

На правах рукописи

Кондратьева Елена Викторовна

СТРЕССОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФИЗИОЛОГО-МЕТАБОЛИЧЕСКИХ  
ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ И ИХ КОРРЕКЦИЯ  
ЭКСТРАКТОМ ИЗ ЛАМИНАРИИ ЯПОНСКОЙ

03.03.01 – физиология  
14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Владивосток - 2010

Работа выполнена на кафедре фармацевтической технологии и биотехнологии с курсом ФПК и ППС ГОУ ВПО «Владивостокский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития РФ и в лаборатории биохимии Отдела биохимических технологий Учреждения Российской академии наук Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева Дальневосточного отделения РАН.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор  
Хотимченко Юрий Степанович

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор  
Кушнерова Наталья Федоровна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук  
Дюйзен Инесса Валерьевна

доктор биологических наук, профессор  
Новгородцева Татьяна Павловна

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития РФ

Защита состоится «21» декабря 2010 г. в 10 часов на заседании объединенного диссертационного совета ДМ 005.008.03 при Учреждении Российской академии наук Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17.

Автореферат разослан «  » ноября 2010 г.

Ученый секретарь объединенного  
диссертационного совета, к.м.н.



А.Ю. Горькая

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Физиолого-метаболические характеристики мембран эритроцитов являются тонким показателем, характеризующим состояние мембран других клеток органов и тканей на уровне целого организма (Эндакова и др., 2002). Интерес к исследованию липидной составляющей мембран эритроцитов и показателей их антиоксидантной защиты для оценки общего напряжения при стрессе возник после того, как было показано, что при многих стрессорных заболеваниях или болезнях адаптации (атеросклероз, язвы желудочно-кишечного тракта, хроническая усталость и др.) нарушения липидного гомеостаза проявляются в изменениях на уровне сывороточных липидов, а также в состоянии процессов липопероксидации (Ланкин и др., 2001, 2009). Вместе с тем изучению эритроцитов как модели для исследования стрессорной нагрузки на биомембраны посвящены единичные работы (Кушнерова, Лесникова, 2003; Лесникова, 2006; Кушнерова и др., 2008, 2010). Поэтому очевидна актуальность изучения взаимосвязи физиолого-метаболических нарушений эритроцитов при воздействии мембраноповреждающих стрессовых факторов, а также возможности их коррекции растительными препаратами.

На сегодняшний день известен ряд препаратов, обладающих стресс-протекторным действием, так называемых адаптогенов, включающих широко известные средства традиционной и народной медицины. К ним относятся корни женьшеня, элеутерококка колючего, аралии маньчжурской, родиолы розовой, семена лимонника китайского (Брехман, 1968; Дардымов, 1987; Хасина, 1986; Горькавая и др., 2007; Шахматов и др., 2007).

---

В работе приняты следующие сокращения: АОЗ – антиоксидантная защита, Г-SH – восстановленный глутатион, ГХС – гиперхолестериновый рацион, ДГДГ – дигалактозилдиацилглицерин, ЖК – жирные кислоты, КЛ – концентрат ламинарии, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, ЛФЭ – лизофосфатидилэтанолламин, ЛХАТ – лецитин:холестеринацилтрансфераза, МДА – малоновый диальдегид, МГДГ – моногалактозилдиацилглицерин, МПХ – медные производные хлорофилла, НЖК – ненасыщенных жирных кислот, ПГ – простагландинов, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты, ПОЛ – перекисное окисление липидов, СДЭ – средний диаметр эритроцита, СОЭр – средний объем эритроцита, СЖК – свободные жирные кислоты, СМ – сфингомиелин, СОД – супероксиддисмутаза, СХДГ – сульфохиновозилдиацилглицерин, ТАГ – триацилглицерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФК – фосфатидная кислота, ФС – фосфатидилсерин, ФХ – фосфатидилхолин, ФЭ – фосфатидилэтанолламин, ХС – холестерин, ЭЖК – эфиры жирных кислот, ЭХС – эфиры холестерина

Однако использование корней и семян приводит к катастрофическому снижению запасов этих растений. Следовательно, возникает необходимость поиска и изучения новых источников сырья, имеющегося на территории Российской Федерации, для получения препаратов со стресс-протекторными свойствами, в частности среди морских водорослей. Одним из сырьевых источников является ламинария японская (*Laminaria japonica*), в состав которой входят биологически активные соединения, такие как полисахариды, полифенолы, каротиноиды, пищевая клетчатка, белки, витамины, минералы и т.п. (Имбс и др., 2009; Kostetsky et al., 2004; Sanina et al., 2008). Полифенольные соединения (флоротаннины и их олигомерные и полимерные формы) представляют одну из наиболее значимых групп биологически активных веществ, характеризующих фармакологическую ценность водорослей. В связи с этим был выделен экстракт из ламинарии японской (*Laminaria japonica*), в состав которого входят полифенольные соединения в количестве 35 % (Спрыгин и др., 2009).

В настоящем исследовании анализируется действие мембраноповреждающих факторов (вертикальная фиксация крыс за дорзальную шейную складку, интоксикация четыреххлористым углеродом, гиперхолестериновый рацион) на физиологические характеристики эритроцитов, систему показателей «перекисное окисление липидов - антиоксидантная защита» и липидную составляющую мембран эритроцитов, а также демонстрируется возможность коррекции наблюдаемых отклонений с помощью водно-спиртового экстракта из ламинарии японской.

**Цель работы** – проанализировать стрессорные изменения физиолого-метаболических характеристик эритроцитов крыс и оценить возможность их коррекции с помощью экстракта из ламинарии японской.

**Задачи исследования:**

1. Изучить размерные характеристики эритроцитов крыс и осмотическую резистентность к гемолизирующему агенту при действии мембраноповреждающих факторов (вертикальная фиксация за дорзальную шейную складку, интоксикация четыреххлористым углеродом, гиперхолестериновый рацион).

2. Изучить липидную составляющую мембран эритроцитов (нейтральные и фосфолипидные фракции) и показатели антиоксидантной защиты

при действии мембрано-повреждающих факторов (вертикальная фиксация за дорзальную шейную складку, интоксикация четыреххлористым углеродом, гиперхолестериновый рацион).

3. Изучить особенности физиолого-метаболических характеристик мембран эритроцитов в период депривации после интоксикации крыс четыреххлористым углеродом.

4. Сравнить мембранопротекторные свойства экстракта из ламинарии японской и элеутерококка в условиях экспериментальной модели стресса.

5. Сравнить мембранопротекторные свойства экстракта из ламинарии японской и «Легалона»™ в условиях экспериментальной модели интоксикации четыреххлористым углеродом.

6. Оценить изменения физиолого-метаболических характеристик эритроцитарных мембран при введении экстракта из ламинарии японской животным в условиях гиперхолестеринового рациона.

