

С. Е. Фоменко¹, Н. Ф. Кушнерова¹, В. Г. Спрыгин¹,
Е. С. Другова¹, Т. В. Момот²

РЕПАРАЦИЯ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ЛИПИДНОЙ ФРАКЦИЕЙ ИЗ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *SARGASSUM PALLIDUM* ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ЧЕТЫРЕХХЛОРИСТЫМ УГЛЕВОДОРОДОМ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹ Тихоокеанский океанологический институт имени В. И. Ильичева ДВО РАН, Россия, 690041, Владивосток.

² Дальневосточный федеральный университет, Россия, 690950, Владивосток.

* e-mail: fomenko29@mail.ru

Исследовано влияние липидной фракции, выделенной из водно-этанольного экстракта таллома бурой водоросли *Sargassum pallidum*, и коммерческого препарата сравнения “Эссенциале®” на физиологические характеристики эритроцитов крыс и липидный состав эритроцитарных мембран при интоксикации четыреххлористым углеродом (CCl₄). Показано, что интоксикация CCl₄ (50 % раствор в оливковом масле, подкожно 2 мл/кг в течение 4 дней) сопровождалась изменением всех изученных физиологических и биохимических параметров эритроцитов, при этом в период отмены токсиканта данные показатели к норме не возвратились. Введение крысам внутривенно через зонд липидной фракции из экстракта саргассума в дозе 80 мг общих липидов на кг массы в течение 7 дней после интоксикации CCl₄ оказывало мембранопротекторное действие, которое проявлялось в восстановлении размерных характеристик эритроцитов (среднего объема и диаметра), расширении порога их устойчивости к гемолизу, сохранении соотношения липидных компонентов в мембране. Липидная фракция из бурой водоросли *S. pallidum* не уступала препарату сравнения эссенциале в восстановлении физиологических характеристик эритроцитов и липидной составляющей их мембран в условиях повреждающего воздействия CCl₄. Выраженный защитный эффект липидной фракции саргассума в репарации мембран эритроцитов, очевидно, обусловлен сочетанным действием входящих в ее состав “морских” липидов.

Ключевые слова: липидная фракция из *Sargassum pallidum*; мембранопротекторное действие; эссенциале; четыреххлористый углерод; эритроциты; липиды.

В связи с растущим спросом на лекарственные препараты, полученные на основе природного сырья, в последнее время возникает повышенный интерес к гидробионтам морского происхождения, в частности, к водорослям. Морские водоросли — это уникальное самовозобновляемое сырье, способное в короткие сроки формировать большую биомассу, синтезировать химические соединения, обладающие высокой биологической активностью. В состав таллома водорослей входят полисахариды, каротиноиды, полифенолы, минеральные вещества, липиды, аминокислоты и др. [1]. Наиболее интересны в этом отношении бурые водоросли, которые являются важным объектом марикультуры, а также представляют собой ценный пищевой биоресурс [2]. Большинство работ в отечественной и зарубежной литературе посвящено исследованию фармакологических и биомедицинских свойств полисахаридной составляющей бурых водорослей [3], и значительно меньше сведений о других компонентах, входящих в их состав. Среди них значительное место занимает липидная фракция, к которой относятся нейтральные липиды, гликолипиды, фосфолипиды, полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) и др. Важным элементом фосфолипидной фракции морских макрофитов является высокое содержание ПНЖК семейства n-3 и n-6 [4]. Причем запасы ПНЖК в морских водорослях существенно выше, чем в наземных

растениях [5]. Полярные липиды и ПНЖК относятся к одной из наиболее значимых групп биологически активных соединений, обуславливающих фармакологическую ценность морских гидробионтов.

В предыдущих исследованиях нами было установлено, что водно-спиртовые экстракты, выделенные из ряда морских гидробионтов (*Halocynthia aurantium*, *Saccharina japonica*, *Sargassum pallidum*) содержат достаточно высокий процент веществ липидной природы, при этом большая часть относится к категории мембранно-активных компонентов [6–8]. В связи с этим нами был исследован состав липидной фракции, выделенной из водно-этанольного экстракта таллома бурой водоросли *Sargassum pallidum*, для изучения возможности ее применения в качестве источников эссенциальных фосфолипидов для репарации мембран.

Sargassum pallidum (Turner) C. Agardh является широко распространенным видом водорослей, произрастающих в прибрежных водах Японского моря Дальнего Востока. Данный вид относится к отряду бурых водорослей семейства Sargassaceae. *S. pallidum* традиционно используется в странах Юго-Восточной Азии как пищевой продукт с высокой биологической ценностью, а также как сырье для получения препаратов альгиновой кислоты (полисахаридный комплекс). *S. pallidum* в виде водных и спиртовых экстрактов ши-

роко используется в традиционной китайской медицине [9].

