

УДК 577.121+615.324

ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ И МЕМБРАНОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА ИЗ МОРСКОЙ ЗЕЛЕННОЙ ВОДОРΟΣЛИ *ULVA LACTUCA* (L.)

© С.Е. Фоменко*, Н.Ф. Кушнерова, В.Г. Спрыгин, Е.С. Другова, Л.Н. Лесникова, В.Ю. Мерзляков

Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН,
ул. Балтийская, 43, Владивосток, 690041 (Россия), e-mail: sfomenko@poi.dvo.ru

Объектом настоящего исследования явился водно-спиртовой экстракт, полученный из высушенного таллома морской зеленой водоросли *Ulva lactuca* (L.) (syn.: *Ulva fenestrata* P. et R.) – ульвы латук. В составе липидной фракции экстракта преобладали гликолипиды (40.6%) и нейтральные липиды (34%), на долю фосфолипидов приходилось 13.4% от общей суммы липидов. Содержание полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) составляло 50% от общей суммы жирных кислот, среди которых преобладали ПНЖК семейства n-3 (37.43%). На модели токсического гепатита, индуцированного введением четыреххлористого углерода (CCl₄) (50% раствор в оливковом масле, подкожно 2 мл/кг в течение 4 дней), исследовали влияние липидной фракции экстракта *U. lactuca* и коммерческого препарата сравнения «Эссенциале®» на физиолого-биохимические характеристики эритроцитов и липидный состав эритроцитарных мембран крыс. Введение животным липидной фракции из ульвы (доза 80 мг общих липидов на кг массы тела) внутривенно в течение 7 дней после отмены CCl₄, оказывало защитное действие, которое проявлялось в восстановлении размерных характеристик эритроцитов (среднего объема и диаметра), их осмотической резистентности к гемолизу, уровня малонового диальдегида и восстановленного глутатиона, а также сохранении соотношения фосфолипидных фракций. В условиях повреждающего воздействия CCl₄ липидная фракция из зеленой водоросли *U. lactuca* не уступала препарату сравнения «Эссенциале®» в восстановлении физиологических характеристик эритроцитов и фосфолипидного состава их мембран.

Ключевые слова: липидная фракция из *Ulva lactuca*, эссенциале, четыреххлористый углерод, эритроциты, липиды, крысы.

Введение

Мир водорослей огромен, уникален и разнообразен. Водоросли являются богатым источником биологически активных компонентов различной структуры с разными биологическими свойствами. За миллионы лет существования нашей планеты водоросли выработали комплекс уникальных целебных свойств, которыми часто не обладают наземные растения [1]. Роль водорослей в сфере применения их для нужд человечества неопределима, они используются, прежде всего, как пищевой продукт с высокой биологической ценностью, а также в качестве удобрений, на корм животных, для создания фармацевтических и лечебно-профилактических препаратов. Морские водоросли с древних времен используются в традиционной медицине, благодаря входящим в их состав разнообразным химическим соединениям: полисахаридам, каротиноидам, полифенолам, минеральным веществам, аминокислотам, липидам и др. [2]. Из многочисленных литературных источников известно, что морские водоросли и выделенные из них экстракты оказывают терапевтическое действие на организм, в том числе антидиабетическое, антимуtagenное, противовоспалительное, противовирусное, антиопухолевое и др. [3].

Фоменко Светлана Евгеньевна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии, e-mail: fomenko29@mail.ru
Кушнерова Наталья Федоровна – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией биохимии, e-mail: natasha50@mail.ru

Спрыгин Владимир Геннадьевич – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии, e-mail: vsprygин@poi.dvo.ru

Другова Елена Сергеевна – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории биохимии, e-mail: drug-2005.84@mail.ru

Лесникова Лариса Николаевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биохимии, e-mail: lesnicova@poi.dvo.ru

Мерзляков Валерий Юрьевич – научный сотрудник лаборатории биохимии, e-mail: vum77@mail.ru

* Автор, с которым следует вести переписку.

Массовые виды морских водорослей являются потенциальными источниками биологически активных соединений. Среди них зеленая водоросль *Ulva lactuca* (L.) (syn.: *Ulva fenestrata* P. et R.) – ульва латук (салатная), традиционно используется как пищевой продукт с высокой биологической ценностью. Относится к Отделу *Chlorophyta* – зеленые водоросли, класс *Ulvotrichophyceae*, порядок *Ulvales* – ульвовые. *U. lactuca* является одним из самых распространенных видов зеленых водорослей дальневосточных морей вплоть до Берингова моря. Данный вид отличается широкой экологической амплитудой: растет на литорали и в сублиторали до глубины 20 м на различных грунтах в открытых и защищенных местах, в чистых и загрязненных водах и нередко выступает как ценозообразующий вид донных сообществ [4], вегетирует круглогодично, при этом в течение года сменяется несколько поколений водоросли.

В предыдущих исследованиях нами было установлено, что экстракты, выделенные из ряда морских макрофитов, содержат достаточно высокий процент веществ липидной природы, при этом большая часть относится к категории мембраноактивных компонентов [5, 6]. Липидный комплекс, полученный из водно-спиртового экстракта *U. lactuca*, проявлял выраженный защитный эффект в условиях различных экспериментальных моделей. Так, при токсическом гепатозе у крыс профилактическое введение экстракта из *U. lactuca*, обогащенного липидной фракцией, способствовало восстановлению относительной массы печени, снижению активности трансаминаз, уровня малонового диальдегида и триацилглицеридов в крови и печени экспериментальных животных [7]. При экспериментальном стресс-воздействии введение экстракта из *U. lactuca* сопровождалось сохранением весовых коэффициентов внутренних органов животных, нормализацией липидного обмена и показателей антиоксидантной системы [6].

Как продолжение предыдущих исследований, в задачу данной работы входило выделение липидной составляющей из водно-этанольного экстракта зеленой водоросли *U. lactuca*, изучение ее качественного и количественного состава, а также эффективности применения для репарации мембранных структур эритроцитов в условиях интоксикации крыс четыреххлористым углеродом.

Четыреххлористый углерод (CCl₄) – известный гепатотоксин, который широко используется для индуктирования токсического гепатита в экспериментальных исследованиях. Система цитохром Р-450 в микросомах печени превращает CCl₄ в высокореактивные свободные радикалы, вызывающие липидную перекисидацию и токсическое поражение печени. В результате происходит накопление цитотоксичных продуктов, таких как малоновый диальдегид и других алифатических альдегидов, которые, свою очередь, приводят к структурным изменениям в мембранах и нарушению клеточных функций [8]. В частности, активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах эритроцитов, а также снижение содержания восстановленного глутатиона в клетках красной крови, были зафиксированы при печеночном гепатозе и циррозе [9]. Таким образом, изменения в эритроцитарных мембранах могут быть использованы в качестве надежного биомаркера различных заболеваний печени, в том числе токсического гепатита. В проведенном исследовании мы использовали эритроцитарные клетки как наиболее доступную и удобную модель для изучения защитного действия водорослевого экстракта.