**Научная новизна.** Получены новые знания о характере нарушений процессов антиоксидантной защиты и перекисного окисления липидов при действии на организм повреждающих факторов (вертикальная фиксация, интоксикация  $CCl_4$ , гиперхолестериновый рацион).

Впервые выполнено системное исследование мембранопротекторных свойств водно-спиртового экстракта из ламинарии японской и получено их экспериментальное подтверждение. Показано, что экстракт из ламинарии японской нормализует показатели в системе «перекисное окисление липидов - антиоксидантная защита» за счет собственной антиоксидантной активности, регулирует реакции этерификации холестерина и нормализуют соотношение фосфолипидных фракций, что обуславливает восстановление размерных характеристик эритроцитов, повышение их эластических свойств и расширение границ осмотической устойчивости.

**Теоретическая и практическая значимость.** Исследование расширяет недостаточно разработанные в науке представления об участии эритроцитарной системы в физиологических механизмах стрессорной реакции. Исследование дополняет современное знание о мембранопротекторных свойствах растительных полифенолов морского происхождения.

Материал о стресспротекторном и мембранопротекторном действии экстракта из ламинарии японской в отношении изменений показателей системы «перекисное окисление липидов–антиоксидантная защита», физиологических и структурных характеристик эритроцитов при действии повреждающих факторов может быть использован при разработке медико-биологической документации на применении этого экстракта в качестве биологически активной добавки как в нативном виде, так и в составе функциональных продуктов питания. На экстракт из ламинарии японской подана заявка на патент (№ 2009128692, приоритет от 24.07.2009 г.) и получено положительное решение от 01.07.2010 г.

Материалы диссертации включены в курс лекций кафедры фармацевтической технологии и биотехнологии с курсом ФПК и ППС ГОУ ВПО «Владивостокский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Изменения размерных характеристик эритроцитов, соотношения нейтральных и фосфолипидных фракций в мембране эритроцитов, напряжение системы антиоксидантной защиты, активация перекисного окисления липидов носят неспецифический характер, что может рассматриваться как атрибут стрессорной реакции.

2. Экстракт из ламинарии японской нормализует показатели системы ПОЛ-АОЗ, размерные характеристики эритроцитов (СДЭ, СОЭр), повышает их эластические свойства (расширяет границы осмотической устойчивости) в условиях действия мембраноповреждающих факторов за счет регуляции этерификации холестерина и нормализации соотношения фосфолипидных фракций.

**Личный вклад.** Автор участвовал в планировании, постановке цели и задач исследования. Подбор и анализ литературы, проведение экспериментов, статистическая обработка экспериментальных данных и их анализ осуществлялись непосредственно соискателем.

**Апробация работы.** Основные результаты работы представлены, доложены и обсуждены на III Международной научно-технической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы технологии живых систем» (Владивосток, 2009),

XVII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2010), 14-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2010), Международной научно-практической конференции «Дальневосточная весна – 2010» (Комсомольск-на-Амуре, 2010).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук», утвержденный ВАК.

**Объем и структура диссертации.** Работа изложена на 138 страницах компьютерного набора и содержит введение, обзор литературы, характеристику материала и методов исследования, описание результатов собственных исследований, обсуждение и выводы. Список литературы включает 271 источник, в том числе 143 отечественных и 128 зарубежных авторов. Текст иллюстрирован 23 рисунками и 16 таблицами.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

**Экспериментальные животные.** В экспериментах использовано 114 крыс-самцов линии Вистар. Крыс получали из питомника «Столбовая» (г. Чехов Московской области). Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985). Проведение исследования одобрено этическим комитетом ГОУ ВПО ВГМУ Росздрава, протокол № 1 от 9 ноября 2009 г.

*Изучение влияния стресса* (вертикальная фиксация за дорзальную шейную складку на 22 часа) на физиолого-метаболические характеристики эритроцитов крыс. Животные были разделены на две группы по 6 крыс в каждой: 1-я – контроль (интактные животные), 2-я – стресс.

*Изучение влияния интоксикации  $CCl_4$  и периода депривации на физиологические и структурные характеристики эритроцитов крыс.* Животные были разделены на 3 группы по 6 крыс в каждой: 1-я – контроль (интактные), 2-я –

$CCl_4$  (введение в течение 6 дней подкожно 50% масляного раствора  $CCl_4$ ); 3-я – введение  $CCl_4$  с последующей отменой (депривация) в течение 7 дней.

*Изучение изменения физиологических и структурных характеристик эритроцитов крыс при гиперхолестериновом рационе.* Животные были разделены на 2 группы по 6 крыс в каждой: 1-я - контроль (интактные, стандартный рацион); 2-я - гиперхолестериновый рацион (введение в рацион животных повышенного содержания насыщенных жиров в течение 6 недель).

*Изучение влияния экстракта из ламинарии японской на стресс-индуцированные изменения физиологических и структурных характеристик эритроцитов крыс.* Животные были разделены на четыре группы по 6 крыс в каждой: 1-я – контроль (интактные животные), 2-я – стресс, 3-я – стресс + экстракт ламинарии, 4-я – стресс + экстракт элеутерококка. Водный раствор экстракта из ламинарии и водный раствор аптечного экстракта элеутерококка вводили крысам внутривенно в дозе 0,4 мл непосредственно перед вертикальной фиксацией и через 6 ч. после начала эксперимента.

*Изучение влияния экстракта из ламинарии японской на изменения физиологических и структурных характеристик эритроцитов крыс в период депривации после интоксикации  $CCl_4$ .* Животные были разделены на 5 групп по 6 крыс в каждой: 1-я – контроль (интактные), 2-я –  $CCl_4$ ; 3-я – введение  $CCl_4$  с последующей отменой (депривация) в течение 7 дней, 4-я – введение  $CCl_4$  в течение 4 дней с последующей отменой и введением экстракта ламинарии в течение 7 дней, 5-я – введение  $CCl_4$  в течение 4 дней с последующей отменой и введением препарата сравнения легалона в течение 7 дней.

*Изучение влияния экстракта из ламинарии японской на физиологические и структурные характеристики эритроцитов крыс при гиперхолестериновом рационе.* Животные были разделены на 3 группы по 6 крыс в каждой: 1-я - контроль (интактные, стандартный рацион); 2-я - гиперхолестериновый рацион; 3-я - гиперхолестериновый рацион + экстракт из ламинарии.

**Острый стресс** моделировали вертикальной фиксацией животных за дорзальную шейную складку на 22 часа (Добряков, Брехман, 1996).

**Интоксикация четыреххлористым углеродом.** Животным в течение 6 дней подкожно (дорзальная шейная складка) вводили 50 % масляный раствор



четырёххлористого углерода (CCl<sub>4</sub>) в дозе 2 мл/кг 1 раз в сутки (Венгеровский и др., 1999).

**Экспериментальную гиперхолестеринемию** вызывали в течение 6 недель введением в рацион животных повышенного содержания насыщенных жиров (растительное сало 25 % от веса рациона), включающих 2,5 % холестерина (Мещерская и др. 1966).

