

УДК [582.26/.27:57.013]:542.943'78

**ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ
ЭКСТРАКТОВ ИЗ МОРСКИХ ВОДОРΟΣЛЕЙ ЯПОНСКОГО МОРЯ
IN VITRO И IN VIVO**

© 2023 г. **С. Е. Фоменко, Н. Ф. Кушнерова, В. Г. Спрыгин, Е. С. Другова,
Л. Н. Лесникова, В. Ю. Мерзляков**

Тихоокеанский океанологический институт имени В. И. Ильичёва ДВО РАН,

Владивосток, Российская Федерация

E-mail: sfomenko@poi.dvo.ru

Поступила в редакцию 12.01.2022; после доработки 25.05.2022;
принята к публикации 16.02.2023; опубликована онлайн 31.05.2023.

Морские водоросли являются источником важных биологически активных соединений — липидов, аминокислот, фенолов, полисахаридов и др. Перспективную группу веществ морского происхождения составляют полифенольные соединения, обладающие высокой антиоксидантной активностью, которые играют ключевую роль в жизнедеятельности морских макрофитов, что позволяет им быстро реагировать на внешний стресс и выполнять защитные функции. В то же время многокомпонентный состав фенольной фракции экстракта из водорослей обуславливает широкий спектр её фармакологической активности, включающей регулирующее влияние на многочисленные нарушения гомеостаза при патологических процессах в организме животных и человека. При этом имеющиеся возможности практического использования экстрактов из водорослей ещё не исчерпаны, что представляет несомненный интерес для современной науки. Цель работы — выполнить сравнительную оценку антиоксидантной активности водно-спиртовых экстрактов, выделенных из талломов представителей трёх классов водорослей [бурых (*Sargassum pallidum*), зелёных (*Ulva lactuca*) и красных (*Ahnfeltia fastigiata* var. *tobuchiensis*)], а также проанализировать их влияние на показатели антиоксидантной защиты печени и плазмы крови мышей при экспериментальном стрессе. Водоросли собирали в летние месяцы в прибрежных водах залива Петра Великого Японского моря, затем сушили при температуре около +50 °С, измельчали на лабораторной мельнице до частиц размером 0,5–1 мм и экстрагировали 70%-ным этиловым спиртом методом реперколяции. Наибольшее количество полифенолов отмечено в экстракте бурой водоросли *S. pallidum* — (218,2 ± 20,3) мг-экв ГК·г⁻¹ сухого веса. В экстракте зелёной водоросли *U. lactuca* значение этого показателя составляло (16,2 ± 1,8) мг-экв ГК·г⁻¹ сухого веса, в экстракте красной водоросли *A. fastigiata* var. *tobuchiensis* — (9,1 ± 1,6) мг-экв ГК·г⁻¹ сухого веса. Соответственно, антирадикальная активность экстракта *S. pallidum* по отношению к катион-радикалу 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS⁺) и алкилпероксильному радикалу была существенно выше, чем таковая экстрактов *U. lactuca* и *A. fastigiata* var. *tobuchiensis*. Проведена экспериментальная проверка с целью определить влияние исследуемых экстрактов водорослей на показатели антиоксидантной защиты печени и плазмы мышей в условиях острого стресса. В задачи эксперимента входило установление весовых показателей (вес животных, индекс массы внутренних органов) и биохимических параметров (уровень антирадикальной активности, содержание малонового диальдегида и восстановленного глутатиона, активность антиоксидантных ферментов). Эксперимент по стрессовому воздействию проводили на белых беспородных мышцах-самцах массой 20–30 г. Острый стресс моделировали путём вертикальной фиксации животных за дорсальную шейную складку на 24 ч. Освобождённые от спирта экстракты водорослей вводили в виде водной взвеси в дозе

100 мг общих полифенолов на кг массы тела в желудок мышам через зонд дважды — непосредственно перед вертикальной фиксацией и спустя 6 ч. Животным контрольной группы и группы «стресс» вводили дистиллированную воду в объёме, равном объёму вводимых препаратов. В данной модели проявились все атрибуты стресса: гипертрофия надпочечников, инволюция тимуса и селезёнки, изъязвления слизистой желудка и кишечника. Также были отмечены нарушения системы антиоксидантной защиты, которые выражались в снижении активности антиоксидантных ферментов в плазме крови, уменьшении содержания восстановленного глутатиона в печени и увеличении уровня малонового диальдегида. Под действием экстрактов во всех группах животных на фоне стресса прослежена тенденция к стабилизации исследуемых показателей антиоксидантной защиты. При этом показатели у мышей, получавших экстракты из *U. lactuca* и *A. fastigiata* var. *tobuchiensis*, уступали аналогичным параметрам в группе животных, получавших экстракт *S. pallidum*. В группе животных, получавших экстракт *S. pallidum*, в показателях антиоксидантной защиты не было выявлено достоверных отличий от контрольных значений. Данный факт обусловлен тем, что основными компонентами полифенольных фракций зелёных и красных водорослей являются мономерные флавоноиды, тогда как в бурых водорослях присутствуют высокомолекулярные флоротаннины, которые проявляют более высокую антиоксидантную активность, чем низкомолекулярные полифенольные фракции зелёных и красных водорослей.

Ключевые слова: морские водоросли, полифенолы, антиоксидантная активность, стресс, мыши

Важным компонентом морских экосистем и основным звеном в пищевых цепях многих видов морских организмов являются водоросли, служащие источником органического вещества и энергии. Благодаря своему разнообразному составу морские водоросли нашли применение как сырьё для получения целого ряда веществ, обладающих полезными свойствами. Так, в состав водорослей входят легкоусвояемые белки, аминокислоты, липиды, полисахариды, каротиноиды, минеральные вещества, полифенольные соединения и др. [Michalak, Chojnacka, 2015].