Применение препаратов липидной природы, обладающих способностью к репарации мембранных структур, обеспечивает эффективное восстановление функционального состояния организма, нарушенного воздействием повреждающих факторов. В настоящей работе в качестве повреждающего агента был выбран четыреххлористый углерод (CCl_4), являющийся мембранотропным ядом. Для изучения мембранопротекторных свойств липидных комплексов в экспериментальных исследованиях были использованы эритроциты как наиболее доступная и удобная модель.

Целью настоящей работы явилось изучение мембранопротекторных свойств липидной фракции, выделенной из водно-этанольного экстракта таллома бурой водоросли *Sargassum pallidum*, при интоксикации крыс четыреххлористым углеродом.

Экспериментальная часть

Образцы водоросли *S. pallidum* собирали в августе — сентябре 2015 г. в заливе Петра Великого Японского моря (бухта Алексеева, о. Попова). Выборка водорослей составляла 10 талломов. Слоевища очищали от эпифитов и донного бентоса, промывали сначала морской, затем дистиллированной водой. После этого отжимали и погружали в кипящую воду на 2 мин для инактивации ферментов. Обработанные таким способом водоросли сушили до воздушно-сухого состояния. Высушенный таллом измельчали с помощью лабораторной мельницы до размеров частиц 0,5 – 1 мм и экстрагировали 70 % этиловым спиртом методом реперколяции. Выход экстракта составлял 1 л на 1 кг сухого сырья.

Для выделения липидной составляющей экстракта и исследования ее состава экстракт предварительно освобождали от спирта упариванием на роторном испарителе при температуре не выше 37 °С. Полученную маслообразную массу экстрагировали смесью хлороформ — метанол (1:2 по объему) в соответствии с общепринятым методом для выделения липидов из растительного и животного сырья [10]. Общее содержание липидов определяли массовым методом. Стандартизацию липидной композиции экстракта *S. pallidum* проводили по суммарному содержанию полярных липидов (гликолипиды и фосфолипиды), которые являются доминирующей мембранно-активной фракцией и составляют до 52 % липидной композиции.

Количество общих фосфолипидов в экстракте и индивидуальных фракций на хроматограммах определяли спектрофотометрически с помощью универсального молибдатного реактива [11]. Фракционное разделение фосфолипидов осуществляли методом двумерной микротонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагеле [12], а их количественное определение по методу [11]. Общее содержание нейтральных липидов (НЛ) и отдельных фракций определяли по методу [13]. Хроматографическое распределение нейтральных липидов (НЛ) по фракциям проводили методом одномер-

ной ТСХ. Обнаружение пятен нейтральных липидов осуществляли с помощью паров йода. Содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы фосфолипидов и нейтральных липидов соответственно.

Определение жирно-кислотного состава липидной фракции экстракта саргассума проводили методом ГЖХ [14], предварительно липиды подвергали метанолизу с хлористым ацетилом [15]. Метилловые эфиры жирных кислот анализировали на хроматографе “ЛХМ-2000” с пламенно-ионизационным детектором. Жирные кислоты идентифицировали двумя способами: сравнением удерживаемых объемов в исследуемой смеси и с помощью стандартных препаратов метилловых эфиров жирных кислот. Результаты выражали в процентах от суммы всех фракций.

Суммарное содержание общих липидов в экстракте составляло 26 мг на 1 г сухого образца, что согласуется с данными [16] о содержании липидной композиции *S. pallidum* в различные сезоны года. В содержании общих липидов преобладали гликолипиды (41,5 %) и НЛ (48,5 %), на долю полярных фосфолипидов приходилось около 10 % от общей суммы липидов.

Гликолипиды являются обязательным компонентом водорослей *Sargassum sp.* и, наряду с фосфолипидами, являются важным источником полиненасыщенных жирных кислот. В составе НЛ в процентном отношении преобладали триацилглицерины (37,33 %) и свободные стеролы (19,04 %). Остальные фракции НЛ, среди которых были обнаружены диацилглицерины, свободные жирные кислоты и эфиры стеролов, составляли в среднем 9 – 12 % от общего количества НЛ. Фосфолипидный комплекс характеризовался наличием в своем составе 3 известных фосфолипидов, обладающих репаративными свойствами: фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилглицерина (ФГ), фосфатидилинозита (ФИ) и одного редкого фосфолипида — фосфатидил-О-[N-(2-гидроксиэтил)глицина] (ФГЭГ), что согласуется с литературными данными [17]. Важно отметить, что ФГЭГ является обязательным компонентом водорослей рода *Sargassum sp.* и, возможно, берет на себя роль отсутствующего фосфатидилхолина [18].