По завершении каждого эксперимента животных выводили из него методом декапитации под легким эфирным наркозом. Кровь для исследований собирали из шейной вены животных в пробирку с 1 % раствором гепарина из расчета 0,02 мл раствора на 1 мл крови.

**Выделение эритроцитов.** Гепаринизированную кровь центрифугировали 10 мин при 3000 г. Плазму удаляли, а эритроциты отмывали 0,9 % раствором NaCl, хорошо перемешивая, осаждали центрифугированием, супернатант удаляли (Новгородцева и др., 2003).

**Выделение эритроцитарных мембран.** Эритроциты помещали в дистиллированную воду, где происходил их гемолиз. Затем центрифугировали 10 мин при 3000 г, супернатант удаляли (Новгородцева и др., 2003).

**Физиологические характеристики эритроцитов.** В мазках крови, окрашенных азур-эозиновой смесью, с помощью окуляр-микрометра определяли диаметр эритроцитов (мкм). Средний объем эритроцита (СОЭр) вычисляли по формуле:  $СОЭр = d^3 \times 0,2$  (мкм<sup>3</sup>), где  $d$  – средний диаметр эритроцита (Гольдберг и др., 1973). Осмотическую резистентность эритроцитов измеряли по методу, предложенному Б.Л. Эндрю (1972).

**Биохимические методы.** Состояние антиоксидантной системы оценивали по величине активности супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) (Paoletty et al., 1986), глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) и уровня восстановленного глутатиона (Новгородцева и др., 2003), малонового диальдегида (Гончаренко, Латинова, 1985). Для определения содержания фракций фосфолипидов и нейтральных липидов применяли следующие методы: экстракция липидов из эритроцитов (Folch et al., 1957); определение общих фосфолипидов (Vaskovsky et al., 1975); приготовление систем растворителей для микротонкослойной хроматографии и реактивов для идентификации фосфолипидов (Кейтс, 1975; Wagner et al., 1961; Rouser et al., 1967;

Vaskovsky et al., 1975); микротонкослойная хроматография фосфолипидов (Svetachev, Vaskovsky, 1972); определение количественного содержания фракций фосфолипидов (Vaskovsky et al., 1975); хроматографическое разделение и количественное определение фракций нейтральных липидов (Amenta, 1964).

**Экстракт из ламинарии японской.** Экстракт из ламинарии готовили методом реперколяции. Измельченное сырье экстрагировали 70 % этанолом с целью освобождения от альгинатов, при соотношении сырья к экстрагенту 1:1 (об/об). Выход экстракта составлял 1 л из 1 кг сухого сырья. Экстракт представляет собой жидкость зеленого цвета со специфическим запахом и вкусом. Имеет сложный композиционный состав различных классов веществ. Содержание общих полифенолов составляло 10,5-12,8 мг/мл.

Предварительно освобожденный от спирта экстракт (путем упаривания в вакууме) животным вводили в виде водного раствора внутривентрикулярно (по 0,4 мл) в дозе, соответствующей 100 мг общих полифенолов на кг массы тела животного (Венгеровский и др., 1999).

**Статистические методы.** Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы InStat (Graph Pad Software Inc. USA, 2005), включая определение средней арифметической величины (M), стандартной ошибки средней (m), оценку достоверности различий по t-критерию Стьюдента.

### **Результаты исследований и их обсуждение** **Физиологические и структурные характеристики эритроцитов при** **воздействии повреждающих факторов**

Изучение физиологических характеристик эритроцитов крыс при исследовании влияния повреждающих факторов в условиях экспериментальных моделей (стресс-вертикальная фиксация, интоксикация четыреххлористым углеродом, гиперхолестеринемия) показало однонаправленность изменений в величинах среднего диаметра эритроцита и его объема (рис. 1).

Во всех экспериментах отмечалось увеличение СДЭ и СОЭр (на 30-38 %,  $p < 0,001$ ). Аналогично увеличивался СОЭр (на 121-164 %,  $p < 0,001$ ). Обращает на себя внимание тот факт, что также во всех экспериментах в эритроцитах возрастало содержание холестерина и снижалось количество общих фосфолипидов. Уровень ХС при гиперхолестеринемии и интоксикации  $CCl_4$  увеличился на 19 % ( $p < 0,001$ ),

тогда как при стресс-вертикальной фиксации его величина увеличилась на 12 % ( $p < 0,001$ ).

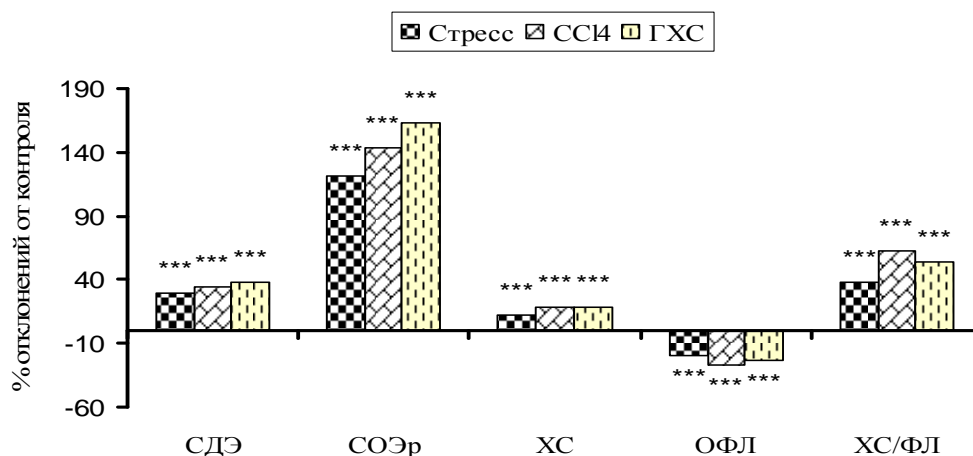


Рис. 1. Изменения физиологических и структурных характеристик эритроцитов крыс в условиях повреждающих факторов.