Важной группой веществ среди вторичных метаболитов, которые входят в состав морских водорослей, являются полифенольные соединения, обладающие выраженными антиоксидантными свойствами. Эти соединения продуцируются морскими водорослями и морскими травами для выполнения защитных, структурных и репродуктивных функций [Pradhan et al., 2021]. Полифенолы участвуют в процессах роста и репродукции клеток водорослей, а также в формировании и раннем развитии клеточной стенки, образуя комплекс с альгиновой кислотой, структурным полисахаридом клеточной стенки водорослей [Имбс, Звягинцева, 2018]. Полифенолы способны защищать макрофиты от поражения патогенными бактериями, выедания травоядными животными и воздействия УФ-излучения. В соответствии с международной классификацией, полифенольные соединения включают различные подклассы: фенольные кислоты, флавоноиды, лигнаны, стильбены и др. [Zhong et al., 2020]. В составе бурых водорослей и некоторых видов красных водорослей обнаружена особая группа фенольных соединений — флоротаннины, которые представляют собой олигомеры флороглюцина (1,3,5-тригидроксибензола) [Ragan, Glombitza, 1986]. Флоротаннины являются основными цитоплазматическими компонентами водорослей и содержатся в особых органеллах — физодах [Ragan, Glombitza, 1986]. В отличие от других полифенольных соединений, флоротаннины характеризуются тем, что около 90 % от их общего количества находится в свободном состоянии [Боголицын и др., 2018]. Эти соединения аккумулируются преимущественно в наружных слоях эпидермиса и в кортикальном слое таллома [Shibata et al., 2004], что позволяет им быстро реагировать на внешний стресс и выполнять защитные функции.

Повышенный интерес к морским водорослям обусловлен содержанием в них биоактивных компонентов, которые могут найти применение в качестве фармацевтических средств, нутрицевтиков, добавок в пищевые продукты. Известно, что полученные из водорослей препараты проявляют широкий спектр фармакологических свойств: антибактериальные, противоопухолевые, противовирусные, антимикробные, гепатопротекторные и др. [Cotas et al., 2020; Manach et al., 2004].

Положительное влияние морских водорослей на здоровье человека и животных во многом связано со способностью входящих в их состав полифенольных соединений улавливать свободные радикалы, что может содействовать снижению оксидативного стресса [Zhong et al., 2020]. Механизм активного связывания свободных радикалов, которые участвуют в развитии ряда патологических процессов в организме, основан на наличии разветвлённой структуры сопряжённых двойных связей высокой подвижности и большого количества свободных гидроксильных групп в полифенолах макрофитов.

В предыдущих исследованиях нами было установлено, что экстракты, выделенные из ряда морских макрофитов, которые относятся к разным классам [бурые — *Sargassum pallidum* (Turner) C. Agardh, 1820; зелёные — *Ulva lactuca* Linnaeus, 1753; красные — *Ahnfeltia fastigiata* var. *tobuchiensis* (Kanno & Matsubara) Skriptsova & Zhigadlova, 2022], характеризовались наличием выраженного защитного эффекта в условиях различных экспериментальных моделей. В частности, экстракт из бурой водоросли *S. pallidum*, обогащённый полифенольными соединениями, оказывал гепатопротекторное действие при моделировании гепатоза у крыс [Спрыгин и др., 2017]. Липидная фракция экстракта из зелёной водоросли *U. lactuca* проявляла профилактическое действие при остром стрессе, что выражалось в сохранении углеводно-липидного обмена печени и снижении уровня перекисного окисления липидов [Фоменко и др., 2019]. Фармакологический эффект экстракта из красной водоросли *A. fastigiata* var. *tobuchiensis* выражался в способности восстанавливать липидный состав крови и соотношение фосфолипидных фракций в мембранах эритроцитов [Кушнерова и др., 2020]. В качестве продолжения проведённых исследований представляются актуальными получение новых знаний о биологической активности изученных водорослевых экстрактов и выяснение перспектив их использования как антиоксидантных средств.

Цель работы — сравнить антиоксидантную активность водно-спиртовых экстрактов, выделенных из талломов бурой водоросли *Sargassum pallidum*, зелёной *Ulva lactuca* и красной *Ahnfeltia fastigiata* var. *tobuchiensis*, и определить их влияние на показатели антиоксидантной защиты печени и плазмы крови мышей при экспериментальном стрессе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования стали морские водоросли:

- *Ulva lactuca* [= *Ulva fenestrata*] — ульва латук (салатная), отдел Chlorophyta, класс Ulvophyceae, порядок Ulvales, семейство Ulvaceae;
- *Sargassum pallidum* — саргассум бледный, отдел Phaeophyta, класс Cyclosporphyceae, порядок Fucales, семейство Sargassaceae;
- *Ahnfeltia fastigiata* var. *tobuchiensis* [= *Ahnfeltia tobuchiensis*] — анфельция тобучинская равновершинная, отдел Rhodophyta, класс Florideophyceae, порядок Ahnfeltiales, семейство Ahnfeltiaceae [Skriptsova, Zhigadlova, 2022].

Выбранные водоросли наиболее широко распространены в морях Дальнего Востока и являются основными, массовыми видами.

Водоросли собирали в августе — сентябре 2021 г. в прибрежных водах залива Петра Великого (Японское море). Выборка — по 20 талломов каждого вида. Слоевища очищали от эпифитов и зообентоса, промывали сначала морской, затем дистиллированной водой, далее высушивали. Таллом в суховоздушном состоянии измельчали с помощью лабораторной мельницы до частиц размером 0,5–1 мм и экстрагировали 70%-ным этиловым спиртом методом реперколяции. Выход экстракта составлял 1 л на 1 кг сухого сырья. Экстрагирование этанолом — эффективный способ переработки водорослей: в процессе извлекается основная часть минеральных

и органических веществ, проявляющих биологическую активность, а этиловый спирт, благодаря своей низкой токсичности, из всех растворителей является наиболее предпочтительным для экстракции фенольных соединений [Cotas et al., 2020].

Экстракты водорослей выпаривали в вакууме до полного удаления этанола и экстрагировали хлороформом для устранения липофильных веществ и пигментов — в соответствии с методом, описанным ранее [Спрыгин и др., 2013]. Полученную водную фракцию, содержащую полифенолы, выпаривали в вакууме досуха и ресуспендировали в воде для получения исходных растворов ($10 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$), в которых предварительно определяли общее содержание полифенолов (далее — ПФ) и антирадикальную активность (далее — АРА). Все биохимические исследования проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-2550 (Япония). Общее содержание ПФ определяли с использованием реактива Фолина — Чокалтеу при длине волны 765 нм [Parys et al., 2007]. В качестве стандарта сравнения при определении общего содержания ПФ использовали галловую кислоту (ГК). Общее содержание ПФ выражали в $\text{мг}\cdot\text{экв}\text{ГК}\cdot\text{г}^{-1}$ сухого экстракта. Уровень АРА оценивали также спектрофотометрически по отношению к катион-радикалу 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS^+) ($\lambda = 734 \text{ нм}$) [Re et al., 1999] и алкилпероксильному радикалу ($\lambda = 414 \text{ нм}$) [Bartosz et al., 1998]. При определении АРА в качестве стандарта сравнения использовали тролокс — водорастворимый аналог витамина Е. АРА выражали в $\text{мкмоль тролокса}\cdot\text{мг}^{-1}$ ПФ. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Instat 3.0, а также статистической программы GraphPad Prism, включающей функцию проверки соответствия выборки закону нормального распределения. Для определения статистической значимости различий в зависимости от параметров распределения применяли параметрический *t*-критерий Стьюдента или непараметрический *U*-критерий Манна — Уитни.