Целью настоящей работы явилось изучение состава липидной фракции, выделенной из водно-этанольного экстракта таллома зеленой водоросли *Ulva lactuca*, и ее мембранопротекторных свойств в условиях интоксикации крыс четыреххлористым углеродом.

Экспериментальная часть

Образцы водоросли *U. lactuca* собирали в летний период (август 2015 г.) в бухте Алексеева о-в Попова зал. Петра Великого Японского моря. Выборка водорослей составляла 10 талломов. Слоевница очищали от эпифитов и донного бентоса, промывали сначала морской, затем дистиллированной водой. После этого отжимали и погружали в кипящую воду на 2 мин. для инактивации ферментов. Обработанные таким способом водоросли сушили до суховоздушного состояния. Высушенный таллом измельчали с помощью лабораторной мельницы до размеров частиц 0.5-1 мм и экстрагировали 70% этиловым спиртом методом реперколяции. Выход экстракта составлял 1 л на 1 кг сухого сырья.

Для выделения липидной составляющей экстракта и исследования ее состава экстракт предварительно освобождали от спирта путем упаривания на ротаторном испарителе при температуре не выше 37 °С. Полученную маслообразную массу экстрагировали смесью хлороформ: метанол (1 : 2 по объему) в соответствии с общепринятым методом для выделения липидов из растительного и животного сырья [10]. Для разделения фаз к экстракту добавляли раствор хлористого натрия (0.73%) в количестве 20% от объема. После

разделения фаз хлороформный слой, содержащий липиды, отделяли на делительной воронке и упаривали на роторном испарителе до отсутствия запаха хлороформа. Общее содержание липидов определяли весовым методом. Стандартизацию липидной композиции экстракта проводили по суммарному содержанию липидов и дозу вводимого препарата рассчитывали в мг общих липидов на 1 кг массы животного.

Качественный анализ липидов проводили с помощью микротонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагеле, используя системы для разделения растительных гликолипидов [11] и фосфолипидов [12]. Для проявления фосфолипидных фракций применяли молибдатный реактив [12], для гликолипидов – антроновый реагент [13]. Липиды, содержащие аминогруппу, обнаруживали 0.2% раствором нингидрина в ацетоне [14]. Фосфолипиды, содержащие гидроксильную группу, обнаруживали с помощью периодатного реактива Шиффа [15]. В качестве неспецифического реагента использовали 10% раствор H_2SO_4 в метаноле с последующим нагреванием пластинок до появления темных пятен. Количество общих фосфолипидов в экстракте и индивидуальных фракций на хроматограммах определяли спектрофотометрически с помощью универсального молибдатного реактива [12]. Фракционное разделение фосфолипидных фракций проводили методом двумерной ТСХ [16], используя следующие системы растворителей: в первом направлении – хлороформ : метанол : аммиак (28%) (65 : 25 : 5 или 65 : 35 : 5, по объему), во втором – хлороформ : ацетон : метанол : ледяная уксусная кислота : вода (30 : 40 : 10 : 10 : 5 или 50 : 20 : 10 : 10 : 5, по объему) [15]. Количественное содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы фосфолипидов. Общее содержание нейтральных липидов (НЛ) и отдельных фракций определяли по методу J.S. Amenta [17]. Исследование фракционного состава НЛ проводили методом одномерной ТСХ на силикагеле в системе растворителей гексан : серный эфир : уксусная кислота в соотношении 80 : 20 : 1 (по объему). Стандарты и пробы после хроматографии обнаруживали раствором фосфорномолибденовой кислоты, которая в дальнейшем не мешает определению. Количественное содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы НЛ. Определение жирно-кислотного состава липидной фракции из экстрактов водорослей проводили методом газо-жидкостной хроматографии. Метилловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) получали переэтерификацией липидов по методу J.P. Sagreau и J.P. Dubaco [18]. Эфиры жирных кислот анализировали на хроматографе «ЛХМ-2000» с пламенно-ионизационным детектором. Идентификацию МЭЖК проводили сравнением времен удерживания со стандартами МЭЖК по значениям «углеродных чисел» [19]. Результаты выражали в процентах от суммы жирных кислот.

В эксперименте использовали белых крыс-самцов линии Вистар массой 180–200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Крысам вводили 50%-ный масляный раствор CCl_4 подкожно в дорсальную шейную складку из расчета 2 мл/кг в течение 4 дней [20]. На следующий день после последнего введения CCl_4 животные получали внутривенно через зонд липидный комплекс из экстракта ульвы в вазелиновом масле в течение 7 дней в дозе 80 мг общих липидов на кг массы животного, что соответствует известной терапевтической дозе для препаратов липидной природы [21]. Выделенный липидный комплекс предварительно освобождали от растворителя путем упаривания в вакууме, затем доводили вазелиновым маслом до требуемого объема. Вазелиновое масло категории «медицинское» является химически инертным и не оказывает влияние на результаты эксперимента. Разведение проводили таким образом, чтобы доза общих липидов, принятая в данном исследовании, а именно 16 мг на одно животное, содержалась в 0.4 мл полученного разведенного препарата. Контрольным животным вводили вазелиновое масло в сопоставимой дозе. В качестве препарата сравнения использовали известный гепатопротектор «Эссенциале®», изготовленный на основе фосфатидилхолина соевых бобов (производства компании «Рон-Пуленк Рорер», Германия), который вводили тем же способом и в той же дозе.

Животные были разделены на 5 групп по 10 крыс в каждой: 1 группа – контроль; 2 группа – введение CCl_4 ; 3-я – введение CCl_4 с последующей отменой в течение 7 дней; 4-я группа – введение CCl_4 в течение 4 дней с последующим введением липидной фракции *U. lactuca* в течение 7 дней; 5-я группа – введение CCl_4 в течение 4 дней с последующим введением эссенциале в течение 7 дней. Крыс выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом с соблюдением «Правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986). Исследование одобрено Комиссией по вопросам этики Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН (протокол № 10 от 15.03.2016 г.).

