$3,46 \pm 0,25^{***}$	$3,12 \pm 0,13^{***}$	$1,98 \pm 0,07^{(3)}$
Стеариновая 18:0	$14,24 \pm 0,82$	$17,0 \pm 1,0^*$	$15,67 \pm 0,76$	$14,85 \pm 1,10$
Олеиновая 18:1 n-9	$16,58 \pm 0,74$	$20,0 \pm 1,04^*$	$17,17 \pm 1,0$	$16,74 \pm 1,0$
Линолевая 18:2 n-6	$16,33 \pm 0,81$	$10,10 \pm 0,81^{***}$	$13,27 \pm 0,74^*$	$15,97 \pm 0,77^{(2)}$
$\alpha$ -Линоленовая 18:3 n-3	$1,42 \pm 0,07$	$1,01 \pm 0,04$	$1,08 \pm 0,06$	$1,21 \pm 0,04^{*(1)}$
Эйкозатриеновая 20:3 n-6	$1,12 \pm 0,02$	$0,55 \pm 0,01$	$0,60 \pm 0,01$	$1,10 \pm 0,04^{(3)}$
Арахидоновая 20:4 n-6	$15,0 \pm 0,69$	$7,0 \pm 0,53$	$11,78 \pm 0,75$	$13,25 \pm 0,76$
Эйкозапентаеновая 20:5 n-3	$1,78 \pm 0,08$	$1,00 \pm 0,05^{***}$	$1,20 \pm 0,05^{***}$	$1,96 \pm 0,07^{(3)}$
Докозатетраеновая 22:4 n-6	$1,10 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,02^{***}$	$0,41 \pm 0,01^{***}$	$0,90 \pm 0,02^{***(3)}$
Докозапентаеновая 22:5 n-6	$0,88 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,02^{***}$	$0,52 \pm 0,01^{***}$	$0,87 \pm 0,03^{(3)}$
Докозагексаеновая 22:6 n-3	$3,53 \pm 0,13$	$2,36 \pm 0,13^{***}$	$2,78 \pm 0,06^{***}$	$3,04 \pm 0,08^{**^{(1)}}$
Сумма насыщенных	40,29	53,76	48,07	42,98
Сумма ненасыщенных	59,71	46,24	51,93	57,02
Индекс насыщенности	0,67	1,16	0,93	0,75

мембран (табл. 2). Так, наблюдалось достоверное снижение содержания основных структурных компонентов мембран: фосфатидилхолина (ФХ) на 12 % ( $p < 0,001$ ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭ) на 24 % ( $p < 0,001$ ) при одновременном увеличении содержания лизофосфатидилхолина (ЛФХ) на 63 % ( $p < 0,001$ ) и лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ) на 83 % ( $p < 0,001$ ). Эти изменения обусловлены активированием фосфолипазы  $A_2$  [23]. Кроме того, образующийся из  $CCl_4$  трихлорметильный радикал, в свою очередь, реагирует с кислородом с образованием еще более токсичного трихлорметилпероксильного радикала, который инициирует цепь реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ) [3]. При этом окисление и разрушение ПНЖК фосфолипидов вызывает уменьшение количества фосфолипидных фракций, в частности, не только ФХ и ФЭ, но и фосфатидилинозита (ФИ) на 28 % ( $p < 0,001$ ) и фосфатидной кислоты (ФК) на 43 % ( $p < 0,001$ ), которые имеют важное значение для функционирования мембраносвязанного фермента  $Na^+ - K^+ - ATP$ азы [24].

Изучение жирно-кислотного спектра общих липидов эритроцитов при интоксикации  $CCl_4$  (табл. 3) показало увеличение суммы насыщенных жирных кислот на 33 % за счет достоверного повышения миристиновой (14:0) в 2 раза, пальмитиновой (16:0) на 37 % ( $p < 0,001$ ) и стеариновой на 19 % ( $p < 0,05$ ). При этом сумма ненасыщенных жирных кислот уменьшилась до 46,24 % (в контроле 59,71 %) за счет снижения содержания жирных кислот семейства n-6: линолевой (18:2), эйкозотриеновой (20:3), арахидоновой (20:4) и семейства n-3:  $\alpha$ -линоленовой (18:3), эйкозопентаеновой (20:5), докозгексаеновой (22:6). В то же время следует отметить количественный рост моноеновых жирных кислот: пальмит-олеиновой (16:1) в 1,7 раза ( $p < 0,001$ ) и олеиновой (18:1) на 21 % ( $p < 0,05$ ). Это рассогласование в составе ЖК обусловило увеличение индекса насыщенности до 1,16 (в контроле 0,67).

