

УДК 577.121+615.324

ВЛИЯНИЕ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА ЭКСТРАКТА ИЗ МОРСКОЙ КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ *Ahnfeltia tobuchiensis* (KANNO et MATSUBARA) МАКИЕНКО НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЛАЗМЫ КРОВИ И МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СТРЕССЕ

© 2020 г. Н. Ф. Кушнерова¹, *, С. Е. Фоменко¹, В. Г. Спрыгин¹, Т. В. Момот²

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

²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток 690950, Россия

*e-mail: nkushnerova@poi.dvo.ru

Поступила в редакцию 20.05.2019 г.

После доработки 10.10.2019 г.

Принята к публикации 28.11.2019 г.

Исследовано влияние липидного комплекса, выделенного из водно-спиртового (70%) экстракта морской красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis*, и коммерческого препарата “Эссенциале” на биохимические показатели плазмы крови и мембран эритроцитов мышей при экспериментальном стрессе (вертикальная фиксация за дорсальную шейную складку). Фармакологический эффект липидного комплекса *A. tobuchiensis* проявлялся в снятии дислипидемии и гиперхолестеринемии, что сопровождалось снижением содержания общих липидов, липопротеинов низкой плотности, а также увеличением содержания липопротеинов высокой плотности в плазме крови, нормализацией соотношения холестерина/фосфолипиды и фосфолипидного состава мембран эритроцитов. По эффективности экстракт анфельции не уступал эталонному препарату “Эссенциале”, а по способности восстанавливать липидный состав крови и соотношению фосфолипидных фракций в мембранах эритроцитов превосходил таковой. Фармакологический эффект липидного комплекса анфельции обусловлен действием входящих в его состав фосфолипидных фракций и полиненасыщенных жирных кислот семейств n-6 и n-3, которые способствуют утилизации холестерина из мембран и восстановлению соотношения липопротеинов в пользу увеличения липопротеинов высокой плотности, а также участвуют в репарации мембран эритроцитов.

Ключевые слова: *Ahnfeltia tobuchiensis*, стресс, кровь, эритроциты, липопротеины, холестерин, фосфолипиды

DOI: 10.31857/S0134347520040051

Морские водоросли представляют собой важный биоресурс для получения пищевых продуктов и фармакологических препаратов. Они являются объектом марикультуры, так как служат богатым источником биологически активных соединений, среди которых полисахариды, липиды, полифенолы, белки, витамины, минералы и др. Полисахариды из морских гидробионтов получили широкое применение для профилактики и лечения дислипидемий (Крыжановский и др., 2016; Аминина, 2017), а также как иммуномодулирующие и противовоспалительные средства (Запорожец, Беседнова, 2007). С этой целью широко используются препараты из бурых водорослей *Saccharina japonica*, *Fucus distichus* subsp. *evanescens* и других видов. Экстракты из *S. japonica* и *Sargassum pallidum*, обогащенные полифенольными соединениями, оказывали выраженное антиоксидантное

и гепатопротекторное действие при экспериментальных гепатозах (Спрыгин и др., 2013, 2017). Липидный комплекс представляет одну из наиболее значимых групп биологически активных веществ, характеризующих фармакологическую ценность водорослей, так как в своем составе содержит метаболиты для биохимических реакций: моно-, ди- и триацилглицерины, гликолипиды, полярные липиды, эссенциальные фосфолипиды и полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) семейств n-6 и n-3 (Гончарова и др., 2004; Sanina et al., 2008; Имбс и др., 2009). Недостаток этих компонентов в повседневном питании, а также нарушения метаболических реакций липидного обмена при воздействии на организм различных стрессовых факторов (физические, химические, психоэмоциональные и др.) могут приводить к развитию широкого спектра заболеваний (атеро-

склероз, гипертония, язвы желудочно-кишечного тракта и др.). Известно, что липидная фракция экстракта из морской зеленой водоросли *Ulva lactuca* при экспериментальном стрессе оказывала выраженное профилактическое действие, которое проявлялось в сохранении липидного обмена печени, ее антиоксидантной защиты, а также в снижении уровня перекисного окисления липидов (Фоменко и др., 2016). Одним из наиболее богатых сырьевых источников липидных комплексов являются красные водоросли, в том числе широко распространенный вид *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara) Makienko. Она относится к отделу красных водорослей Rhodophyta порядку анфельциевых Ahnfeltiales семейству Ahnfeltiaceae. Это многолетнее жесткое кустистое плотнохрящеватое растение высотой до 10 см от темного буровато-красного до почти черного цвета (Титлянов, Титлянова, 2012). *A. tobuchiensis* формирует пласт толщиной от 10 см до 1 м над илистым и илисто-песчаным дном на глубине от 2 до 30 м. В талломе *A. tobuchiensis* содержится высокий процент веществ липидной природы. Фосфолипидный состав представлен фосфатидилхолином, фосфатидилглицерином, фосфатидилэтаноламином и фосфатидилинозитом (Хотимченко, 2003; Гончарова и др., 2004). Важным элементом гликолипидной и фосфолипидной фракции является высокое содержание ПНЖК семейств n-6 и n-3 (арахионовая, эйкозапентаеновая, докозагексаеновая жирные кислоты) (Khotimchenko, Vaskovsky, 1990; Хотимченко, 2003; Sanina et al., 2004), что может обуславливать высокую фармакологическую активность липидного комплекса.

