

УДК

*Т.В. Кушнерова¹, Е.В. Кондратьева², Н.Ф. Кушнерова³, С.Е. Фоменко³, В.Г. Спрыгин³, Л.Н. Лесникова³*¹ Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041 г. Владивосток, Пальцевого, 17),² Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),³ Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН (690041 г. Владивосток, ул. Балтийская, 43)

КОРРЕКЦИЯ ФИЗИОЛОГО-МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНОВОМ РАЦИОНЕ ЭКСТРАКТОМ ИЗ ЛАМИНАРИИ ЯПОНСКОЙ

Ключевые слова: эритроциты, гиперхолестеринемия, экстракт из ламинарии.

Приведены данные по изучению в эксперименте на крысах мембранопротекторного действия экстракта из морской бурой водоросли ламинарии японской (*Laminaria japonica*). Определены физиологические характеристики эритроцитов и содержание в них фракций нейтральных липидов и фосфолипидов в условиях гиперхолестеринемия рациона. Показано, что гиперхолестеринемия сопровождалась увеличением объема и осмотической резистентности эритроцитов, соотношения «холестерин/фосфолипиды», количества холестерина, сфингомиелина, лизофракций фосфолипидов, а также снижением концентрации эфиров холестерина, фосфатидилинозита и фосфатидной кислоты. При введении экстракта из ламинарии отмечалась нормализация означенных параметров.

Использование эритроцитов для изучения мембранопротекторных свойств растительных препаратов не имеет такого широкого распространения в модельных экспериментах, как, например, гепатоцитов, микросомальных мембран, эпителиальных клеток кишечника, эндотелиоцитов, тромбоцитов, нейтрофилов и других клеток [10]. Между тем изменение свойств эритроцитов представляет интерес для расширения представлений о механизмах мембранозащитного действия препаратов растительного происхождения. Известно, что гиперхолестеринемический рацион является распространенной экспериментальной моделью, при которой происходит встраивание холестерина (ХС) из липопротеинов в мембраны красных клеток крови [5]. Перегруженность эритроцитарной мембраны ХС может приводить к нарушению ее функции (вследствие изменения физических свойств и активности мембраносвязанных ферментов), проницаемости, а также снижению скорости переноса кислорода [11]. Под воздействием ХС увеличиваются размеры и изменяется форма эритроцитов (превращение в сфероциты) с резким снижением фильтрационной способности. Наличие больших эритроцитов служит надежным признаком атеросклеротического процесса. В настоящее время установлено, что растительные полифенолы обладают выраженным гипохолестеринемическим действием за счет активации фермента лецитинхолестеринацилтрансферазы [2]. Следовательно, целесообразно использовать растительные препараты и биологически активные добавки, содержащие полифенольные структуры, для снижения

уровня мембранного ХС. Одним из сырьевых источников фармакологических препаратов с высокой концентрацией полифенольных соединений являются морские водоросли. Однако количество работ, посвященных изучению комплексных препаратов из водорослей, весьма немногочисленно по сравнению с исследованиями свойств их полисахаридной составляющей [4]. В связи с этим был выделен экстракт из ламинарии японской (*Laminaria japonica*) в состав которого входят полифенольные соединения (флоротанины и их олигомерные и полимерные формы), минеральные вещества, аминокислоты (из них 7 незаменимых), полиненасыщенные жирные кислоты семейства n-3 и n-6, фосфолипиды, липофильные вещества и др. [7].

Целью работы явилось использование экстракта из ламинарии японской для коррекции физиолого-метаболических нарушений в эритроцитах крыс при гиперхолестеринемическом рационе.

Материал и методы. Свежие водоросли *Laminaria japonica*, собранные в 2008 г. в б. Южная о. Попова зал. Петра Великого Японского моря высушивали при температуре, не превышающей 50°C. Измельченное сырье с целью освобождения от альгинатов экстрагировали методом реперколяции 70% этиловым спиртом при соотношении сырья к экстрагенту 1:1 (по объему). Выход экстракта на 1 кг сырья составлял 1 л. Полученный экстракт упаривали в вакууме до сухого остатка и ресуспензировали в воде. Содержание общих полифенолов определяли с помощью реактива Фолина–Чокальтеу [13]. Полифенолы составляли 35% от сухого остатка экстракта.

