

Лесникова Лариса Николаевна

**СТРЕССОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ  
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ  
И ИХ КОРРЕКЦИЯ С ПОМОЩЬЮ ЭКСТРАКТА  
ИЗ ТУНИКИ АСЦИДИИ ПУРПУРНОЙ  
(HALOCYNTHIA AURANTIUM)**

03.00.13 – физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук



**ВЛАДИВОСТОК**

2006

Работа выполнена в лаборатории биохимии Отдела биохимических технологий Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН

Научный руководитель:

*доктор биологических наук Кушнерова Наталья Федоровна*

Научный консультант:

*доктор медицинских наук Кириллов Олег Иванович*

Официальные оппоненты:

*доктор биологических наук Лукьянова Ольга Николаевна*

*доктор биологических наук, профессор Колдаев Владимир Михайлович*

Ведущая организация:

*Владивостокский филиал ГУ Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания СО РАМН – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения*

Защита состоится « 12 » октября 2006 года в 10 часов на заседании регионального диссертационного совета КМ 005.008.01 при Институте биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН по адресу: 690041, Владивосток, ул. Пальчевского, 17. Факс (4232) 310900, электронный адрес [inmarbio@primorye.ru](mailto:inmarbio@primorye.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН

Автореферат разослан « 8 » сентября 2006 года

И.о. ученого секретаря  
Диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Н.А. Одинцова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Функциональное состояние эритроцитов – наиболее удачная биологическая модель для изучения динамики многих нарушений, протекающих в организме при развитии патологии (Foote et al., 1990; Theret et al., 1993; Эндакова и др., 2002; Cao et al., 2002; Zhao et al., 2006). Вместе с тем, изучение эритроцита как модели для исследования стрессорной нагрузки на биомембраны не получило должного развития. Данное обстоятельство объясняется тем, что в отличие от других форменных элементов крови стрессорная реакция не сопровождается изменением количества эритроцитов (Горизонтов и др., 1983). Интерес к изучению липидной составляющей мембран эритроцитов для оценки общего напряжения при стрессе возник после того, как оказалось, что действие на организм повреждающих факторов сопровождается существенным сдвигом в липидном обмене печени (Verison et al., 2001; Jaeschke et al., 2002; Кушнерова и др., 2002, 2004, 2005; Спрыгин и др., 2002, 2003; Фоменко и др., 2003; Lieber, 2005). Поскольку этот сдвиг затрагивал фосфолипидный обмен, было очевидно, что он может обусловить и изменения функциональных свойств эритроцитарной мембраны (Beauge et al., 1991; Simonetti, 1995; Lindi et al., 1998; Varga et al., 2000; Soderberg et al., 2003; Broncel et al., 2005). К сожалению, неспецифический стереотип подобных отклонений, который в литературе рассматривается как атрибут стрессорной реакции, охарактеризован только в самой общей форме.

Физиологические свойства, такие как деформируемость, осмотическая резистентность и способность к агрегации, обеспечивающие продвижение эритроцитов по кровяному руслу, а, следовательно, транспорт кислорода к органам и тканям, определяются лабильностью эритроцитарной мембраны (Зинчук, 2001; Иржак, 2001; Johnson, 1994). Последняя, в свою очередь, регулируется комплексом взаимосвязанных изменений в структуре липидного бислоя биомембран, важное значение в котором имеет отношение холестерин/фосфолипиды (Tsuzuki et al., 2000;

---

В работе приняты следующие сокращения: ГХС – гиперхолестериновый рацион, ЖК – жирная кислота, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, ЛФЭ – лихофосфатидилэтаноламин, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты, ПОЛ – перекисное окисление липидов, СДЭ – средний диаметр эритроцита, СЖК – свободные жирные кислоты, СМ – сфингомиелин, СОЭр – средний объем эритроцита, ОРЭ – осмотическая резистентность эритроцитов, ОФЛ – общие фосфолипиды, ТАГ – триацилглицерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФК – фосфатидная кислота, ФЛ – фосфолипиды, ФС – фосфатидилсерин, ФХ – фосфатидилхолин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ХС – холестерин, ЭЖК – эфиры жирных кислот, ЭХС – эфиры холестерина, ССЛ<sub>4</sub> – четыреххлористый углерод.

Ohvo-Rekila, 2002; Filippov et al., 2003), фосфолипидный состав (Lindi et al., 1998; Florin-Christensen et al., 2001) и соотношение жирных кислот в общих липидах (Zwaal, Schroit, 1997; Kuypers, 1998).

В настоящем исследовании анализируются стрессорные изменения физиологических характеристик и липидной составляющей мембран эритроцитов при четырех повреждающих факторах (фиксация крыс в вертикальном положении за дорзальную шейную складку, интоксикация этанолом и  $CCl_4$ , гиперхолестериновый рацион), а также демонстрируется возможность коррекции наблюдаемых отклонений с помощью водно-спиртового экстракта из туники (оболочки) асцидии пурпурной *Halosynthia aurantium*. Данные об изменении функциональных свойств эритроцитов при использовании экстракта из туники асцидии как стресс-протектора отсутствуют.

**Цель работы** – охарактеризовать стрессорные изменения функциональных свойств эритроцитов и оценить возможность их коррекции с помощью экстракта из туники асцидии пурпурной *Halosynthia aurantium*.

#### **Задачи:**

1. Изучить физиологические характеристики и липидный состав мембран эритроцитов крыс при действии повреждающих факторов (стресс-вертикальная фиксация за дорзальную шейную складку, интоксикация этиловым спиртом и  $CCl_4$ , гиперхолестериновый рацион).

2. Изучить влияние экстракта из туники асцидии пурпурной на физиологические параметры и липидную составляющую мембран эритроцитов интактных крыс.

3. Оценить репаративный эффект экстракта из туники асцидии пурпурной на физиологические параметры и липидную составляющую мембран эритроцитов в условиях действия на крыс повреждающих факторов.

**Научная новизна.** В рамках одного исследования сопоставлены изменения физиологических и структурных характеристик эритроцитов крыс при действии на организм повреждающих факторов (стресс-вертикальная фиксация, интоксикация этанолом и  $CCl_4$ , гиперхолестериновый рацион).