Эксперимент проводили на белых беспородных мышках-самцах массой 20–30 г, содержащихся в условиях вивария в клетках по 5 особей на стандартном рационе питания, при естественном освещении и постоянной температуре воздуха $+20\dots+22 \text{ }^\circ\text{C}$.

Острый стресс моделировали путём вертикальной фиксации животных за дорсальную шейную складку на 24 ч. Эту модель стресса применяют на лабораторных животных в экспериментальных исследованиях [Кушнерова и др., 2005]. Освобождённые от спирта экстракты водорослей вводили в виде водной взвеси в дозе 100 мг общих полифенолов на кг массы тела в желудок мышам через зонд дважды — непосредственно перед вертикальной фиксацией и спустя 6 ч. Данная концентрация соответствует известной терапевтической дозе для полифенольных гепатопротекторов [Венгеровский и др., 1999]. Животным контрольной группы и группы «стресс» вводили дистиллированную воду в объёме, равном объёму вводимых препаратов.

В ходе исследования были выделены пять групп животных по 10 мышей в каждой: 1-я — контрольная (интактные); 2-я — «стресс» (вертикальная фиксация за дорсальную шейную складку); 3-я — «стресс + экстракт саргассума»; 4-я — «стресс + экстракт ульвы»; 5-я — «стресс + экстракт анфельции». Животных выводили из эксперимента декапитацией под лёгким эфирным наркозом с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [European Convention, 1986].

После воздействия острого стресса определяли вес животного, индекс массы внутренних органов ($\text{мг}\text{ массы органа на }100 \text{ г}\text{ массы тела}$) и количество изъязвлений на слизистой оболочке желудка, которые учитывали визуально путём подсчёта образовавшихся язвенных поражений. Дизайн исследования одобрен комиссией по вопросам этики Тихоокеанского океанологического института имени В. И. Ильичёва ДВО РАН.

Кровь для исследований собирали из шейной вены животных в вакуэты с 1%-ным раствором гепарина. Для отделения плазмы кровь центрифугировали 10 мин при 3000 об·мин⁻¹, затем образцы плазмы замораживали при температуре -80 °С для дальнейшего определения биохимических показателей. Печень после извлечения промывали в физиологическом растворе и также замораживали в рефрижераторе при температуре -80 °С. Состояние антиоксидантной системы оценивали в плазме крови животных спектрофотометрическим методом по величине общей АРА ($\lambda = 734$ нм) [Re et al., 1999], уровню малонового диальдегида (далее — МДА) ($\lambda = 532$ нм) [Buege, Aust, 1978], активности супероксиддисмутазы (далее — СОД) ($\lambda = 550$ нм) [Paoletti et al., 1986] и ферментов глутатионового звена — глутатионредуктазы (далее — ГР) [Goldberg, Spooner, 1983] и глутатионпероксидазы (далее — ГП) ($\lambda = 340$ нм) [Burk et al., 1980], а также по уровню восстановленного глутатиона (далее — Г-SH) в ткани печени ($\lambda = 412$ нм) [Ellman, 1959].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Перед проведением эксперимента по изучению состояния системы антиоксидантной защиты организма животных в условиях стресс-воздействия в образцах экстрактов исследуемых макрофитов определяли общее содержание ПФ и АРА. Оценка количественного состава ПФ в экстрактах показала, что их содержание существенно варьирует у разных видов макрофитов (табл. 1). Наибольшее содержание ПФ обнаружено в экстракте бурой водоросли *S. pallidum*, причём значение было в 13,5 раза выше, чем в *U. lactuca*, и в 24 раза выше, чем в *A. fastigiata* var. *tobuchiensis*.

Таблица 1. Содержание полифенолов и антирадикальная активность в экстрактах из морских водорослей ($M \pm m$)

Table 1. Polyphenol content and antiradical activity of the seaweed extracts ($M \pm m$)

Морская водоросль	Общие полифенолы, мг-экв ГК·г ⁻¹ сухого экстракта	Антирадикальная активность к АВТС ⁺ , μmol тролокса·мг ⁻¹ ПФ	Антирадикальная активность к алкилпероксильным радикалам, μmol тролокса·мг ⁻¹ ПФ
<i>Sargassum pallidum</i>	218,2 ± 20,3	1,62 ± 0,04	0,64 ± 0,02
<i>Ulva lactuca</i>	16,2 ± 1,8	0,32 ± 0,03	0,15 ± 0,02
<i>Ahmfeltia fastigiata</i> var. <i>tobuchiensis</i>	9,1 ± 1,6	0,13 ± 0,03	0,06 ± 0,01

Важным аспектом изучения антиоксидантного потенциала исследуемых препаратов из водорослей является оценка их АРА по отношению к катион-радикалу АВТС⁺ и алкилпероксильному радикалу. Уровень АРА в экстрактах макрофитов существенно различался, как и содержание ПФ. Так, экстракт *S. pallidum* характеризовался более высоким уровнем АРА по отношению к АВТС⁺: значение в 5 раз превышало соответствующие показатели у *U. lactuca* и в 12,5 раза — у *A. fastigiata* var. *tobuchiensis*. Аналогичная тенденция прослеживалась для показателей АРА по отношению к алкилпероксильному радикалу. Алкилпероксильные радикалы образуются в организме в процессе перекисидации липидов и являются одними из основных инициаторов свободнорадикальных реакций. В экстракте *S. pallidum* этот показатель в 4 раза превышал соответствующее значение для *U. lactuca*. Ещё более низкий уровень АРА по отношению к алкилпероксильному радикалу зафиксирован у *A. fastigiata* var. *tobuchiensis*: его значение было в 2,5 раза меньше такового у *U. lactuca* и в 10 раз меньше, чем у *S. pallidum*.