Выделение эритроцитов из крови и получение эритроцитарных мембран проводили традиционным способом. Средний объем (СОЭр) и средний диаметр эритроцитов (СДЭ) крови определяли на гематологическом анализаторе «Abacus» (Diatron, Австрия). Осмотическую резистентность эритроцитов (ОРЭ) к изменению концентрации NaCl рассчитывали по методу Б.Л. Эндрю [22]. Экстракты общих липидов из мембран эритроцитов готовили по методу J. Folch et al. [23]. Количество общих фосфолипидов в эритроцитах определяли в соответствии с методом [12]. Фракционное разделение фосфолипидов осуществляли методом двумерной ТСХ на силикагеле, а их количественное определение по методу V.E. Vaskovsky et al. [12]. Содержание отдельных фракций фосфолипидов выражали в процентах от общей суммы их оптических плотностей. Содержание холестерина в мембране эритроцитов определяли методом одномерной ТСХ и выражали в % от общих липидов [17]. Содержание малонового диальдегида и восстановленного глутатиона [24] определяли в цельной крови экспериментальных животных. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ InStat 3.0, используя статистическую программу (Graph Pad Software Inc. USA, 2005), включающего функцию проверки соответствия выборки закону нормального распределения. Для определения статистической значимости различий для межгрупповых сравнений в зависимости от параметров распределения использовали параметрический t-критерий Стьюдента или непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

Обсуждение результатов

Количество общих липидов, выделенных из экстракта зеленой водоросли *U. lactuca*, составляло 28.05 ± 0.18 мг/г сухой ткани. В их содержании преобладали гликолипиды и нейтральные липиды, которые составляли 40.6% (11.4 ± 0.10 мг/г сухой ткани) и 34% (9.54 ± 0.65 мг/г сухой ткани) соответственно от суммы общих липидов. При этом на долю фосфолипидов приходилось 13.4% (3.75 ± 0.23 мг/г сухой ткани) от суммы общих липидов. Гликолипиды являются обязательным компонентом морских макрофитов и наряду с фосфолипидами представляют собой важный источник полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). В составе нейтральных липидов (НЛ) в процентном отношении преобладали триацилглицерины (ТАГ) ($33.68 \pm 0.87\%$), диацилглицерины ($16.90 \pm 0.28\%$) и свободные стеринны ($14.65 \pm 0.27\%$) (табл. 1). При этом ТАГ морских растений, как и наземных, исполняют роль запасных липидов. В летний период при высокой освещенности избыток энергии используется клетками фотосинтезирующих организмов для производства запасных ТАГ. Остальные фракции НЛ, среди которых были обнаружены свободные жирные кислоты и эфиры стериннов, составляли в среднем 13–15% от общего количества НЛ.

Таблица 1. Химический состав липидной фракции таллома *Ulva lactuca*

Биохимические параметры	Показатели	Биохимические параметры	Показатели
Нейтральные липиды	% от суммы всех фракций	Жирные кислоты	% от суммы всех фракций
Диацилглицерины + Моноацилглицерины	16.90 ± 0.38	14:0 (миристиновая)	1.44 ± 0.06
Свободные стеринны	14.65 ± 0.27	16:0 (пальмитиновая)	3.10 ± 1.34
Свободные жирные кислоты	13.32 ± 0.20	18:0 (стеариновая)	1.0 ± 0.02
Триацилглицерины	33.68 ± 0.87	16:1 транс	1.0 ± 0.01
Эфиры стериннов	15.95 ± 0.27	16:1 n-7 (пальмитолеиновая)	3.59 ± 0.07
Остаточная фракция	5.50 ± 0.35	16:4n-3 (гексадекатетраеновая)	12.06 ± 0.85
Фосфолипиды	% от суммы всех фракций	18:1n-7 (цис-вакценовая)	9.42 ± 0.54
Фосфатидилэтаноламин	21.29 ± 1.52	18:1n-9 (олеиновая)	2.5 ± 0.07
Фосфатидилглицерин	27.35 ± 1.38	18:2 n-6 (линолевая)	9.80 ± 0.22
Фосфатидилинозит	20.20 ± 1.47	18:3 n-3 (α -линоленовая)	16.45 ± 1.36
Фосфатидилсерин	16.73 ± 0.50	18:4n-3 (стеаридоновая)	7.21 ± 0.15
Фосфатидная кислота	14.43 ± 1.38	20:4 n-6 (арахидоновая)	2.82 ± 0.08
		20:5 n-3 (эйкозопентаеновая)	1.71 ± 0.43
		Σ НЖК	33.44
		Σ МНЖК	16.51
		Σ ПНЖК	50.05
		Σ n-6 ПНЖК	12.62
		Σ n-3 ПНЖК	37.43

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

Липидный комплекс экстракта ульвы характеризовался наличием в своем составе пяти известных представителей класса фосфолипидов: фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилглицерин (ФГ), фосфатидинозит (ФИ), фосфатидилсерин (ФС) и фосфатидная кислота (ФК) (табл. 1), что согласуется с литературными данными [25]. Отличительной особенностью *U. lactuca* является отсутствие фосфатидилхолина (ФХ), но при этом присутствуют бетаиновые липиды, на долю которых приходилось до 12% (3.36 ± 0.12 мг/г сухой ткани) от общего количества липидов. В частности, одним из представителей данного класса липидов является 1,2-диацилглицеро-О-4-(N,N,N-триметил)-гомосерин (ДГТС), который, имея определенное структурное сходство с ФХ, не является фосфолипидом, так как не содержит остатка фосфорной кислоты. Согласно литературным данным, зеленые водоросли, в том числе *U. lactuca*, накапливающие высокое количество ДГТС, не содержат ФХ [26]. Из фосфолипидных фракций преобладали ФГ ($27.35 \pm 1.38\%$), ФЭ ($21.29 \pm 1.52\%$) и ФИ ($20.20 \pm 1.47\%$), которые являются наиболее значимыми компонентами мембран, обеспечивающих функционирование мембранных структур и клеток в целом. На долю других компонентов фосфолипидной фракции – ФС и ФК приходилось 14–16%.

Жирнокислотный состав общих липидов экстракта *U. lactuca* представлен в таблице 1. Содержание насыщенных жирных кислот (НЖК) составляло 33.44% от общего содержания жирных кислот, причем основным компонентом являлась пальмитиновая кислота (16:0), ее количество составляло 31%. Мононенасыщенные жирные кислоты (МНЖК) составляли 16.51% и были представлены кислотами: пальмит-олеиновой (16:1n-7; 3.59%), олеиновой (18:1 n-9; 2.5%) и *цис*-вакценовой (18:1 n-7; 9.42%). Наличие *цис*-вакценовой кислоты среди жирных кислот 18:1 характерно для зеленых водорослей рода *Ulva* и является таксономическим признаком [27]. Среди основных идентифицированных жирных кислот превалировали ПНЖК, их количество составляло 50% от общей суммы жирных кислот. Следует отметить, что жирнокислотный состав *U. lactuca* отличался наибольшим содержанием ПНЖК семейства n-3 (37.43%), что в 3 раза превышало содержание ПНЖК семейства n-6 (12.62%). В соответствии с литературными данными [28] для зеленых водорослей рода Chlorophyta, в том числе *U. lactuca*, является характерным высокое содержание ПНЖК семейства n-3. Из них преобладали α -линоленовая (18:3; 16.45%), гексадекатетраеновая (16:4; 12.06%) и стеариновая (18:4; 7.21%) кислоты. Как известно, именно жирные кислоты семейства n-3 являются важным элементом жирнокислотного состава морских водорослей, которые в большинстве случаев определяют ценность морских организмов в качестве источников лекарственного сырья.