Из фосфолипидных фракций преобладали ФЭ (48,3 %) и ФГ (28,5 %), которые являются наиболее значимыми структурными компонентами мембран, обеспечивающих функционирование мембранных структур и клеток в целом. На долю других компонентов фосфолипидов — ФИ и ФГЭГ — приходилось 10 – 12 %.

В жирно-кислотном составе общих липидов экстракта *S. pallidum* из насыщенных жирных кислот (НЖК) доминировала пальмитиновая кислота (16:0), ее содержание составляло 22,4 %. Мононенасыщенные жирные кислоты были представлены олеиновой (18:1 n-9) и пальмит-олеиновой (16:1 n-7) кислотами, суммарное содержание которых составляло 13,3 %. Важно отметить, что среди основных идентифицированных жирных кислот преобладали полиненасыщен-

ные жирные кислоты (ПНЖК), их количество составляло около 60 % от общей суммы жирных кислот. Причем именно данный вид *S. pallidum* среди бурых водорослей рода *Sargassum* отличается высоким содержанием ПНЖК семейства n-6 [19]. Их суммарное содержание составляло 41,3 % от общего количества жирных кислот. Главными представителями семейства n-6 являлись арахидоновая (20:4) и линолевая (18:2) кислоты, содержание которых составляло 18 и 15 %, соответственно. При этом линолевая и α -линоленовая (18:3 n-3) кислоты относятся к категории эссенциальных, которые не синтезируются в организме животных и человека и могут быть получены только из пищи. Данные кислоты являются предшественниками других жирных кислот и являются высоко лабильными компонентами фосфолипидов мембран. Из ПНЖК семейства n-3 были идентифицированы 18:3, 18:4, 20:5, их содержание в сумме составляло 18,6 %. При этом отношение n-6/n-3 равно 2,22. Согласно рекомендации ВОЗ, величина данного коэффициента в продуктах питания должна быть меньше 10, чтобы предотвратить расстройства сердечно-сосудистой, гепатобиллиарной, нервной систем и др.

В эксперименте использовали белых крыс-самцов линии Вистар массой 180 – 200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Крысам вводили 50 % масляный раствор CCl_4 подкожно в дорсальную шейную складку из расчета 2 мл/кг в течение 4 дней [20]. На следующий день после последнего введения CCl_4 животные получали внутривенно через зонд липидный комплекс из экстракта саргассума в вазелиновом масле в течение 7 дней в дозе 80 мг общих липидов на 1 кг массы, что соответствует известной терапевтической дозе для препаратов липидной природы [21]. Суммарное содержание мембранно-активной фракции полярных липидов составляло 42 мг в 80 мг липидного комплекса из экстракта саргассума. Выделенный липидный комплекс предварительно освобождали от растворителя упариванием в вакууме, затем доводили вазелиновым маслом до требуемого объема. Разведение проводили таким образом, чтобы доза общих липидов, принятая в данном исследовании, а именно 16 мг на одно животное, содержалась в 0,4 мл полученного разведенного препарата. Контрольным животным вводили вазелиновое масло в сопоставимой дозе. В качестве препарата сравнения использовали известный мембранопротектор “Эссенциале®” (Sanofi), изготовленный на основе фосфатидилхолина соевых бобов, содержащий 76 % (3-sn-фосфатидил)холина (производитель А. Наттерманн энд Сие. ГмБХ, Германия). Эссенциале вводили тем же способом и в той же дозе, что и липидный комплекс из экстракта саргассума. Готовая липидная субстанция на основе продукта экстракции саргассума обладает низкой токсичностью (ЛД₅₀ составляет 2000 мг/кг) и не оказывает вредного влияния при длительном введении в желудок и парентерально, что позволило провести экспериментальные исследования на животных.

Животные были разделены на 5 групп по 10 крыс в каждой: 1-я группа — контроль; 2-я группа — введе-

ние CCl_4 ; 3-я группа — введение CCl_4 с последующей отменой в течение 7 дней; 4-я группа – введение CCl_4 в течение 4 дней с последующим введением липидной фракции *S. pallidum* в течение 7 дней; 5-я группа — введение CCl_4 в течение 4 дней с последующим введением эссенциале 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 имени В. И. Ильичева ДВО РАН (протокол № 10 от 15.03.2016 г.).