Следующий этап экспериментальных исследований состоял в изучении влияния экстрактов из морских водорослей на состояние системы антиоксидантной защиты животных в условиях стресс-воздействия. Вертикальная фиксация животных за дорсальную шейную складку в течение 24 ч сопровождалась проявлением всех известных атрибутов стресса, таких как гипертрофия надпочечников, инволюция тимуса и селезёнки, изъязвления слизистой желудка и кишечника. Данные изменения зафиксированы у всех животных, подвергнутых стрессовому воздействию (2–5-я группы), однако по степени выраженности между группами имелись существенные различия. Так, во 2-й группе («стресс») вес животных снизился на 23 % ($p < 0,01$) при одновременном уменьшении индекса массы внутренних органов (печень, селезёнка) в среднем на 19–23 % ($p < 0,05$) (рис. 1). Во 2-й группе под действием стресса количество зафиксированных изъязвлений слизистой желудка составило ($2,6 \pm 0,1$) шт./животное, в контроле — 0.

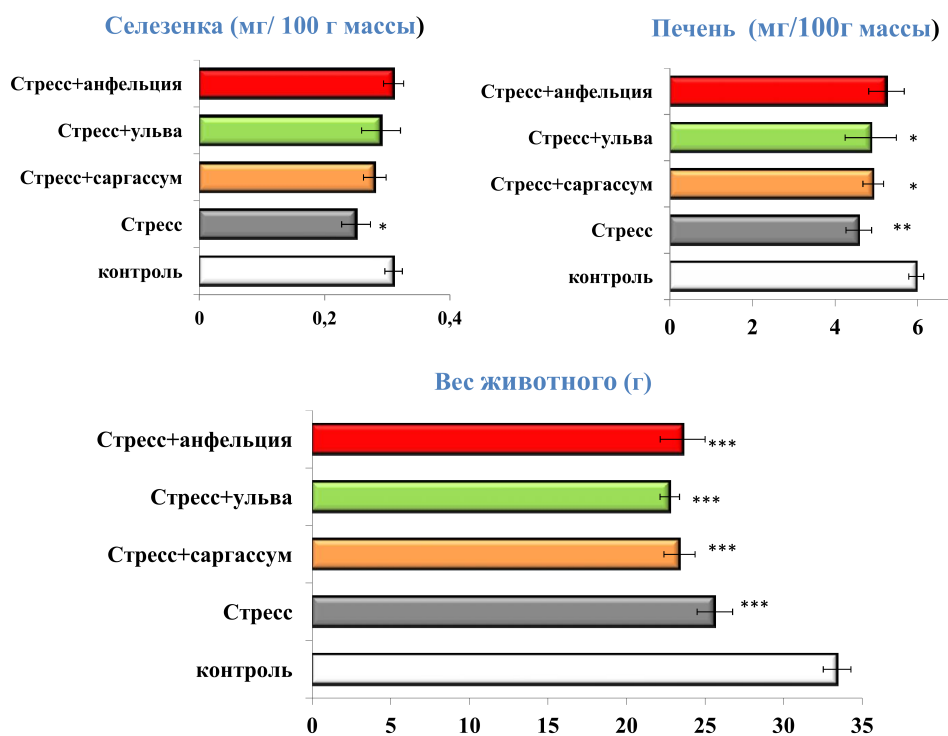


Рис. 1. Влияние экстрактов из морских водорослей на общий вес мышей и весовые коэффициенты их внутренних органов при стрессе. Различия статистически значимы по сравнению с контролем: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

Fig. 1. The effect of the seaweed extracts on the total weight of mice and weight coefficients of their internal organs under stress. Differences are statistically significant compared to the control: $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)

При оценке состояния антиоксидантной системы животных при стрессовом воздействии выявлено уменьшение величины АРА плазмы крови на 46 % ($p < 0,001$) по сравнению со значением в контроле. Одновременно отмечено снижение активности одного из ключевых ферментов антиоксидантной защитной системы, СОД, на 40 % ($p < 0,001$) (рис. 2). Уровень Г-SH в печени сократился почти в 2 раза (рис. 3), при этом активность ГР — фермента, играющего главную роль в поддержании определённой концентрации Г-SH внутри клетки, уменьшилась на 26 % ($p < 0,001$). Активность другого ключевого фермента глутатионового звена — ГП, катализирующей восстановление гидропероксида (H_2O_2) и органических перекисей при наличии восстановленного глутатиона, была снижена на 35 % ($p < 0,001$). Такие изменения в показателях системы антиоксидантной защиты можно определить как её ослабление.

Нарушения в функционировании системы антиоксидантной защиты в условиях стресса проявлялись также в увеличении содержания МДА на 68 % ($p < 0,001$) (рис. 3), что является биомаркером оксидативного стресса.

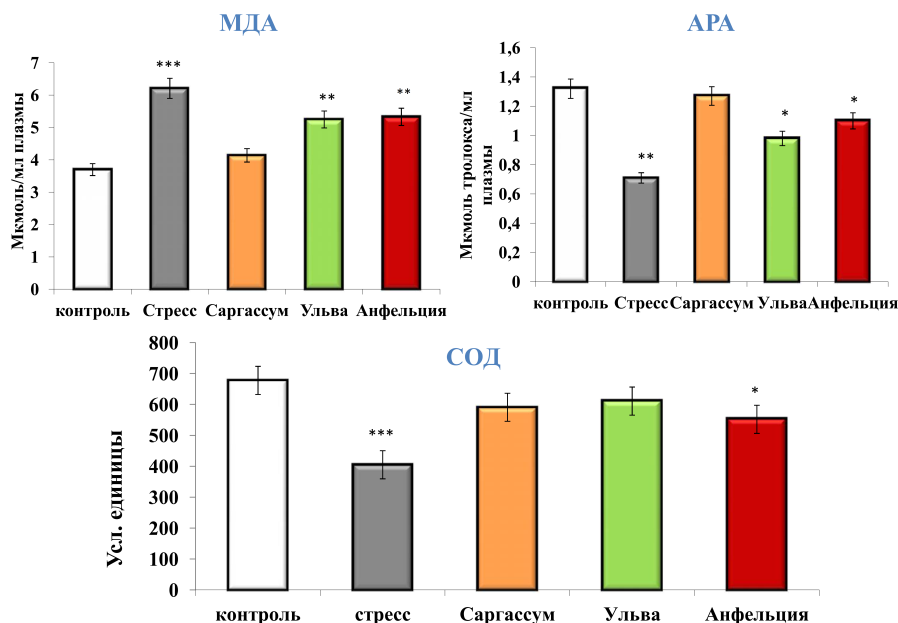


Рис. 2. Влияние экстрактов из морских водорослей на показатели системы антиоксидантной защиты мышей при стрессе. МДА — малоновый диальдегид; АРА — антирадикальная активность; СОД — супероксиддисмутаза. Различия статистически значимы по сравнению с контролем: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