Экспериментально было установлено, что липидная фракция из ульвы обладает низкой токсичностью (ЛД₅₀ составляет более 5000 мг/кг) и безопасностью при длительных введениях в желудок и парэнтерально.

Введение ССl₄ в течение 4 дней сопровождалось существенными изменениями физиологических параметров эритроцитов и разбалансировкой липидного состава их мембран. При исследовании среднего диаметра эритроцитов (СДЭ) и их среднего объема (СОЭр) отмечались однонаправленные изменения в сторону увеличения (табл. 2). Так, СДЭ достоверно превышал контрольные значения на 34% ($p < 0.001$), а СОЭр – в 2.4 раза ($P < 0.001$). Кроме того, был обнаружен сдвиг порога начала ($0.62 \pm 0.02\%$ NaCl) и окончания ($0.47 \pm 0.02\%$ NaCl) гемолиза эритроцитов (в норме гемолиз эритроцитов начинается при концентрации 0.45% NaCl, а завершается при 0.35% NaCl).

Таким образом, мембрана эритроцитов обладала пониженной устойчивостью к гемолизирующему агенту. Также отмечалось снижение на 27% ($p < 0.001$) количества общих фосфолипидов (ОФЛ) в мембранах эритроцитов. При исследовании содержания холестерина (ХС) было обнаружено его увеличение на 19% ($p < 0.001$). Холестерин и фосфолипиды в эритроцитарных мембранах играют важную роль в функционировании мембран, их проницаемости, текучести и целостности клеток [29]. Коэффициент холестерин/общие фосфолипиды (ХС/ОФЛ) повысился на 63% ($p < 0.001$), что свидетельствует о повышении жесткости мембран и снижении их лабильности.

Изменения в фосфолипидном спектре мембран эритроцитов после интоксикации ССl₄ также подтверждают нарушения их проницаемости. Это проявлялось в увеличении содержания лизофракций: лизофосфатидилхолина (ЛФХ) на 27% ($p < 0.001$) и лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ) на 12% ($p < 0.01$) (табл. 3), что обусловлено активированием фосфолипазы А₂ под действием ССl₄ и радикальных продуктов его метаболизма [30]. При этом наблюдалось достоверное снижение содержания основных структурных компонентов мембран – ФХ на 5% ($p < 0.05$) и ФЭ на 6% ($p < 0.05$).

Таблица 2. Влияние интоксикации CCl_4 и периода отмены на физиолого-биохимические характеристики эритроцитов крыс и их коррекция липидным комплексом из экстракта ульвы и эссенциале ($M \pm m$)

Показатели	1 группа Контроль (интактные)	2 группа CCl_4	3 группа Отмена CCl_4	4 группа Отмена + ульва	5 группа Отмена + эссенциале
Средний диаметр эритроцита (СДЭ, мкм)	6.29±0.04	8.46±0.06 ³	8.40±0.05 ³	6.40±0.05 ^{в,е}	7.04±0.04 ^{3,в}
Средний объем эритроцита (СОЭр, мкм ³)	49.77±1.75	121.10±2.36 ³	118.54±2.00 ₃	52.43±1.68 ^{в,е}	69.78±1.71 ^{3,в}
Осмотическая резистентность (% NaCl)	<u>0.45±0.01</u> 0.35±0.01	<u>0.62±0.02³</u> 0.47±0.02 ³	<u>0.60±0.02³</u> 0.50±0.02 ³	<u>0.45±0.01^{в,д}</u> 0.35±0.01 ^{в,г}	<u>0.49±0.01^{2,в}</u> 0.38±0.01 ^{1,в}
Общие фосфолипиды (% от общих липидов)	64.05±1.87	47.00±1.73 ³	52.54±1.58 ³	63.77±1.79 ^{в,г}	58.70±1.60 ^{1,б}
Холестерин (% от общих липидов)	22.01±0.80	26.21±0.65 ³	26.80±0.63 ³	22.76±0.78 ^{в,д}	25.90±0.66 ^{3,а}
Коэффициент ХС/ОФЛ	0.35±0.02	0.57±0.04 ³	0.51±0.03 ³	0.36±0.02 ^{в,д}	0.45±0.02 ^{2,б}
Малоновый диальдегид (мкмоль/мл)	6.51±0.12	9.0±0.25 ³	7.60±0.22 ³	6.7±0.26 ^а	6.98±0.20 ^{1,а}
Восстановленный глутатион (мкмоль/г Hb)	5.82±0.23	4.76±0.39 ¹	5.45±0.25	6.07±0.25	5.96±0.53

Примечание: Различия статистически значимы по сравнению: с контролем: ¹ – $p < 0,05$; ² – $p < 0,01$; ³ – $p < 0,001$; с 3-й группой (отмена CCl_4): ^а – $p < 0,05$, ^б – $p < 0,01$, ^в – $p < 0,001$; с 5-й группой (эссенциале): ^г – $p < 0,05$, ^д – $p < 0,01$, ^е – $p < 0,001$. ХС/ОФЛ – холестерин/общие фосфолипиды.

Таблица 3. Влияние интоксикации CCl_4 и периода отмены на содержание фракций фосфолипидов в мембранах эритроцитов крыс и их коррекция липидным комплексом из экстракта ульвы и эссенциале ($M \pm m$)

Фракции	1 группа Контроль	2 группа CCl_4	3 группа Отмена CCl_4	4 группа Отмена + ульва	5 группа Отмена + эссенциале
ФХ	36.00±0.50	34.16±0.49 ¹	34.03±0.41 ²	35.98±0.67 ^а	35.71±0.59 ^а
ЛФХ	10.31±0.39	13.12±0.47 ³	13.20±0.38 ³	11.15±0.22 ^б	11.38±0.18 ^б
СМ	10.24±0.39	12.86±0.58 ²	12.50±0.18 ²	10.90±0.13 ^а	11.25±0.12 ^{1,в}
ФЭ	24.70±0.46	23.12±0.53 ¹	23.00±0.48 ¹	24.39±0.31 ^а	24.72±0.41 ^а
ЛФЭ	6.16±0.18	6.89±0.17 ²	6.85±0.18 ²	6.07±0.10 ^б	6.11±0.11 ^б
ФС	4.52±0.15	4.12±0.21 ³	4.27±0.11	4.40±0.08	4.33±0.09
ФИ	5.67±0.14	4.40±0.11 ³	4.65±0.08 ³	5.00±0.08 ^{б,д}	4.60±0.07 ³
ФК	2.40±0.15	1.33±0.08 ³	1.50±0.10 ³	2.11±0.05 ^{в,г}	1.90±0.06 ^в