В настоящее время в экспериментальных исследованиях на лабораторных животных в качестве модели стресса применяют вертикальную фиксацию за дорсальную шейную складку (Кушнерова и др., 2005). В данной модели проявляются все атрибуты стресса (гипертрофия надпочечников, инволюция тимуса и селезенки, изъязвления слизистой желудка и кишечника), а также метаболические нарушения в крови и печени, обусловленные активацией радикальных реакций и перекисного окисления липидов. В результате изменяется соотношение липидных компонентов мембран и повышается их проницаемость (Момот и др., 2016). Таким образом, липидная составляющая мембран эритроцитов является тонким показателем, определяющим состояние мембран других клеток органов и тканей на уровне организма (Эндакова и др., 2002). Все это предполагает стресс-протекторное действие липидного комплекса красных водорослей, обусловленное репарацией мембранных структур. Однако анфельция как сырье для получения лекарственных препаратов и биологически активных добавок в фармацевтической промышленности не используется, хотя применяется для получения агар-ага-

ра и йода. В настоящее время в качестве средств, восстанавливающих структуру мембран, используют коммерческий препарат “Эссенциале®” форте Н (Sanofi, Франция), в составе которого содержится фосфатидилхолин соевых бобов в комбинации с линолевой, линоленовой и олеиновой жирными кислотами. Из-за высокой стоимости данный зарубежный препарат малодоступен для большей части населения, поэтому очевидна необходимость поиска местного природного сырья для импортозамещения, которым и может быть липидный комплекс анфельции.

Цель настоящей работы – изучение влияния липидного комплекса экстракта морской красной водоросли *A. tobuchiensis* на липидный состав крови и мембран эритроцитов при экспериментальном стрессе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Образцы водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* (100 талломов) собирали в летний период в б. Дарагана (о-в Попова, зал. Петра Великого Японского моря), тщательно очищали от эпифитов и частиц песка, промывали сначала морской, а затем дистиллированной водой и сушили при температуре не менее 50°C. Высушенный таллом измельчали с помощью лабораторной мельницы до частиц размером 0.5–1.0 мм и экстрагировали 70% этиловым спиртом в объемном соотношении 1 : 2 (сырье : экстрагент). Данный способ переработки морских водорослей позволяет извлекать основную часть липидного комплекса без полисахаридной составляющей (Спрыгин и др., 2012). При определении количественного состава экстракта среди биологически активных фракций доминирующей была липидная фракция, поэтому стандартизацию экстракта из анфельции проводили по суммарному содержанию липидов и дозу вводимого препарата рассчитывали в миллиграммах общих липидов на 1 кг массы тела животного. В липидном комплексе экстракта анфельции гликолипиды составляли 30.3%, нейтральные липиды – 44.0% и фосфолипиды – 25.7% (табл. 1). Среди нейтральных липидов преобладали триацилглицерины. В составе липидного комплекса также присутствовали моноацилглицерины + диацилглицерины, свободные жирные кислоты, свободные стеринны и эфиры стериннов. Фосфолипидный комплекс характеризовался наличием в своем составе четырех известных представителей класса фосфолипидов, обладающих репаративными свойствами: фосфатидилхолина, фосфатидилглицерина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилинозита. В составе жирных кислот присутствовали насыщенные кислоты ($26.50 \pm 0.32\%$), моноеновые кислоты ($24.86 \pm 0.53\%$), представители семейства n-6 линолевая и арахидоновая кислоты ($27.94 \pm 0.38\%$), а также семейства n-3 линоленовая

Таблица 1. Химический состав липидного комплекса экстракта морской красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis*