Fig. 2. The effect of the seaweed extracts on the antioxidant defense indices of mice under stress. МДА, malondialdehyde; АРА, antiradical activity; СОД, superoxide dismutase. Differences are statistically significant compared to the control: $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)

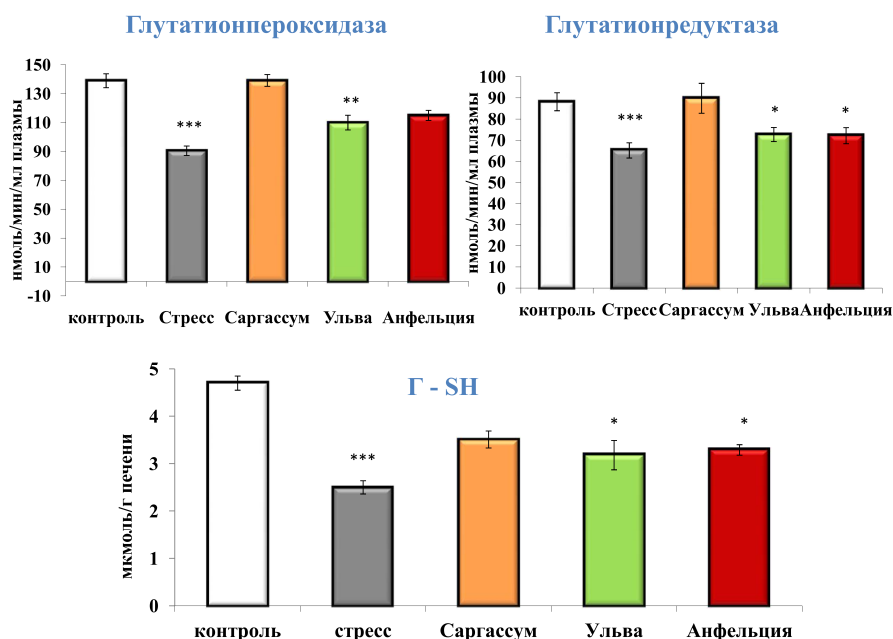


Рис. 3. Влияние экстрактов из морских водорослей на показатели глутатионовой системы у мышей при стрессе. Различия статистически значимы по сравнению с контролем: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

Fig. 3. The effect of the seaweed extracts on the glutathione system indices in mice under stress. Differences are statistically significant compared to the control: $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)

Введение на фоне острого стресса экстрактов водорослей (3–5-я группы) сопровождалось тенденцией к уменьшению выраженности инволюционных изменений внутренних органов по сравнению с их выраженностью во 2-й группе («стресс»). Так, в группах мышей, получавших экстракты *U. lactuca* и *S. pallidum*, относительная масса печени возросла в среднем на 6–8 % ($p < 0,05$), в то время как в 5-й группе под действием экстракта *A. fastigiata* var. *tobuchiensis* данный показатель был выше на 15 % ($p < 0,05$). Также у мышей, получавших экстракты водорослей, увеличилась относительная масса селезёнки — в среднем на 12–24 % ($p < 0,001$). Отмечено, что применение водорослевых экстрактов ещё не приводило к полному восстановлению относительной массы внутренних органов, но способствовало достоверному повышению значений этих показателей по сравнению с таковыми во 2-й группе (см. рис. 1). В отношении параметров массы тела мышей в 3–5-й группах данные показатели достоверно отличались от контроля; важно отметить, что у них не было зафиксировано изъязвлений слизистых оболочек желудка.

Во всех группах животных, получавших препараты из водорослей на фоне стрессового воздействия, прослеживалась тенденция к стабилизации исследуемых показателей системы антиоксидантной защиты (рис. 2, 3). Так, в 3-й группе животных (экстракт *S. pallidum*), показатели соответствовали контрольным значениям. Сравнение со 2-й группой («стресс») выявило: у этих мышей снизился уровень МДА в плазме крови на 33 % ($p < 0,001$) при одновременном повышении величины АРА в 1,8 раза ($p < 0,001$) и увеличении активности СОД на 46 % ($p < 0,001$). Также под действием экстракта *S. pallidum* отмечено повышение уровня Г-SH в ткани печени на 40 % ($p < 0,001$); при этом активность антиоксидантных ферментов (ГП и ГР) в плазме крови возросла в среднем на 38–54 % ($p < 0,001$).

Состояние антиоксидантной системы у животных 4-й и 5-й групп (мыши, получавшие экстракты из *U. lactuca* и *A. fastigiata* var. *tobuchiensis* на фоне острого стресса) тоже характеризовалось положительной динамикой, но исследуемые биохимические показатели всё ещё имели достоверные отличия от контроля. В то же время при сравнении с группой «стресс» определено, что в плазме крови мышей из 4-й и 5-й групп произошло повышение уровня АРА на 37 % ($p < 0,001$) и 54 % ($p < 0,001$) соответственно. Активность СОД у животных 4-й группы (*U. lactuca*) увеличилась на 51 % ($p < 0,001$), а у представителей 5-й группы (*A. fastigiata* var. *tobuchiensis*) — на 36 % ($p < 0,001$); при этом содержание МДА в плазме крови данных животных снизилось в среднем на 14–16 % ($p < 0,001$). В отношении уровня Г-SH в ткани печени и активности ферментов глутатионового звена также зафиксирована положительная динамика. В частности, применение экстрактов *U. lactuca* и *A. fastigiata* var. *tobuchiensis* сопровождалось повышением содержания Г-SH на 27 и 32 % соответственно ($p < 0,05$). В свою очередь, активность ГП у животных в этих группах возросла в среднем на 22–27 % ($p < 0,05$), активность ГР — на 12–20 % ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Из полученных результатов следует, что в условиях острого стресса нарушается комплексное функциональное равновесие органов и систем целостного организма. Об этом свидетельствует уменьшение относительной массы внутренних органов (печень, селезёнка). Между тем достоверное снижение индекса массы селезёнки происходит в результате инволюции лимфатической системы, что связано с усиленной секрецией корой надпочечников стероидных гормонов, вызывающих распад лимфоцитов и угнетение метаболических процессов в клетках [Chrousos, 2009]. В системе антиоксидантной защиты происходит напряжение из-за избыточного образования свободных радикалов под действием стресса [Şahin, Gümüşlü, 2007]. В результате антиоксидантная система организма не в состоянии справиться с их чрезмерной продукцией, при этом снижаются активность антиоксидантных ферментов (СОД, ГП, ГР) и величина Г-SH. Данное явление лежит

в основе нарушений многих метаболических реакций организма. Свидетельством повышенной генерации свободных радикалов является достоверное уменьшение значения АРА наряду с повышением уровня МДА в плазме крови мышей, что характеризуется высокой активностью перекисного окисления жирных кислот, входящих в состав мембранных липидов, и сопровождается повышением проницаемости клеточных мембран в различных тканях [Şahin, Gümüşlü, 2007]. Впоследствии недостаточность факторов антиоксидантной защиты приводит к неконтролируемому усилению процессов липопероксидации и к развитию оксидативного стресса.