Показано, что при первых трех экспериментальных моделях наблюдается увеличение размера и снижение осмотической резистентности эритроцитов. Эти функциональные изменения сопровождаются адаптивной перестройкой липидного

состава эритроцитов, свидетельствующей об изменении лабильности (снижении вязкости и повышении жесткости) эритроцитарной мембраны. В условиях гиперхолестеринового рациона отмечается увеличение размеров эритроцитов при одновременном повышении их осмотической резистентности, но интервал концентраций NaCl между началом и завершением гемолиза был минимальным (0,05%), тогда как при стресс-вертикальной фиксации, интоксикации этанолом и CCL<sub>4</sub> – 0,1-0,2%.

Получены новые данные, подтверждающие, что при действии на организм повреждающих факторов в липидной составляющей мембран эритроцитов наблюдается увеличение лизоформ фосфолипидов (ЛФХ и ЛФЭ), ТАГ, ХС, СЖК, насыщенных жирных кислот и снижение n-6 и n-3. ПНЖК. Уменьшение количества основных структурных фосфолипидов (ФХ и ФЭ) сопровождается усилением биосинтеза холестерина, что вызывает рост коэффициента ХС/ФЛ.

Приведены доказательства того, что в условиях стресса происходят компенсаторные изменения в соотношении фосфолипидных фракций: наряду со снижением количества ФХ и ФЭ, локализованных, соответственно, в наружном и внутреннем монослоях биомембран, увеличивалось количество СМ и ФС, располагающихся аналогично.

Так как комплекс перечисленных изменений в функциональном состоянии и липидном составе эритроцитов является стереотипным, его можно рассматривать как атрибут стрессорной реакции.

Впервые показано, что водно-спиртовой экстракт из туники асцидии пурпурной восстанавливает липидный состав и физиологические характеристики эритроцитов, нарушенные повреждающими факторами. Это является дополнительным доказательством возможности использования его в качестве стресс-протектора.

**Практическая значимость работы.** Исследование расширяет недостаточно разработанные в науке представления об участии эритроцитарной системы в физиологических механизмах стрессорной реакции. Материал о репаративном действии экстракта из туники асцидии пурпурной в отношении стрессорных изменений физиологических и структурных характеристик эритроцитов может быть

использован при разработке медико-биологической документации на применение этого средства в качестве биологически активной добавки.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Изменения липидного состава эритроцитов, вызванные действием повреждающих факторов, имеют неспецифический характер (образование лизоформ основных структурных фосфолипидов, накопление холестерина, триацилглицеринов, насыщенных жирных кислот, снижение ПНЖК), что может рассматриваться как атрибут стрессорной реакции.

2. Функциональными проявлениями стрессорной реакции на эритроциты являются нарушение их физиологических характеристик (увеличение размера эритроцитов, изменение осмотической резистентности), рассогласования в соотношении фосфолипидных и нейтральных фракций липидов, жирнокислотном спектре.

3. Водно-спиртовой экстракт из туники асцидии пурпурной как источник фосфолипидов и широкого спектра n-6 и n-3 ПНЖК, восстанавливает липидный состав и физиологические характеристики эритроцитов крыс при действии повреждающих факторов.

**Апробация работы.** Основные результаты работы представлены на II Международном Тихоокеанском конгрессе по традиционной медицине (Владивосток, 2001), II Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создания функциональных продуктов» (Москва, 2003), Дальневосточной региональной конференции с Всероссийским участием «Медицинская физика и новейшие медицинские технологии» (Владивосток, 2005), Международной научной конференции «Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных» (Саранск, 2005), Четвертой Российской конференции с международным участием «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция» (Москва, 2005), а также на заседаниях совета Отдела биохимических технологий ТОИ ДВО РАН и Физиологического общества ВГМУ (Владивосток, 2006).

Работа выполнена при поддержке гранта № 05-III-A-07-064 ДВО РАН.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе две статьи в рецензируемых журналах.

**Структура и объем диссертации.** Работа изложена на 154 страницах и содержит введение, обзор литературы, характеристику материала и методов исследования, описание результатов собственных экспериментов, обсуждение результатов и выводы. Список литературы включает 251 работу, в том числе 118 отечественных и 133 зарубежных авторов. Текст иллюстрирован 39 рисунками и 11 таблицами. В приложение вынесено 20 таблиц с экспериментальными данными.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Экспериментальные животные.** В экспериментах использовано 200 крыс-самцов линии Вистар. Крыс получали из питомника РАМН «Столбовая» (г. Чехов Московской области).

**Острый стресс** моделировали вертикальной фиксацией животных за дорзальную шейную складку на 22 часа (Ю. Добряков, 1978).

**Интоксикация этанолом.** Животным в течение 7 дней внутрибрюшинно вводили 33%-ный этанол в дозе 7,5 мл/кг 2 раза в сутки (Gajdos et al., 1972).

**Интоксикация четыреххлористым углеродом.** Крысам внутрижелудочно вводили 50%-ный масляный раствор четыреххлористого углерода ( $\text{CCl}_4$ ) из расчета 1,25 мл/кг в течение 4 дней (Венгеровский и др., 1999).

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

По завершении каждого эксперимента животных выводили из него методом декапитации и проводили взятие крови из шейной вены.

**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  $\text{СОЭр} = d^3 \times 0,2$  (мкм<sup>3</sup>), где  $d$  – средний диаметр эритроцита (Гольдберг и др., 1973). Осмотическую резистентность эритроцитов (ОРЭ) определяли по методу Б. Эндрю (1972).

**Биохимические методы.** Эритроциты выделяли по методу М.С.Усатенко и Г.И.Берлин (1979). 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); получение метиловых эфиров жирных кислот метанолизом с хлористым ацетилом (Кейтс, 1975), их анализ на хроматографе «Биохром» с пламенно-ионизационным детектором; идентификация жирных кислот путем сравнения удерживаемых объемов в исследуемой смеси (Берчфилд, Сторрс, 1964) и с помощью стандартных препаратов метиловых эфиров жирных кислот (C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>).