Выделение эритроцитов из крови и получение эритроцитарных мембран проводили традиционным способом. Средний объем (СОЭр) и средний диаметр эритроцитов (СДЭ) крови определяли на гематологическом анализаторе “Abacus” (Diatron, Австрия). Осмотическую резистентность эритроцитов (ОРЭ) к изменению концентрации NaCl рассчитывали по методу [22]. Экстракты общих липидов из мембран эритроцитов готовили по методу [10]. Количество общих фосфолипидов в эритроцитах определяли в соответствии с методом [11]. Фракционное разделение фосфолипидов осуществляли методом двумерной ТСХ на силикагеле. Содержание отдельных фракций фосфолипидов выражали в процентах от общей суммы их оптических плотностей. Содержание холестерина в мембране эритроцитов определяли методом одномерной ТСХ [13] и выражали в % от общих липидов. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ InStat 3.0, используя статистическую программу (Graph Pad Software Inc. USA, 2005), включающего функцию проверки соответствия выборки закону нормального распределения. Для определения статистической значимости различий для межгрупповых сравнений в зависимости от параметров распределения использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента или непараметрический *U*-критерий Манна — Уитни.

Результаты и их обсуждение

Введение CCl_4 в течение 4 дней сопровождалось существенными изменениями физиологических параметров эритроцитов и разбалансировкой липидного состава их мембран. Исследование размерных характеристик эритроцитов крыс после воздействия токсиканта (2-я группа) выявило увеличение СДЭ на 37 % ($p < 0,001$) и СОЭр более чем в 2,5 раза ($p < 0,001$) по отношению к контрольным показателям. Резко снизилась ОРЭ к гемолизирующему агенту, при этом начало и окончание гемолиза эритроцитов происходило раньше, чем у контрольных крыс (табл. 1).

Количество общих фосфолипидов (ОФЛ) в мембранах эритроцитов у животных 2-й группы (табл. 1) относительно контроля снизилось на 20 % ($p < 0,001$) при одновременном увеличении содержания холесте-

рина на 26 % ($p < 0,001$). Это обусловило повышение коэффициента холестерин/фосфолипиды (ХС/ФЛ) более чем в 1,5 раза. Увеличение количества ХС связано с активацией его биосинтеза из ацетил-КоА, образующегося при окислении жирных кислот на фоне угнетения их митохондриального окисления под действием CCl_4 [23]. Изменение липидного состава в мембранах эритроцитов и повышение в них отношения ХС/ФЛ приводит к увеличению асимметрии, жесткости и микровязкости эритроцитарных мембран и, соответственно, снижается текучесть и способность к деформации клеток красной крови в микроциркулярном русле [24].

Изменения в фосфолипидном спектре эритроцитарных мембран после интоксикации CCl_4 сопровождались увеличением количества лизофосфатидилхолина (ЛФХ) на 27 % ($p < 0,001$) и лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ) на 5 % ($p < 0,05$) (табл. 2), что обусловлено активацией фосфолипазы A_2 под действием CCl_4 [23]. Одновременно отмечалось снижение содержания основного структурного компонента мембран — фосфатидилхолина (ФХ) на 5 % ($p < 0,05$). Известно, что CCl_4 преобразуется в микросомах печени с участием системы цитохром Р-450 в трихлорметил- и трихлорметилпероксил радикалы. Эти радикалы являются высоко реактивными и способны связываться с ПНЖК из мембранных фосфолипидов, приводя к липидной перекисидации клеточных мембран и образованию гетерогенного пула окисленных фосфолипидов [25]. При этом окисление и разрушение ПНЖК фосфолипидов вызывает уменьшение количества фосфолипидных фракций. В данном случае снижается не только содержание ФХ, но и фосфатидилинозита (ФИ) на 28 % ($p < 0,001$) и фосфатидной кислоты (ФК) на 45 % ($p < 0,001$), которые имеют важное значение для функционирования мембраносвязанного фермента $Na^+K^+-ATPазы$ [26]. Обращает на себя внимание факт повышения содержания сфингомиелина (СМ) на 26 % ($p < 0,001$), что может быть адаптивной реакцией организма для повышения жесткости мембран и снижения, тем самым, их проницаемости [27].

Таким образом, CCl_4 вызывает разбалансировку фосфолипидного состава эритроцитарных мембран,

что сопровождается нарушением их проницаемости, размерных характеристик эритроцитов и, как следствие, функциональных свойств.