Введение экстрактов из морских водорослей на фоне стресса сопровождалось увеличением активности антиоксидантных ферментов и содержания восстановленного глутатиона при одновременном снижении концентрации МДА. Между тем в 4-й и 5-й группах животных, как было отмечено выше, значения показателей антиоксидантной системы (МДА, Г-SH, ГП и ГР) всё ещё отличались от контрольных. При этом значения параметров антиоксидантной защиты у мышей, получавших экстракты из *U. lactuca* и *A. fastigiata* var. *tobuchiensis*, уступали аналогичным показателям в 3-й группе (*S. pallidum*). Подтверждением данному факту является расчёт статистической достоверности между величинами изученных биохимических показателей в плазме крови и ткани печени мышей 3–5-й групп. Так, показатели активности ГП и ГР плазмы крови у животных, получавших экстракты из *U. lactuca* и *A. fastigiata* var. *tobuchiensis* (4-я и 5-я группа соответственно), были ниже в среднем на 17–21 % ($p < 0,05$), чем в 3-й группе (экстракт *S. pallidum*). Достоверные отличия между этими группами выявлены и по другим показателям: уровень МДА был выше на 27–28 % ($p < 0,01$), содержание Г-SH оказалось ниже на 7–9 % ($p < 0,05$), АРА — ниже на 13–23 % ($p < 0,001$).

Данный эффект обусловлен, по нашему мнению, тем, что метаболическая активность полифенолов в экстракте бурой водоросли *S. pallidum* существенно выше, чем в экстрактах *U. lactuca* и *A. fastigiata* var. *tobuchiensis*. Соответственно, экстракт *S. pallidum* характеризуется более высоким уровнем АРА, что подтверждают полученные данные (см. табл. 1). Известно, что основными компонентами полифенольных фракций зелёных и красных водорослей являются мономерные флавоноиды [Alagan et al., 2017; de Quirós et al., 2010]. В свою очередь, высокомолекулярные флоротаннины бурых водорослей и их экстракты, обогащённые флоротаннинами, проявляют высокую антиоксидантную активность [Ferrerres et al., 2012; Wang et al., 2012], в отличие от низкомолекулярных полифенольных фракций зелёных и красных водорослей. По мнению исследователей [Agregán et al., 2018], экстракты морских водорослей с высоким содержанием полифенольных соединений обладают выраженным антиоксидантным потенциалом.

На основании полученных данных можно заключить, что при стрессовом воздействии введение экстрактов из морских водорослей способствовало восстановлению показателей системы антиоксидантной защиты, которая играет ключевую роль в протекании большинства жизненно важных процессов.

Выводы:

1. В условиях экспериментального острого стресса у мышей отмечено нарушение метаболических реакций организма, которое сопровождалось инволюцией лимфатической системы, появлением изъязвлений слизистой оболочки желудка, уменьшением веса внутренних органов, а также напряжением в системе антиоксидантной защиты и активированием реакций перекисного окисления липидов.
2. Введение экстрактов из морских водорослей способствовало стабилизации системы антиоксидантной защиты, которая участвует в протекании большинства жизненно важных процессов.
3. Профилактическое применение при стрессе экстрактов водорослей, обогащённых полифенольными соединениями, способствовало восстановлению весовых коэффициентов внутренних органов животных (печень, селезёнка), а также отсутствию язв слизистой желудка.

4. Морские водоросли *S. pallidum*, *U. lactuca* и *A. fastigiata* var. *tobuchiensis* являются перспективным видом сырья для создания препаратов, способных повышать потенциал эндогенной системы антиоксидантной защиты организма в условиях стрессиндуцированных расстройств.
5. Преимущественный эффект экстракта из бурой водоросли *S. pallidum* в условиях стресса определяется высокомолекулярным строением флоротаннинов, что обеспечивает более высокую антиоксидантную активность по сравнению с таковой мономерных флавоноидов в экстрактах *U. lactuca* и *A. fastigiata* var. *tobuchiensis*.