**Экстракт из туники асцидии пурпурной «Хаурантин»** (патент № 1522487, свидетельство на товарный знак № 236689) вводили внутривентрикулярно через зонд или *per os* в дозе 0,4 мл/кг массы, что соответствовало 28 мг/кг сухого остатка. Данная доза была разработана экспериментально (Ю.Добряков, 2000). Перед введением животным экстракт деалкоголизировали в вакууме и доводили дистиллированной водой до нужной концентрации сухого остатка. В качестве препарата сравнения использовали фосфолипидный препарат «Эссенциале» производства компании «Rhone-Poulenc Roger» (Германия). Доза эссенциале составляла 125 мг/кг массы тела животного в водном растворе (Саратиков и др., 2004).

**Статистические методы.** Экспериментальные данные обработаны методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента и коэффициента корреляции. Для расчетов применяли программу «STATISTICA for Windows, release 5.1».

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **1. Физиологические и структурные характеристики эритроцитов крыс при действии повреждающих факторов**

Изучение физиологических характеристик эритроцитов крыс в условиях экспериментальных моделей (стресс-вертикальная фиксация животных, интоксикация этиловым спиртом, четыреххлористым углеродом, гиперхолестериновый рацион)



показало однонаправленность изменений в величинах среднего диаметра эритроцитов и его объема. Во всех экспериментах отмечалось увеличение СДЭ и СОЭр, но степень выраженности была различной (рис. 1). Увеличение СДЭ при стресс-вертикальной фиксации, интоксикации  $\text{CCl}_4$  и ГХС достигало 30-37% ( $P < 0,001$ ), тогда как при интоксикации этанолом только 15% ( $P < 0,001$ ). Аналогично увеличивался СОЭр.

Обращает на себя внимание тот факт, что во всех экспериментах в эритроцитах возрастало содержание холестерина и снижалось количество общих фосфолипидов.

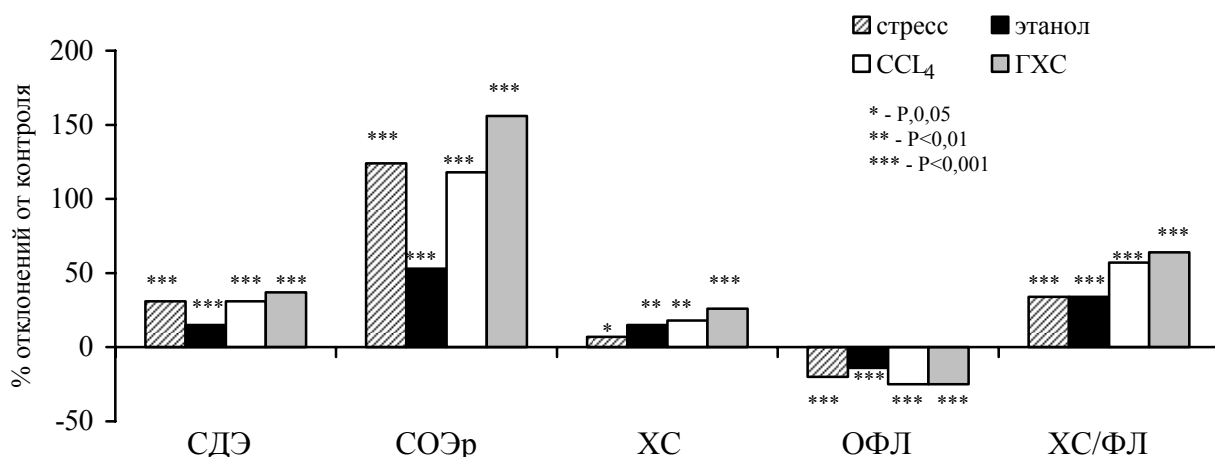


Рис. 1. Изменения физиологических и структурных характеристик эритроцитов крыс в условиях повреждающих факторов.

Повышение уровня ХС при ГХС составляло 26% ( $P < 0,001$ ), интоксикации  $\text{CCl}_4$  18% ( $P < 0,01$ ), действию этанола 15% ( $P < 0,01$ ), а при стресс-вертикальной фиксации всего 7% ( $P < 0,05$ ). Степень снижения количества общих фосфолипидов при интоксикации  $\text{CCl}_4$ , стресс-вертикальной фиксации и ГХС (в среднем 20-25%,  $P < 0,001$ ) была значительнее, чем при действии этанола (14%,  $P < 0,001$ ).

Сравнивая коэффициент ХС/ФЛ следует отметить, что при стресс-вертикальной фиксации и интоксикации этанолом, его величина возросла на 34% ( $P < 0,001$ ), тогда как при интоксикации  $\text{CCl}_4$  и при ГХС - на 57% ( $P < 0,001$ ) и 64% ( $P < 0,001$ ), соответственно.

Как известно, в результате встраивания холестерина в мембраны эритроцитов увеличиваются их размеры и изменяется форма: происходит превращение двояковогнутых дисков в сфероциты и эхиноциты. (Лопухин и др., 1983; Но et al., 1994; Simonetti et al., 1995; Lindi et al., 1998). Этот процесс сопряжен с изменением

физико-химических свойств эритроцитарной мембраны: повышением ее микровязкости, ухудшением деформируемости клеток, способности к прохождению в микроциркулярном русле и снижением активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -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 осмотической резистентности эритроцитов были выявлены специфические особенности в изменении этого физиологического параметра. Так, при стресс-вертикальной фиксации, интоксикации этанолом и  $\text{CCl}_4$  происходил сдвиг начала гемолиза и его завершения влево относительно контроля, т. е. в сторону меньшей устойчивости к более высоким концентрациям  $\text{NaCl}$  (0,47% при стрессе, 0,55% при интоксикации этанолом, 0,61% при интоксикации  $\text{CCl}_4$ ;  $P < 0,001$ ). Менее устойчивыми к гемолизу оказались эритроциты при действии  $\text{CCl}_4$ . При ГХС, напротив, наблюдался сдвиг начала гемолиза вправо относительно контроля, т. е. в сторону высокой устойчивости эритроцитов к более низким концентрациям  $\text{NaCl}$  (начало гемолиза при концентрации  $\text{NaCl}$  0,35%;  $P < 0,01$ ). Завершение гемолиза также было значительно позже при ГХС (при концентрации  $\text{NaCl}$  0,3%;  $P < 0,01$ ), тогда как при стрессе, интоксикации этанолом и  $\text{CCl}_4$ , соответственно, при 0,37% ( $P < 0,05$ ) и 0,45% ( $P < 0,001$ ). Следует отметить, что интервал концентраций  $\text{NaCl}$  между началом и завершением гемолиза при ГХС был минимальным (0,05%), а при стресс-вертикальной фиксации, интоксикации этанолом и  $\text{CCl}_4$  – 0,1-0,2%. Это свидетельствует о том, что проницаемость мембран эритроцитов при гиперхолестеринемии была ниже, чем таковая в других исследуемых группах, за счет большего количества холестерина в мембране, являющегося ее стабилизатором. Но, так как холестерин снижает эластичность мембраны, то при ГХС эритроцит имеет меньшие возможности к растяжению, чем в других экспериментальных моделях, что и обусловило более быстрое завершение гемолиза.