Через 7 дней после отмены CCl_4 (3-я группа) в эритроцитах крыс отклонения от контроля отмечались по многим показателям. Сохранились повышенными величины СДЭ на 19 % ($p < 0,001$) и СОЭр на 68 % ($p < 0,001$), и пониженной ОРЭ (табл. 1). Количество ОФЛ по сравнению с контролем оставалось достоверно низким (снижение на 25 %; $p < 0,001$), при этом в сравнении с показателями 2-й группы (введение CCl_4) оно снизилось еще значительно. В то же время количество холестерина было выше контрольных значений на 19 % ($p < 0,001$), в связи с этим коэффициент ХС/ФЛ оставался таким же достоверно высоким, как и во 2-й группе крыс.

Анализ фракционного состава фосфолипидов эритроцитарных мембран в период отмены CCl_4 (табл. 2) показал, что содержание ФХ оставалось все также ниже контрольного уровня, а количество ЛФХ при сравнении с соответствующими показателями 2-й группы (введение CCl_4) практически не изменилось и было выше контрольных показателей на 28 % ($p < 0,001$). Это свидетельствует о сохранении высокой активности фосфолипаз даже в отсутствие экзогенного поступления токсиканта. Также достоверно повышенным относительно контроля было содержание СМ (на 12 %) и пониженными показатели ФИ (на 18 %) и ФК (на 37 %). Полученные данные в период отмены CCl_4 свидетельствуют о сохраняющемся состоянии дестабилизации мембранных структур эритроцитов.

Для восстановления функциональной целостности мембран и их проницаемости в условиях повреждающего воздействия токсиканта необходимо применение липидных препаратов, обладающих репаративными свойствами, каким и является, по нашему мнению, предложенный липидный комплекс из *S. pallidum*.

Изучение физиологических характеристик эритроцитов (СДЭ, СОЭр, ОРЭ) в 4-й группе крыс (табл. 1), получавших в период отмены липидный комплекс из *S. pallidum*, показало их сопоставимость с контроль-

Таблица 1
Влияние интоксикации CCl_4 и периода отмены на физиолого-биохимические характеристики эритроцитов крыс и их коррекция липидной фракцией из экстракта саргассума и эссенциале ($M \pm m$)

Показатель	1 группа, контроль (интактные)	2 группа, CCl_4	3 группа, отмена CCl_4	3 группа, отмена CCl_4 + саргассум	5 группа, отмена CCl_4 + эссенциале
СДЭ, мкм	6,00 ± 0,02	8,24 ± 0,04 ³	7,14 ± 0,02 ³	6,07 ± 0,03 ^В	6,12 ± 0,02 ^{3, В}
СОЭр, мкм ³	43,20 ± 0,80	111,90 ± 3,19 ³	72,80 ± 1,12 ³	44,72 ± 1,00 ^В	45,84 ± 0,94 ^{1, В}
Осмотическая резистентность, % NaCl	0,45 ± 0,01	0,55 ± 0,01 ³	0,50 ± 0,02 ¹	0,44 ± 0,02 ^В	0,47 ± 0,01 ^В
	0,35 ± 0,01	0,50 ± 0,01 ^В	0,45 ± 0,01 ¹	0,35 ± 0,01 ^В	0,36 ± 0,01 ^В
ОФА, % от общих липидов	62,74 ± 1,22	50,38 ± 1,54 ³	46,87 ± 1,63 ³	60,00 ± 1,51 ^В	58,68 ± 1,31 ^{1, В}
Холестерин, % от общих липидов	22,80 ± 0,56	28,62 ± 0,73 ³	27,11 ± 0,68 ³	23,91 ± 0,35 ^В	24,68 ± 0,471 ^{1, В}
Холестерин/фосфолипиды	0,36 ± 0,02	0,57 ± 0,01 ³	0,58 ± 0,02 ³	0,40 ± 0,02 ^В	0,42 ± 0,02 ^{1, В}

Здесь и в табл. 2: различия статистически достоверны при: ^{1,а} $p < 0,05$; ^{2,б} $p < 0,01$; ^{3,в} $p < 0,001$. Цифры справа — сравнение с контрольной группой, буквы справа — сравнение с группой 3.