Работа выполнена в рамках государственного задания Тихоокеанского океанологического института имени В. И. Ильичёва ДВО РАН по теме «Эколого-биогеохимические процессы в морских экосистемах: роль природных и антропогенных факторов» (0211-2021-0014, № гос. регистрации 121-21500052-9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Боголицын К. Г., Дружинина А. С., Овчинников Д. В., Каплицин П. А., Шульгина Е. В., Паршина А. Э. Полифенолы бурых водорослей // *Химия растительного сырья*. 2018. № 3. С. 5–21. [Bogolitsyn K. G., Druzhinina A. S., Ovchinnikov D. V., Kaplitsyn P. A., Shulgin E. V., Parshina A. E. Polyphenols of brown algae. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 3, pp. 5–21. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2018031898>
2. Венгеровский А. И., Маркова И. В., Саратиков А. С. Доклиническое изучение гепатозащитных средств // *Ведомости фармакологического комитета*. 1999. № 2. С. 9–12. [Vengerovsky A. I., Markova I. V., Saratikov A. S. Doklinicheskoe izuchenie gepatozashchitnykh sredstv. *Vedomosti farmakologicheskogo komiteta*, 1999, no. 2, pp. 9–12. (in Russ.)]
3. Имбс Т. И., Звягинцева Т. Н. Флоротаннины – полифенольные метаболиты бурых водорослей // *Биология моря*. 2018. Т. 44, № 4. С. 217–227. [Imbs T. I., Zvyagintseva T. N. Phlorotannins are polyphenolic metabolites of brown algae. *Biologiya morya*, 2018, vol. 44, no. 4, pp. 217–227. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S0134347518040010>
4. Кушнерова Н. Ф., Спрыгин В. Г., Фоменко С. Е., Рахманин Ю. А. Влияние стресса на состояние липидного и углеводного обмена печени, профилактика // *Гигиена и санитария*. 2005. № 5. С. 17–21. [Kushnerova N. F., Sprygin V. G., Fomenko S. Ye., Rakhmanin Yu. A. Impact of stress on hepatic lipid and carbohydrate metabolism, prevention. *Gigiena i sanitariya*, 2005, no. 5, pp. 17–21. (in Russ.)]
5. Кушнерова Н. Ф., Фоменко С. Е., Спрыгин В. Г., Момот Т. В. Влияние липидного комплекса экстракта из морской красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara) Makienko на биохимические показатели плазмы крови и мембран эритроцитов при экспериментальном стрессе // *Биология моря*. 2020. Т. 46, № 4. С. 269–276. [Kushnerova N. F., Fomenko S. E., Sprygin V. G., Momot T. V. The effects of the lipid complex of extract from the marine red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara) Makienko on the biochemical parameters of blood plasma and erythrocyte membranes during experimental stress exposure. *Biologiya morya*, 2020, vol. 46, no. 4, pp. 269–276. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.31857/S0134347520040051>
6. Спрыгин В. Г., Кушнерова Н. Ф., Фоменко С. Е., Сизова Л. А., Момот Т. В. Гепатопротекторные свойства экстракта из бурой водоросли *Saccharina japonica* // *Биология моря*. 2013. Т. 39, № 1. С. 50–54. [Sprygin V. G., Kushnerova N. F., Fomenko S. E., Sizova L. A., Momot T. V. The hepatoprotective properties of an extract from the brown alga *Saccharina japonica*. *Biologiya morya*, 2013, vol. 39, no. 1, pp. 50–54. (in Russ.)]
7. Спрыгин В. Г., Кушнерова Н. Ф., Фоменко С. Е., Другова Е. С., Лесникова Л. Н., Мерзляков В. Ю., Момот Т. В. Влияние экстракта из морской бурой водоросли *Sargassum pallidum* (Turner) C. Agardh, 1820 на метаболические реакции печени при экспериментальном токсическом гепатите // *Биология моря*. 2017. Т. 43, № 6. С. 444–449. [Sprygin V. G., Kushnerova N. F., Fomenko S. E., Drugova E. S., Lesnikova L. N., Merzlyakov V. Y., Momot T. V. The influence of an extract from the marine brown alga *Sargassum pallidum* on the metabolic

- reactions in the liver under experimental toxic hepatitis. *Biologiya morya*, 2017, vol. 43, no. 6, pp. 444–449. (in Russ.)]
8. 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 зелёной водоросли *Ulva lactuca* (L.) // *Химия растительного сырья*. 2019. № 3. С. 41–51. [Fomenko S. E., Kushnerova N. F., Sprygin V. G., Drugova E. S., Lesnikova L. N., Merzlyakov V. Yu. Lipid composition and membranoprotective action of extract from marine green algae *Ulva lactuca* (L.). *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2019, no. 3, pp. 41–51. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2019035116>
 9. Agregán R., Munekata P. E. S., Franco D., Carballo J., Barba F. J., Lorenzo J. M. Antioxidant potential of extracts obtained from macroalgae (*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*) and microalgae (*Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*) assisted by ultrasound. *Medicines*, 2018, vol. 5, iss. 2, art. no. 33 (9 p.). <https://doi.org/10.3390/medicines5020033>
 10. Alagan V. T., Valsala R. N., Rajesh K. D. Bioactive chemical constituent analysis, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activity of whole plant methanol extracts of *Ulva lactuca* Linn. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 2017, vol. 15, no. 1, pp. 1–14. <https://doi.org/10.9734/BJPR/2017/31818>
 11. Bartosz G., Janaszewska A., Ertel D., Bartosz M. Simple determination of peroxy radical-trapping capacity. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1998, vol. 46, iss. 3, pp. 519–528. <https://doi.org/10.1080/15216549800204042>
 12. Buege J. A., Aust S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: *Biomembranes. Part C, Biological Oxidants, Microsomal, Cytochrome P-450, and Other Hemoprotein Systems* / F. Sidney, P. Lester (Eds). New York : Academic Press, 1978, pp. 302–310. (Methods in Enzymology ; vol. 52). [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
 13. Burk R. F., Lawrence R. A., Lane J. M. Liver necrosis and lipid peroxidation in the rat as the result of paraquat and diquat administration: Effect of selenium deficiency. *The Journal of Clinical Investigation*, 1980, vol. 65, iss. 5, pp. 1024–1031. <https://doi.org/10.1172/JCI109754>
 14. Chrousos G. P. Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, 2009, no. 5, pp. 374–381. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>
 15. Cotas J., Leandro A., Monteiro P., Pacheco D., Figueirinha A., Gonçalves A. M. M., da Silva G. J., Pereira L. Seaweed phenolics: From extraction to applications. *Marine Drugs*, 2020, vol. 18, iss. 8, pp. 384–431. <https://doi.org/10.3390/md18080384>
 16. de Quirós A. R.-B., Lage-Yusty M. A., López-Hernández J. Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. *Food Chemistry*, 2010, vol. 121, iss. 2, pp. 634–638. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.078>
 17. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl group. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1959, vol. 82, iss. 1, pp. 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
 18. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes*. Strasbourg : Council of Europe, 1986, 11 p. (European Treaty Series ; no. 123). URL: <https://rm.coe.int/168007a67b> [accessed: 28.12.2021].
 19. Ferreres F., Lopes G., Gil-Izquierdo A., Andrade P. B., Sousa C., Mouga T., Valentão P. Phlorotannin extracts from Fucales characterized by HPLC-DAD-ESI-MSn: Approaches to hyaluronidase inhibitory capacity and antioxidant properties. *Marine Drugs*, 2012, vol. 10, iss. 12, pp. 2766–2781. <https://doi.org/10.3390/md10122766>
 20. Goldberg D. M., Spooner R. J. Assay of glutathione reductase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 3: Enzymes 1. Oxidoreductases, transferases. 3rd edition / H. U. Bergmeyer (Ed.). Weinheim : Verlag Chemie, 1983, pp. 258–265.
 21. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, vol. 79, iss. 5, pp. 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
 22. Michalak I., Chojnacka K. Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Sciences*, 2015, vol. 15, iss. 2, pp. 160–176. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400191>
 23. Paoletti F., Aldinucci D., Mocali A., Cappellini A. A sensitive spectrophotometric