Примечание: Различия статистически значимы по сравнению: с контролем: ¹ – $p < 0,05$; ² – $p < 0,01$; ³ – $p < 0,001$; с 3-й группой (отмена CCl_4): ^а – $p < 0,05$, ^б – $p < 0,01$, ^в – $p < 0,001$; с 5-й группой (эссенциале): ^г – $p < 0,05$, ^д – $p < 0,01$, ^е – $p < 0,001$. ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭ – фосфатидилэтанолламин, ЛФЭ – лизофосфатидилэтанолламин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФК – фосфатидная кислота.

Преобразование CCl_4 в высокотоксичные реактивные радикалы (трихлорметил- и трихлорметилпероксил), способные связываться с ПНЖК из мембранных фосфолипидов, приводит к липидной перекисидации клеточных мембран и образованию гетерогенного пула окисленных фосфолипидов [31]. Активация перекисного окисления жирных кислот мембранных фосфолипидов подтверждается увеличением количества МДА на 38% ($p < 0,001$) (табл. 2). В результате уменьшается количество фосфолипидных фракций. Причем снижается не только содержание ФХ и ФЭ, но также ФС на 9% ($p < 0,01$), фосфатидилинозита (ФИ) на 22% ($p < 0,001$) и ФК на 45% ($p < 0,001$), которые необходимы для функционирования мембраносвязанного фермента Na^+K^+ -АТФазы [32]. Компенсаторной реакцией на повышение проницаемости мембран является увеличение количества сфингомиелина (СМ) на 25% ($p < 0,01$), который, в свою очередь, менее подвержен перекисидации из-за высокого содержания в нем насыщенных жирных кислот.

Таким образом, CCl_4 вызывает разбалансировку фосфолипидного состава эритроцитарных мембран, что сопровождается нарушением их проницаемости, размерных характеристик эритроцитов и, как следствие, функциональных свойств. Необходимо отметить о снижении под действием CCl_4 уровня восстановленного глутатиона (Г-SH) в клетках красной крови почти на 20% ($p < 0,05$) (табл. 2). Для эритроцитов весьма

важным является постоянный уровень Г-SH, который разрушает пероксид водорода в эритроцитах, поддерживая антиоксидантный статус. Накопление пероксида водорода в дальнейшем может сократить время жизни эритроцитов (путем повышения скорости окисления гемоглобина в метгемоглобин).

Через 7 дней после отмены CCl_4 (период депривации) в эритроцитах крыс 3-й группы отклонения от контроля отмечались по многим биохимическим показателям. Так, величины СДЭ и СОЭр остались на уровне таковых величин во 2-й группе (введение CCl_4), и достоверно превышали контрольные значения на 33% ($P < 0.001$) и в 2.3 раза ($P < 0.001$) соответственно. Также на уровне показателей 2-й группы оставалась осмотическая резистентность эритроцитов, при которой начало гемолиза происходило при $0.60 \pm 0.02\%$ NaCl, а завершение при $0.50 \pm 0.02\%$ NaCl, то есть процесс более быстрого гемолиза эритроцитов сохранился.

Количество ОФЛ по сравнению с контролем оставалось достоверно низким (снижение на 18%; $p < 0.001$). В то же время количество ХС было выше контрольных значений на 22% ($p < 0.001$), в связи с этим коэффициент ХС/ОФЛ оставался достоверно высоким и превышал контрольный показатель на 46% ($p < 0.001$).

Анализ фракционного состава ФЛ эритроцитов в период отмены CCl_4 (3-я группа) показал, что содержание ЛФЭ и ЛФХ оставалось достоверно выше контрольных величин на 11% ($p < 0.01$) и 28% ($p < 0.001$) соответственно, что свидетельствует о дальнейшей активизации фосфолипаз. Количество основных структурных компонентов мембран – ФХ и ФЭ не изменилось по сравнению со 2-й группой (CCl_4) и оставалось ниже контрольного уровня. Также достоверно повышенным относительно контроля было содержание СМ (на 22%) и пониженным ФИ (на 18%) и ФК (на 37%). Содержание МДА в период отмены токсиканта оставалось выше контрольных значений на 17% ($p < 0.01$), что указывает на сохранение повышенного уровня ПОЛ. Уровень Г-SH в период депривации также не соответствовал контрольным показателям. Таким образом, полученные данные по изучению физиолого-метаболических характеристик эритроцитов в период депривации указывают на продолжающиеся нарушения даже в отсутствии токсического агента.

При введении животным липидной фракции из *U. lactuca* (в дозе 80 мг общих липидов на кг массы) в период отмены CCl_4 (4-я группа) отмечалась нормализация исследуемых биохимических показателей. В то же время при сравнении этих величин с таковыми в 3-й группе (отмена без препарата) выявлены достоверные отличия по всем параметрам. Так, отмечалось снижение СДЭ на 24% ($p < 0.001$) и СОЭр на 56% ($p < 0.001$). Расширились границы устойчивости эритроцитов к гемолизирующему агенту: начало гемолиза происходило при $0.45 \pm 0.01\%$ NaCl, а завершение при $0.35 \pm 0.01\%$ NaCl. Возросло количество ОФЛ на 21% ($p < 0.001$), при этом содержание ХС достоверно снизилось на 15% ($p < 0.001$), что обусловило снижение коэффициента ХС/ОФЛ на 29% ($p < 0.001$). Содержание МДА и Г-SH в крови животных 4-й группы приближалось к контрольным показателям.

Анализ фосфолипидного спектра мембран эритроцитов у крыс 4-й группы показал их сопоставимость с контрольными показателями. До контрольных значений снизилось количество ЛФХ и ЛФЭ при одновременном увеличении ФХ и ФЭ. При сравнении этих показателей с величинами в 3-й группе (отмена CCl_4) выявлено снижение содержания ЛФХ на 15% ($p < 0.001$), ЛФЭ на 12% ($p < 0.01$), повышение уровня ФХ и ФЭ в среднем на 6% ($p < 0.05$) и ФК на 40% ($p < 0.001$), что подразумевает снижение активности фосфолипаз. Обращает на себя внимание значительное повышение уровня ФК, что может считаться одним из механизмов репаративного действия липидной фракции водорослевого экстракта, так как этот фосфолипид является основой для синтеза всех фосфолипидов.