Биохимические параметры	Значение
Общие липиды, мг/г сухой ткани	15.35 ± 0.22
Общие фосфолипиды, мг/г сухой ткани	3.95 ± 0.23
Общие нейтральные липиды, мг/г сухой ткани	6.76 ± 0.43
Общие гликолипиды, мг/г сухой ткани	4.64 ± 0.34
Фракции нейтральных липидов, % от суммы всех фракций	
Диацилглицерины + моноацилглицерины	15.16 ± 0.56
Свободные стеринны	13.21 ± 0.89
Свободные жирные кислоты	13.31 ± 0.38
Триацилглицерины	43.45 ± 2.35
Эфиры стериннов	10.95 ± 0.44
Остаточная фракция	3.92 ± 0.25
Фракции фосфолипидов, % от суммы всех фракций	
Фосфатидилхолин	64.80 ± 1.72
Фосфатидилглицерин	20.85 ± 1.62
Фосфатидилэтанолламин	8.20 ± 0.12
Фосфатидилинозит	6.15 ± 0.13
Жирная кислота, % от суммы всех жирных кислот	
Миристиновая (14:0)	2.00 ± 0.17
Пальмитиновая (16:0)	19.53 ± 0.65
Стеариновая (18:0)	4.97 ± 0.14
Пальмитолеиновая (16:1 n-9)	3.70 ± 0.11
Цис-вакценовая (18:1 n-7)	1.50 ± 0.03
Олеиновая (18:1 n-9)	19.66 ± 1.68
Линолевая (18:2 n-6)	1.70 ± 0.07
Арахидоновая (20:4 n-6)	26.24 ± 0.68
Линоленовая (18:3 n-3)	0.50 ± 0.02
Эйкозапентаеновая (20:5 n-3)	20.20 ± 0.43

Примечание. Здесь и в табл. 2 приведена средняя ± ошибка средней.

и эйкозапентаеновая кислоты (20.70 ± 0.33%). Количественные характеристики фосфолипидов и жирных кислот экстракта согласуются с литературными данными (Хотимченко, 2003; Гончарова и др., 2004; Sanina et al., 2008).

Эксперимент проводили на беспородных мышах-самцах с массой тела 25–27 г, содержащихся в стандартных условиях вивария и на стандартном рационе питания. Острый стресс моделировали при вертикальной фиксации животных за дорсальную шейную складку в течение 24 ч. Контрольных животных содержали в стандартных условиях вивария. Препараты вводили в желудок через зонд дважды: непосредственно перед вертикальной фиксацией и через 6 ч после первого введения. Перед введением липидный комплекс водоросли разводили в вазелиновом масле таким образом, чтобы необходимая доза исследуемого препарата (2 мг на особь массой 25 г) содержалась

в 0.2 мл. Это соответствует известной дозе препарата сравнения “Эссенциале®” (80 мг/кг) в экспериментальных исследованиях на животных (Саратиков и др., 2004). Животным контрольной группы и группы “стресс” вводили одинаковый объем медицинского вазелинового масла, которое является химически инертным и не оказывает влияния на результаты эксперимента (Саратиков и др., 2004).

В ходе исследования были выделены четыре группы по 10 животных: 1-я группа – контроль, 2-я группа – стресс (вертикальная фиксация), 3-я группа – “стресс” + липидный комплекс анфельции и 4-я группа – “стресс” + “Эссенциале”. Животных выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом.

Плазму крови и эритроциты выделяли общепринятым методом центрифугирования (Новгородцева и др., 2003). Для получения мембранной

массы эритроциты вносили в дистиллированную воду, где происходил их полный гемолиз. Содержание общего холестерина, общих фосфолипидов и липопротеинов в плазме крови определяли с помощью диагностических наборов “Ольвекс-диагностикум” (Россия). Экстракты общих липидов из плазмы крови и мембран эритроцитов готовили по методу Фольча (Folch et al., 1957). Количество общих липидов в экстракте определяли весовым методом. Суспензию силикагеля марки “КСК”, а также пластинки размером 6×6 см для двумерной микротонкослойной хроматографии фосфолипидов и нейтральных липидов готовили по методу Светашева и Васковского (Svetachev, Vaskovsky, 1972). Для фракционного разделения фосфолипидов использовали системы растворителей, описанные Роузером (Rouser et al., 1967). Для обнаружения холинсодержащих фосфолипидов (фосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин, сфингомиелин) использовали реактив Драгендорфа (Wagner et al., 1961); липиды проявлялись в виде оранжевых пятен на желтом фоне. Для обнаружения фосфолипидов, содержащих аминокетильную группу (фосфатидилэтанолламин, лизофосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин), пластинки опрыскивали 5% раствором нингидрина в ацетоне (Rouser et al., 1967) и нагревали в течение 2–3 мин над парами воды до появления розовых пятен на белом фоне. Фосфолипиды, содержавшие гидроксильные группы (фосфатидилинозит), обнаруживали с помощью периодатного реактива Шиффа (Кейтс, 1975); пятна липидов имели розово-сиреневый цвет. Для проявления всех фосфолипидных фракций применяли молибдатный реактив (Vaskovsky et al., 1975) и реагент на основе малахитового зеленого (Vaskovsky, Latyshev, 1975). При этом липиды проявлялись в виде синих или зеленых пятен на белом фоне. Для количественного определения фракций использовали 10% раствор серной кислоты в метаноле с последующим нагреванием. Содержание отдельных фракций фосфолипидов и общих фосфолипидов рассчитывали, как предложено ранее (Vaskovsky et al., 1975). Фракционное разделение нейтральных липидов для выделения фракции холестерина в липидном экстракте из мембран эритроцитов осуществляли с помощью метода одномерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле (Amenta, 1964). Содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы фосфолипидов и нейтральных липидов соответственно.