ными показателями. В то же время при сравнении этих величин с таковыми в 3-й группе (отмена без препарата) выявлены достоверные отличия по всем параметрам. Так отмечалось снижение СДЭ на 15 % ($p < 0,001$) и СОЭр на 39 % ($p < 0,001$), расширились границы устойчивости эритроцитов к гемолизирующему агенту (табл. 1). Возросло количество ОФЛ на 28 % ($p < 0,001$), при этом содержание холестерина достоверно снизилось на 12 % ($p < 0,001$), что обусловило снижение коэффициента ХС/ФЛ на 31 % ($p < 0,001$).

Содержание фосфолипидных фракций в эритроцитах крыс 4-й группы (табл. 2) не имело достоверных отклонений от такового в контроле. При этом отмечалось увеличение уровня ФХ до контрольных значений на фоне нормализации содержания его лизофракций. При сравнении этих показателей с величинами в 3-й группе (отмена токсиканта) выявлено снижение величины ЛФХ на 19 % ($p < 0,001$), повышение уровня ФИ на 12 % ($p < 0,01$) и ФК на 60 % ($p < 0,001$), что подразумевает снижение активности фосфолипаз. Полученные результаты фракционного состава фосфолипидов и размерных характеристик эритроцитов под действием липидного комплекса из *S. pallidum* указывают на восстановление физиолого-биохимических характеристик эритроцитов.

В 5-й группе сравнения (эссенциале) изменения изученных биохимических показателей носили аналогичную направленность, что и у животных 4-й группы (саргассум), однако некоторые показатели имели достоверные отличия от контроля. Так, СОЭр превышал контрольные величины на 6 % ($p < 0,05$), а осмотическая резистентность эритроцитов оставалась пониженной. Содержание холестерина сохранялось на уровне, превышающем контроль (на 8 %; $p < 0,05$) на фоне пониженного содержания ОФЛ (на 7 %; $p < 0,05$). В результате отношение ХС/ФЛ было достоверно выше контрольных показателей (на 16 %; $p < 0,05$), что указывает на сохранение повышенной жесткости липидного бислоя эритроцитарных мембран. В содержании фосфолипидных фракций также наблюдались достоверные отклонения: уровень ЛФХ превышал контрольные значения на 9 % ($p < 0,05$), а количество ФИ и ФК было ниже контрольных вели-

чин, соответственно, на 15 % ($p < 0,001$) и 17 % ($p < 0,05$).

На основании полученных результатов можно сделать заключение о том, что по сравнению с липидным комплексом из бурой водоросли *S. pallidum*, эталонный препарат “Эссенциале” оказался менее эффективным в восстановлении физиологических показателей эритроцитов и липидной составляющей их мембран в условиях повреждающего воздействия CCl_4 . Липидная фракция из экстракта *S. pallidum* в этих условиях проявила выраженные мембранопротекторные свойства.

В основе мембранопротекторного и липидкорригирующего действия липидной фракции из экстракта *S. pallidum* лежит способность фосфолипидов и ПНЖК, входящих в ее состав, при поступлении в организм встраиваться в поврежденные под действием CCl_4 мембраны эритроцитов и нормализовать их функциональную активность. Благодаря этому происходит восстановление фосфолипидного состава мембран эритроцитов, нормализуется отношение ХС/ФЛ, что и обуславливает восстановление размерных характеристик эритроцитов (СДЭ и СОЭр), расширение порога устойчивости эритроцитов к гемолизирующему агенту.

Известно, что фосфолипиды, богатые ПНЖК, в особенности эссенциальными жирными кислотами, имеют высокую биодоступность вследствие прямой абсорбции либо реацилирования абсорбированных лизофракций фосфолипидов [28]. В кровяном русле фосфолипиды встраиваются в ЛПВП. Обнаружено избирательное накопление фосфолипидов клетками печени в первые 24 – 48 ч после введения животным [29]. В свою очередь, эритроциты адсорбируют на своей поверхности липопротеиды плазмы крови в форме ЛПВП, ЛПНП и ЛПОНП. Между мембранами эритроцитов и компонентами липидного спектра сыворотки крови постоянно происходит обмен, поэтому встраивание фосфолипидов в мембраны эритроцитов с последующим изменением их параметров является вполне закономерным [29].