В мазках крови, окрашенных азурэозиновой смесью, с помощью окуляр-микрометра определяли диаметр эритроцитов. Средний объем эритроцита (СО-Эр) и средний диаметр эритроцита (СДЭ) вычисляли по Д.И. Гольдбергу и др. [3], осмотическую резистентность эритроцитов – по общепринятому методу. Эритроциты выделяли по методу Т.П. Новгородцевой [6]. Экстракты общих липидов из эритроцитов готовили в соответствии с рекомендациями J. Folch et al. [9]. Хроматографическое распределение нейтральных липидов и их количественное определение проводили посредством одномерной тонкослойной хроматографии [8]. Фракционное разделение фосфолипидов (ФЛ) осуществляли двумерной тонкослойной хроматографией, а их количество определяли по методу

V.E. Vaskovsky et al. [14]. Результаты выражали в процентах от суммы всех фракций. Полученные данные обрабатывали с использованием параметрического критерия Стьюдента в статистической программе Instat (Graph Pad Software Inc., USA).

В эксперименте использовали белых крыс-самцов линии Вистар массой 180–200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Экспериментальную гиперхолестеринемию вызывали введением в рацион животных повышенного содержания насыщенных жиров (растительное сало – 25% от веса рациона), включающих 2,5% холестерина [5]. Экстракт из ламинарии давали перорально в дозе 100 мг/кг массы общих полифенолов в сутки [1]. В эксперименте продолжительностью в 6 недель животные были разделены на три группы по 10 крыс в каждой:

1-я группа – контроль (интактные крысы, стандартный рацион);

2-я группа – гиперхолестериновый рацион;

3-я группа – гиперхолестериновый рацион плюс экстракт из ламинарии.

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).

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Гиперхолестериновый рацион вызвал формирование типичной картины гиперхолестеринемии с 2-кратным увеличением концентрации ХС в крови ($2,88 \pm 0,05$ против $1,31 \pm 0,02$ ммоль/л в контроле). Развивался макроцитоз: более чем на 1/3 увеличивался СДЭ ($8,55 \pm 0,17$ против $6,19 \pm 0,14$ мкм в контроле) и более чем в 2 раза – СОЭр ($125,01 \pm 1,64$ против $47,44 \pm 1,26$ мкм³ в контроле). При этом начало и окончание гемолиза в опыте происходило позже: начало – при концентрации NaCl $0,35 \pm 0,01\%$, а окончание – при $0,30 \pm 0,01\%$; в контроле начало – при $0,45 \pm 0,01\%$, а окончание – при $0,35 \pm 0,01\%$ NaCl. Гиперхолестеринемия сопровождалась снижением доли общих ФЛ до $50,00 \pm 1,82\%$, что было на 23% меньше контрольных значений ($64,72 \pm 1,78\%$). Уровень ХС в эритроцитах повышался на 19%, в связи с чем коэффициент ХС/ФЛ увеличился до $0,54 \pm 0,04$ (в контроле $0,35 \pm 0,02$). Обращали на себя внимание увеличение на 16% доли триацилглицеринов и на 21% – свободных жирных кислот. Одновременно на 15% уменьшилось количество эфиров жирных кислот и на 27% – эфиров ХС (табл. 1). При исследовании фосфолипидного спектра эритроцитов отмечалось достоверное снижение (на 11%) уровня фосфатидилхолина при одновременном увеличении на 65% концентрации лизофосфатидилхолина и на 27% – сфингомиелина. Гиперхолестеринемия сопровождалась 27%-м снижением количества фосфатидинозита и 65%-м – фосфатидной кислоты (табл. 2).

Таблица 1

Влияние экстракта из ламинарии на содержание фракций нейтральных липидов в эритроцитах крыс, % от суммы всех фракций ($M \pm m$)

Фракция ¹	1-я группа	2-я группа	3-я группа
ТАГ	$16,29 \pm 0,44$	$18,87 \pm 0,85^2$	$16,35 \pm 0,58^3$
СЖК	$13,21 \pm 0,24$	$15,93 \pm 0,61^2$	$13,10 \pm 0,27^3$
ЭЖК	$17,57 \pm 0,49$	$14,86 \pm 0,56^2$	$18,00 \pm 0,60^3$
ХС	$22,65 \pm 0,60$	$27,00 \pm 0,74^2$	$22,88 \pm 0,67^3$
ЭХС	$17,34 \pm 0,62$	$12,61 \pm 0,63^2$	$17,20 \pm 0,59^3$
ОФ	$12,94 \pm 0,22$	$10,73 \pm 0,35$	$12,47 \pm 0,46$

¹ ТАГ – триацилглицерины, СЖК – свободные жирные кислоты, ЭЖК – эфиры жирных кислот, ЭХС – эфиры ХС, ОФ – остаточная фракция.