- method for the determination of superoxide-dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 1986, vol. 154, iss. 2, pp. 536–541. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90026-6)
24. Parys S., Rosenbaum A., Kehraus S., Reher G., Glombitza K.-W., König G. M. Evaluation of quantitative methods for the determination of polyphenols in algal extracts. *Journal of Natural Products*, 2007, vol. 70, iss. 12, pp. 1865–1870. <https://doi.org/10.1021/np070302f>
 25. Pradhan B., Patra S., Behera C., Nayak R., Jit B. P., Ragusa A., Jena M. Preliminary investigation of the antioxidant, anti-diabetic, and anti-inflammatory activity of *Enteromorpha intestinalis* extracts. *Molecules*, 2021, vol. 26, iss. 4, pp. 1171–1187. <https://doi.org/10.3390/molecules26041171>
 26. Ragan M. A., Glombitza K. W. Phlorotannins, brown algal polyphenols. In: *Progress in Phycological Research*. Bristol : Biopress Ltd, 1986, vol. 4, pp. 129–241.
 27. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, vol. 26, iss. 9–10, pp. 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
 28. Şahın E., Gümüşlü S. 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). *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2007, vol. 34, iss. 5–6, pp. 425–431. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04584.x>
 29. Shibata T., Kawaguchi S., Hama Y., Inagaki M., Yamaguchi K., Nakamura T. Local and chemical distribution of phlorotannins in brown algae. *Journal of Applied Phycology*, 2004, vol. 16, pp. 291–296. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000047781.24993.0a>
 30. Skriptsova A. V., Zhigadlova G. G. A revision of the red algal genus *Ahnfeltia* on the Russian coast of the North Pacific. *Phycologia*, 2022, vol. 61, iss. 4, pp. 396–402. <https://doi.org/10.1080/00318884.2022.2061154>
 31. Wang T., Jónsdóttir R., Liu H., Gu L., Kristinsson H. G., Raghavan S., Ólafsdóttir G. Antioxidant capacities of phlorotannins extracted from the brown algae *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, vol. 60, iss. 23, pp. 5874–5883. <https://doi.org/10.1021/jf3003653>
 32. Zhong B., Robinson N. A., Warner R. D., Barrow C. J., Dunshea F. R., Suleria H. A. R. LC-ESI-QTOF-MS/MS characterization of seaweed phenolics and their antioxidant potential. *Marine Drugs*, 2020, vol. 18, iss. 6, pp. 331–352. <https://doi.org/10.3390/md18060331>

**ASSESSMENT OF ANTIOXIDANT ACTIVITY
OF SEAWEED EXTRACTS FROM THE SEA OF JAPAN
IN VITRO AND IN VIVO**

**S. E. Fomenko, N. F. Kushnerova, V. G. Sprygin, E. S. Drugova,
L. N. Lesnikova, and V. Yu. Merzlyakov**

V. I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute FEB RAS, Vladivostok, Russian Federation
E-mail: sfomenko@poi.dvo.ru

Seaweeds are a source of important biologically active substances: lipids, amino acids, phenolic compounds, polycarbohydrates, *etc.* Polyphenolic compounds are one of the perspective groups of constituents of marine origin with high antioxidant activity; those play a key role in the life of marine macrophytes, allowing them to quickly respond to external stress and to perform protective functions. At the same time, the multicomponent composition of the phenolic fraction of the seaweed extract provides a wide spectrum of its pharmacological activity, *inter alia* a regulatory effect on numerous homeostasis disorders occurring during pathological processes in humans and animals. Wherein, the available opportunities for the practical use of seaweed extracts have not yet been depleted,

and this is of undoubted interest for modern science. The aim of the work was to carry out a comparative assessment of the antioxidant activity of hydroalcoholic extracts isolated from the thalli of three classes of algae [brown (*Sargassum pallidum*), green (*Ulva lactuca*), and red (*Ahnfeltia fastigiata* var. *tobuchiensis*)] and to analyze their effect on indices of the endogenous antioxidant system of liver and blood in mice under experimental stress. Seaweeds were sampled in summer in the coastal waters of the Peter the Great Bay (the Sea of Japan). Sampled seaweeds were dried at a temperature of about +50 °C, grinded in a laboratory mill to particles 0.5–1 mm in size, and extracted with 70% ethanol *via* repercolation. In the extract of the brown alga *S. pallidum*, the highest content of polyphenols was recorded – (218.2 ± 20.3) mg-Eq GA·g⁻¹ dry weight. In the extract of the green alga *U. lactuca*, the value was (16.2 ± 1.8) mg-Eq GA·g⁻¹ dry weight; in the extract of the red alga *A. fastigiata* var. *tobuchiensis*, (9.1 ± 1.6) mg-Eq GA·g⁻¹ dry weight. Accordingly, the antiradical activity of *S. pallidum* extract towards the cation radical ABTS⁺ and the alkyl peroxy radical was significantly higher than that of *U. lactuca* and *A. fastigiata* var. *tobuchiensis* extracts. The effect of these seaweed extracts on the antioxidant defense indices of liver and plasma in mice under acute stress was studied experimentally. Weight indicators (weight of animals and weight coefficients of their internal organs) and biochemical indices (level of antiradical activity, malondialdehyde and reduced glutathione content, and activity of antioxidant enzymes) were established. The experiment was carried out on white outbred male mice (weight of 20–30 g). To model conditions of acute stress, mice were fixed vertically by the dorsal neck crease for 24 h. Alcohol-free seaweed extracts were injected into mice stomachs as an aqueous suspension (a dose of 100 mg of total polyphenols *per* kg of body weight) through a tube twice: right before vertical fixation and in 6 h. Into stomachs of the animals of the control and the “stress” groups, distilled water was injected in a volume equal to that of the injected extracts. In this model, all the attributes of stress manifested themselves: adrenal hypertrophy, involution of the thymus and spleen, and ulceration of the gastric and intestinal mucosa. Moreover, disturbances of the antioxidant defense system were recorded: a decrease of antioxidant enzymes activity in blood plasma, a drop in reduced glutathione content in liver, and an increase of the malondialdehyde level. Under the effect of the extracts, in all the groups of animals under stress, a tendency to stabilization of the studied antioxidant defense indices was observed. Interestingly, the values in mice receiving *U. lactuca* and *A. fastigiata* var. *tobuchiensis* extracts were inferior to those in the group of animals receiving *S. pallidum* extract. In the latter group of mice, there were no significant differences from the control values in terms of antioxidant defense indices. This is due to the fact the main components of the polyphenolic fractions of green and red algae are monomeric flavonoids, while brown algae contain high molecular weight phlorotannins. The latter ones are characterized by higher antioxidant activity than low molecular weight polyphenolic fractions of green and red algae.

Keywords: seaweeds, polyphenols, antioxidant activity, stress, mice