В 5-й группе сравнения (эссенциале) изменения изученных биохимических показателей носили аналогичную направленность, что и у животных 4-й группы (ульва), однако некоторые показатели имели достоверные отличия от контроля. Так, повышенными относительно контроля оставались СДЭ (на 12%, $p < 0.001$) и СОЭр (на 40%, $p < 0.001$). При этом осмотическая резистентность эритроцитов также была несколько ниже (гемолиз начинался при $0.49 \pm 0.01\%$ NaCl и завершался при $0.38 \pm 0.01\%$ NaCl), чем в контроле. Количество ХС оставалось выше контрольного уровня на 18% ($p < 0.001$), а общих фосфолипидов ниже на 8% ($p < 0.05$). В результате отношение ХС/ОФЛ было достоверно выше контрольных показателей (на 28%; $p < 0.01$), что указывает на сохранение повышенной жесткости липидного бислоя эритроцитарных мембран. Уровень МДА при введении эссенциале был на 7% ($p < 0.05$) выше контроля, в то время как содержание Г-SH находилось в пределах контрольных значений. В содержании фосфолипидных фракций наблюдались

достоверные отклонения по некоторым показателям. Так, содержание ЛФХ превышало контрольные значения на 10% ($p < 0.05$), а уровень ФИ и ФК был ниже контрольных величин соответственно на 19% ($p < 0.001$) и 21% ($p < 0.01$).

При сравнении выраженности защитного действия препарата сравнения «Эссенциале» и липидного комплекса из зеленой водоросли *U. lactuca* в условиях повреждающего воздействия CCl_4 можно заключить, что водорослевый комплекс не уступал гепатопротекторному препарату в восстановлении физиологических показателей эритроцитов и липидной составляющей их мембран. Большинство исследуемых показателей красной крови у животных (СДЭ, СОЭр, ХС, ОФЛ, ФЛ, МДА), получавших липидный комплекс из *U. lactuca*, были наиболее близки к контрольным значениям в отличие от соответствующих показателей у животных, получавших препарат «Эссенциале».

В основе мембранопротекторного действия липидной фракции из экстракта *U. lactuca* лежит способность фосфолипидов и ПНЖК, входящих в ее состав, при поступлении в организм встраиваться в поврежденные под действием CCl_4 мембраны эритроцитов и нормализовать их функциональную активность. Благодаря этому происходит восстановление фосфолипидного состава мембран эритроцитов, нормализуется отношение ХС/ОФЛ, что и обуславливает восстановление размерных характеристик эритроцитов (СДЭ и СОЭр), расширение порога устойчивости эритроцитов к гемолизирующему агенту.

Выводы

1. Количество общих липидов, выделенных из экстракта зеленой водоросли *U. Lactuca*, составляло 28.05 ± 0.18 мг/г сухой ткани. В их содержании преобладали гликолипиды (40.6%) и нейтральные липиды (34%), на долю фосфолипидов приходилось 13.4% от общей суммы липидов. Среди основных идентифицированных жирных кислот преобладали ПНЖК, их количество составляло 50% от общей суммы жирных кислот.

2. Липидный комплекс из зеленой водоросли *U. lactuca* проявлял мембранопротекторные свойства при внутрижелудочном введении крысам с экспериментальным CCl_4 -гепатитом. Выраженный защитный эффект на физиологические характеристики эритроцитов крыс и фосфолипидный состав эритроцитарных мембран при интоксикации CCl_4 обусловлен действием, главным образом, содержащихся в нем фосфолипидов «морского» происхождения и ПНЖК семейства n-3 и n-6.

3. Липидный комплекс из зеленой водоросли *U. lactuca* не уступал гепатопротекторному препарату сравнения «Эссенциале» в восстановлении физиологических показателей эритроцитов и липидной составляющей их мембран в условиях повреждающего воздействия CCl_4 .

4. Сочетание высокой биологической активности и низкой токсичности водорослевого экстракта позволяет говорить о перспективе создания и использования новых эффективных лекарственных средств из зеленой морской водоросли *U. lactuca* при токсических повреждениях печени.

Список литературы

1. Фукоиданы – сульфатированные полисахариды бурых водорослей. Структура, ферментативная трансформация и биологические свойства / под ред. Н.Н. Беседновой, Т.Н. Звягинцевой. Владивосток: Дальнаука, 2014. 380 с.
2. Kumar C.S., Ganesan P., Suresh P.V., Bhaskar N. Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds – A review // J. Food Sci. Technol. 2008. Vol. 45. Pp. 1–13.
3. Mayer A.M.S., Haman M.T. Marine pharmacology in 2001–2002: marine compounds with antihelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, anti-tuberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action // Comp. Biochem. Physiol. 2005. Vol. 140. Pp. 265–286. DOI: 10.1016/j.cca.2005.04.004.
4. Виноградова К.Л. Определитель водорослей дальневосточных морей СССР. Зеленые водоросли. Л., 1979. 147 с.
5. Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е., Сизова Л.А. Морские водоросли – перспективный источник полифенольных антиоксидантов и комплексов эссенциальных фосфолипидов // Известия Самарского научного центра РАН. 2012. Т. 14. №1(7). С. 2299–2302.
6. Fomenko S.E., Kushnerova N.F., Sprygin V.G., Momot T.V. The Antioxidant and Stress-Protective Properties of an Extract from the Green Alga *Ulva lactuca* Linnaeus, 1753 // Russian Journal of Marine Biology. 2016. Vol. 42. N6. Pp. 509–514. DOI: 10.1134/S1063074016060031
7. Спрыгин В.Г., Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф. Защитное действие липидной фракции из морской зеленой водоросли *Ulva fenestrata* при поражении печени крыс четыреххлористым углеродом // Фундаментальные исследования. 2014. №8 (1). С. 110–114.
8. Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions // Chem. Phys. Lipids. 2009. Vol. 157. Pp. 1–11. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2008.09.004.