Примечание: СДЭ – средний диаметр эритроцита, СОЭр – средний объем эритроцита, ХС – холестерин, ОФЛ – общие фосфолипиды, ХС/ФЛ – холестерин/фосфолипиды. \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Количество общих фосфолипидов при интоксикации  $\text{CCl}_4$ , стресс-вертикальной фиксации и гиперхолестеринемии снизилось на 20-27 % ( $p < 0,001$ ). Известно, что в результате встраивания холестерина в мембрану эритроцитов увеличиваются их размеры и изменяется форма: происходит превращение двояковогнутых дисков в сфероциты (Лопухин и др., 1983; Но et al., 1994; Simonetty et al., 1995; Lindi et al., 1998). Сравнивая величины роста коэффициента ХС/ФЛ следует отметить, что при воздействии стресс-вертикальной фиксации его величина возросла на 38 % ( $p < 0,001$ ), тогда как при интоксикации  $\text{CCl}_4$  и при ГХС - на 63 % ( $p < 0,001$ ) и 54 % ( $p < 0,001$ ), соответственно. Известно, что увеличение содержания холестерина в мембране эритроцитов приводит к существенному изменению ее физико-химических свойств: увеличивается микровязкость мембраны, ухудшается деформируемость и способность к прохождению в микроциркулярном русле, снижается активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы (Tsuzuki et al., 2000; Ohvo-Rekila, 2002; Filippov et al., 2003; Koter et al., 2004; Lee et al., 2004; Kempaiah, Srinivasan, 2005). При анализе всех вышеназванных параметров следует отметить, что наиболее существенным изменениям подвергались исследуемые величины при ГХС и интоксикации четыреххлористым углеродом. Следовательно,

данные экспериментальные модели вызывают более глубокие нарушения структуры мембран.

При анализе осмотической резистентности эритроцитов были выявлены специфические особенности в изменении этого физиологического параметра. Так, при действии стресс-вертикальной фиксации и интоксикации четыреххлористым углеродом происходит сдвиг начала гемолиза и его завершения влево относительно контроля, т.е. в сторону меньшей устойчивости к более высоким концентрациям NaCl (0,50 % при стрессе, 0,62 % при интоксикации четыреххлористым углеродом). При ГХС, напротив, наблюдается сдвиг начала гемолиза вправо относительно контроля, т.е. в сторону высокой устойчивости эритроцитов к более низким концентрациям NaCl (начало гемолиза при концентрации NaCl 0,35 %). Завершение гемолиза также было значительно позже при ГХС (при концентрации NaCl 0,30 %), тогда как при стресс-вертикальной фиксации и интоксикации четыреххлористым углеродом, соответственно, при 0,45 % и 0,47 %. Но следует отметить, что интервал концентраций NaCl между началом и завершением гемолиза при ГХС и стресс-вертикальной фиксации был минимальным (0,05 %), тогда как при интоксикации четыреххлористым углеродом – 0,15 %. Это свидетельствует о том, что проницаемость мембран эритроцитов при ГХС и стресс-вертикальной фиксации была ниже, чем таковая в группе интоксикации четыреххлористым углеродом за счет большего количества холестерина в мембране, являющегося ее стабилизатором. Так как холестерин снижает эластичность мембраны, то при ГХС и стресс-вертикальной фиксации эритроцит имеет меньшие возможности к растяжению, чем при интоксикации четыреххлористым углеродом, что и обусловило более быстрое завершение гемолиза.

При анализе показателей системы ПОЛ-АОЗ в крови крыс при стресс-вертикальной фиксации и интоксикации четыреххлористым углеродом относительно таковых величин в контроле прослеживается однонаправленность изменений, но степень их выраженности различается. Наибольшее напряжение и тенденция к истощению антиоксидантной защиты наблюдается при интоксикации четыреххлористым углеродом: активность СОД возросла на 48 %, тогда как при стрессе на 41 %. В пользу этого говорит то факт, что величина восстановленного

глутатиона (Г-SH) в крови животных при стресс-вертикальной фиксации была снижена на 12 %. В то же время при интоксикации четыреххлористым углеродом величина восстановленного глутатиона была снижена на 32 %. Более интенсивно протекает процесс перекисного окисления липидов при интоксикации четыреххлористым углеродом, так как уровень МДА при этом был увеличен в крови крыс на 38 %, а при стрессе величина этого показателя возросла на 15 %.

При анализе нейтральных липидов в эритроцитах всех экспериментальных групп возрастает количество ТАГ и СЖК (рис. 2). Это обусловлено биохимическим механизмом стрессовой реакции, при которой активируется липолиз в адипоцитах жировой ткани, развивается выраженная гипертриглицеридемия, что сопровождается повышением этих липидов в мембране эритроцитов.

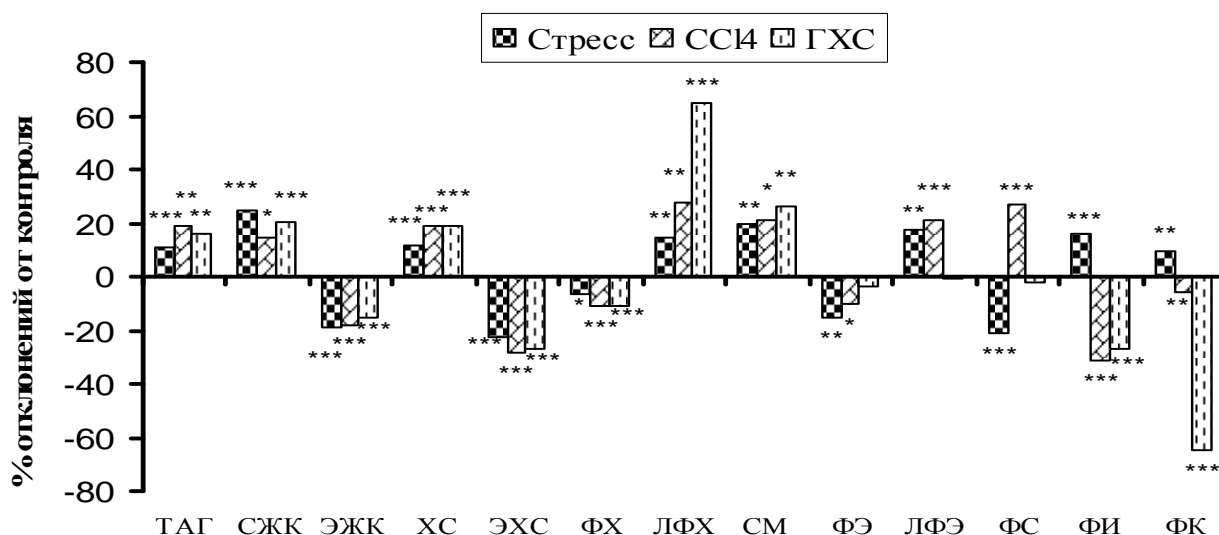


Рис. 2. Изменения липидных фракций эритроцитов крыс в условиях повреждающих факторов.

Примечание: ТАГ – триацилглицерин, СЖК – свободные жирные кислоты, ЭЖК – эфиры жирных кислот, ХС – холестерин, ЭХС – эфиры холестерина, ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФК – фосфатидная кислота. \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

В то же время, стресс-вертикальная фиксация, интоксикация  $CCl_4$  и гиперхолестеринемия сопровождаются угнетением этерифицирующей функции печени (Кушнерова и др., 2002; Спрыгин и др., 2002; Verson et al., 2001; Jaeschke, 2002), что приводит к нарушению синтеза и катаболизма липопротеинов. Кроме того, одинаковая направленность в снижении ЭХС во всех экспериментальных

группах, как при стресс-вертикальной фиксации, интоксикации  $CCl_4$ , так и при гиперхолестеринемии, по-видимому, связано со снижением активности лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (ЛХАТ) (Никифорова, 1981; Sasso et al., 1989; Carrasco et al., 1998), фермента, участвующего в катаболизме липопротеинов, богатых ТАГ (хиломикронов) и ЛПОНП.