Таким образом,  $CCl_4$  вызывает разбалансировку липидного состава мембран эритроцитов, что сопровождается нарушением их проницаемости, размерных характеристик и, как следствие, функциональных свойств.

Через 7 дней после отмены  $CCl_4$  (период депривации) в эритроцитах крыс (3-я группа) отклонение от нормы отмечалось по многим показателям. Сохранялись повышенными величины СДЭ ( $7,46 \pm 0,03$  мкм) и СОЭр ( $83,03 \pm 1,69$  мкм<sup>3</sup>). ОРЭ оставалась пониженной (начало гемолиза происходило при  $0,51 \pm 0,02$  % NaCl и завершение — при  $0,47 \pm 0,02$  %;  $p < 0,001$ ). Количество ОФЛ по сравнению с контролем оставалось достоверно низким ( $51,62 \pm 1,79$  %;  $p < 0,001$ ), но в сравнении со 2-й группой (введение  $CCl_4$ ) возросло на 13 % ( $p < 0,001$ ). В то же время, количество ХС не изменилось, в этой связи коэффициент ХС/ФЛ оставался повышенным по отношению к контролю, но при сравнении со 2-й группой отмечалось его снижение. В отношении других показателей НЛ (ТАГ, СЖК, ЭЖК) не отмечалось достоверных отличий от контроля. Анализ фракционного состава ФЛ эритроцитов в период

депривации (табл. 2) показал, что содержание лизоформ ФЛ значительно превышало контрольный уровень. Количество основных структурных компонентов мембран — ФХ и ФЭ — при сравнении с соответствующими показателями 2-й группы (введение  $CCl_4$ ) не изменилось, но было ниже контрольных величин на 9 % ( $p < 0,001$ ) и 17 % ( $p < 0,001$ ) соответственно. Сохранялось повышенным относительно контроля содержание сфингомиелина (СМ) и ФС. Содержание ФИ и ФК приблизилось к норме. Жирно-кислотный состав общих липидов эритроцитов в период депривации (табл. 3) характеризовался снижением суммы насыщенных жирных кислот до 48,07 % за счет кислот 14:0, 16:0, 18:0. Сумма ненасыщенных жирных кислот увеличилась до 51,93 % за счет ПНЖК семейства n-6. Среди ПНЖК семейства n-3 позитивных сдвигов в сторону нормализации их состава не обнаружено. В связи с этим индекс насыщенности оставался достоверно высоким (0,93).

Полученные результаты в период депривации свидетельствуют о сохраняющемся состоянии дестабилизации мембранных структур эритроцитов и продолжающихся свободно-радикальных процессах. В связи с этим для восстановления нарушенных мембранных структур необходимо применение препаратов, содержащих в своем составе липидные составляющие, каким и является предложенный экстракт из туники асцидии.

При анализе физиологических характеристик эритроцитов (СДЭ, СОЭр, ОРЭ) в 4-й группе крыс, получавших в период депривации экстракт из туники асцидии, отмечалась их сопоставимость с контрольными показателями. В то же время, при сравнении этих величин с таковыми в 3-й группе (депривация без препарата) выявлены отличия по всем параметрам. Так, отмечалось снижение СДЭ на 11 % ( $p < 0,001$ ) и СОЭр на 30 % ( $p < 0,001$ ), что составляло  $6,63 \pm 0,09$  и  $58,29 \pm 1,37$  мкм соответственно. Расширились границы устойчивости эритроцитов к гемолизирующему агенту: начало гемолиза происходило при  $0,45 \pm 0,015$  % NaCl, а завершение при  $0,40 \pm 0,01$  % NaCl. Возросло количество ОФЛ до  $58,55 \pm 1,65$  % ( $p < 0,01$ ). При этом содержание ХЛ достоверно снизилось на 9 % ( $p < 0,05$ ), что обусловило снижение коэффициента ХС/ФЛ на 20 % ( $p < 0,001$ ).