9. Kholari F.S., Dehpour A.R., Nourbakhsh M. et al. Erythrocytes Membrane Alterations Reflecting Liver Damage in CCl₄ – Induced Cirrhotic Rats: The Ameliorative Effect of Naltrexone // *Acta Medica Iranica*. 2016. Vol. 54. N10. Pp. 631–639.
10. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959. N37. Pp. 911–917. DOI: 10.1139/o59-099.
11. Vaskovsky V.E., Khotimchenko S.V. HPTLC of Polar Lipids of Algae and Other Plants // *J. Chromatography*. 1982. Vol. 5. Pp. 635–636. DOI: 10.1002/jhrc.1240051113
12. Vascovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. Universal Reagent for Phospholipid Analysis // *J. Chromatography*. 1975. Vol. 114. Pp. 129–141. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)85249-8.
13. Van Gent C.M., Roseleur O.J., Van der Bijl P. Detection of Cerebrosides on Thin-Layer Chromatograms with an Anthrone Spray Reagent // *J. Chromatography*. 1973. Vol. 85. Pp. 174–176. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)91884-9.
14. Rouser G., Kritchevsky G., Yamamoto A. Column chromatographic and associated procedures // *Lipid chromatographic analysis*. New York: Dekker, 1967. Vol. 1. Pp. 99–162.
15. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 322 с.
16. Svetachev V.I., Vaskovsky V.E. A simplified technique for thin-layer microchromatography of lipids // *J. Chromatography*. 1972. Vol. 6. Pp. 376–378. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)91245-2.
17. Amenta J.S. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography // *J. Lipid Res*. 1964. Vol. 5. Pp. 270–272.
18. Carreau J.P., Dubaco J.P. Adaptation of Macro-Scale Method to the Micro-Scale for Fatty Acid Methyl Transesterification of Biological Lipid Extracts // *J. Chromatogr.* 1978. Vol. 151. Pp. 384–390. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)88356-9.
19. Christie W.W. Equivalent Chain-Lengths of Methyl Ester Derivatives of Fatty Acids on Gas Chromatography: A Reappraisal // *J. Chromatogr.* 1988. Vol. 447. Pp. 305–314. DOI: 10.1016/0021-9673(88)90040-4.
20. Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. Доклиническое изучение гепатозащитных средств // *Ведомости фарм. комитета*. 1992. №2. С. 9–12.
21. Саратиков А.С., Ратькин А.В., Фролов В.Н., Чучалин В.С. Влияние гепатопротекторов фосфолипидной природы на токсичность циклофосфана // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2004. №2. С. 43–47.
22. Эндрю Б.Л. Экспериментальная физиология. М., 1972. 324 с.
23. Folch J., Less M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue // *Biol. Chem.* 1957. Vol. 226. Pp. 497–509.
24. Новгородцева Т.П., Эндакова Э.А., Янькова В.И. Руководство по методам исследования параметров системы «Перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» в биологических жидкостях. Владивосток, 2003. 80 с.
25. Goncharova S.N., Kostetsky E.Y., Sanina N.M. The effect of seasonal shifts in temperature on the lipid composition of marine macrophytes // *Russ. J. Plant Physiol.* 2004. Vol. 51. N2. Pp. 169–175. DOI: 10.1023/B:RUPP.0000019209.10747.9d.
26. Dembitsky V.M., Rozetsvet O.A. Diacylglyceryltrimethylhomoserines and Phospholipids of Some Green Marine Macrophytes // *Phytochemistry*. 1989. Vol. 28. Pp. 3341–3343. DOI: 10.1016/0031-9422(89)80343-7.
27. Khotimchenko S.V. Lipids of marine Macrophytic Algae and Grasses: Structure, Distribution, Analysis. Vladivostok: Dalnauka, 2003.
28. Sanina N.M., Goncharova S.N., Kostetsky E.Y. Seasonal changes of fatty acid composition and thermotropic behavior of polar lipids from marine macrophytes // *Phytochemistry*. 2008. Vol. 69. Pp. 1517–1527. DOI: 10.1016/j.phytochem.2008.01.014.
29. Fadeel B., Xue D. The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane roles in health and disease // *Critical Reviews In Biochemistry & Molecular Biology*. 2009. Vol. 44. Pp. 264–277. DOI: 10.1080/10409230903193307.
30. Boll M., Lutz W.D., Becker E., Stampfl A. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites // *Z. Naturforsch.* 2001. Vol. 56. N7–8. Pp. 649–659. DOI: 10.1515/znc-2001-7-826.
31. Manibusan M.K., Odin M., Eastmond D.A. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review // *J. Environ. Sci. Health. C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 2007. Vol. 25. N3. Pp. 185–209. DOI: 10.1080/10590500701569398.
32. Akyuz F., Aydin O., Demir T.A. et al. The effects of CCl₄ on Na⁺/K⁺-ATPase and trace elements in rats // *Biol. Trace Elem. Res.* 2009. Vol. 132. N1–3. Pp. 207–214. DOI: 10.1007/s12011-009-8395-9.

Поступила в редакцию 29 января 2019 г.

После переработки 7 февраля 2019 г.

Принята к публикации 12 февраля 2019 г.

Для цитирования: Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Другова Е.С., Лесникова Л.Н., Мерзляков В.Ю. Липидный состав и мембранопротекторное действие экстракта из морской зеленой водоросли *Ulva Lacustica* (L.) // *Химия растительного сырья*. 2019. №3. С. 41–51. DOI: 10.14258/jcrpm.2019035116.

Fomenko S.E.*, Kushnerova N.F., Sprygin V.G., Drugova E.S., Lesnikova L.N., Merzluakov V.Yu. LIPID COMPOSITION AND MEMBRANOPROTECTIVE ACTION OF EXTRACT FROM MARINE GREEN ALGAE *ULVA LACTUCA* (L.)

V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Baltiiskaya, 43, Vladivostok, 690041 (Russia), e-mail: sfomenko@poi.dvo.ru

The object of the present study was a water-alcohol extract obtained from the dried thallus of the marine green alga *Ulva lactuca* (L.) (syn.: *Ulva fenestrata* P. et R.) – ulva lettuce. Glycolipids (40.6%) and neutral lipids (34%) prevailed in the lipid fraction of the extract; phospholipids contained 13.4% of the total lipids. The content of polyunsaturated fatty acids (PUFA) was 50% of the total amount of fatty acids, among which PUFA of the n-3 family predominated (37.43%). On the model of toxic hepatitis induced by the introduction of carbon tetrachloride (CCl₄) (50% solution in olive oil, subcutaneously 2 ml/kg for 4 days), we study the effect of the lipid fraction of *U. lactuca* extract and the commercial reference preparation Essentiale® on the physiological and biochemical characteristics of erythrocytes and lipid composition of erythrocyte membranes in rats. The introduction of the lipid fraction from the ulva (dose 80 mg of total lipids per kg of body weight) to the animals intragastrically for 7 days after withdrawal of CCl₄ exerted a protective effect, which was manifested in the restoration of the erythrocyte size characteristics (average volume and diameter), their osmotic resistance to hemolysis, levels of malondialdehyde and reduced glutathione, as well as maintaining of the ratio of phospholipid fractions. Under the damaging effects of CCl₄, the lipid fraction from the green alga *U. lactuca* was not inferior to the effectiveness of reference preparation Essentiale® in restoring of the physiological characteristics of erythrocytes and the phospholipid composition of its membranes.