При анализе фосфолипидного спектра следует отметить примерно одинаковое снижение ФХ во всех группах, в среднем, на 7-11 % ( $p < 0,05 - 0,001$ ) относительно контроля. При этом по некоторым параметрам отличалась группа с гиперхолестерининовым рационом. Так, при стрессе и при интоксикации четыреххлористым углеродом у животных однонаправлено возрастает количество ЛФХ и ЛФЭ, что свидетельствует об активации фосфолипазы  $A_2$  и увеличении проницаемости мембран (Kabarowsky et al., 2002). При гиперхолестерининовом рационе увеличивается только ЛФХ, а количество ЛФЭ остается неизменным. То есть гиперхолестерининовый рацион в данной экспериментальной модели затрагивает наружный монослой биомембраны и не повреждает внутренний монослой. Однако компенсация недостатка ФХ в наружном монослое мембран эритроцитов осуществилась за счет повышения количества СМ. Такое соотношение фосфолипидных фракций в мембране предполагает уменьшение жидкостных свойств (в мембранах с высоким содержанием холестерина низкое содержание воды) и увеличение микровязкости липидного бислоя (Надиров и др., 1986; Broncel et al., 2005; Ridgway, 2000). При исследовании изменений фосфолипидных фракций, характеризующих внутренний монослой мембраны эритроцитов (ФЭ, ЛФЭ, ФС), также отмечались рассогласования в их соотношении. Количество ФЭ снижалось в группах животных, подвергнутых стрессу и интоксикации четыреххлористым углеродом. Наибольшее снижение содержания ФЭ происходило в эритроцитах крыс при стресс-вертикальной фиксации (на 15 %). При воздействии гиперхолестеринемии изменения в количестве ФЭ и ФС были незначительными, что говорит о нарушении в основном только наружного монослоя биомембран эритроцитов и не затрагивает внутреннего монослоя.

На основании вышеизложенного следует, что воздействие стресс-вертикальной фиксации, интоксикации  $CCl_4$ , гиперхолестерининового рациона

сопровождается неспецифической реакцией организма, которая проявляется в одинаковой направленности изменений липидной составляющей мембран эритроцитов, и обуславливает увеличение их размерных характеристик. В связи с этим все исследуемые нами факторы воздействия на организм следует считать стрессорными.

### **Изменения физиологических и структурных характеристик эритроцитов в период депривации**

В данной работе в одном эксперименте исследовались физиологические и структурные параметры эритроцитов в период отмены стрессорного агента (депривация), то есть в период после интоксикации  $CCl_4$  в течение 7 дней. Через 7 дней после отмены воздействия токсических агентов большинство изученных физиологических и структурных параметров эритроцитов не нормализовалось, более того, отмечалось еще большее отклонение от нормы ряда биохимических показателей, что свидетельствовало о продолжающемся токсическом стрессе и недостаточности собственных защитных сил организма противостоять развитию токсической патологии.

### **Влияние экстракта из ламинарии японской и экстракта элеутерококка на стресс-индуцированные изменения физиологических и структурных характеристик эритроцитов**

При введении животным экстракта из ламинарии и препарата сравнения известного стресс-протектора экстракта элеутерококка нормализовались многие исследуемые параметры. Восстановились и даже расширились границы устойчивости к гемолизирующему агенту. Однако экстракт элеутерококка показал меньшую эффективность в процессах восстановления: сохранялись повышенными размерные характеристики эритроцитов, что обусловлено увеличенным коэффициентом ХС/ФЛ (рис. 3). При сравнении полученных результатов по количественным характеристикам фосфолипидных фракций в эритроцитах при введении экстрактов из ламинарии и элеутерококка на фоне стресса с таковыми у контрольных животных отмечается нормализация практически по всем показателям (рис. 4), за исключением более низкой величины ЛФХ на 5 % ( $p <$

0,05) и более высоких величин ФК на 32 % ( $p < 0,001$ ) и ФИ на 9 % ( $p < 0,001$ ) при введении экстракта из ламинарии.

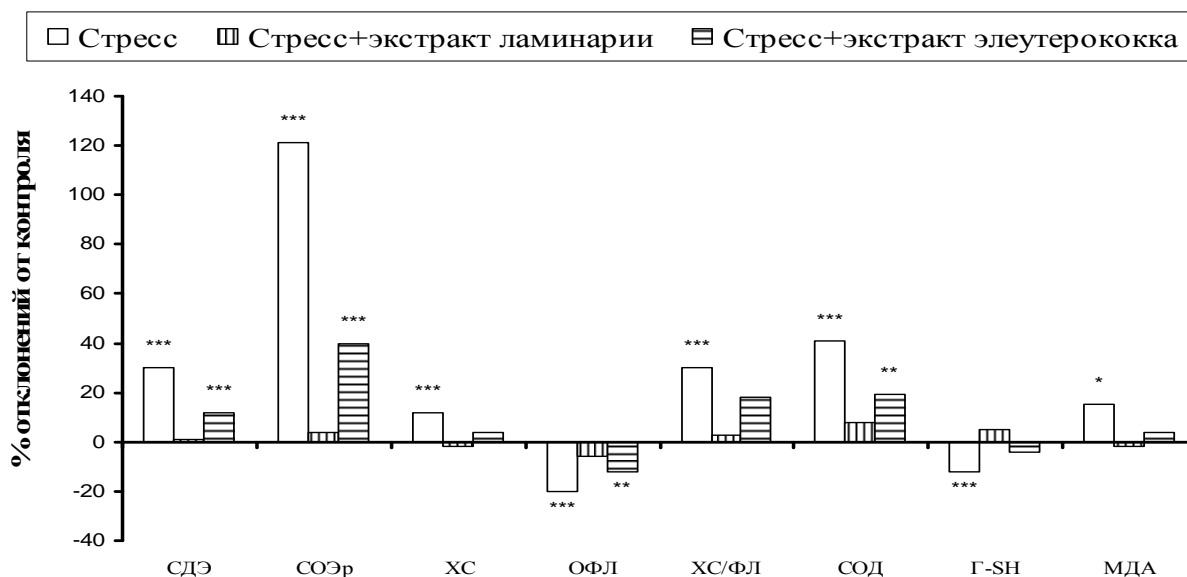


Рис. 3. Влияние экстракта из ламинарии и элеутерококка на физиологические характеристики эритроцитов крыс и показатели системы ПОЛ-АОЗ при стрессе.

Примечание: СДЭ – средний диаметр эритроцита, СОЭр – средний объем эритроцита, ХС – холестерин, ОФЛ – общие фосфолипиды, ХС/ФЛ – холестерин/фосфолипиды, СОД – супероксиддисмутаза, Г-SH – восстановленный глутатион, МДА – малоновый диальдегид. \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .



Рис. 4. Влияние экстракта из ламинарии и элеутерококка на липидный состав мембран эритроцитов крыс при стрессе.

Примечание: ТАГ – триацилглицерин, СЖК – свободные жирные кислоты, ЭЖК – эфиры жирных кислот, ХС – холестерин, ЭХС – эфиры холестерина, ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФК – фосфатидная кислота. \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .



Данный феномен может считаться одним из механизмов более эффективного репаративного действия экстракта ламинарии по сравнению с экстрактом элеутерококка, так как эти две фосфолипидные фракции являются основой для синтеза фосфолипидов, нарушенного стрессом. По остальным показателям экстракт из ламинарии проявлял свойства, сходные с таковыми из элеутерококка.

### **Влияние экстракта из ламинарии и легалона на изменение физиологических и структурных характеристик эритроцитов при интоксикации четыреххлористым углеродом в период депривации**

Введение экстракта из ламинарии и препарата сравнения легалона в период депривации способствовало нормализации практически всех изученных физиологических и структурных характеристик эритроцитов. При сопоставлении эффектов экстракта из ламинарии и легалона в период депривации показало, что при введении легалона оставалась повышенными СОЭр, активность СОД, уровень МДА и сниженной концентрация ОФЛ и Г-SH (рис. 5). В течение 7 дней после прекращения интоксикации четыреххлористым углеродом экстракт из ламинарии был более эффективен, чем легалон в плане нормализации антиоксидантной защиты.

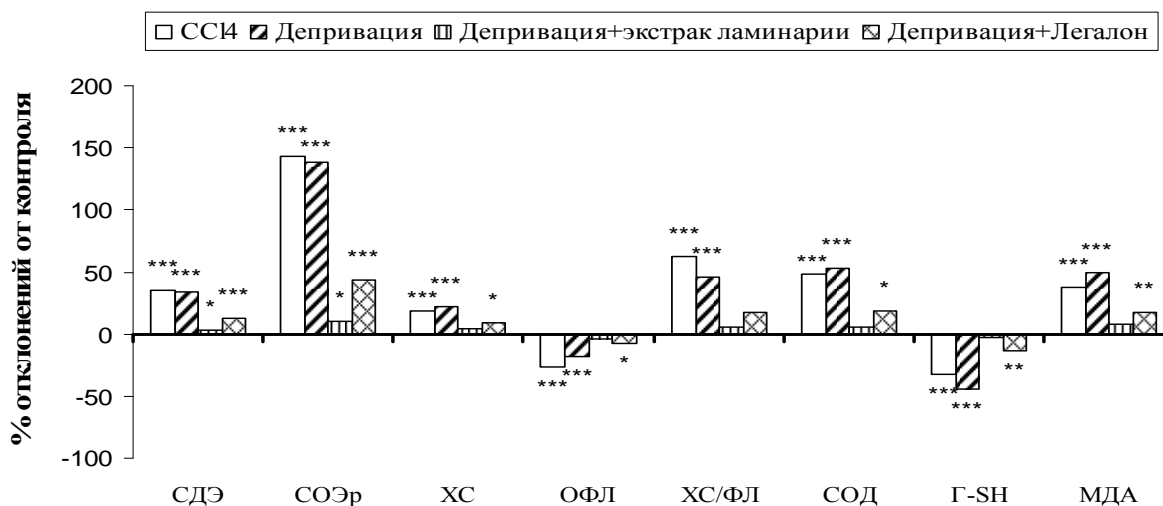


Рис. 5. Влияние экстракта из ламинарии и легалона на физиологические характеристики эритроцитов крыс и показатели системы ПОЛ-АОЗ при интоксикации четыреххлористым углеродом и в период депривации.

Примечание: СДЭ – средний диаметр эритроцитов, СОЭр – средний объем эритроцитов, ХС – холестерин, ОФЛ – общие фосфолипиды, ХС/ФЛ – холестерин/фосфолипиды, СОД – супероксиддисмутаза, Г-SH – восстановленный глутатион, МДА – малоновый диальдегид. \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Обращает на себя внимание более высокий, чем в контроле, уровень ФК при введении экстракта из ламинарии (рис. 6), что может считаться одним из механизмов репаративного действия экстракта, так как этот фосфолипид является основой для синтеза всех фосфолипидов. Действие легалона оказалось менее эффективным, чем экстракта из ламинарии в восстановлении липидной составляющей мембран эритроцитов и снятии токсического стресса. Полученные результаты указывают на мембранопротекторный эффект как экстракта из ламинарии, так и легалона.

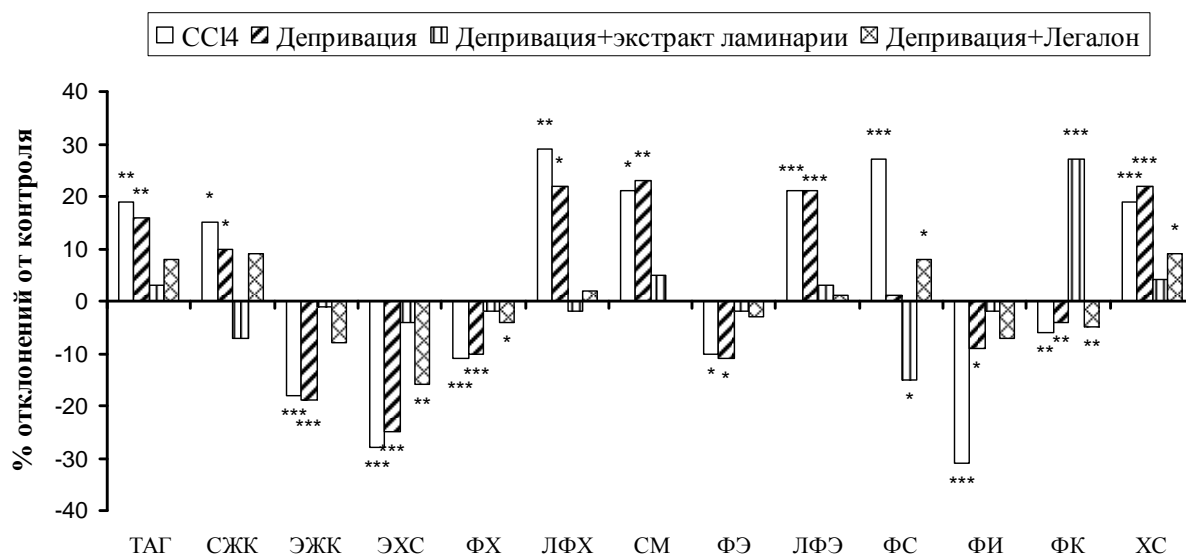


Рис.6 Влияние экстракта из ламинарии и легалона на липидный состав мембран эритроцитов крыс при интоксикации четыреххлористым углеродом и в период депривации.