² Различие с контролем статистически значимо.

³ Различие со 2-й группой статистически значимо.

Таким образом, введение в рацион больших количеств насыщенного жира (50% по калорийности) и ХС (2,5%) меняло соотношение липидных структур в мембране эритроцитов по сравнению с нормой. Эти изменения обуславливали увеличение размерных физиологических характеристик эритроцитов, их резистентности к гемолизирующему агенту, что предполагало увеличение плотности и жесткости мембран, снижение их фильтрационной способности.

У крыс 3-й группы к окончанию опыта размерные характеристики эритроцитов возвращались к норме и статистически значимо отличались от параметров 2-й группы. Так, СДЭ в 3-й группе составлял $6,43 \pm 0,10$ мкм, а СОЭр – $53,17 \pm 1,61$ мкм³ (во 2-й группе – $8,55 \pm 0,17$ мкм и $125,01 \pm 1,64$ мкм³ соответственно). Осмотическая резистентность эритроцитов у крыс 3-й группы имела более широкие границы устойчивости: $0,40 \pm 0,02\%$ NaCl в начале гемолиза и $0,30 \pm 0,01\%$ NaCl при его завершении. Следовательно, экстракт из ламинарии не только восстанавливал устойчивость мембран к снижению концентрации NaCl, но и на 0,05% расширял пределы осмотической резистентности. В 3-й группе также отмечался более высокий уровень общих ФЛ ($63,19 \pm 1,76\%$), что обусловило статистически значимое уменьшение коэффициента ХС/ФЛ (до $0,36 \pm 0,02$).

При введении экстракта из ламинарии на 15% снижалась концентрация ХС и на 36% увеличивалась концентрация эфиров ХС. При сравнении показателей по другим фракциям нейтральных липидов прослеживался выраженный гипотриглицеридемический эффект (табл. 1).

Анализ фосфолипидного спектра показал восстановление фракционного состава до контрольных значений, за исключением фосфатидной кислоты, доля которой оставалась на 22% выше, чем во 2-й группе. Это позитивный фактор, так как фосфатидная кислота является основой для синтеза фосфолипидных фракций, необходимых для восстановления структуры

Таблица 2

Влияние экстракта из ламинарии на содержание фракций фосфолипидов в эритроцитах крыс при гиперхолестериновом рационе (в % от суммы всех фракций; $M \pm m$)

Фракция ¹	1-я группа	2-я группа	3-я группа
ФХ	37,83±0,71	33,67±0,82 ²	36,80±0,86 ³
ЛФХ	9,51±0,46	15,70±0,48 ²	12,11±0,54 ³
СМ	9,43±0,76	11,90±0,65 ²	8,93±0,66 ³
ФЭ	24,50±0,79	23,55±0,8 ²	24,00±0,69
ЛФЭ	6,00±0,38	5,95±0,31	6,00±0,30
ФС	4,30±0,12	4,20±0,17	4,25±0,13
ФИ	5,48±0,10	4,00±0,11 ²	5,30±0,07 ³
ФК	2,95±0,22	1,03±0,06 ²	2,61±0,11 ^{2,3}

¹ ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФК – фосфатидная кислота.

² Различие с контролем статистически значимо.

³ Различие со 2-й группой статистически значимо.

мембран. Действие экстракта сопровождалось ростом уровня фосфатидилхолина на 9% и снижением доли сфингомиелина на 17% по сравнению со 2-й группой. Обращали на себя внимание более высокие концентрации фосфатидилинозита и фосфатидной кислоты (табл. 2). По-видимому, под влиянием приема ламинарии восстанавливалось соотношение метаболически активных фракций, необходимых для нормализации активности мембраносвязанных ферментов. Важно отметить и достоверное снижение уровня лизофосфатидилхолина (на 36%), что свидетельствовало об ингибировании активности фосфолипаз полифенолами экстракта [12]. Данный вывод согласуется с отмеченным выше снижением концентраций свободных жирных кислот и триацилглицеринов.