**Нейтральные липиды.** В эритроцитах всех экспериментальных групп возрастало количество ТАГ и СЖК (рис. 2). Это обусловлено биохимическими механизмами стрессорной реакции, включающими активацию липолиза в адипоцитах жировой ткани с развитием выраженной гипертриглицеридемии. Наиболее высокое содержание ТАГ и СЖК отмечалось при ГХС, что, по нашему мнению, связано с рационом, содержащим большие концентрации насыщенных жиров.

При анализе изменений в содержании ЭЖК обращает на себя внимание тот факт, что при интоксикации этанолом эта величина возростала, тогда как в других экспериментальных моделях, наоборот, уменьшалась. Известно, что при воздействии этанола активируются реакции этерификации между этанолом и жирными кислотами (Lieber, 2000, 2000a, Кушнерова и др., 2004; 2005), что обуславливает его разжижающий эффект на мембраны.

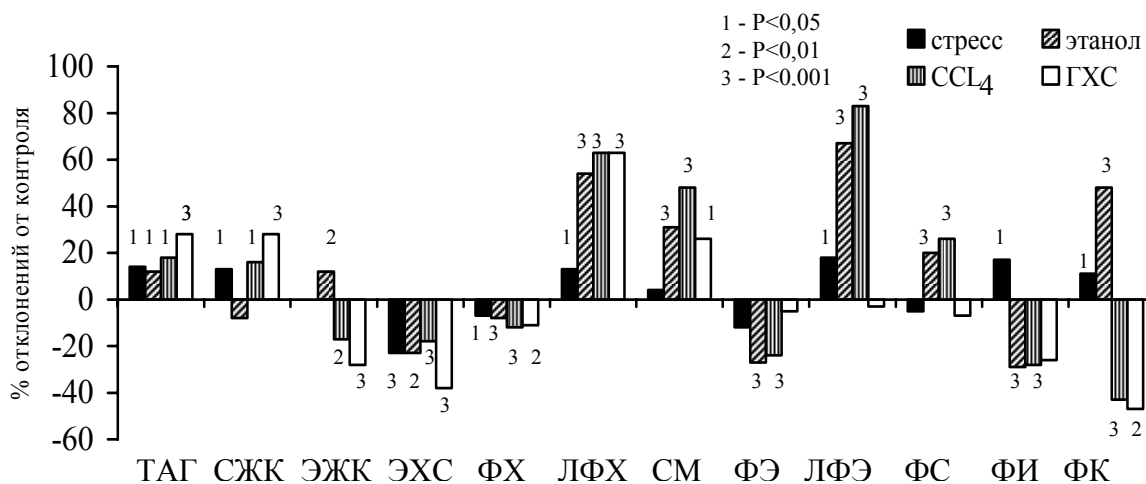


Рис. 2. Изменения липидных фракций эритроцитов крыс в условиях повреждающих факторов.

В то же время, все повреждающие факторы, включая ГХС угнетают этерифицирующую функцию печени (Berson et al., 2001; Jaeschke, 2002; Кушнерова и др., 2002; Спрыгин и др., 2002), что приводит к нарушению синтеза и катаболизма липопротеинов. Кроме того, одинаковая направленность в снижении ЭХС во всех экспериментальных группах, по-видимому, связана со снижением активности лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (ЛХАТ), фермента, участвующего в катаболизме липопротеинов, богатых ТАГ (хиломикрон) и ЛПОНП (Никифорова, 1981; Sasso et al., 1989; Carrasco et al., 1998).

**Фосфолипиды.** Следует отметить примерно одинаковое снижение содержания ФХ во всех экспериментальных группах (в среднем, на 7-12% относительно контроля) с одновременным ростом образования ЛФХ, что свидетельствует об активации фосфолипазы А<sub>2</sub>. Однако компенсация недостатка ФХ в наружном монослое мембран эритроцитов осуществлялась за счет повышения количества СМ (рис. 2.). Расчет коэффициента ФХ/СМ, характеризующего уровень

перераспределения фосфолипидных фракций внутри мембранного бислоя, показал отличия от нормы. Так, при воздействии стресс-вертикальной фиксации  $K=1,91$  (в контроле 2,12), при интоксикации этанолом  $K=2,42$  (в контроле 3,46), при интоксикации  $CCL_4$   $K=2,17$  (в контроле 3,65), при ГХС  $K=2,84$  (в контроле 4,02), т.е. наблюдается общая тенденция к снижению этого коэффициента, что предполагает уменьшение жидкостных свойств (в мембранах с высоким содержанием холестерина низкое содержание воды) и увеличение микровязкости липидного бислоя (Надиров и др., 1986; Ridgway, 2000; Broncel et al., 2005).