Примечание: ТАГ – триацилглицерин, СЖК – свободные жирные кислоты, ЭЖК – эфиры жирных кислот, ХС – холестерин, ЭХС – эфиры холестерина, ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭ – фосфатидилэтанолламин, ЛФЭ – лизофосфатидилэтанолламин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФК – фосфатидная кислота. \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

### **Влияние экстракта из ламинарии на изменения физиологических и структурных характеристик эритроцитов при гиперхолестериновом рационе**

Введение экстракта из ламинарии оказало позитивный эффект на исследованные параметры. Снизился уровень холестерина в мембране, восстановился уровень общих фосфолипидов, что обусловило снижение коэффициента ХС/ФЛ. Значительно уменьшился объем эритроцитов, хотя и оставался достоверно увеличенным (рис. 7). Границы осмотической устойчивости

расширились до 0,1 %, что говорит об увеличении эластичности мембраны эритроцитов.

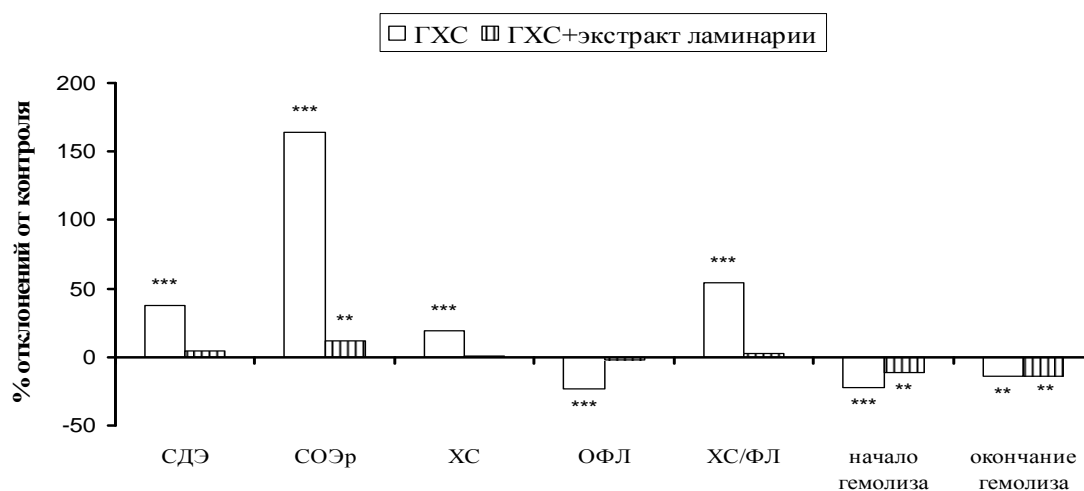


Рис. 7. Влияние экстракта из ламинарии на физиологические характеристики эритроцитов крыс и показатели системы ПОЛ-АОЗ при гиперхолестеринемии.

Примечание: СДЭ – средний диаметр эритроцитов, СОЭр – средний объем эритроцитов, ХС – холестерин, ОФЛ – общие фосфолипиды, ХС/ФЛ – холестерин/фосфолипиды. \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Введение экстракта из ламинарии на фоне ГХС сопровождалось увеличением ЭХС (рис. 8). Данный феномен обусловлен активацией фермента лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (ЛХАТ) полифенолами препарата (Гаскина и др., 1989) и, соответственно, насыщением липопротеинов эфирами холестерина. Следует отметить нормализацию уровня СЖК. При сравнении количественных показателей других фракций нейтральных липидов прослеживается выраженный гипотриглицеридемический эффект экстракта.

Анализ фосфолипидного спектра (рис. 8) показал восстановление фракционного состава до контрольных значений, за исключением ФК, величина которой была выше на 22 % ( $p < 0,01$ ). В то же время, при сравнении с группой гиперхолестеринового рациона отмечались достоверные различия по ряду показателей.

Сопоставляя полученные результаты и оценивая позитивный эффект применения экстракта из ламинарии, следует отметить его высокий мембранопротекторный эффект в условиях гиперхолестеринового рациона.

Данный феномен объясняется тем, что молекулы полифенолов активируют  $7\alpha$ -холестерингидроксилазу, участвующую в окислении ХС в желчные кислоты, а также ЛХАТ (Гаскина и др., 1989), что обуславливает выведение холестерина из мембран и поступление в гепатоцит возросшего потока холестерина в этерифицированной форме в составе липопротеинов высокой плотности. По-видимому, эти механизмы лежат в основе гипохолестеринемического действия экстракта из ламинарии японской.

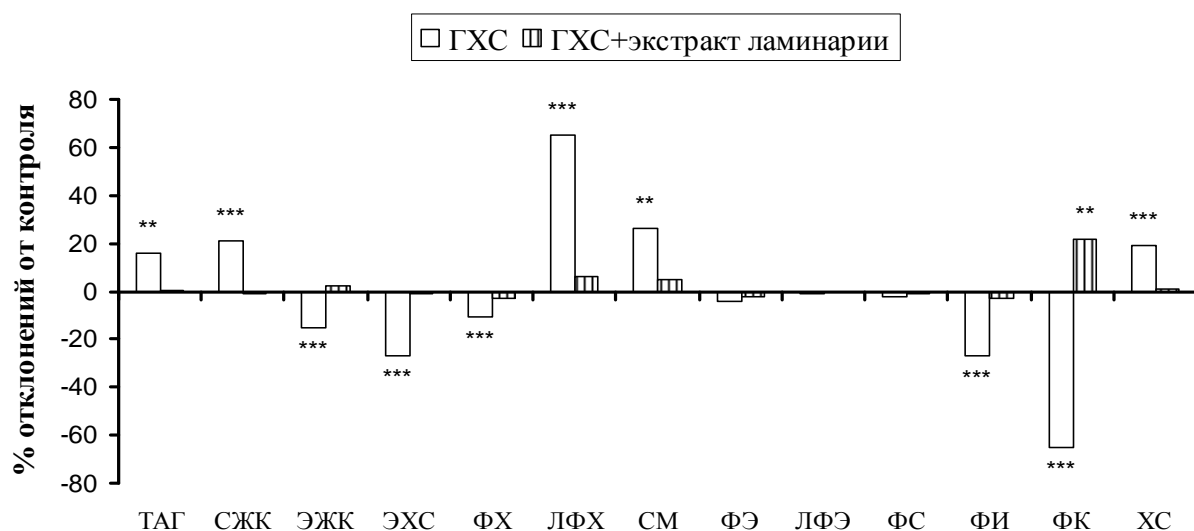


Рис. 8. Влияние экстракта из ламинарии на липидный состав мембран эритроцитов крыс при гиперхолестеринемии.