Keywords: lipid fraction from *Ulva lactuca*, essential, carbon tetrachloride, erythrocytes, lipids, rats.

References

1. *Fukoidany – sul'fatirovannyye polisakharidy burykh vodorosley. Struktura, fermentativnaya transformatsiya i biologicheskiye svoystva* [Fucoidans – sulfated polysaccharides of brown algae. Structure, enzymatic transformation and biological properties], ed. N.N. Besednovoy, T.N. Zvyagintsevoy. Vladivostok, 2014, 380 p. (in Russ.).
2. Kumar C.S., Ganesan P., Suresh P.V., Bhaskar N. *J. Food Sci. Technol.*, 2008, vol. 45, pp. 1–13.
3. Mayer A.M.S., Haman M.T. *Comp. Biochem. Physiol.*, 2005, vol. 140, pp. 265–286, DOI: 10.1016/j.cca.2005.04.004.
4. Vinogradova K.L. *Opredelitel' vodorosley dal'nevostochnykh morey SSSR. Zelenyye vodorosli*. [Key to algae of the Far Eastern seas of the USSR. Green algae]. Leningrad, 1979, 147 p. (in Russ.).
5. Sprygin V.G., Kushnerova N.F., Fomenko S.Ye., Sizova L.A. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN*, 2012, vol. 14, no. 1(7), pp. 2299–2302. (in Russ.).
6. Fomenko S.E., Kushnerova N.F., Sprygin V.G., Momot T.V. *Russian Journal of Marine Biology*, 2016, vol. 42, no. 6, pp. 509–514, DOI: 10.1134/S1063074016060031.
7. Sprygin V.G., Fomenko S.Ye., Kushnerova N.F. *Fundamental'nyye issledovaniya*, 2014, no. 8(1), pp. 110–114. (in Russ.).
8. Catala A. *Chem. Phys. Lipids.*, 2009, vol. 157, pp. 1–11, DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2008.09.004.
9. Kholari F.S., Dehpour A.R., Nourbakhsh M. et al. *Acta Medica Iranica*, 2016, vol. 54, no. 10, pp. 631–639.
10. Bligh E.G., Dyer W.J. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, no. 37, pp. 911–917, DOI: 10.1139/c59-099.
11. Vaskovsky V.E., Khotimchenko S.V. *J. Chromatography*, 1982, vol. 5, pp. 635–636, DOI: 10.1002/jhrc.1240051113.
12. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. *J. Chromatography*, 1975, vol. 114, pp. 129–141, DOI: 10.1016/S0021-9673(00)85249-8.
13. Van Gent C.M., Roseleur O.J., Van der Bijl P. *J. Chromatography*, 1973, vol. 85, pp. 174–176, DOI: 10.1016/S0021-9673(01)91884-9.
14. Rouser G., Kritchevsky G., Yamamoto A. *Lipid chromatographic analysis*, New York: Dekker, 1967, vol. 1, pp. 99–162.
15. Keyts M. *Tekhnika lipidologii*. [Technique of lipidology]. Moscow, 1975, 322 p. (in Russ.).
16. Svetachev V.I., Vaskovsky V.E. *J. Chromatography*, 1972, vol. 6, pp. 376–378, DOI: 10.1016/S0021-9673(01)91245-2.
17. Amenta J.S. *J. Lipid Res.*, 1964, vol. 5, pp. 270–272.
18. Carreau J.P., Dubaco J.P. *J. Chromatogr.*, 1978, vol. 151, pp. 384–390, DOI: 10.1016/S0021-9673(00)88356-9.
19. Christie W.W. *J. Chromatogr.*, 1988, vol. 447, pp. 305–314, DOI: 10.1016/0021-9673(88)90040-4.
20. Vengerovskiy A.I., Markova I.V., Saratikov A.S. *Vedomosti farm. komiteta*, 1992, no. 2, pp. 9–12. (in Russ.).
21. Saratikov A.S., Rat'kin A.V., Frolov V.N., Chuchalin V.S. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*, 2004, no. 2, pp. 43–47. (in Russ.).
22. Endryu B.L. *Eksperimental'naya fiziologiya*. [Experimental physiology]. Moscow, 1972, 324 p. (in Russ.).
23. Folch J., Less M., Sloane-Stanley G.H. *Biol. Chem.*, 1957, vol. 226, pp. 497–509.
24. Novgorodtseva T.P., Endakova E.A., Yan'kova V.I. *Rukovodstvo po metodam issledovaniya parametrov sistemy "Perekisnoye okisleniye lipidov – antioksidantnaya zashchita" v biologicheskikh zhidkostyakh*. [Guide to methods for studying the parameters of the system "Lipid peroxidation – antioxidant protection" in biological fluids]. Vladivostok, 2003, 80 p. (in Russ.).
25. Goncharova S.N., Kostetsky E.Y., Sanina N.M. *Russ. J. Plant Physiol.*, 2004, vol. 51, no. 2, pp. 169–175, DOI: 10.1023/B:RUPP.0000019209.10747.9d.
26. Dembitsky V.M., Rozetsvet O.A. *Phytochemistry*, 1989, vol. 28, pp. 3341–3343, DOI: 10.1016/0031-9422(89)80343-7.
27. Khotimchenko S.V. *Lipids of marine Macrophytic Algae and Grasses: Structure, Distribution, Analysis*, Vladivostok: Dalnauka, 2003.

* Corresponding author.

28. Sanina N.M., Goncharova S.N., Kostetsky E.Y. *Phytochemistry*, 2008, vol. 69, pp. 1517–1527, DOI: 10.1016/j.phytochem.2008.01.014.
29. Fadeel B., Xue D. *Critical Reviews In Biochemistry & Molecular Biology*, 2009, vol. 44, pp. 264–277, DOI: 10.1080/10409230903193307.
30. Boll M., Lutz W.D., Becker E., Stampfl A. *Z. Naturforsch.*, 2001, vol. 56, no. 7–8, pp. 649–659, DOI: 10.1515/znc-2001-7-826.
31. Manibusan M.K., Odin M., Eastmond D.A. *J. Environ. Sci. Health. C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.*, 2007, vol. 25, no. 3, pp. 185–209, DOI: 10.1080/10590500701569398.
32. Akyuz F., Aydin O., Demir T.A. et al. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2009, vol. 132, no. 1–3, pp. 207–214, DOI: 10.1007/s12011-009-8395-9.

Received January 29, 2019

Revised February 7, 2019

Accepted February 12, 2019

For citing: Fomenko S.E., Kushnerova N.F., Sprygin V.G., Drugova E.S., Lesnikova L.N., Merzluakov V.Yu. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2019, no. 3, pp. 41–51. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2019035116.