При исследовании изменений фосфолипидных фракций, характеризующих внутренний монослой мембраны эритроцитов (ФЭ, ЛФЭ, ФС), также отмечались рассогласования в их соотношении. Количество ФЭ уменьшалось во всех группах животных, подвергнутых стрессорным воздействиям, но больше всего это снижение происходило при влиянии этанола и  $CCL_4$  (на 24-27%;  $P<0,001$ ). При этом в данных группах более всего возрастало количество ЛФЭ, что может быть обусловлено не только активацией фосфолипаз, но и воздействием радикалов трихлорметана, хлорина (из  $CCL_4$ ) и этильных радикалов (из этанола). В этих же группах обращает на себя внимание увеличение количества ФС. Расчет коэффициента ФЭ/ФС показал, что при интоксикации этанолом его величина составляет 1,89 (в контроле 3,1), а при интоксикации  $CCL_4$  – 1,92 (в контроле 3,19). Таким образом, прослеживается четкая тенденция к снижению обоих коэффициентов в этих двух группах, что свидетельствует о наличии глубоких структурно-функциональных нарушений внутри мембранного бислоя эритроцитарной мембраны при действии стрессорного агента. При стресс-вертикальной фиксации и ГХС изменения в количестве ФЭ и ФС были незначительными, т.е. нарушению подвергался в основном наружный монослой мембран эритроцитов.

Другой характеристикой лабильности липидного бислоя является его асимметрия. ФХ совместно с СМ располагаются преимущественно во внешнем монослое липидного бислоя мембраны, а ФЭ и ФС во внутреннем монослое. Расчет коэффициента  $\frac{ФЭ+ФС}{ФХ+СМ}$ , который отражает отношение суммы фосфолипидов с меньшей насыщенностью жирных кислот к фосфолипидам с большей насыщенностью, позволяет получить представление о жидкостности мембраны. Так, при стресс-вертикальной фиксации  $K=0,41$  (в контроле 0,45), при интоксикации

этанолом  $K=0,44$  (в контроле  $0,53$ ), при интоксикации  $CCL_4$   $K=0,46$  (в контроле  $0,53$ ), при ГХС  $K=0,6$  (в контроле  $0,61$ ), т.е. во всех выше названных экспериментах коэффициент асимметрии был ниже контрольной величины, что обуславливает повышение насыщенности липидного бислоя и, соответственно, потери воды и увеличение микровязкости.

Коэффициент окисляемости, характеризующий отношение лекоокисляемых фосфолипидов к трудноокисляемым фосфолипидам ( $ФК+ФС+ФЭ+ФИ/ФХ+СМ$ ) снижался во всех группах крыс. Так, при стресс-вертикальной фиксации  $K=0,60$  (в контроле  $0,63$ ), интоксикации этанолом  $K=0,60$  (в контроле  $0,70$ ),  $CCL_4$   $K=0,56$  (в контроле  $0,68$ ), при ГХС  $K=0,63$  (в контроле  $0,78$ ). Уменьшение коэффициента окисляемости, как и коэффициента асимметрии, принято рассматривать в качестве критерия повышения микровязкости и жесткости мембраны (Шевченко и др., 2002).

**Жирные кислоты.** Под влиянием стрессорных факторов в эритроцитарных мембранах возрастало количество насыщенных жирных кислот (рис. 3). Это негативный фактор, так как в мембране насыщенные жирные кислоты не только снижают связывание воды (Надиров и др., 1986), но и формируют локальные участки (домены) и неспецифичные ионные каналы, через которые начинается пассивная диффузия одно- и двухвалентных катионов по градиенту концентрации, что приводит к увеличению размера клеток (Титов, 1999).

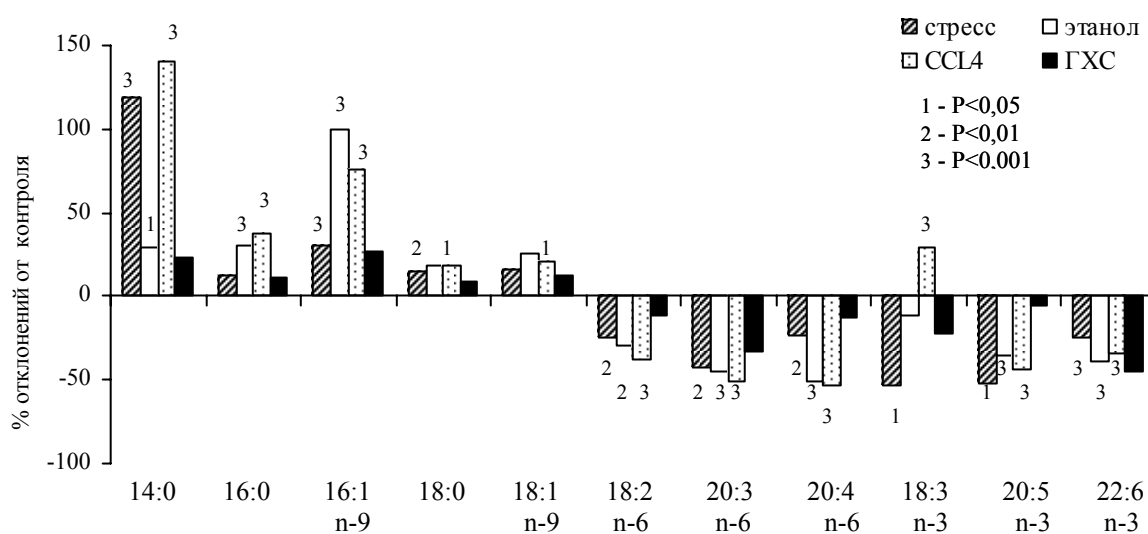


Рис. 3. Изменения спектра жирных кислот эритроцитов крыс в условиях повреждающих факторов.

Одновременно в эритроцитарной мембране наблюдался дефицит полиеновых жирных кислот (ЖК). Следует отметить достоверное снижение эссенциальных жирных кислот (18:2 n-6 и 18:3 n-3), являющихся основой для синтеза кислот линолевого и линоленового рядов. Сниженные количества последующих кислот этих каскадов обусловлены, по нашему мнению, угнетением ферментов элонгации и десатурации. Такой дисбаланс жирных кислот меняет молекулярные виды фосфолипидов (Кушнерова и др., 1991; Кушнерова, Панченко, 1993).

На основании вышеизложенного следует, что действие стресс-вертикальной фиксации, интоксикации этанолом,  $CCl_4$ , гиперхолестеринового 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 могут быть отнесены к стрессорным.

## **2. Влияние периода депривации на физиологические и структурные характеристики эритроцитов крыс**

В двух экспериментах (интоксикация этанолом и  $CCl_4$ ) физиологические и структурные параметры эритроцитов исследовались в период отмены стрессорного агента (депривация), т.е. после интоксикации этанолом и  $CCl_4$ . Через 7 дней после отмены токсических агентов большинство изученных физиологических и структурных характеристик эритроцитов к норме не возвращалось.