Сопоставляя полученные результаты, следует отметить высокий мембранопротекторный эффект экстракта из ламинарии в условиях гиперхолестеринового рациона. Данный феномен объясняется тем, что молекулы полифенолов активируют 7 α -холестерингидроксилазу, участвующую в окислении ХС в желчные кислоты, а также повышают активность лецитинхолестеринацилтрансфераз [2], что обуславливает выведение холестерина из мембран и поступление его в этерифицированной форме в составе липопротеинов высокой плотности.

Литература

1. Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. Доклиническое изучение гепатопротективных средств // *Вед. фарм. ком.* 1999. № 2. С. 9–12.
2. Гаскина Т.К., Курилович С.А., Горчаков В.Н. Изменение скорости лецитин-холестерин-ацилтрансферазной реакции и липидных показателей сыворотки крови под влиянием катергена в условиях острого экспериментального перерождения печени // *Вопр. мед. химии.* 1989. Т. 35, № 4. С. 24–28.
3. Гольдберг Д.И., Гольдберг Е.Д., Шубин Н.Г. Гематология животных. Томск, 1973. 100 с.

4. Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Урванцева А.М. и др. Сравнительное исследование биологической активности фукоиданов из бурых водорослей // *Вестник ДВО РАН.* 2006. № 6. С. 105–110.
5. Левачев М.М. Пищевые детерминанты липидного состава биологических мембран // *Вестн. АМН СССР.* 1986. № 11. С. 15–21.
6. 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 ДВГУ, 2003. 80 с.
7. Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е. и др. Гепатопротекторная активность экстракта из бурой водоросли *Laminaria japonica* // *Бюллетень московского общества испытателей природы. Отдел биологический.* 2009. Т. 114, вып. 3. Прил. 1, часть 2. С. 380–383.
8. Amenta J.S. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography // *J. Lipid. Res.* 1964. Vol. 5, No 2. P. 270–272.
9. Folch J., Less M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue // *Biol. Chem.* 1957. Vol. 226. P. 497–509.
10. Kaneko T., Baba N. Protective effect of flavonoids on endothelial cells against linoleic acid hydroperoxide-induced toxicity // *Biosci. Biotechnol. Bioche.* 1999. Vol. 63. P. 323–328.
11. Lee C.Y., Kim K.C., Park H.W. et al. Reological properties of erythrocytes from male hypercholesterolemia // *Microvasc. Res.* 2004. Vol. 67, No. 2. P. 133–138.
12. Lindahl M., Tagesson C. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2 // *Inflammation.* 1997. Vol. 21, No. 3. P. 347–356.
13. Singleton, V. L., Orthofer R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent // *Oxidants and Antioxidants, Pt A. L. Packer.* San Diego, Academic Press Inc., 1999. Vol. 299. P. 152–178.
14. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasenden I.M. A universal reagent for phospholipid analysis // *J. Chromatography.* 1975. Vol. 114, No. 1. P. 129–141.

Поступила в редакцию 21.12.2009.

TREATMENT OF PHYSICAL AND METABOLICAL CHARACTERISTICS OF RED BLOOD CELLS DURING HYPERCHOLESTEROL DIET WITH LAMINARIA JAPONICA EXTRACT

T.V. Kushnerova¹, E.V. Kondratieva², N.F. Kushnerova³, S.E. Fomenko³, V.G. Sprygin³, L.N. Lesnikova³

¹ Institute of Marine Biology named after A.V. Zhirmundsky, FEB RAS (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russia),

² Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia), ³ Pacific Oceanographic Institute named after V.I. Il'yichev, FEB RAS (43 Baltiyskaya St. Vladivostok 690041 Russia)

Summary – The authors provide data about rat experiments aimed to study membrane-protective effect of *Laminaria japonica* brown algae-derived extract, identify physiological characteristics of red blood cells and content of neutral lipids and phospholipids in case of hypercholesterol diet. The hypercholesterolemia is characterized by increasing volume and osmotic fragility of red blood cells, ratio 'cholesterol/phospholipids', quantity of cholesterol, sphingomyelin, lysofractions of phospholipids, and decreasing concentration of cholesterol, phosphatidylinositols and phosphatidic acid ethers. The introduction of the *Laminaria japonica*-derived extract results in regulation of the aforementioned parameters. **Key words:** red blood cells, hypercholesterolemia, *Laminaria japonica*-derived extract.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 2, p. 56–58.