Количественные данные обрабатывали с использованием статистического пакета InStat 3.0 (GraphPad. Software Inc. USA, 2005) со встроенной процедурой проверки соответствия выборки закону нормального распределения. Для определения статистической значимости различий в зависимости от параметров распределения использовали пара-

метрический *t*-критерий Стьюдента или непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При вертикальной фиксации животных за дорсальную шейную складку в течение 24 ч масса надпочечников увеличилась на 53% (3.17 ± 0.03 мг по сравнению с 2.07 ± 0.02 мг в контроле, $p < 0.001$), масса селезенки снизилась на 29% (0.15 ± 0.01 мг по сравнению с 0.21 ± 0.01 мг в контроле, $p < 0.01$) и появились язвенные поражения слизистой оболочки желудка (2.6 ± 0.1 шт/животное, в контроле – 0); эти признаки являются известными атрибутами стресса.

Влияние стресса сопровождалось изменением биохимических показателей в плазме крови и мембранах эритроцитов (табл. 2), которые характеризовались увеличением содержания общих липидов в 1.5 раза ($p < 0.001$) и общего холестерина на 49% ($p < 0.01$) при одновременном снижении содержания общих фосфолипидов на 15% ($p < 0.001$). Это обусловило увеличение соотношения холестерин/фосфолипиды на 74% ($p < 0.001$), которое является показателем развития гиперхолестеринемии. Содержание липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) снизилось на 40% ($p < 0.001$) при одновременном увеличении концентрации липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) на 36% ($p < 0.01$). Таким образом, при стрессе формировалась выраженная картина дислипидемии.

При стрессе в мембранах эритроцитов изменялось соотношение липидных составляющих. В эритроцитарных мембранах воздействие стресса сопровождалось снижением содержания фосфатидилхолина (ФХ) на 10% ($p < 0.01$) и фосфатидилэтанолламина (ФЭ) на 7% ($p < 0.05$) (табл. 2). Одновременно происходило равнозначное увеличение содержания лизофосфатидилхолина (ЛФХ) и фосфатидной кислоты (ФК) на 35% ($p < 0.001$), обусловленное активацией фосфолипаз. Под действием стресса в мембране эритроцитов повышалось содержание сфингомиелина (СМ) на 12% ($p < 0.001$), что является компенсаторной реакцией на снижение содержания ФХ и повышение проницаемости мембран. Наблюдалось снижение содержания фосфатидилсерина (ФС) на 7% ($p < 0.05$) и увеличение такового фосфатидилинозита (ФИ) на 67% ($p < 0.001$). Изменение в соотношении метаболически активных фракций фосфолипидов (ФС, ФИ, ФК) предполагает изменение активности мембраносвязанной Na^+K^+ -АТФазы (Sato et al., 1993). В мембране эритроцитов отмечали повышение содержания холестерина на 13% ($p < 0.001$).

Введение липидного комплекса анфельции и “Эссенциале” сопровождалось выраженной тенденцией к восстановлению нарушенных стрессом биохимических показателей крови и мембран

Таблица 2. Влияние липидного комплекса анфельции и “Эссенциале” на биохимические показатели плазмы крови и мембран эритроцитов животных при воздействии стресса

Показатель	1-я группа, контроль	2-я группа, стресс	3-я группа, стресс + анфельция	4-я группа, стресс + “Эссенциале”
Плазма крови				
Общие липиды, г/л	4.62 ± 0.17	6.00 ± 0.21 ³	4.73 ± 0.15 ^B	5.15 ± 0.13 ^{1,6*}
Общие фосфолипиды, ммоль/л	2.46 ± 0.07	2.10 ± 0.06 ³	2.51 ± 0.08 ^B	2.33 ± 0.07 ^A
Холестерин, ммоль/л	2.82 ± 0.05	4.20 ± 0.07 ²	3.15 ± 0.16 ^B	3.50 ± 0.07 ^{3,В,*}
Холестерин/фосфолипиды	1.15 ± 0.01	2.00 ± 0.02 ³	1.25 ± 0.06 ^B	1.50 ± 0.03 ^{3,В***}
ЛПНП, ммоль/л	0.61 ± 0.04	0.83 ± 0.05 ²	0.61 ± 0.05 ^б	0.66 ± 0.04 ^A
ЛПВП, ммоль/л	1.72 ± 0.08	1.03 ± 0.05 ³	1.69 ± 0.07 ^B	1.45 ± 0.06 ^{1,В*}
Фосфолипидные фракции мембран эритроцитов				
ФХ	30.92 ± 0.58	27.83 ± 0.56 ²	31.06 ± 0.59 ^B	30.70 ± 0.55 ^б
ЛФХ	2.84 ± 0.13	3.82 ± 0.09 ³	2.90 ± 0.07 ^B	3.12 ± 0.06 ^{В*}
СМ	24.61 ± 0.36	27.50 ± 0.42 ³	24.58 ± 0.50 ^B	24.77 ± 0.32 ^B
ФЭ	26.93 ± 0.53	25.27 ± 0.51 ¹	26.73 ± 0.44 ^A	26.64 ± 0.33 ^A
ФС	11.24 ± 0.17	10.42 ± 0.30 ¹	11.26 ± 0.24 ^A	11.10 ± 0.18 ^A
ФИ	1.53 ± 0.18	2.55 ± 0.15 ³	1.55 ± 0.10 ^B	1.57 ± 0.11 ^B
ФК	1.93 ± 0.07	2.61 ± 0.07 ³	1.92 ± 0.06 ^B	2.10 ± 0.05 ^{В*}
ХС	21.88 ± 0.46	24.73 ± 0.35 ³	21.76 ± 0.45 ^B	22.07 ± 0.50 ^B

Примечание. Различия статистически достоверны при: ¹ $p < 0.05$, ² $p < 0.01$, ³ $p < 0.001$ по сравнению с контролем; ^A $p < 0.05$, ^б $p < 0.01$, ^B $p < 0.001$ по сравнению со 2-й группой; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с 3-й группой. ЛПНП – липопротеины низкой плотности, ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭ – фосфатидилэтанолламин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФК – фосфатидная кислота, ХС – холестерин.

эритроцитов, однако степень выраженности нормализующего эффекта различалась. При введении липидного комплекса анфельции (3-я группа животных) и препарата сравнения “Эссенциале” (4-я группа) при стрессе отмечали значимые различия величин с таковыми во 2-й группе (“стресс”) (табл. 2). Содержание общих липидов в плазме крови при введении липидного комплекса анфельции снизилось на 22% ($p < 0.001$), а при введении “Эссенциале” – на 15% ($p < 0.01$). При этом содержание общих фосфолипидов увеличилось на 20% ($p < 0.001$) (3-я группа) и 11% ($p < 0.05$) (4-я группа), а содержание холестерина снизилось на 25% ($p < 0.001$) и 17% ($p < 0.001$) соответственно. В результате соотношение холестерина/фосфолипиды при введении липидного комплекса анфельции снизилось на 37% ($p < 0.001$), а при введении “Эссенциале” – на 25% ($p < 0.001$). Содержание ЛПНП в плазме крови животных при введении липидного комплекса анфельции снизилось на 26% ($p < 0.01$), а при введении “Эссенциале” – на 20% ($p < 0.05$). Одновременно увеличилась концентрация ЛПВП в плазме крови животных 3-й группы на 64% ($p < 0.001$), а 4-й группы – на 41% ($p < 0.001$).

В то же время при введении “Эссенциале” при стрессе сохранились статистически достоверные различия с контролем. Содержание общих липи-

дов превышало контроль на 11% ($p < 0.05$), холестерина – на 24% ($p < 0.001$), а соотношение холестерина/фосфолипиды – на 30% ($p < 0.001$) при одновременном снижении содержания ЛПВП на 16% ($p < 0.05$).

В мембранах эритроцитов также отмечали статистически достоверные различия в содержании фосфолипидных фракций и холестерина при введении препаратов (3-я и 4-я группы) по сравнению с показателями в группе “стресс” (табл. 2). При введении липидного комплекса анфельции наблюдалось увеличение содержания ФХ на 12% ($p < 0.001$) и ФЭ на 6% ($p < 0.05$). При введении “Эссенциале” содержание ФХ увеличилось на 10% ($p < 0.01$), а ФЭ – на 5% ($p < 0.05$). При введении липидного комплекса анфельции одновременно снизилось содержание ЛФХ на 24% ($p < 0.001$) и ФК на 26% ($p < 0.001$), тогда как при введении “Эссенциале” количество ЛФХ снизилось на 18% ($p < 0.001$), а ФК – на 20% ($p < 0.001$). Содержание СМ в мембранах эритроцитов животных при введении обоих препаратов снизилось на 11% ($p < 0.001$), а ФИ – на 40% ($p < 0.001$) при одновременном повышении содержания ФС на 8% ($p < 0.05$). Снизилось также содержание холестерина в среднем на 12% ($p < 0.001$).

Липидный комплекс анфельции был более эффективным стресс-протектором, чем “Эссенциале”. Подтверждением этому является расчет статистической достоверности между соответствующими величинами изученных биохимических показателей в плазме крови и мембранах эритроцитов животных 3-й и 4-й групп. В плазме крови при введении “Эссенциале” содержание общих липидов было выше на 11% ($p < 0.05$), а общих фосфолипидов ниже на 7% по сравнению с их концентрацией при введении липидного комплекса анфельции. Содержание холестерина в плазме крови животных 4-й группы было выше, чем в 3-й группе, на 11% ($p < 0.05$), что обусловило увеличенное на 20% ($p < 0.01$) соотношение холестерин/фосфолипиды. Следует также отметить пониженное содержание ЛПВП (на 14%; $p < 0.05$) по сравнению с таковым в 3-й группе. В мембранах эритроцитов животных 4-й группы содержание ЛФХ и ФК было в среднем на 9% ($p < 0.05$) выше, чем в таковых животных 3-й группы, что свидетельствовало о сохранении повышенной активности фосфолипаз.

ОБСУЖДЕНИЕ

На основании полученных результатов следует, что в условиях экспериментальной модели стресса происходит нарушение соотношения липидов в крови и формируется дислипидемия. Биохимический механизм увеличения уровня холестерина в плазме крови при стрессе обусловлен активацией липолиза в жировой ткани. При интенсивном окислении жирных кислот на фоне снижения функции цикла Кребса происходит избыточное образование ацетата, являющегося основой для синтеза холестерина (Момот и др., 2016). В результате в крови изменяется содержание липопротеинов: увеличивается концентрация липопротеинов низкой плотности, доставляющих липиды (в основном холестерин) от печени, где они образуются, к клеткам, и снижается содержание липопротеинов высокой плотности, которые выводят холестерин из клеточных мембран в печень. Таким образом, избыточное образование холестерина способствует образованию ЛПНП и, соответственно, в плазме крови регистрируется их высокий уровень. Изменение липидного состава мембран эритроцитов, в частности, увеличение содержания холестерина и лизофракций фосфолипидов, а также одновременное снижение основных структурных фосфолипидов (ФХ и ФЭ) и разбалансировка метаболически активных фракций (ФС, ФИ, ФК) приводят к изменению их физико-химических свойств, проницаемости, лабильности и сложности прохождения по микроциркуляторному руслу. Такие биохимические изменения, возможно, лежат в основе формирования стрессовых заболеваний.

Перспективными корректорами метаболических изменений, возникающих при стрессе, являются природные липидные комплексы морского происхождения, содержащие фосфолипидные фракции и полиненасыщенные жирные кислоты семейства n-3, оказывающие гипохолестеринемическое действие (Новгородцева и др., 2010). Известно, что этерификация холестерина происходит преимущественно с ненасыщенными жирными кислотами (Крылов и др., 1991). Диета с морскими липидами сопровождается встраиванием полиненасыщенных жирных кислот в фосфолипиды мембран и этерификацией холестерина с участием фермента лецитин:холестерин-ацилтрансферазы (ЛХАТ) (Калинкина и др., 1990). Данный биохимический механизм способствует утилизации холестерина из мембран и восстановлению соотношения липопротеинов в сторону увеличения ЛПВП.