Репарацию поврежденных участков клеточных мембран могут взять на себя именно фосфолипиды, поступившие в организм в составе липидного комплекса из *S. pallidum*, за счет встраивания в мембраны

Таблица 2

Влияние интоксикации CCl_4 и периода отмены на содержание фосфолипидных фракций в мембранах эритроцитов крыс и их коррекция липидной фракцией из экстракта саргассума и эссенциале (в % от суммы всех фракций; $M \pm m$)

Фракция	1 группа, контроль (интактные)	2 группа, CCl_4	3 группа, отмена CCl_4	4 группа, отмена CCl_4 + саргассум	5 группа, отмена CCl_4 + эссенциале
ФХ	36,00 ± 0,50	34,16 ± 0,49 ¹	34,63 ± 0,41 ¹	35,98 ± 0,67	35,71 ± 0,59
ЛФХ	10,31 ± 0,39	13,12 ± 0,47 ³	13,20 ± 0,38 ³	10,65 ± 0,12 ^b	11,28 ± 0,18 ^{1, b}
СМ	10,24 ± 0,39	12,86 ± 0,58 ²	11,50 ± 0,38 ¹	10,90 ± 0,13	11,05 ± 0,22
ФЭ	24,70 ± 0,46	23,52 ± 0,53	24,00 ± 0,48	24,39 ± 0,31	24,72 ± 0,41
ЛФЭ	6,16 ± 0,18	6,49 ± 0,17 ¹	6,25 ± 0,18	6,07 ± 0,10	6,11 ± 0,11
ФС	4,52 ± 0,15	4,42 ± 0,21	4,27 ± 0,11	4,40 ± 0,08	4,33 ± 0,09
ФИ	5,67 ± 0,16	4,10 ± 0,11 ³	4,65 ± 0,12 ³	5,20 ± 0,18 ^b	4,80 ± 0,07 ³
ФК	2,40 ± 0,15	1,33 ± 0,08 ³	1,50 ± 0,10 ³	2,41 ± 0,05 ^b	2,00 ± 0,06 ^{1, b}

эритроцитов и, тем самым, восстановления их функциональной активности. Полиненасыщенные жирные кислоты липидного комплекса *S. pallidum* также выполняют мембрано-репарирующую функцию, встраиваясь в поврежденные мембраны эритроцитов. Включение ПНЖК в молекулы лизофосфолипидов происходит по известному механизму их рециклирования ацил-КоА при участии ацилтрансферазы. Таким образом может происходить обновление окисленных жирных кислот за счет включения в клеточные мембраны полиненасыщенных жирных кислот липидной фракции из водоросли *S. pallidum*.

Таким образом, выраженный защитный эффект экстракта из саргассума на физиологические характеристики эритроцитов крыс и липидный состав эритроцитарных мембран при интоксикации CCl_4 обусловлен действием липидного комплекса и, главным образом, содержащихся в нем фосфолипидов “морского” происхождения и ПНЖК семейства n-3 и n-6. Сочетание высокой биологической активности и низкой токсичности водорослевого экстракта позволяет говорить о перспективе создания и использования новых эффективных фармакологических средств природного происхождения из *S. pallidum*.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. J. Smit, *J. Appl. Phycol.*, **16**, 245 – 262 (2004).
2. В. Г. Спрыгин, Н. Ф. Кушнерова, С. Е. Фоменко и др., *Биология моря*, **39**(1), 50 – 54 (2013).
3. H. R. Raghavendran, A. Sathivel, and T. Devaki, *Mol. Cell. Biochem.*, **276**(1 – 2), 89 – 96 (2005).
4. N. M. Sanina, S. N. Goncharova, and E. Y. Kostetsky, *Phytochemistry*, **65**(6), 721 – 730 (2004).
5. V. J. T van Ginneken, J. Helsper, and W. de Visser, et al., *Lipids in Health and Disease*, **10**(1), 104 – 112 (2011).
6. S. E. Fomenko, N. F. Kushnerova, and L. N. Lesnikova, *Pharm. Chem. J.*, **46**(10), 606 – 611 (2013).
7. В. Г. Спрыгин, Н. Ф. Кушнерова, С. Е. Фоменко, Л. А. Сизова, *Известия Самарского науч. центра РАН*, **14**(1), 2299 – 2302 (2012).