Содержание фракций НЛ и ФЛ в эритроцитах крыс 4-й группы (табл. 2) не имело достоверных отклонений от таковых в контроле. Однако при сравнении этих показателей с величинами в 3-й группе отмечается снижение уровня СЖК на 14 % ( $p < 0,05$ ) и повышение количества ЭХС на 23 % ( $p < 0,001$ ). Среди фосфолипидных фракций отмечается повышение ФХ и ФЭ на 8 % ( $p < 0,05$ ) и 16 % ( $p < 0,01$ ) соответственно. Значительно были снижены величины лизофракций этих фосфолипидов в среднем на 24–29 % ( $p < 0,001$ ), и содержание СМ на 19 % ( $p < 0,01$ ).

В жирно-кислотном спектре эритроцитов крыс 4-й группы (табл. 3) количественное соотношение ЖК приближалось к таковому в контрольной группе за некоторым исключением. Так, в семействе n-3 — это

$\alpha$ -линоленовая (18:3) и докозагексаеновая (22:6) кислоты, содержание которых было ниже контрольных значений в среднем на 14–15 % ( $p < 0,05 - 0,01$ ), а в семействе n-6 — это докозатетраеновая кислота (22:4), уровень которой был ниже контроля на 18 % ( $p < 0,001$ ). При введении экстракта в период депривации отмечалось снижение суммы насыщенных ЖК и повышение суммы ненасыщенных ЖК по сравнению с аналогичными величинами при депривации без экстракта (3-я группа). В связи с этим снизился индекс насыщенности до 0,75 (в 3-й группе 0,93). Насыщенность уменьшилась за счет снижения содержания кислот 14:0 на 46 % ( $p < 0,001$ ) и 16:0 на 11 % ( $p < 0,05$ ). Среди мононенасыщенных кислот уменьшилось количество 16:1 n-9 на 36 % ( $p < 0,001$ ). В ряду ПНЖК семейства n-6 обращает на себя внимание повышение уровня кислоты 18:2 на 20 % ( $p < 0,001$ ) и соответственно, повышение величин, образующихся из нее кислот 20:3 и 22:4 почти в 2 раза ( $p < 0,001$ ), а также 20:4 на 12 % ( $p < 0,01$ ). В ряду ПНЖК семейства n-3 отмечалось увеличение содержания кислоты 18:3 на 17 % ( $p < 0,05$ ), а также образующихся из нее кислот 20:5 и 22:6. Явное увеличение доли n-3 ПНЖК в жирнокислотном спектре эритроцитов крыс, получавших экстракт из туники асцидии, позволяет отнести репаративный эффект экстракта именно за счет присутствия в его составе этих кислот.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о выраженном мембранопротекторном действии экстракта из туники асцидии. При этом отмечается восстановление размерных характеристик эритроцитов (СДЭ и СОЭр), расширяется порог устойчивости эритроцитов к гемолизирующему агенту. Принимая во внимание восстановление липидного состава мембран эритроцитов, нормализацию соотношения ХЛ/ФЛ, можно предположить, что экстракт из туники асцидии обладает высоким липидкорректирующим действием за счет встраивания в поврежденные мембраны эритроцитов фосфолипидов и ПНЖК семейства n-3, входящих в состав экстракта. Сочетание высокой биологической активности и низкой токсичности экстракта позволяет говорить о перспективе создания новых эффективных лекарственных средств из морских гидробионтов при токсических повреждениях организма.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Н. Ф. Кушнерова, Ю. А. Рахманин, С. Е. Фоменко и др., *Гиг. и сан.*, № 3, 70–73 (2000).
2. Е. Ю. Добряков, *Автореф. дис. канд. биол. наук*, Владивосток (2004).
3. L. M. Weber, M. Boll, and A. Stampfl, *Crit. Rev. Toxicol.*, **33**(2), 105–136 (2003).
4. A. A. Nava-Ocampo, S. Suster, and P. Muriel, *Eur. J. Clin. Invest.*, **27**(1), 77–84 (1997).
5. P. Muriel, L. Favari, and C. Soto, *Life Sci.*, **52**(7), 647–655 (1993).
6. Ю. И. Добряков, И. И. Брехман, *Валеология: Диагностика, средства и практика обеспечения здоровья*, Сб. науч. тр., Вып. 4, Дальнаука, Владивосток (1996), сс. 83–89.
7. Н. Ф. Кушнерова, Ю. И. Добряков, В. И. Янькова, *Валеология: Диагностика, средства и практика обеспечения здоровья*, Сб. науч. тр., Вып. 4, Дальнаука, Владивосток (2000), сс. 151–155.
8. Н. Ф. Кушнерова, Ю. И. Добряков, Л. Н. Лесникова, Е. Ю. Добряков, *Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты: Сб. науч. тр.*, Вып. 12, РАЕН, Москва (2005), сс. 52–57.
9. К. К. Сидоров, *Токсикология новых промышленных химических веществ*, Медицина, Москва (1973), вып. 3, с. 47.
10. J. Folch, M. Less, and G. H. Sloane-Stanley, *Biol. Chem.*, **226**(1), 497–509 (1957).
11. V. I. Svetachev and V. E. Vaskovsky, *Chromatogr.*, **67**(2), 376–378 (1972).
12. J. S. Amenta, *J. Lipid. Res.*, **5**(2), 270–272 (1964).
13. Г. Берчфилд, Э. Стоппе, *Газовая хроматография в биохимии*, Мир, Москва (1964), с. 620.
14. М. Кейтс, *Техника липидологии*, Мир, Москва (1975), с. 221.
15. А. И. Венгеровский, Е. Л. Головина, М. Ю. Коваленко и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, № 2, 28–30 (1999).
16. А. С. Саратиков, А. В. Ратькин, В. Н. Фролов, В. С. Чучалин, *Вопросы биол., мед. и фарм. химии*, № 2, 43–47 (2004).
17. V. E. Vaskovsky, E. Y. Kostetsky, and I. M. Vasendin, *Chromatogr.*, **114**(1), 129–141 (1975).
18. V. E. Vaskovsky, E. Y., G. Kritchevsky, and A. Yamamoto, *Lipid Chromatogr. Anal.*, № 1, 99–162 (1967).
19. K. Wagner, L. Horhammer, and P. Wolff, *Biochem. Z.*, **334**, 175–184 (1961).
20. V. E. Vaskovsky and N. A. Latyshev, *Chromatogr.*, **115**(1), 246–249 (1975).
21. В. Г. Спрыгин, Н. Ф. Кушнерова, Ю. А. Рахманин, *Гиг. и сан.*, № 3, 57–60 (2003).
22. В. Н. Титов, *Вопр. мед. химии*, **44**(4), 317–330 (1998).
23. E. A. Glende and R. O. Recknagel, *Toxicol Appl. Pharmacol.*, **113**(1), 159–162 (1992).
24. T. Satoh, H. T. Cohen, and A. I. Katz, *Clin. Invest.*, **91**(2), 409–415 (1993).