Примечание: ТАГ – триацилглицерин, СЖК – свободные жирные кислоты, ЭЖК – эфиры жирных кислот, ХС – холестерин, ЭХС – эфиры холестерина, ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФК – фосфатидная кислота. \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

## ВЫВОДЫ

1. Совокупность изменений в липидном составе мембран эритроцитов при действии на крыс повреждающих факторов (стресс-вертикальная фиксация за дорзальную шейную складку, интоксикация четыреххлористым углеродом, гиперхолестериновый рацион) имеет стереотипный характер (напряжение системы антиоксидантной защиты, усиление перекисного окисления липидов, увеличение размерных характеристик эритроцитов, изменение их осмотической резистентности, образование лизофракций фосфолипидов, увеличение содержания холестерина, триацилглицеринов), что позволяет рассматривать их как атрибут стрессорной реакции.

2. Наряду со снижением содержания количества структурных фосфолипидов (ФХ и ФЭ), происходит увеличение содержания СМ и лизофракций (ЛФХ и ЛФЭ). Перераспределение отдельных классов фосфолипидов внутри липидного бислоя эритроцитарной мембраны свидетельствует о формировании компенсаторной реакции в ответ на действие повреждающего фактора.

3. При стресс-вертикальной фиксации животных, интоксикации  $CCl_4$ , а также гиперхолестериновом рационе изменения в липидной составляющей мембран эритроцитов обуславливают увеличение их размера и ослабление осмотической резистентности.

4. В период депривации после действия на крыс интоксикации четыреххлористым углеродом восстановления исследованных физиолого-метаболических характеристик эритроцитов не происходит, что указывает на продолжающееся и углубляющееся состояние дестабилизации их мембранных структур, обусловленное сохранением свободнорадикальных процессов и активацией фосфолипаз.

5. Экстракт из ламинарии японской проявляет мембранопротекторные свойства в условиях воздействия мембраноповреждающих факторов у животных.

6. Экстракт из ламинарии японской нормализует показатели системы «перекисное окисление липидов–антиоксидантная защита» за счет собственной антиоксидантной активности, регулирует реакции этерификации холестерина и нормализуют соотношение фосфолипидных фракций, что обуславливает

восстановление размерных характеристик эритроцитов (средний диаметр и средний объем эритроцитов), повышение их эластических свойств и расширение границ осмотической устойчивости.

7. Экстракт из ламинарии в условиях стресс-вертикальной фиксации животных по своей восстанавливающей активности превосходит экстракт из элеутерококка по способности увеличивать в мембране эритроцитов эфиры жирных кислот и фосфатидную кислоту.

8. Экстракт из ламинарии в период депривации после интоксикации четыреххлористым углеродом превосходит полифенольный препарат «Легалон»™ по способности снижать напряжение системы антиоксидантной защиты и перекисного окисления липидов, нормализовать размерные характеристики эритроцитов, снижать холестерин, что обеспечивало восстановление порога осмотической устойчивости эритроцитов к гемолизирующему агенту.

9. Экстракт из ламинарии японской обладает гипохолестеринемическим эффектом в условиях гиперхолестеринемического рациона, усиливает этерификацию холестерина и выведение его из мембран, нормализует соотношение липидных компонентов и восстанавливает осмотическую устойчивость эритроцитов.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Физиологические параметры эритроцитов (средний диаметр, средний объем и осмотическая резистентность) целесообразно использовать в клинической практике для оценки интенсивности стрессовых воздействий различной природы.

2. Использование определения фракций нейтральных липидов и фосфолипидов в мембране эритроцитов, а также показателей антиоксидантной защиты целесообразно для исследования физиологических механизмов нарушения структурной организации мембран при действии повреждающих факторов и механизмов восстановления при применении фармакологических препаратов.

3. Рекомендуется применение экстракта из ламинарии японской для коррекции нарушений липидного обмена эритроцитарных мембран. Перспективным направлением является применение экстракта из ламинарии японской при воздействии вредных экологических и производственных факторов.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кушнерова Т.В., **Кондратьева Е.В.**, Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е., Спрыгин В.Г., Лесникова Л.Н. Коррекция физиолого-метаболических характеристик эритроцитов при гиперхолестеринином рационе экстрактом из ламинарии японской // Тихоокеанский медицинский журнал. 2010. № 2. С. 36-38.
2. Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е., Спрыгин В.Г., Кушнерова Т.В., Хотимченко Ю.С., **Кондратьева Е.В.**, Другова Л.А. Экстракт из бурой водоросли *Laminaria japonica* – перспективный стресс-протекторный препарат // Биология моря. 2010. Т. 36, № 3. С. 215-220.
3. Кушнерова Т.В., Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Лесникова Л.Н., Хотимченко Ю.С., **Кондратьева Е.В.** Антиоксидантные и мембранопротекторные свойства экстракта из бурой водоросли *Laminaria japonica* // Биология моря. 2010. Т.36, № 5. С. 384-389.
4. **Кондратьева Е.В.**, Кушнерова Т.В. Использование экстрактов из морских водорослей как мембранопротекторов при стрессе // Актуальные проблемы технологии живых систем: Сб. мат. III Международной научно-технической конференции молодых ученых. 8-10 октября 2009 г., Владивосток. Владивосток: Изд-во ТГЭУ, 2009. С. 211-213.
5. Кушнерова Т. В., **Кондратьева Е. В.** Коррекция стрессовых нарушений мембран эритроцитов экстрактом из ламинарии японской // Биология – наука XXI века. 14-я международная Пушинская школа-конференция молодых ученых. 19-23 апреля 2010 г., Пушино: Сб. тезисов. Пушино, 2010. Т. 1. С. 151.
6. **Кондратьева Е.В.**, Кушнерова Т.В. Гипохолестеринемические свойства экстракта из ламинарии японской // Биология – наука XXI века. 14-я международная Пушинская школа-конференция молодых ученых. 19-23 апреля 2010 г., Пушино: Сб. тезисов. Пушино, 2010. Т. 1. С. 142.
7. Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е., Спрыгин В.Г., Лесникова Л.Н., Кушнерова Т.В., **Кондратьева Е.В.** Экстракт из ламинарии японской – профилактическое средство при гиперхолестеринемии // Дальневосточная весна – 2010: Мат. 10-й международной научно-практической конференции (г. Комсомольск-на-Амуре, Россия, 20-21 мая 2010 г.). Комсомольск-на-Амуре, 2010. С. 438-440.
8. Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Кушнерова Т.В., **Кондратьева Е.В.**, Сизова Л.А., Другова Е.С. Стресс-протекторные свойства экстракта из ламинарии японской (*Laminaria japonica*) // XVII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: Сб. мат. конгресса (тезисы докладов). 12-16 апреля 2010 г., Москва. Москва, 2010. С. 735.



Кондратьева Елена Викторовна

СТРЕССОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФИЗИОЛОГО-МЕТАБОЛИЧЕСКИХ  
ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ И ИХ КОРРЕКЦИЯ ЭКСТРАКТОМ ИЗ  
ЛАМИНАРИИ ЯПОНСКОЙ

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук