

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЛИПИДНОГО ЭКСТРАКТА МОРСКОЙ ЗЕЛЕННОЙ ВОДОРΟΣЛИ *CODIUM FRAGILE* (SURINGAR) HARIOT ДЛЯ РЕПАРАЦИИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ МЫШЕЙ ПРИ СТРЕССОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

© 2024 г. С. Е. Фоменко<sup>1,\*</sup>, Н. Ф. Кушнерова<sup>1</sup>, В. Г. Спрыгин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН, Владивосток, Россия

\*e-mail: fomenko29@mail.ru

Поступила в редакцию 01.08.2023 г.

После доработки 24.11.2023 г.

Принята к публикации 05.12.2023 г.

Кодиум ломкий – *Codium fragile* (Suringar) Hariot – морская зеленая водоросль, относящаяся к семейству Codiaceae, является одним из массовых видов макрофитов Дальневосточного Региона РФ. Содержание липидов в талломе кодиума достигает  $13.92 \pm 0.22$  мг в пересчете на г сухой ткани, из которых основную часть составляют нейтральные липиды и гликолипиды (40–44%), на долю фосфолипидов приходится 16%. Количество полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в липидном экстракте кодиума составляет свыше 50% от общей суммы, среди которых преобладают ПНЖК семейства  $\omega$ -3 (36.2%) и  $\omega$ -6 (17.8%). Изучено влияние липидного экстракта *C. fragile* и препарата сравнения Омега-3 на биохимические и физиологические показатели эритроцитов мышечной ткани, подвергнутых стрессовому воздействию (вертикальная фиксация за дорсальную шейную складку). Под действием стресса эритроциты претерпевают определенные изменения, как в отношении размерных характеристик, так и фосфолипидной составляющей мембран, что приводит к изменению проницаемости и лабильности, осложняется их циркуляция по капиллярному руслу. Эндогенная система антиоксидантной защиты организма мышечной ткани при стрессе испытывает значительное напряжение, о чем свидетельствует увеличение уровня малонового диальдегида при одновременном снижении активности супероксиддисмутазы и величины антирадикальной активности в плазме крови. Введение липидного экстракта *C. fragile* в условиях стресса сопровождалось восстановлением содержания липидов в мембранах эритроцитов, уменьшением количества лизофосфолипидов, а также нормализацией соотношения сфингомиелин/фосфатидилхолин, что способствовало восстановлению размерных параметров эритроцитов, их осмотической резистентности и показателей антиоксидантной системы крови. Выраженный мембранопротекторный эффект липидного экстракта *C. fragile* обусловлен наличием в его составе широкого спектра нейтральных и полярных липидов, содержащих ПНЖК семейства  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6, что обеспечивает более высокую эффективность водорослевого экстракта при стрессе по сравнению с эталонным препаратом “Омега-3”.

**Ключевые слова:** липидный экстракт, *Codium fragile*, Омега-3, стресс, эритроциты, фосфолипиды, мышцы  
**DOI:** 10.31857/S0044452924010067, **EDN:** ZFMPXC

### ВВЕДЕНИЕ

Морские водоросли являются ценным источником биологически активных соединений и функциональных пищевых продуктов, оказывающих благотворное влияние на здоровье. В многочисленных исследованиях сообщается, что морские водоросли обладают важными биологическими свойствами, такими как противовоспалительные, антиоксидантные, противомикробные, противоопухолевые и др. [1–3]. Настоящее исследование посвящено изучению *Codium fragile* (Suringar) Hariot – кодиум ломкий, одного из массовых видов зеленых водорослей. *C. fragile* относится к семейству

Codiaceae и является признанным космополитом, так как широко распространен в районах с умеренным климатом по всему земному шару [4] из своего родного ареала Азиатско-Тихоокеанского региона (Китай, Тайвань, Япония, Корея, Россия). В прибрежной акватории залива Петра Великого Японского моря кодиум растет в защищенных и полужащищенных бухтах у нижней границы литорали до глубины 3 м на скалистых, каменистых и илисто-песчаных грунтах [5]. В больших количествах развивается летом и осенью.

В Азии морские водоросли употреблялись в пищу с незапамятных времен. В современной Японии и Корее *C. fragile* часто используется в качестве

ингредиента для приготовления пищи, а также как восточное лекарство для лечения кишечных и урологических расстройств [6]. Данные литературы по химическому составу *C. fragile* существенно отличаются, что может быть связано с климатическими условиями региона, временем года, географией сосредоточения водорослей. Согласно исследованиям авторов [7], в составе *C. fragile* выявлено наличие значительных количеств углеводов (20.47%), белков (6.13%) и липидов (2.53%), а также отмечено высокое содержания полифенолов, флавоноидов, минеральных элементов (Mg, Ca, Fe, Cu, Zn). Ввиду наличия столь значительного количества углеводов в составе кодиума, большинство исследований посвящены выделению полисахаридов и изучению их биологической активности. Сульфатированные полисахариды, выделенные из кодиума, находят широкое применение для профилактики и лечения дислипидемии и ожирения [8], а также как иммуномодулирующие и противовоспалительные средства [9, 10].

В тоже время, не менее ценными составляющими морских водорослей являются липиды. В предыдущих наших исследованиях [11] изучение химического состава экстрактов, выделенных из разных видов морских макрофитов, относящихся к разным таксономическим группам, выявило явные различия в составе и содержании липидов, их жирных кислот, что обуславливает существенные отличия в биологической активности исследованных водорослевых экстрактов.

В работе Гоеске и соавт. [12] отмечено, что липидные экстракты, полученные из разных видов рода *Codium* sp., проявляют антибактериальную, противовирусную, противогрибковую и цитотоксическую активность. И за эту активность отвечают различные представители обширного класса липидов: стеролы, жирные кислоты, гликолипиды и фосфолипиды, терпены и др. [13]. Благодаря способности морских водорослей продуцировать полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) С:18 и С:20, они привлекли к себе большое внимание исследователей всего мира [14]. Помимо того, что незаменимые жирные кислоты имеют высокую пищевую ценность, они являются важными составляющими фосфолипидных фракций клеточных мембран, участвуют в синтезе ряда гормонов, а также выполняют важную роль в процессах клеточной активности и геной экспрессии. Длинноцепочечные жирные кислоты морского происхождения могут снизить риск развития тромбозов, атеросклеротических бляшек в кровеносных сосудах, уменьшить содержание триглицеридов, холестерина в крови и уровень артериального давления [15], а также обладают гипохолестеринемическим, иммуностимулирующим и антиоксидантным действи-

ем, согласно исследованиям Sanhueza и соавт. [16] и Komal и соавт. [17].

Значительное содержание ПНЖК семейства  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6, которые являются основными составляющими полярной фракций липидного комплекса *C. fragile* [18], по-видимому, обуславливает его высокую фармакологическую активность. Из опубликованных данных С. Хотимченко [19] следует, что содержание липидов в талломе кодиума, произрастающего в Дальневосточных морях, может достигать 4.4–5.3 мг/г сырого веса. При этом, одной из важных частей липидной составляющей кодиума являются фосфолипиды, относящиеся к категории структурообразующих и функциональных компонентов биомембран. Однако, изучение липидного экстракта *C. fragile*, как возможного мембранопротектора при стрессовом воздействии на организм, до настоящего времени не получило должного развития.

В качестве модели стресса в лабораторных исследованиях на мелких мышевидных грызунах применяют вертикальную фиксацию за дорсальную шейную складку [20]. Независимо от природы стресса (физический, иммобилизационный, холодовой, эмоциональный) организм реагирует неизменным набором биохимических и физиологических реакций, таких как гиперемия и гипертрофия коры надпочечников, деграция тимико-лимфатической системы, появление изъязвлений в желудочно-кишечном тракте. Эти изменения в организме были названы “классической триадой стресса по Г. Селье”. Действие стресс-факторов (стрессоров) приводит к выбросу в кровь, так называемых гормонов стресса (кортикостероидов, катехоламинов), которые регулируют все обменные процессы в организме. Помимо этого, интенсивный стресс приводит к увеличению образования реактивных кислородных радикалов, что сопровождается перекисидацией липидов клеточных мембран [21]. В результате происходит образование полярных гидроперекисей липидов и разбалансировка в соотношении фосфолипидных фракций мембран, что приводит к изменению их проницаемости и возможным повреждениям [22]. Необходимо отметить, что первой мишенью действия стрессоров на организм являются эритроциты. Липидная составляющая эритроцитарных мембран представляет собой один из важных компонентов, характеризующий состояние клеточных мембран в органах и тканях всего организма при патологии [23]. При этом мембраны эритроцитов являются классической моделью для исследования защитного действия препаратов, так как они единственные из плазматических мембран, которые можно выделить в “чистом” виде, не загрязненных мембранами других клеток или клеточных органелл.

Цель работы — исследование состава липидного экстракта, выделенного из таллома морской зеленой водоросли *C. fragile*, и его воздействия на мембраны эритроцитов мышей в условиях острого стресса.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все экземпляры водорослей *C. fragile* собирали вручную в летние месяцы в заливе Петра Великого Японского моря на глубине не более 2 м. Выборка водорослей составляла 100 талломов. Предварительная обработка собранного материала проводилась на базе научно-исследовательской станции. Для максимального очищения талломов от песка, зообентоса и разных загрязнений водоросли промывали в морской воде, затем в пресной воде. Далее очищенные экземпляры макрофитов погружали в кипящую воду на 2 мин для ингибирования активности ферментов, после чего отжимали и высушивали в естественных условиях до остаточной влажности ~30–40%. Высушенные образцы водорослей измельчали на лабораторной мельнице и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  для проведения всех последующих аналитических процедур. Экстракцию липидов из высушенного сырья проводили в соответствии с методом, предложенным Blich и Dyer [24]. Для этого один килограмм измельченного порошка водорослей экстрагировали 1.5 л смеси хлороформ: метанол (1:2 по объему) и оставляли на ночь. Для разделения фаз к смеси приливали 500 мл хлороформа и дистиллированной воды, затем смесь аккуратно перемешивали. Верхний водно-метанольный слой отделяли и удаляли, нижний хлороформенный слой, содержащий липидную фракцию, концентрировали на вакуумном испарителе (Type 349/2, Unipan, Польша) при температуре не выше  $37^{\circ}\text{C}$ . Содержание общих липидов в экстракте определяли взвешиванием высушенных до постоянного веса аликвот экстракта в 5-ти повторностях.

Хроматографическое распределение липидов проводили методом микротонкослойной хроматографии (ТСХ) на стеклянных пластинках с нанесенным слоем силикагеля марки “КСК” (ООО “Лабхимос”, Россия). Для разделения растительных гликолипидов использовали систему растворителей ацетон: бензол: вода в соотношении 91:30:8 (по объему) [25]. Гликолипиды выявляли на хроматограммах, используя антроновый реактив [26]. Определение количества общих фосфолипидов в водорослевом экстракте проводили по методу Vaskovsky и соавт. [27]. Для разделения фосфолипидов по фракциям использовали методом двумерной ТСХ системе растворителей: в первом направлении — смесь хлороформа: метанола: 28% аммиака в соотношении 65:35:5 (по объему), во

втором — смесь хлороформа: ацетона: метанола: ледяной уксусной кислоты: воды в соотношении 50:20:10:10:5 (по объему). Разделенные на хроматограммах фракции фосфолипидов обнаруживали 10% раствором серной кислоты в метаноле с последующим нагреванием пластинок на закрытой электрической плите. Содержание индивидуальных фракций фосфолипидов рассчитывали в процентах от их общей суммы.

Хроматографическое распределение нейтральных липидов проводили методом одномерной ТСХ [28] в системе растворителей гексан: серный эфир: ледяная уксусная кислота в соотношении 80:20:1 об/об или 90:10:1 об/об. Пробы после хроматографирования обнаруживали парами йода. Содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы нейтральных липидов.

Состав жирных кислот в липидном экстракте водорослей анализировали методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Для этого получали метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) путем переэтерификации липидов по методу Carreau и Dubacq [29]. Полученные МЭЖК очищали с помощью ТСХ, используя в системе бензол, затем элюировали с силикагеля гексаном и выделенный элюат упаривали. МЭЖК перерастворяли в определенном объеме гексана и анализировали методом ГЖХ на хроматографе “ЛХМ-2000” (ОАО “Хроматограф”, Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Жирные кислоты идентифицировали сравнением времени удерживания ( $R_t$ ) со стандартами и значениям “углеродных чисел” [30]. Результаты рассчитывали в процентах от общей суммы жирных кислот.

В эксперименте по моделированию стрессового воздействия использовали 40 беспородных белых мышей-самцов 8-недельного возраста массой тела 25–30 г. В период адаптации в течение 7 дней животные содержались в условиях вивария при комнатной температуре  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  (в клетках по 5 особей) на базовом рационе питания, со свободным доступом к воде. Затем мышей разделили произвольно на контрольных (10 особей) и опытных (30 особей). Животные опытных групп подвергались стресс-вертикальной фиксации за дорсальную шейную складку на 24 ч. Непосредственно перед проведением эксперимента 10 мышей получали экстракт кодиума, 10 — препарат Омега-3, и 10 — физиологический раствор, спустя 6 ч препараты вводились повторно. Для создания одинаковых условий животным контрольной группы и группы “стресс” вводили эквивалентное количество 0.9% раствора NaCl. Введение физиологического раствора не оказывает влияние на результаты эксперимента, но при этом исключает погрешности исследования, так как любое внешнее раздражение является стрессом для организма.

Стандартизацию липидного экстракта кодиума проводили по сумме общих липидов. Животным одной из опытных групп вводили аптечный препарат Omega-3/Fish Oils (Now Foods, США), который использовали в качестве эталонного препарата сравнения. Препарат Омега-3 представляет концентрат натурального рыбьего жира, полученного из анчоусов. В 1 г препарата Омега-3 содержится 0.25 г насыщенных жирных кислот, 0.25 г мононенасыщенных жирных кислот и 0.5 г полиненасыщенных жирных кислот, представленных эйкозапентаеновой (180 мг) и докозагексаеновой (120 мг) кислотами. Липидный экстракт кодиума и липидный комплекс Омега-3 вводили в дозе 1 г/кг веса животного. Выбор использованной дозы основан на данных Новгородцевой и соавт. [31], а также собственных исследованиях. В результате были сформированы следующие группы: 1-я группа – контроль; 2-я группа – стресс (вертикальная фиксация) + физ. раствор; 3-я группа – стресс + липидный экстракт кодиума; 4-я группа стресс + Омега-3.

По окончании эксперимента животные подвергались декапитации под легким эфирным наркозом с соблюдением принципов и международных рекомендаций, изложенных в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (European Convention, 1986).

После отделения плазмы из крови, взятой с гепарином, эритроцитарную фракцию трижды отмывали охлажденным до +4°C изотоническим раствором натрия хлорида с последующим центрифугированием, каждый раз удаляя надосадочную жидкость. Для определения размерных параметров – средний объем (СОЭр) и средний диаметр эритроцитов (СДЭ) использовали автоматический гематологический анализатор “Abacus” производства австрийской компании “Diatron”. Для оценки физико-химических свойств эритроцитов использовали метод определения осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ) к различным воздействиям, в данном случае к изменению концентрации NaCl [32].

Липидный экстракт из эритроцитарной фракции получали традиционным способом [24]. Для разделения фосфолипидов по фракциям и их количественного определения использовали методом двумерной ТСХ, описание которого приведено выше. Содержание отдельных фракций фосфолипидов рассчитывали в процентах от их общей суммы.

Для оценки потенциала антиоксидантной защиты организма использовали следующие показатели: величину антирадикальной активности (АРА), активность супероксиддисмутазы (СОД), содержание малонового диальдегида (МДА) в плазме крови. Все биохимические исследования проводили на

спектрофотометре “Shimadzu UV-2550” (Shimadzu, Япония).

Определение антирадикальной активности проводили методом, предложенным Bartosz и соавт. [33]. В термостатированную кювету помещали 10 мкл образца плазмы, 2.6 мл 0.1 М раствора фосфатного буфера, 90 мкл 5mM раствора АВТС, с последующим инкубированием в течении 5 мин при 37°C. Реакцию запускают добавлением 300 мкл 200 mM раствора АВАР (2,2'-азобис(2-амидопропан) гидрохлорид) (Sigma, США) и регистрируют реакцию при  $\lambda=414$  нм. Термическая декомпозиция АВАР сопровождается образованием алкил-пероксильных радикалов, которые окисляют АВТС, вызывают цветное окрашивание. В качестве стандарта сравнения использовали тролокс (водорастворимый аналог витамина Е). Антирадикальную активность выражали в мкМ тролокса на мл плазмы.

Активность СОД (КФ 1.15.1.1) определяли спектрофотометрически при 340 нм по методу Paoletti и соавт. [34]. Метод основан на фиксировании снижения оптической плотности при окислении НАДН, вызванного супероксид-анионом. Реакционная смесь содержала 80 mM Трис-НСl буферного раствора (pH 7.4), 100 мкМ НАДН, 80 мкМ/40 мкМ ЭДТА/MnCl<sub>2</sub> и 0.1 мл плазмы. После инкубирования смеси при 25°C, запускали реакцию добавлением 0.1 мл 10 mM меркаптоэтанола. Снижение поглощения оптической плотности регистрировали в течение 10 мин. Активность СОД выражали в условных единицах.

Для определения содержания МДА использовали метод [35], основанный на способности образующихся в биологических образцах низкомолекулярных альдегидов взаимодействовать с тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного комплекса, имеющего максимум поглощения при  $\lambda=535$  нм. Исходную смесь, содержащую 1 мл плазмы, 2 мл смеси реагентов (15% раствор трихлоруксусной кислоты, 0.375% раствор тиобарбитуровой кислоты, 0.25% раствор соляной кислоты), тщательно перемешивали, затем нагревали на водяной бане в течение 15 мин с последующим центрифугированием при 1000g для удаления осадка. Оптическую плотность определяли против холостой пробы, содержащей все ингредиенты кроме образца плазмы. Концентрацию МДА выражали в мкмоль/мл плазмы.

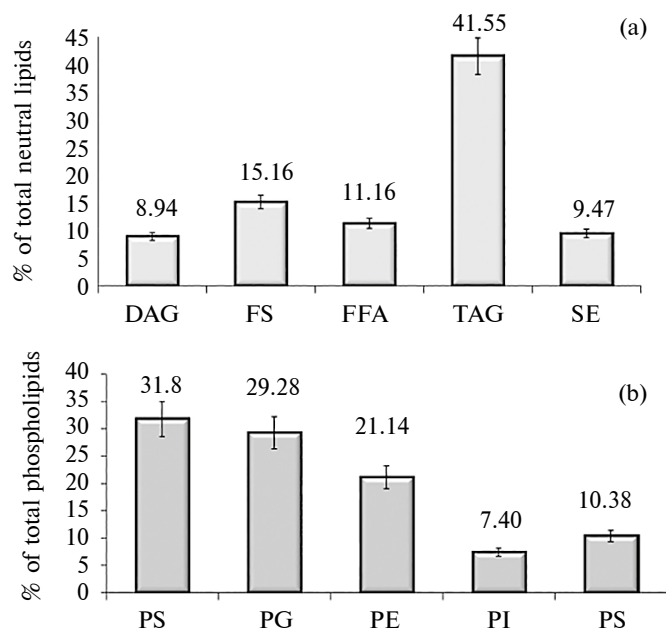
Все биохимические исследования (контрольной и опытных групп) проводились не менее чем в трех повторностях. Полученные количественные данные выражали как среднее значение  $\pm$  ошибка среднего. Обработку полученных данных проводили с помощью статистического пакета Instat 3.0 (GraphPad Software Inc. США). Статистическую значимость различий средних величин определя-

ли по непараметрическому критерию сравнения, применив тест Краскела–Уоллиса с последующим тестом Данна (Dunn's Multiple Comparisons Test) при сравнении нескольких групп. Различия считали статистически достоверными при значении  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование состава липидного экстракта, выделенного из зеленой водоросли *C. fragile* показало, что общее содержание липидов составило  $13.92 \pm 0.22$  мг в пересчете на г сухой ткани. При этом 44% от общей суммы липидов составляли гликолипиды (6.12 мг/г сухой ткани) и 40% – нейтральные липиды (5.57 мг/г сухой ткани), на долю фосфолипидов приходилось 16% (2.23 мг/г сухой ткани). В составе фосфолипидов и гликолипидов присутствуют незаменимые ПНЖК, которые наряду с другими биологически активными соединениями определяют ценность морских организмов.

На рис. 1 представлено содержание нейтральных липидов и фосфолипидов по фракциям в липидном экстракте *C. fragile*. Среди нейтральных липидов преобладали триацилглицерины ( $41.55 \pm 2.15\%$ ) и стеринны ( $15.16 \pm 0.74\%$ ), содержание остальных минорных фракций составляло



**Рис. 1.** Содержание фракций нейтральных липидов (а) и фосфолипидов (б) в липидном экстракте зеленой водоросли *Codium fragile*. DAG – диацилглицерины, FS – свободные стеринны, FFA – свободные жирные кислоты, TAG – триацилглицерины, SE – эфиры стериннов, PS – фосфатидилхолин, PG – фосфатидилглицерин, PE – фосфатидилэтаноламин, PI – фосфатидилинозит, PS – фосфатидилсерин.

в среднем 9–11%, в их числе диацилглицерины, эфиры стериннов и свободные жирные кислоты. Среди выделенных полярных фракций были идентифицированы пять фосфолипидов: фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилглицерин (ФГ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилинозит (ФИ), фосфатидилсерин (ФС). При этом, основные фосфолипиды (ФХ, ФГ, ФЭ), относящиеся к структурообразующим и функциональным компонентам биологических мембран, отличались относительно высоким содержанием по сравнению с другими фосфолипидами. Их количество находилось в пределах 21–31% от общей суммы фосфолипидов. Полученные количественные показатели липидного состава кодиума согласуются с данными, представленными ранее в исследованиях Хотимченко [19].

Морские зеленые водоросли близки по составу жирных кислот с наземными растениями, однако по содержанию отдельных кислот могут сильно отличаться от них. Изучение жирно-кислотного состава *C. fragile* (табл. 1) показало, что содержание ПНЖК превалировало среди других идентифицированных жирных кислот и составляло 54% от их общей суммы. При этом доля насыщенных жирных кислот (НЖК) в липидном экстракте составляло 34% и мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) – 12%. Из НЖК основной по содержанию являлась пальмитиновая кислота (16:0), ее количество в липидном экстракте кодиума составляло более 28%. Среди МНЖК наибольшее количество (10.72%) приходилось на олеиновую кислоту (18:1  $\omega$ -9). Из ПНЖК, преобладающими по содержанию, являлись  $\alpha$ -линоленовая (18:3  $\omega$ -3) (19.7%) и гексадекатриеновая (16:3  $\omega$ -3) (12.2%). При этом в зеленых водорослях содержание олеиновой и  $\alpha$ -линоленовой кислот значительно превышает их количество в наземных растениях.

Следует отметить, что водоросли отдела Chlorophyta, в их числе *C. fragile*, отличаются присутствием значительных количеств  $C_{16}$  и  $C_{18}$  ПНЖК. Для водорослей семейства Codiaceae рода *Codium sp.* характерно высокое содержание ПНЖК 16:3, что является таксономическим признаком этого рода [12]. При этом водоросли рода *Codium sp.* способны синтезировать также длинноцепочечные  $C_{20}$  и  $C_{22}$  ПНЖК. Полученные результаты по содержанию жирных кислот в липидной фракции *C. fragile* согласуются с данными, приведенными в отечественных и зарубежных литературных источниках [12, 14, 19].

Следующая стадия экспериментального исследования состояла в изучении влияния липидного экстракта кодиума и препарата сравнения Омега-3 на биохимические и физиологические показатели эритроцитов мышечной ткани в условиях стресса.

**Таблица 1.** Жирно-кислотный состав липидной фракции таллома *Codium fragile* Suringar (Hariot) 1889

Жирные кислоты (в % от суммы всех фракций)	
Миристиновая кислота (14:0)	1.7±0.02
Пальмитиновая кислота (16:0)	28.38±1.45
Стеариновая кислота (18:0)	0.9±0.03
Пальмитолеиновая кислота (16:1 ω-7)	1.6±0.01
Олеиновая кислота (18:1 ω-9)	10.72±0.46
16:2 ω-6	2.6±0.12
Линолевая кислота (18:2 ω-6)	9.0±0.36
Гексадекатриеновая кислота (16:3 ω-3)	12.2±0.56
α-Линоленовая кислота (18:3 ω-3)	19.7±0.64
Арахидоновая кислота (20:4 ω-6)	6.2±0.23
Эйкозопентаеновая кислота (20:5 ω-3)	4.3±0.32
Бегеновая кислота (22:0)	2.7±0.04
Σ НЖК	33.68
Σ МНЖК	12.32
Σ ПНЖК	54.0

*Примечание.* НЖК – насыщенные жирные кислоты, МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты.

Под действием стресс-вертикальной фиксации во 2-й группе подопытных животных были выявлены существенные различия, как в отношении размерных параметров эритроцитов, так и их осмотической резистентности по сравнению с контрольной группой (табл. 2). При этом СДЭ превысил показатели контроля на 25% ( $p < 0.001$ ), а СОЭр достоверно увеличился в 2 раза.

Количественное определение степени гемолиза эритроцитов у животных, подвергнутых стрессовому воздействию, показало уменьшение диапазона осмотической устойчивости эритроцитов. У стрессированных животных разрушение красных клеток крови начиналось раньше – при concentra-

ции  $\text{NaCl} = 0.50 \pm 0.02\%$  (в контрольной группе при  $\text{NaCl} = 0.45 \pm 0.01\%$ ), полный гемолиз отмечался уже при концентрации  $\text{NaCl} = 0.45 \pm 0.02\%$  (в контрольной группе при  $\text{NaCl} = 0.35 \pm 0.01\%$ ). Следовательно, под действием стресса отмечалось снижение осмотической резистентности, то есть начало появления гемолизированных эритроцитов происходит при более высокой, чем в норме концентрации хлорида натрия. Полный гемолиз эритроцитов у стрессированных животных был выявлен при концентрации  $\text{NaCl}$  на 29% ( $p < 0.001$ ) выше таковой в контрольной группе.

Влияние стресса также отразилось на содержании отдельных фракций фосфолипидов, которые играют важную роль в структурно-функциональной целостности мембран эритроцитов. Из приведенных данных в табл. 3 следует, что стрессовое воздействие вызывает достоверное снижение количества ФХ и ФЭ в среднем на 14%, при этом отмечалось увеличение концентрации их лизоформ: лизофосфатидилхолина (ЛФХ) на 33% ( $p < 0.05$ ) и лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ) на 24% ( $p < 0.05$ ), что может быть обусловлено активацией фосфолипаз под действием реактивных оксигенных радикалов, образующихся в значительном количестве при стрессе [36]. Избыток образующихся лизофосфолипидов под действием эндогенных фосфолипаз оказывает мембранолитическое действие, что приводит к нарушению упорядоченной структуры мембран, в результате возрастает их проницаемость, нарушается целостность мембранного матрикса с дальнейшей его деградацией [37].

Существенное влияние на структурно-функциональные свойства мембран оказывает содержание сфингомиелина (СМ), в составе которого содержатся преимущественно насыщенные жирные кислоты, поэтому СМ менее подвержен перекисидации. Отмеченное достоверное повышение уровня СМ на 20% ( $p < 0.001$ ) при стрессе является защитно-приспособительной реакцией на уменьшение количества ФХ в мембране. Согласно исследованиям Shevchenko и Shishkina [38], сфингомиелин

**Таблица 2.** Влияние стресс-вертикальной фиксации на размерные характеристики и осмотическую резистентность эритроцитов мышей и их коррекция липидным экстрактом кодиума и Омега-3 ( $M \pm m$ )

Группы	1-я группа Контроль	2-я группа Стресс	3-я группа Стресс + кодиум	4-я группа Стресс + Омега-3
Средний диаметр эритроцитов (СДЭ, мкм)	6.50±0.12	8.21±0.18***	6.56±0.12 <sup>3</sup>	7.00±0.14
Средний объем эритроцитов (СОЭр, мкм <sup>3</sup> )	56.20±1.9	110.66±2.8***	56.46±1.86 <sup>3, a</sup>	70.08±2.50*
Осмотическая резистентность (% NaCl)	$\frac{0.45 \pm 0.01}{0.35 \pm 0.01}$	$\frac{0.50 \pm 0.02}{0.45 \pm 0.02^{**}}$	$\frac{0.40 \pm 0.02^1}{0.30 \pm 0.01^1}$	$\frac{0.40 \pm 0.01^1}{0.30 \pm 0.01^1}$

*Примечание.* Изменения статистически достоверны: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  – при сравнении с контролем; <sup>1</sup>  $p < 0.05$ , <sup>2</sup>  $p < 0.01$ , <sup>3</sup>  $p < 0.001$  – со 2-й группой (стресс); <sup>a</sup>  $p < 0.001$  – сравнение 3-й группы (кодиум) с 4-й группой (Омега-3).

**Таблица 3.** Влияние липидного экстракта кодиума и Омега-3 на содержание фосфолипидов в мембранах эритроцитов мышей при стрессе (% от суммы фракций,  $M \pm m$ )

Фосфолипиды	1-я группа Контроль	2-я группа Стресс	3-я группа Стресс + кодиум	4-я группа Стресс + Омега-3
Фосфатидилэтаноламин	24.55 ± 0.36	21.07 ± 0.69**	23.82 ± 0.39 <sup>2</sup>	23.12 ± 0.16
Фосфатидилхолин	29.43 ± 0.62	25.22 ± 0.25***	27.93 ± 0.57 <sup>1</sup>	27.79 ± 0.39 <sup>1</sup>
Сфингомиелин	19.38 ± 0.31	23.22 ± 0.51***	19.90 ± 0.49 <sup>2</sup>	20.16 ± 0.42 <sup>1</sup>
Лизофосфатидилэтаноламин	4.87 ± 0.27	6.05 ± 0.26*	4.53 ± 0.25 <sup>2, a</sup>	5.0 ± 0.17
Лизофосфатидилхолин	4.40 ± 0.53	5.87 ± 0.34*	4.71 ± 0.28	4.92 ± 0.17 <sup>1</sup>
Фосфатидилинозит	6.60 ± 0.15	7.40 ± 0.31*	6.57 ± 0.42	7.04 ± 0.23
Фосфатидилсерин	7.13 ± 0.20	7.62 ± 0.37	7.02 ± 0.44	7.71 ± 0.39
Фосфатидная кислота	3.64 ± 0.20	3.55 ± 0.16	5.52 ± 0.16*** <sup>3, a</sup>	4.26 ± 0.20
Сфингомиелин/ Фосфатидилхолин	0.66	0.92	0.71	0.72

*Примечание.* Изменения статистически достоверны: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  – при сравнении с контролем; <sup>1</sup>  $p < 0.05$ , <sup>2</sup>  $p < 0.01$ , <sup>3</sup>  $p < 0.001$  – со 2-й группой (стресс); <sup>a</sup>  $p < 0.05$  – сравнение 3-й группы (кодиум) с 4-й группой (Омега-3).

является важным компонентом стабильности мембраны и одной из основных фракций эритроцитов у грызунов разных видов. Рост доли СМ способствует увеличению микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов. Рассчитанный коэффициент СМ/ФХ был выше почти на 40% (табл. 2) по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о повышении жесткости мембраны эритроцитов и снижении их подвижности. Обращает на себя внимание также увеличение количества фосфатидилинозита (ФИ) на 12% ( $p < 0.05$ ), который характеризуется высокой скоростью обмена по сравнению с другими фосфолипидами, при этом основная его часть расположена во внутреннем слое мембран. ФИ образует с белками сложный белково-липидный комплекс и обеспечивает передачу информации соединениям, управляющим физиологической активностью клетки, и сохраняя ее гомеостаз на молекулярном уровне [39]. При стресс-индуцированном воздействии потребность в передаче информации значительно возрастает, что, по-видимому, обуславливает повышение количества ФИ в мембране.

Из полученных данных следует, что в эритроцитах при стрессе происходят существенные изменения, как в отношении размерных характеристик, так и в соотношении фосфолипидных составляющих мембран, что вероятно отражается на их физико-химических свойствах, приводит к изменению проницаемости и лабильности, осложняется их циркуляция по капиллярному руслу.

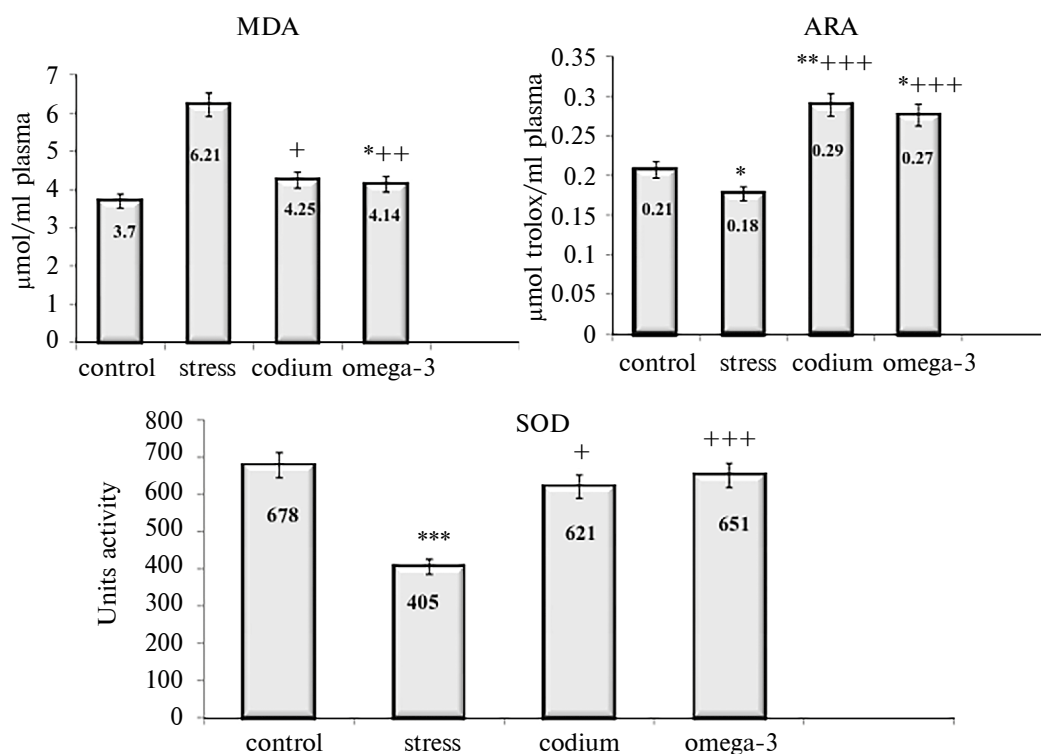
Повышенная генерация свободных радикалов при стрессе [21] является одной из основных причин выявленных изменений в содержании мембранных фосфолипидов, которые наиболее

уязвимы к их действию, так как легко окисляются. Образующиеся радикалы кислорода взаимодействуют с ПНЖК фосфолипидов с образованием радикала жирной кислоты, что приводит к перекисному окислению липидов (ПОЛ) клеточных мембран и образованию окисленных фосфолипидов.

Накопление вторичных высокотоксичных продуктов ПОЛ свидетельствует об активации перекисного окисления жирных кислот фосфолипидов, что подтверждается увеличением количества МДА на 68% ( $p < 0.001$ ) при одновременном снижении антирадикальной активности на 14% ( $p < 0.05$ ) в плазме крови (рис. 2). Снижение активности супероксиддисмутазы (СОД) на 40% ( $p < 0.001$ ), одного из ключевых антиоксидантных ферментов, также свидетельствует о неконтролируемом усилении процессов липопероксидации и развитии оксидативного стресса.

При введении липидных комплексов кодиума и Омега-3 животным отмечалась тенденция к восстановлению нарушенных стрессом исследуемых размерных характеристик и осмотической устойчивости эритроцитов (табл. 2). Действие липидного экстракта кодиума сопровождалось сохранением размерных величин эритроцитов и отсутствием достоверных отличий от контрольных значений. В тоже время при сравнении с контролем аналогичных показателей у животных, получавших Омега-3, выявлено увеличение СОЭр на 25% ( $p < 0.05$ ).

В отношении осмотической резистентности эритроцитов у животных обеих групп, получавших липидные препараты в условиях стресса, отмечено расширение границ устойчивости крас-



**Рис. 2.** Влияние липидного экстракта кодиума и Омега-3 на показатели антиоксидантной системы плазмы крови мышей при стрессе. MDA – малоновый диальдегид, ARA – антирадикальная активность, SOD – супероксиддисмутаза. Изменения статистически достоверны: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  – при сравнении с контролем; +-  $p < 0.05$ , ++  $p < 0.01$ , +++  $p < 0.001$  – со 2-й группой (стресс).

ных клеток крови к гемолизирующему агенту. Так начало гемолиза у них происходило при концентрации  $\text{NaCl} = 0.40 \pm 0.02\%$ , а полный гемолиз – при  $\text{NaCl} = 0.30 \pm 0.01\%$ , что на 20% и 33% соответственно было ниже таковых концентраций во 2-й группе (стресс). Следовательно, липидный экстракт кодиума и Омега-3 способствовали восстановлению ОРЭ к снижению концентрации хлорида натрия в условиях стрессового воздействия.

При исследовании содержания основных фракций фосфолипидов в мембранах эритроцитов подопытных животных 3-й и 4-й групп, получавших липидные комплексы, не было выявлено достоверных отличий относительно контрольных значений (табл. 2). Сравнение данных показателей с аналогичными величинами во 2-й группе (стресс) показало увеличение количества основных структурных фосфолипидов мембран: ФХ в среднем на 11% ( $p < 0.05$ ) и ФЭ на 13% ( $p < 0.01$ ) и 10% соответственно. В отношении их лизофракций было выявлено снижение количества ЛФЭ на 25% ( $p < 0.01$ ) в 3-й группе (кодиум) и ЛФХ на 16% ( $p < 0.05$ ) в 4-й группе (Омега-3). Снижение количества лизофракций фосфолипидов, по-видимому, может свидетельствовать о падении активности фосфолипаз под действием липидных комплексов. В обеих группах мышей в мембранах эритроцитов достоверно снизилось содержание

СМ в среднем на 13–14%, что обусловило понижение коэффициента СМ/ФХ на 22–23% относительно 2-й группы (стресс). Также необходимо отметить значительное повышение уровня фосфатидной кислоты (ФК) на 55% ( $p < 0.001$ ) в мембране эритроцитов мышей, получавших липидный экстракт кодиума. Данный факт имеет немаловажное значение для репарации поврежденных мембран эритроцитов под действием стресса, так как известно, что фосфатидная кислота является основой для синтеза многих фосфолипидов, в том числе ФХ и ФЭ. У мышей, получавших Омега-3, уровень ФК также повысился, но не столь значительно.

Полученные данные влияния липидных комплексов кодиума и Омега-3 на мембраны эритроцитов в условиях стресс-воздействия могут свидетельствовать о восстановлении липидных структур мембран, соответственно их проницаемости и лабильности, а также снижении повышенной жесткости.

Липидный экстракт кодиума и Омега-3 проявляли выраженное антиоксидантное действие, о чем свидетельствует достоверный рост показателей АРА на 63% и 56% соответственно относительно аналогичных значений в группе “стресс” (рис. 2). Также отмечалось восстановление активности СОД в плазме крови животных до уровня контроля на фоне достоверного снижения содер-



жания МДА в среднем на 32–33% по сравнению со 2-й группой (стресс), что свидетельствует об уменьшении активности процессов свободно-радикального окисления под действием липидных комплексов морского происхождения. Отмеченный эффект липидного экстракта кодиума и препарата сравнения Омега-3, по-видимому, вызван действием ПНЖК  $\omega$ -3, способных активировать ферменты антиоксидантной защиты, в том числе СОД [40], тем самым предохраняя мембраны эритроцитов от повреждений. Согласно исследованиям Richard и соавт. [41] показано, что ПНЖК семейства  $\omega$ -3, являются эффективными антиоксидантами направленного действия, способными “гасить” свободные радикалы.

Проведя сравнительный анализ действия липидного экстракта кодиума и Омега-3 в условиях стрессового воздействия животных, было выявлено, что оба липидных комплекса проявили выраженный защитный эффект в восстановлении размерных параметров эритроцитов, их осмотической устойчивости к гемолизу, а также показателей мембранных фосфолипидов и антиоксидантной системы. Однако по ряду показателей при расчете статистической достоверности между 3-й и 4-й группами животных были отмечены некоторые достоверные отличия. Так в 4-й группе мышей, получавших Омега-3 при стрессе, величина СОЭр достоверно отличалась от контрольных показателей и превышала на 24% ( $p < 0.05$ ) соответствующие значения в 3-й группе животных, получавших липидный экстракт кодиума. В отношении фосфолипидных фракций мембран эритроцитов выявлено, что уровень ФК у животных 3-й группы (кодиум) на 30% ( $p < 0.05$ ) превышал соответствующие показатели 4-й группы (Омега-3). При этом в содержании лизофракций мембранных фосфолипидов у мышей, получавших водорослевый экстракт, уровень ЛФЭ в эритроцитах мышей был достоверно ниже (на 10%) аналогичных значений у животных, получавших препарат сравнения Омега-3.

Таким образом, липидный экстракт кодиума в условиях стресс-индуцирующего воздействия проявлял большую эффективность по сравнению с Омега-3, как в отношении восстановления размерных показателей эритроцитов, так и фосфолипидной составляющей их мембран, что может быть обусловлено преимущественно различным составом исследуемых комплексов. Необходимо отметить, что препарат Омега-3 в качестве основных действующих веществ содержит полиненасыщенные жирные кислоты (эйкозапентаеновую и докозагексаеновую), а также насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты. В свою очередь, липидный экстракт кодиума характеризуется более разнообразным составом. В его состав входят пять

основных видов класса фосфолипидов, содержащих жирные кислоты с преимущественным преобладанием ПНЖК  $\omega$ -3 ( $\alpha$ -линоленовая, гексадекатриеновая, эйкозапентаеновая) и  $\omega$ -6 (линолевая, арахидоновая), а также насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты. По-видимому, такой многокомпонентный состав липидного экстракта кодиума определяет более высокую биологическую активность, чем у Омега-3.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование состава липидного экстракта *C. fragile* показало наличие неполярных и полярных фракций липидов, содержащих незаменимые жирные кислоты семейства  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6. Из полученных данных по изучению структурных и физиологических характеристик эритроцитов мышей в условиях стрессового воздействия следует, что липидный экстракт *C. fragile* обладает мембранопротекторным действием. Эффект липидного экстракта кодиума в условиях стресса проявлялся в отсутствии макроцитоза эритроцитов, сохранении их осмотической устойчивости к гемолизирующему агенту, а также в восстановлении показателей мембранных фосфолипидов и антиоксидантной защиты организма. Входящие в состав *C. fragile* фосфолипиды, как основные структурообразующие и функциональные компоненты всех биомембран, по-видимому, обеспечивают мембранно-репарирующую функцию, встраиваясь в поврежденные мембраны эритроцитов. Преимущество защитного действия липидного экстракта кодиума перед препаратом Омега-3 обусловлено наличием в его составе широкого спектра липидной составляющей, а именно: гликолипидов, нейтральных липидов, фосфолипидов и полиненасыщенных жирных кислот с преобладанием семейств  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6. Полученные данные свидетельствуют, что использование липидных комплексов, выделенных из морских водорослей, в частности из *C. fragile*, имеет большие перспективы для создания профилактических препаратов с мембранопротекторными свойствами.