При анализе величин отклонений исследованных биохимических параметров в плазме крови и мембранах эритроцитов при введении липидного комплекса анфельции и препарата сравнения “Эссенциале” наиболее значимые эффекты были выявлены у липидного комплекса анфельции. В состав “Эссенциале” (фосфатидилхолин соевых бобов) входят преимущественно линолевая кислота (около 70%), а также линоленовая и олеиновая кислоты. Липидный комплекс анфельции представлен четырьмя видами фосфолипидов (ФХ, ФЭ, ФГ, ФИ), а также жирными кислотами семейств n-3 (линоленовая, эйкозапентаеновая) и n-6 (линолевая, арахидоновая). Присутствие более широкого спектра фосфолипидов и полиненасыщенных жирных кислот обеих семейств, по-видимому, обуславливает более высокую биологическую активность липидного комплекса анфельции по сравнению с таковой препарата “Эссенциале”.

Результаты проведенного исследования позволяют предположить, что применение липидного комплекса анфельции может быть полезным и перспективным при дислипидемии и гиперхолестеринемии, что позволит проводить эффективную профилактику нарушений метаболических реакций при воздействии стрессовых факторов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Исследование одобрено Комиссией по вопросам этики Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН (протокол № 13 от 10.10.2018 г.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № 0271-2019-0004 “Влияние природных и антропогенных факторов на биогеохимические процессы и состояние биоты в морских экосистемах”, государственная регистрация № АААА-А17-117030110038-5.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аминина Н.М. Перспективы использования бурых водорослей для профилактики производственно-обусловленных нарушений состояния здоровья // Здоровье. Мед. экология. Наука. 2017. Т. 5. № 72. С. 38–42.
- Гончарова С.Н., Костецкий Э.Я., Санина Н.М. Влияние сезонных изменений температуры на липидный состав морских макрофитов // Физиол. раст. 2004. Т. 51. № 2. С. 190–196.
- Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. Иммуноактивные биополимеры из морских гидробионтов. Владивосток: Изд-во ТИНРО-центра. 2007. 219 с.
- Имбс Т.И., Красовская Н.П., Ермакова С.П. и др. Сравнительное исследование химического состава и противоопухолевой активности водно-этанольных экстрактов бурых водорослей *Laminaria sichorioides*, *Costaria costata* и *Fucus evanescens* // Биол. моря. 2009. Т. 35. № 2. С. 140–146.
- Калинкина О.М., Перова Н.В., Зыкова В.П. и др. Влияние диеты, обогащенной ω -3 полиненасыщенными жирными кислотами, на функциональную активность тромбоцитов и липидо-аполипопротеиновый спектр крови при впервые возникшей стенокардии // Терапевт. архив. 1990. Т. 62. № 9. С. 77–82.
- Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир. 1975. 221 с.
- Крыжановский С.П., Гельцер Б.И., Запорожец Т.С. и др. Бурые водоросли Тихого океана в лечении и профилактике атеросклероза. Владивосток: Дальнаука. 2016. 152 с.
- Крылов О.Ф., Любимов И.Б., Муляр А.Г. Фармакодинамика эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот // Фармакол. и токсикол. 1991. Т. 54. № 5. С. 67–71.
- Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Фоменко С.Е., Рахманин Ю.А. Влияние стресса на состояние липидного и углеводного обмена печени, профилактика // Гигиена и санитария. 2005. № 5. С. 17–21.
- Момот Т.В., Кушнерова Н.Ф., Рахманин Ю.А. Профилактика нарушения биохимических показателей в крови крыс при экспериментальном стрессе // Гигиена и санитария. 2016. Т. 95. № 7. С. 678–681.
- Новгородцева Т.П., Эндакова Э.А., Янькова В.И. Руководство по методам исследования параметров системы “Перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита” в биологических жидкостях. Владивосток: Изд-во Дальневост. гос. ун-та. 2003. 80 с.
- Новгородцева Т.П., Караман Ю.К., Бивалькевич Н.В., Жукова Н.В. Использование биологически активной добавки к пище на основе липидов морских гидробионтов в эксперименте на крысах // Вопр. питания. 2010. Т. 79. № 2. С. 24–27.
- Саратиков А.С., Ратькин А.В., Фролов В.Н., Чучалин В.С. Влияние гепатопротекторов фосфолипидной природы на токсичность циклофосфана // Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии. 2004. № 2. С. 43–47.
- Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е., Сизова Л.А. Морские водоросли – перспективный источник полифенольных антиоксидантов и комплексов эссенциальных фосфолипидов // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2012. Т. 14. № 1. С. 2299–2302.
- Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е. и др. Гепатопротекторные свойства экстракта из бурой водоросли *Saccharina japonica* // Биол. моря. 2013. Т. 39. № 1. С. 50–54.
- Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е. и др. Влияние экстракта из морской бурой водоросли *Sargassum pallidum* (Turner) C. Agardh, 1820 на метаболические реакции печени при экспериментальном токсическом гепатите // Биол. моря. 2017. Т. 43. № 6. С. 444–449.
- Титлянов Э.А., Титлянова Т.В. Морские растения стран Азиатско-Тихоокеанского региона, их использование и культивирование. Владивосток: Дальнаука. 2012. 377 с.
- Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Момот Т.В. Антиоксидантные и стресс-протекторные свойства экстракта из морской зеленой водоросли *Ulva lactuca* Linnaeus, 1753 // Биол. моря. 2016. Т. 42. № 6. С. 465–470.
- Хотимченко С.В. Липиды морских водорослей-макрофитов и трав: структура, распределение, анализ. Владивосток: Дальнаука. 2003. 234 с.
- Эндакова Э.А., Новгородцева Т.П., Светашев В.И. Модификация состава жирных кислот крови при сердечнососудистых заболеваниях. Владивосток: Дальнаука. 2002. 296 с.
- Amenta J.S. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography // J. Lipid Res. 1964. V. 5. № 2. P. 270–272.
- Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497–509.
- Khotimchenko S.V., Vaskovsky V.E. Distribution of C₂₀ polyenoic fatty acids in red macrophytic algae // Bot. Mar. 1990. V. 33. № 6. P. 525–528.
- Rouser G., Kritchevsky G., Yamamoto A. Column chromatographic and associated procedures for separation and determination of phosphatides and glycolipids // Lipid Chromatographic Analysis. N.Y.: Dekker. 1967. V. 1. P. 99–162.
- Sanina N.M., Goncharova S.N., Kostetsky E.Y. Fatty acid composition of individual polar lipid classes from marine macrophytes // Phytochemistry. 2004. V. 65. № 6. P. 721–730.
- Sanina N.M., Goncharova S.N., Kostetsky E.Y. Seasonal changes of fatty acid composition and thermotropic behavior of polar lipids from marine macrophytes // Phytochemistry. 2008. V. 69. P. 1517–1527.
- Satoh T., Cohen H.T., Katz A.I. Intracellular signaling in the regulation of renal Na-K-ATPase. II. Role of eicosanoids // J. Clin. Invest. 1993. V. 91. P. 409–415.