При депривации после интоксикации этанолом содержание СМ и ХС стало еще выше, а количество ФИ и ФК еще меньше, чем в контроле. Кроме того, снизилось количество общих фосфолипидов, что обусловило повышение коэффициента ХС/ФЛ. Не восстановились реакции синтеза n-6 и n-3 ПНЖК. По нашему мнению, период отмены этанола является стрессором для организма, так как возросли величины изменений некоторых изученных параметров эритроцитов, выявленные при воздействии этанола. То, что отмена этанола является стрессорным фактором, было высказано ранее при исследовании липидного и углеводного обменов в печени крыс в период депривации (Рахманин и др., 1995; Кушнерова и др., 1995, 2002; Спрыгин, Кушнерова, 2002; Фоменко и др., 2003).

При депривации после интоксикации  $\text{CCl}_4$  не наблюдалось выраженных позитивных сдвигов как в физиологических, так и в структурных характеристиках эритроцитов. Данные параметры имели лишь незначительную тенденцию к нормализации. Большинство изученных показателей остались на уровне, который был зафиксирован после интоксикации  $\text{CCl}_4$ . По-видимому, метаболизм был настолько нарушен токсикантом, что его отмена в течение 7 дней не обеспечила восстановления исследуемых характеристик.

Таким образом, в период депривации сохраняется макроцитоз, который может быть обусловлен стойкостью патологических сдвигов в соотношении групп липопротеинов плазмы крови, влияющих на состав липидов в мембране эритроцитов.

### **3. Влияние экстракта из туники асцидии пурпурной на физиологические и структурные характеристики эритроцитов интактных крыс**

Применение препаратов, осуществляющих репарацию мембранных структур (фосфолипидные средства, жирные кислоты и др.) при различных видах стрессорного воздействия, является важным этапом системы комплексной реабилитации. Биологическое действие сложных природных комплексов, подобных тому, что содержится в тунике асцидии пурпурной, приходится рассматривать как результирующую всей суммы входящих в них составляющих. Вместе с тем, явное увеличение доли n-3 ПНЖК в жирнокислотном составе эритроцитов контрольных и стрессированных животных, получавших экстракт асцидии пурпурной, позволяет отнести его репаративный эффект, в первую очередь, за счет этой группы веществ.

Исследование влияния внутрижелудочного введения в течение 4-х недель экстракта из туники асцидии на физиологические и структурные характеристики эритроцитов интактных крыс показало достоверное расширение порога их осмотической устойчивости к окончательному гемолизу. В составе липидной составляющей мембран эритроцитов отмечалось увеличение содержания ЭХС, ФИ, ФС, ФК и n-3 ПНЖК. Данный феномен можно объяснить встраиванием полиеновых ЖК в состав фосфолипидов, их этерификацию с холестерином, что увеличивает жидкость мембраны и понижает ее микровязкость (Jeffrey et al., 1998; Tulenko et al., 1998; Титов, 2000). По-видимому, при введении экстракта из туники асцидии

происходит повышение эластических свойств мембран эритроцитов, что, расширяет границы осмотической устойчивости к гемолизирующему агенту.

#### **4. Влияние экстракта из туники асцидии пурпурной на стресс-индуцированные изменения физиологических и структурных характеристик эритроцитов крыс**

**Стресс-вертикальная фиксация.** При стресс-вертикальной фиксации действие экстракта из туники асцидии сравнивалось с коммерческим фосфолипидным препаратом «Эссенциале». Экстракт из туники асцидии отличается высоким содержанием n-3 ПНЖК и некоторым количеством n-6 ПНЖК, в состав же эссенциале входит полиненасыщенный ФХ соевых бобов, содержащий n-6 ПНЖК. Соответственно, экстракт из туники асцидии препятствовал уменьшению содержания части n-6 ПНЖК и всего спектра n-3 ПНЖК, тогда как протективный эффект эссенциале охватывал все n-6 ПНЖК, но не распространялся на n-3 ПНЖК (табл.).

Введение экстракта из туники асцидии нормализовало большинство изученных физиологических и структурных параметров эритроцитов, тогда как при введении эссенциале размерные характеристики клеток (СДЭ, СОЭр) оставались повышенными. Это обусловлено сохранением сниженного содержания общих фосфолипидов и повышенного содержания холестерина, что способствует подъему коэффициента ХС/ФЛ (на 16%;  $P < 0,01$ ). СОЭр был повышен и при введении экстракта из туники асцидии. Однако, его величина была значительно ниже, чем при эссенциале (19%;  $P < 0,05$  против 52%;  $P < 0,001$ ). Это свидетельствует о более эффективном восстановлении размерных характеристик эритроцитов при введении экстракта.

В эритроцитах стрессированных животных, получавших экстракт из туники асцидии, наблюдался повышенный на 55% ( $P < 0,001$ ) уровень фосфатидной кислоты (ФК), являющейся основой для синтеза всех фосфолипидов. Данный феномен был отмечен и при введении экстракта интактным животным. Это может считаться позитивным моментом и являться одним из механизмов репаративного действия экстракта.



Изменения физиологических характеристик и липидной составляющей мембран эритроцитов крыс в условиях экспериментальных моделей (в % от контроля)