Поступила 22.06.11

## EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF THE EFFICACY OF PURPLE ASCIDIUM TUNIC EXTRACT FOR ERYTHROCYTE MEMBRANE REPAIR UPON CARBON TETRACHLORIDE INTOXICATION

S. E. Fomenko, N. F. Kushnerova, and L. N. Lesnikova

V. I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far East Branch, Russian Academy of Sciences Vladivostok

Physiological characteristics and a lipid component of erythrocyte membranes have been studied in the case of carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ) intoxication and subsequent correction of related disorders by an aqueous-alcohol extract from tunic of purple ascidium (*Halocynthia aurantium*). It is established that  $\text{CCl}_4$  intoxication leads to an increase in the average volume and diameter of erythrocytes and disturbances in the ratio of phospholipid and neutral lipid fractions and the fatty acid composition of membranes. In the period of deprivation, most of the studied indices remained on a level that has been fixed upon  $\text{CCl}_4$  intoxication. Introduction of an extract from the purple ascidium tunic increases the resistance of erythrocytes to hemolysis and favors retention of the normal ratio of lipid components in the membrane of erythrocytes and their physiological characteristics. The combination of a high biological activity and low toxicity of the obtained extract shows good prospects of creating new effective medicinal preparations from sea hydrobionts for the treatment of toxic damages of the human organism.

**Key words:** Purple ascidium tunic extract, carbon tetrachloride intoxication, erythrocytes, lipids