- Svetachev V.I., Vaskovsky V.E.* A simplified technique for thin-layer microchromatography of lipids // *J. Chromatogr. A.* 1972. V. 67. № 2. P. 376–378.
- Vaskovsky V.E., Latyshev N.A.* Modified Jungnickel's reagent for detecting phospholipids and other phosphorus compounds on thin-layer chromatograms // *J. Chromatogr. A.* 1975. V. 115. № 1. P. 246–249.
- Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M.* A universal reagent for phospholipid analysis // *J. Chromatogr. A.* 1975. V. 114. № 1. P. 129–141.
- Wagner H., Horhammer L., Wolff P.* Thin layer chromatography of phosphatides and glycolipids // *Biochem. Z.* 1961. Bd. 334. S. 175–184.

Effects of the Lipid Complex of Extract from the Marine Red Alga *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara) Makienko on the Biochemical Parameters of Blood Plasma and Erythrocyte Membranes during Experimental Stress Exposure

N. F. Kushnerova^a, S. E. Fomenko^a, V. G. Sprygin^a, and T. V. Momot^b

^a*V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia*

^b*Far Eastern Federal University, Vladivostok 690950, Russia*

The present study considers effects of a lipid complex isolated from the aqueous–ethanol (70%) extract from the marine red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* and effects of the commercial reference preparation Essentiale on the biochemical parameters of blood plasma and erythrocyte membranes of mice exposed to experimental stress (vertical restraining by the scruff). The pharmacological effect of the lipid complex from *A. tobuchiensis* is manifested as elimination of dyslipidemia and hypercholesterolemia, accompanied by a reduction in levels of total lipids and low-density lipoproteins, an increase in the level of high-density lipoproteins in plasma, and normalization of the cholesterol/phospholipids ratio and the phospholipid composition of erythrocyte membranes. The *Ahnfeltia* extract is not inferior to the Essentiale preparation in terms of effectiveness, and even superior in the potential to restore the blood lipid composition and the phospholipid fraction ratio in erythrocyte membranes. The pharmacological effect of the lipid complex from *Ahnfeltia* is determined by the action of its phospholipid fractions and polyunsaturated n-6 and n-3 fatty acids which contribute to the utilization of cholesterol from membranes, enhancement of the lipoprotein ratio towards increase in high-density lipoproteins, and are also involved in erythrocyte membrane repair.

Keywords: *Ahnfeltia tobuchiensis*, stress, blood, erythrocytes, lipoproteins, cholesterol, phospholipids