Показатели	Стресс+ экстракт	Стресс+ эссенциале	Депривация (этанол)+ экстракт	Этанол+ экстракт	Депривация (CCL <sub>4</sub> )+ экстракт	ГХС+ экстракт
СДЭ	+6	+15	-	+1	+3	-
СОЭр	+19	+52	+1	+2	+9	-
ОРЭ (начало гемолиза)	+8	+13	-	-	+5	-
ОРЭ (заверш. гемолиза)	-	+3	-14	-	+5	-
ОФЛ	-6	-9	-3	-2	-4	-2
ХС/ФЛ	+3	+16	+3	+3	+5	+6
ТАГ	-2	-2	+4	-9	+3	-
СЖК	-2	+9	+3	-3	-9	+14
ЭЖК	+8	+12	-4	+5	+2	-7
ХС	-5	+3	-1	+1	+3	+6
ЭХС	-1	-4	+4	+6	-4	+5
ФХ	+1	+5	+3	+2	-2	-4
ЛФХ	-28	-28	-5	-9	+6	+22
СМ	+6	+8	+12	+5	+12	+13
ФЭ	+8	+6	-8	-1	-3	-3
ЛФЭ	-33	-37	-7	-18	-5	-3
ФС	+2	+6	+9	-5	-	-7
ФИ	+2	+10	-11	+3	-2	-11
ФК	+55	+5	-7	-11	-1	+9
14:0	+39	+68	-5	-9	+11	-8
16:0	+6	+8	+1	+4	+8	+3
16:1 n-9	+17	+9	+11	-3	-	+3
18:0	+7	+2	+2	-2	+4	+3
18:1 n-9	+4	+4	-	-	-	+5
18:2 n-6	-6	-4	-1	-	-2	-4
20:3 n-6	-14	-9	-	+9	-2	-2
20:4 n-6	-18	-8	-7	-9	-12	-6
22:4 n-6	-16	+2	-	-13	-18	-11
22:5 n-6	-12	+3	-13	+18	-	-7
18:3 n-3	+5	-53	+18	-11	-15	+6
20:5 n-3	+8	-50	+4	+8	+10	+5
22:5 n-3	+6	-22	-	-	-	-2
22:6 n-3	-3	-24	+5	+4	-14	-4
Индекс насыщенности	+15	+14	+10	+3	+12	+5

Таким образом, оба препарата способствуют восстановлению липидной составляющей мембран эритроцитов при стрессе. Однако, наиболее выраженный эффект проявляется у экстракта из туники асцидии.

**Этанол.** При введении экстракта из туники асцидии одновременно с этанолом отмечалась нормализация практически всех исследуемых параметров эритроцитов. Колебания величин были в пределах контрольных значений, т. е. экстракт обеспечивал защиту мембран эритроцитов от токсического действия этанола.

Введение экстракта из туники асцидии в период депривации после интоксикации этанолом способствовало нормализации большинства изученных параметров. Вместе с тем, у подопытных животных сохранялось рассогласование в соотношении холиновых и этаноламиновых фосфолипидов: содержание СМ (замещает ФХ) оставалось повышенным на 12%, а ФС (замещает ФЭ) на 9%. Для жирнокислотного спектра характерно умеренное повышение линолевой кислоты (18:3 n-3), являющейся запускаяющим звеном каскада реакций синтеза эйкозапентаеновой кислоты, что также является одним из механизмов действия экстракта из туники асцидии.

**Четыреххлористый углерод (CCl<sub>4</sub>).** В период депривации после интоксикации CCl<sub>4</sub> введение экстракта не обеспечивало полного восстановления как физиологических, так и структурных характеристик мембран эритроцитов. Так, оставались повышенными размерные величины эритроцитов, уровень СМ (обеспечивает усиление вязкости и жесткости мембраны), насыщенных жирных кислот (14:0, 16:0, 18:0). Значительно ниже контрольных значений было содержание полиненасыщенных жирных кислот линолевого и линоленового рядов, а также сохранялся высоким индекс насыщенности, т. е. CCl<sub>4</sub> является настолько сильным мембранотоксическим агентом, что за данный восстановительный период экстракт из туники асцидии не обеспечивал необходимой репарации мембран эритроцитов.

**Гиперхолестериновый рацион (ГХС).** Наиболее ярко липидкорректирующее действие экстракта из туники асцидии проявлялось при ГХС. Размерные характеристики эритроцитов не отличались от контрольных величин, что обусловлено снижением уровня холестерина в мембране на 16% (P<0,01). Также увеличилось содержание ФХ на 7,3% (P<0,05) и ФИ на 21% (P<0,001).

Обращает на себя внимание повышенное содержание ФК (на 9%,  $P < 0,001$ ), полиеновых ЖК 18:3 n-3 (на 6%) и 20:5 n-3 (на 5%), нормализация индекса насыщенности.

Согласно литературным данным «морские липиды», в частности n-3 ПНЖК, обладают высокой активностью в снижении уровня холестерина и триацилглицеринов в крови, печени и сердце (Антонюк, 2003; Эндакова, 2003). Данные о подвижности холестерина в мембране эритроцитов, возможность накопления в ней дополнительных количеств холестерина в виде эфиров с ПНЖК, обменивающихся с липопротеинами плазмы, свидетельствуют о том, что эритроциты выступают в роли «холестеринового буфера» плазмы. Эритроциты могут выполнять транспортную функцию, перенося холестерин из тканей в печень, где из него синтезируются желчные кислоты (Лопухин и др., 1983). В то же время эфиры холестерина транспортируют в клетки полиеновые жирные кислоты семейства n-3 (Титов, 2000), улучшая тем самым пластические свойства клеточных мембран.

## ВЫВОДЫ

1. Совокупность изменений в липидном составе мембран эритроцитов при действии на крыс повреждающих факторов (сресс-вертикальная фиксация за дорзальную шейную складку, интоксикация этанолом и  $CCl_4$ , гиперхолестериновый рацион) имеет стереотипный характер (увеличение размерных характеристик эритроцитов, изменение их осмотической резистентности, образование лизофракций фосфолипидов, увеличение холестерина, триацилглицеринов, насыщенных жирных кислот, снижение n-6 и n-3 ПНЖК), что позволяет рассматривать их как атрибут стрессорной реакции.

2. Наряду со снижением концентраций структурных фосфолипидов (ФХ и ФЭ) происходит увеличение содержания СМ и ФС. Перераспределение отдельных классов фосфолипидов внутри мембранного бислоя эритроцитарной мембраны свидетельствует о наличии структурно-функциональных нарушений при стрессе и формировании компенсаторной реакции в ответ на действие повреждающего фактора.

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

4. Для гиперхолестеринового рациона характерно увеличение объема эритроцитов и увеличение осмотической резистентности. Однако интервал концентраций NaCl между началом и завершением гемолиза был минимальным (0,05%), тогда как при стресс-вертикальной фиксации, интоксикации этанолом и  $CCl_4$  – 0,1-0,2%.

5. Экстракт из туники асцидии пурпурной расширяет порог осмотической устойчивости эритроцитов к окончательному гемолизу, обладает высоким репаративным эффектом за счет встраивания в поврежденные мембраны эритроцитов полиненасыщенных «морских фосфолипидов» и ПНЖК семейства n-3.

6. Одновременное введение этанола и экстракта из туники асцидии способствует сохранению соотношения липидных компонентов в мембране эритроцитов, а также их физиологических характеристик.

7. Экстракт из туники асцидии в условиях стресс-вертикальной фиксации превосходит эталонный мембранопротектор эссенциале по способности снижать размерные характеристики эритроцитов, увеличивать содержание фосфатидной кислоты, нормализовать пул ПНЖК за счет кислот семейства n-3. По остальным показателям экстракт из туники асцидии пурпурной показывает биологическую активность, равную таковой эссенциале.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Кушнерова Н.Ф., Рахманин Ю.А., Гордейчук Т.Н., Фоменко С.Е., Добряков Ю.И., Лесникова Л.Н., Добряков Е.Ю. Применение биологически активных веществ морских гидробионтов для коррекции нарушений липидного обмена при алкогольной интоксикации // Гигиена и санитария. 2000. № 3. С. 70-73.

2. Лесникова Л.Н., Добряков Е.Ю. Эффективность использования «Хаурантина» при восстановлении структурной организации мембран // Материалы II Международного Тихоокеанского конгресса по традиционной медицине. Владивосток, 4-6 октября 2001г. Владивосток, 2001. С. 228-229.

3. Кушнерова Н.Ф., Добряков Ю.И., Спрыгин В.Г., Гордейчук Т.Н., Гоненко В.А., Долматова Л.С., Фоменко С.Е., **Лесникова Л.Н.**, Солодова Е.Е., Добряков Е.Ю. Перспективные биологически активные добавки к пище // Информационный каталог. Владивосток: Дальнаука, 2001. 33 с.
4. **Лесникова Л.Н.**, Добряков Е.Ю. Мембранопротекторные свойства хаурантина при экзогенном воздействии // Актуальные проблемы качества: теория и практика: Тез. докл. Межрегиональной науч.-практ. конф. Владивосток, 15-16 ноября 2001. Владивосток: Изд-во ДВГАЭУ, 2001. С. 55-56.
5. **Лесникова Л.Н.**, Кушнерова Н.Ф., Добряков Е.Ю. Особенности метаболизма организма при остром стрессе и его коррекция хаурантином и эссенциале // Новые медицинские технологии на Дальнем Востоке: Материалы V Региональной науч.-практ. конф. Хабаровск, 30 января-1 февраля 2002 г. Владивосток: Дальнаука, 2002. С. 71.
6. Кушнерова Н.Ф., **Лесникова Л.Н.**, Солодова Е.Е., Лаптев В.М., Добряков Ю.И. Модификация липидного состава мембран эритроцитов при поражении этиловым спиртом и возможность его коррекции фосфолипидами и жирными кислотами из морских гидробионтов // Третья Всероссийская конф. (с международным участием) «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция». Москва, 7-9 октября 2002. Тез. докл. М., 2002. С. 73.
7. Кушнерова Н.Ф., **Лесникова Л.Н.**, Добряков Е.Ю., Добряков Ю.И. Восстановление структуры мембран эритроцитов биологически активными добавками из морских гидробионтов. Биологически активные добавки в профилактической и клинической медицине. // Материалы науч.-практ. конф. Улан-Удэ, 18-19 сентября 2003 г. Улан-Удэ, 2003. С. 48-49.
8. Кушнерова Н.Ф., Добряков Ю.И., **Лесникова Л.Н.**, Добряков Е.Ю. Гидробионты непищевого назначения – сырье для производства стресс-протекторных препаратов // II Всероссийская науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создания функциональных продуктов». Москва, 2-3 июня 2003 г.: Материалы конф. Москва, 2003. С. 116
9. Кушнерова Н.Ф., **Лесникова Л.Н.** Влияние хаурантина на процессы восстановления липидной составляющей мембран эритроцитов после поражения этиловым спиртом // Наркология. 2003. № 5. С. 25-28

10. Кушнерова Н.Ф., **Лесникова Л.Н.** Мембранопротекторные свойства хаурантина при поражении этиловым спиртом // Материалы VII Международного съезда «Фитофарм-2003»: Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения. Санкт-Петербург, 3-5 июля 2003 г. Санкт-Петербург – Пушкин. 2003. С. 202-205.

11. Kushnerova N.F., Dobryakov Yu.I., **Lesnikova L.N.**, Dobryakov E.Yu. Non-edible hydrobionts – raw material for production of stress-protective preparations // Untraditional natural resources, innovation technologies and products: Collected scientific works. Moscow, 2005. Iss. 12. P. 308.

12. **Лесникова Л.Н.**, Кушнерова Н.Ф., Кириллов О.И. Влияние острого стресса на липидный состав мембран эритроцитов и профилактическая роль препаратов из морских гидробионтов // Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных: Материалы Международной науч. конф. Саранск: Изд-во Мордовского ун-та, 2005. С. 133-134.

13. **Лесникова Л.Н.**, Кушнерова Н.Ф., Кириллов О.И. Профилактика нарушений липидного состава мембран эритроцитов препаратами из морских гидробионтов при влиянии острого стресса // Медицинская физика и новейшие медицинские технологии: Материалы Дальневосточной региональной конф. с Всероссийским участием. Владивосток, 30-31 мая 2005. Владивосток: Дальнаука, 2005. С.150

14. **Lesnikova L.N.**, Kushnerova N.F., Kirillov O.I. Purple ascidium – the perspective source of biologically active substances for the correction of infringements of metabolic reactions at stress // Science of Northeast of Russia – Beginning of century. Materials of the All-Russia scientific conference. Devoted to Memories of the Academician K.V. Simakov, Magadan, April 26-28, 2005. Magadan, 2005. P. 473-475.

15. **Лесникова Л.Н.**, Кушнерова Н.Ф. Антигипоксантажные свойства препаратов из морских гидробионтов при воздействии острого стресса // «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция». Материалы Четвертой всероссийской конф. (с международным участием). Москва, 12-14 октября 2005 г. Москва, 2005. С. 66-67.