## ВКЛАДЫ АВТОРОВ

С.Е.Ф. осуществляла планирование эксперимента, сбор данных, участвовала в обработке экспериментального материала и обсуждении полученных данных, написании статьи. Н.Ф.К. осуществляла планирование эксперимента, сбор данных, участвовала в обработке экспериментального материала и обсуждении экспериментальных данных. В.Г.С. осуществлял планирование эксперимента, участвовал в обработке экспериментального материала и обсуждении экспериментальных данных, осуществлял техническую поддержку при проведении экспериментов с животными.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках госзадания ФГБУН ТОО ДВО РАН по теме “Эколого-биогеохимические процессы в морских экосистемах: роль природных и антропогенных факторов” (0211–2021–0014). Регистрационный номер: 121–21500052–9.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Эксперименты с животными проводились в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>). Протоколы с использованием животных были одобрены Этическим комитетом Тихоокеанского океанологического института ДВО РАН им. В.И. Ильичева (протокол № 21 от 10.11.2022 г.). Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Perez MJ, Falque E, Dominguez H (2016) Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. *Mar Drugs* 14: 52. <https://doi.org/10.3390/md14030052>
2. Khalifa SAM, Elias N, Farag MA, Chen L, Saeed A, Hegaz MF, Moustafa MS, Abd El-Wahed A, Al-Mousawi SM, Musharraf SG (2019) Marine Natural Products: A Source of Novel Anticancer. *Mar Drugs* 17: 491. <https://doi.org/10.3390/md17090491>
3. Agatonovic-Kustrin S, Morton DW, Ristivojević P (2016) Assessment of antioxidant activity in Victorian marine algal extracts using high performance thin-layer chromatography and multivariate analysis. *J Chromatogr A* 1468: 228. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.09.041>
4. Cherif W, Ktari L, Bour MEI, Boudabous A, Grignon-Dubois M (2016) *Codium fragile* subsp. *fragile* (Suringar) Hariot in Tunisia: morphological data and status of knowledge. *Algae* 31: 129. <http://dx.doi.org/10.4490/algae.2016.31.4.17>
5. Тумлянов ЭА, Тумлянова ТВ (2012) Морские растения стран Азиатско–Тихоокеанского региона, их использование и культивирование. Владивосток: Дальнаука. [Titlyanov EA, Titlyanova TV (2012) Marine plants of the countries of the Asia-Pacific region, their use and cultivation. Vladivostok: Dalnauka (In Russ)].
6. Ahn J, Kim MJ, Yoo A, Ahn J, Ha T, Jung C.H, Seo HD, Jang YJ (2021). Identifying *Codium fragile* extract components and their effects on muscle weight and exercise endurance. *Food Chemistry* 353: 129463. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129463>
7. Kolsi RBA, Salah HB, Hamza A, Elfeki A, Allouche N, Elfeki L, Belguith K (2017) Characterization and evaluating of antioxidant and antihypertensive properties of green alga (*Codium fragile*) from the coast of Sfax. *J Pharmacogn Phytochem* 6: 186.
8. Kolsi RBA, Jardak N, Hajkacem F, Chaaben R, Jribi I, Feki AE, Rebai T, Jamoussi K, Fki L, Belghith H, Belghith K (2017) Anti-obesity effect and protection of liver-kidney functions by *Codium fragile* sulphated polysaccharide on high fat diet induced obese rats. *Int J Biol Macromol* 102: 119. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.017>
9. Park H-B, Hwang J, Zhang W, Go S, Kim J, Choi I, You SG, Jin J-O (2020) Polysaccharide from *Codium fragile* Induces Anti-Cancer Immunity by Activating Natural Killer Cells. *Mar Drugs* 18: 626. <https://doi.org/10.3390/md18120626>
10. Lee C, Park GH, Ahn EM, Kim BA, Park CI, Jang JH (2013) Protective effect of *Codium fragile* against UVB-induced pro-inflammatory and oxidative damages in HaCaT cells and BALB/c mice. *Fitoterapia* 86: 54.
11. Fomenko SE, Kushnerova NF, Sprygin VG, Drugova ES, Lesnikova LN, Merzlyakov VY, Momot TV (2019) Lipid Composition, Content of Polyphenols, and Antiradical Activity in Some Representatives of Marine Algae. *Russ J Plant Physiol* 66: 942–949.
12. Goecke F, Hernandez V, Bittner M, Gonzalez M, Becerra J, Silva M (2010) Fatty acid composition of three species of *Codium* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Chile. *Rev Biol Marin Oceanograf* 45: 325.
13. Caccamese S, Azzolina D, Furnari G, Cormaci M, Grasso S (1981) Antimicrobial and antiviral activities of some marine algae from eastern Sicily. *Botanic Marin* 24: 365. <http://dx.doi.org/10.1515/botm.1981.24.7.365>
14. Dembitsky VM, Rezankova H, Rezanka T, Hanus LO (2003) Variability of the fatty acids of the marine green algae belonging to the genus *Codium*. *Biochem Systemat Ecol* 31: 1125. [https://doi.org/10.1016/s0305-1978\(03\)00043-7](https://doi.org/10.1016/s0305-1978(03)00043-7)
15. Jump DB, Depner CM, Tripathy S, Lytle KA (2015) Potential for Dietary omega-3 Fatty Acids to Prevent Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Reduce the Risk of Primary Liver Cancer. *Adv Nutr* 6: 694–702. <https://doi.org/10.3945/an.115.009423>
16. Sanhueza J, Nieto SK, Valenzuela AB (2002) Conjugated linoleic acid: a trans isomer fatty acid potentially beneficial. *Revist Chilena Nutrición* 29: 98–105.
17. Komal F, Khan MK, Imran M, Ahmad MH, Anwar H, Ashfaq UA, Ahmad N, Masroor A, Ahmad RS, Nadeem M, Nisa MU (2020) Impact of different omega-3 fatty acid sources on lipid, hormonal, blood glucose, weight gain and histopathological damages profile in PCOS rat model. *J Transl Med* 18: 349. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02519-1>
18. Ortiz J, Uquiche E, Robert P, Romero N, Quitral V, Llantén C (2009) Functional and nutritional value of the Chilean

- seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and *Macrocystis pyrifera*. Eur J Lipid Sci Technol 111: 320.  
<https://doi.org/10.1002/ejlt.200800140>
19. Хотимченко СВ (2003) Липиды морских водорослей-макрофитов и трав. Структура, распределение, анализ. Владивосток: Дальнаука. [*Khotimchenko SV* (2003) Lipids of marine algae-macrophytes and herbs. Structure, distribution, analysis. Vladivostok: Dalnauka. (In Russ)].
  20. Кушнерова НФ, Спрыгин ВГ, Фоменко СЕ, Рахманин ЮА (2005) Влияние стресса на состояние липидного и углеводного обмена печени, профилактика. Гиг санитар 5: 17–21. [*Kushnerova NF, Sprygin VG, Fomenko SE, Rakhmanin YuA* (2005) Impact of stress on hepatic lipid and carbohydrate metabolism, prevention. Hyg Sanit 5: 17–21. (In Russ)].
  21. Sahin E, Gumuöslu S (2007) Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and anti-oxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization-cold). Clin Exp Pharmacol Physiol 34: 425–431.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04584.x>
  22. Kovacs P, Juranek I, Stankovicova T, Svec P (1996) Lipid peroxidation during acute stress. Pharmazie 51: 51–53.
  23. Морозова ВТ, Луговская СА, Почтарь МЕ (2007) Эритроциты: структура, функции, клинико-диагностическое значение. Клин лаб диагн 10: 21–35. [*Morozova TV, Lugovskaya SA, Pochtary ME* (2007) Red blood cells: structure, function, clinical and diagnostic value. Klin Lab Diagn 10: 21–35. (In Russ)].
  24. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 37: 911–917.
  25. Vaskovsky VE, Khotimchenko SV (1982) HPTLC of Polar Lipids of Algae and Other Plants J Chromatography 5: 635–636.  
<https://doi.org/10.1002/jhrc.1240051113>
  26. Van Gent CM, Roseleur OJ, Van Der Bijl P (1973) The detection of cerebrosides on thin-layer chromatograms with an anthrone spray reagent. J Chromatogr 85: 174–176.
  27. Vascovsky VE, Kostetsky EY, Vasendin IM (1975) Universal Reagent for Phospholipid Analysis J Chromatography 114: 129–141.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)85249-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85249-8)
  28. Amenta JS (1964) A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography. J Lipid Res 5: 270–272.  
[https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)40251-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)40251-2)
  29. Carreau JP, Dubacq JP (1978) Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts. J Chromatogr 151: 384–390.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)88356-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)88356-9)
  30. Christie WW (1988) Equivalent chain-lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gas chromatography A reappraisal. J Chromatogr 447: 305–314.
  31. Новгородцева ТП, Караман ЮК, Бивалькевич НВ, Жукова НВ (2010) Использование биологически активной добавки к пище на основе липидов морских гидробионтов в эксперименте на крысах. Вопр питан 79: 24–27. [*Novgorodtseva TP, Karaman YuK, Bivalkevich NV, Zhukova NV* (2010) The use of biologically active food supplements based on lipids of marine aquatic organisms in an experiment on rats. Probl Nutrition 79: 24–27. (In Russ)].
  32. Меньшиков ВВ (ред) (1987) Лаб мет исслед клин. М.: Медицина. [*Menshikov VV* (ed.) (1987) Lab Res Meth Clin M.: Medicine. (In Russ)].
  33. Bartosz G, Janaszewska A, Ertel D, Bartosz M (1998) Simple determination of peroxy radical-trapping capacity. Biochem Mol Biol Int 46: 519–528.  
<https://doi.org/10.1080/15216549800204042>
  34. Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A (1986) A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide-dismutase activity in tissue-extracts. Analyt Biochem 154: 536–541.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90026-6)
  35. Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology. N.Y.: Academic Press 52: 302–310.
  36. Adibhatla RM, Hatcher JF (2008) Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipidperoxidation in CNS pathologies. BMB reports 41: 560–567.  
<https://doi.org/10.5483/bmbrep.2008.41.8.560>
  37. Cumming DS, Mchowat J, Schnellmann RG (2000) Phospholipase A2s in cell injury and death. J Pharmacol Experim Therapeutic 294: 793–799.
  38. Shevchenko OG, Shishkina LN (2011) Comparative analysis of phospholipid composition in blood erythrocytes of various species of mouse-like rodents. J Evol Biochem Physiol 47: 179–186  
<https://doi.org/10.1134/s0022093011020071>
  39. Zabelinskii SA, Chebotareva MA, Shukolyukova EP, Krivchenko AI (2017) Phospholipids, fatty acids and hemoglobin in rat erythrocytes under stress conditions (swimming at low temperature). J Evol Biochem Physiol 53:17–24.  
<https://doi.org/10.1134/s0022093017010021>
  40. Garrel C, Alessandri J-M, Guesnet P, Al-Gubory KH (2012) Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. Int J Biochem Cell Biol 44: 123–131.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.007>
  41. Richard D, Keft K, Barbe U, Bausero P, Visioli F (2008) Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. Pharmacol Res 57: 451–455.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.05.002>

## EFFICACY OF LIPID EXTRACT OF MARINE GREEN ALGA *CODIUM FRAGILE* (SURINGAR) HARIOT FOR REPAIR OF MOUSE RED CELLS MEMBRANES UNDER STRESS EXPOSURE

S. E. Fomenko<sup>a,#</sup>, N. F. Kushnerova<sup>a</sup>, V. G. Sprygin<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Ilyichev Pacific Oceanological Institute FEB RAS, Vladivostok, Russia*

<sup>#</sup> *e-mail: fomenko29@mail.ru*

*Codium fragile* (Suringar) Hariot is a marine green alga belonging to the Codiaceae family, is one of the mass species of macrophytes in the Far East Region of the Russian Federation. The total lipid content was  $13.92 \pm 0.22$  mg per g of dry tissue, of which 44% were glycolipids and 40% were neutral lipids, phospholipids accounted for 16%. The content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) was over 50% of the total fatty acids, of which PUFAs of the  $\omega$ -3 family (36.2%) and  $\omega$ -6 family (17.8%) predominated. Under of stress exposure (vertical fixation by dorsal neck fold) the effect of lipid extract of *C. fragile* and reference remedy Omega-3 on biochemical and physiological parameters of mice erythrocytes was studied. Under the impact of stress erythrocytes undergo certain changes, as in terms of dimensional characteristics so as in phospholipid pattern of membranes. This leads to changes in its permeability and lability, also made more complex their circulation through the capillary bed. The endogenous antioxidant defense system of mice under stress experiences a considerable strain, as evidenced by the increase in the level of malonic dialdehyde while reducing in the activity of superoxide dismutase and the level of anti-radical activity in blood plasma. The administration of the lipid extract of *C. fragile* under stress conditions was accompanied by the restoration of the lipid content in the erythrocyte membranes, a decrease in the amount of lysophospholipids, and the normalization of the sphingomyelin/phosphatidylcholine ratio, which contributed to the restoration of the dimensional parameters of erythrocytes, their osmotic resistance, and indices of the body's antioxidant system. The pronounced stress- and membrane-protective effect of the lipid extract of *C. fragile* is due to the presence in its composition of a wide range of neutral and polar lipids containing PUFAs of the  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 families, which ensures a higher efficiency of the algal extract under stress compared to the reference preparation "Omega-3".

**Keywords:** lipid extract, *Codium fragile*, omega-3, stress, erythrocytes, phospholipids, mice