8. S. E. Fomenko, N. F. Kushnerova, and V. G. Sprygin, *J. Stress Physiol. Biochem.*, **12**(4), 15 – 22 (2016).
9. L. Liu, M. Heinrich, S. Myers, and S. A. Dworjanyn, *J. Ethnopharmacology*, **142**(3) 591 – 619 (2012).
10. J. Folch, M. Less, and G. H. Sloane-Stanley, *Biol. Chem.*, **226**, 497 – 509 (1957).
11. V. E. Vaskovsky, E. Y. Kostetsky, and I. M. Vasendin, *J. Chromatogr.*, **114**(1), 129 – 141 (1975).
12. V. I. Svetachev, and V. E. Vaskovsky, *J. Chromatogr.*, **67**, 376 – 378 (1972).
13. J. S. Amenta, *J. Lipid. Res.*, **5**(2), 270 – 272 (1964).
14. Г. Берчфилд, Э. Сторр, *Газовая хроматография в биохимии*, Мир, Москва (1964).
15. М. Кейтс, *Техника липидологии*, Мир, Москва (1975).
16. N. Gerasimenko and S. Logvinov, *Open J. Marine Sci.*, No 6, 498 – 523 (2016).
17. E. Y. Kostetsky, S. N. Goncharova, N. M. Sanina, and V. L. Shnurov, *Botanica Marina*, **47**, 134 – 139 (2004).
18. S. N. Goncharova, E. Y. Kostetsky, and N. M. Sanina, *Rus. J. Plant Physiol.*, **51**(2), 169 – 175 (2004).
19. S. V. Khotimchenko, *Lipids of marine Macrophytic Algae and Grasses: Structure, Distribution, Analysis*, Dalnauka, Vladivostok (2003).
20. А. И. Венгеровский, И. В. Маркова, А. С. Саратиков, *Ведомости фарм. комитета*, № 2, 9 – 12 (1999).
21. А. С. Саратиков, А. В. Ратькин, В. Н. Фролов, В. С. Чучалин, *Вопросы биол., мед. и фарм. химии*, № 2, 43 – 47 (2004).
22. Б. Л. Эндриу, *Экспериментальная физиология*, Мир, Москва (1972).
23. M. Boll, L. W. Weber, E. Becker, and A. Stampfl, *Z. Naturforsch.*, **56**(7 – 8), 649 – 665 (2001).
24. B. Fadeel, and D. Xue, *Critical Rev. Biochem. Molec. Biol.*, **44**, 264 – 277 (2009).
25. M. K. Manibusan, M. Odin, and D. A. Eastmond, *J. Environ. Sci. Health. C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, **25**(3), 185 – 209 (2007).
26. F. Akyuz, O. Aydin, T. A. Demir, et al., *Biol. Trace Elem. Res.*, **132**(1 – 3), 207 – 214 (2009).
27. J. Reichen, J. T. M. Buters, Z. Sojicic, et al., *Experientia*, **48**(5), 482 – 486 (1992).
28. А. О. Буеверов, В. С. Ешану, М. В. Маевская и др., *Клин. перспективы гастроэнтерол., гепатол.*, **1**, 17 – 22 (2008).
29. С. А. Курилович, М. В. Кручинина, А. А. Громов и др., *Эксперим. и клин. гастроэнтерол.*, **11**, 46 – 52 (2010).

Поступила 27.11.17

REPAIR OF ERYTHROCYTE MEMBRANES WITH LIPID FRACTION FROM BROWN ALGAE *SARGASSUM PALLIDUM* IN EXPERIMENTAL TOXIC HEPATITIS

S. E. Fomenko^{1*}, N. F. Kushnerova¹, V. G. Sprygin¹, E. S. Drugova¹, and T. V. Momot²

¹ V. I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia

² Far-Eastern Federal University, Vladivostok, 690950 Russia

* e-mail: fomenko29@mail.ru

We have studied the influence of lipid fraction isolated from aqueous ethanol extract of brown algae *Sargassum pallidum* and commercial reference preparation “EssentialeR” on the physiological characteristics of rat erythrocytes and the lipid composition of erythrocyte membrane in animals upon carbon tetrachloride (CCl_4) induced toxic injury. It was found that the intoxication with CCl_4 (50% solution in olive oil, subcutaneously in a dose 2 mL/kg for 4 days) was followed by changes in all physiological and biochemical parameters of erythrocytes, but the withdrawal of toxicant did not restore to the normal level of indicators. Administration of the lipid fraction of *S. pallidum* extract to rats intragastrically through a probe in a dose of 80 mg/kg for 7 days after CCl_4 intoxication produced membrane-protective effect, which was manifested by restoration of the erythrocyte dimensions (average volume and diameter), increase in the threshold of stability at hemolysis, and retention of the ratio of lipid constituents in membrane. Lipid fraction of brown algae *S. pallidum* was comparable in efficiency to “EssentialeR” preparation in restoration of the physiological characteristics of erythrocytes and lipid constituent of their membranes upon CCl_4 induced damage. The pronounced effect of *S. pallidum* lipid fraction is evidently determined by combined action of “marine” lipids in this composition.

Keywords: *Sargassum pallidum*; lipid fraction; membrane-protective effect; essentiale; carbon tetrachloride; erythrocytes; lipids.