

АНТИОКСИДАНТНЫЕ И МЕМБРАНОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТА ИЗ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *LAMINARIA JAPONICA*

© 2010 г. Т. В. Кушнерова¹, С. Е. Фоменко², Н. Ф. Кушнерова²,
В. Г. Спрыгин², Л. Н. Лесникова², Ю. С. Хотимченко¹, Е. В. Кондратьева³

¹Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток 690041;

²Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичёва ДВО РАН, Владивосток 690041;

³Владивостокский государственный медицинский университет, Владивосток 690002
e-mail: kushnerova83@mail.ru

Статья принята к печати 28.01.2010 г.

Приведены сравнительные данные по антиоксидантному и мембранопротекторному действию экстракта из морской бурой водоросли *Laminaria japonica* и коммерческого препарата "Легалон"TM. Показано, что интоксикация четыреххлористым углеродом сопровождается истощением системы антиоксидантной защиты эритроцитов, увеличением их размерных характеристик, нарушением в соотношении фракций фосфо- и нейтральных липидов. При восстановлении липидной составляющей мембран эритроцитов и снятии токсического стресса действие экстракта из ламинарии оказалось более эффективным, чем "Легалона".

Ключевые слова: ламинария японская, "Легалон", четыреххлористый углерод, эритроциты, антиоксидантная активность, липиды.

Antioxidant and membrane-protective properties of an extract from the brown alga *Laminaria japonica*.
T. V. Kushnerova¹, S. E. Fomenko², N. F. Kushnerova², V. G. Sprygin², L. N. Lesnikova², Yu. S. Khotimchenko¹,
E. V. Kondratieva³ (¹A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041; ²V.I. Ilyichev Pacific Oceanological Institute, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041; ³Vladivostok State Medical University, Vladivostok 690002)

This paper presents comparative data on the antioxidant and membrane-protective activity of an extract from the brown seaweed *Laminaria japonica* and the commercial drug "Legalon"TM. It was shown that the intoxication with carbon tetrachloride was accompanied by the exhaustion of the antioxidant defense system of erythrocytes, the increase in their dimensional characteristics, and the change in the phospholipids to neutral lipids ratio. The *Laminaria* extract has appeared to be more efficient than legalon in the restoration of the lipid component of erythrocyte membranes and the removal of toxic stress. (Biologiya Morya, Vladivostok, 2010, vol. 36, no. 5, pp. 384–389).

Key words: *Laminaria japonica*, legalon, carbon tetrachloride, erythrocytes, antioxidant activity, lipids.

В настоящее время в экспериментальных исследованиях на животных в качестве мембранотоксического агента наиболее широко используется четыреххлористый углерод. Этот яд в первую очередь воздействует на мембраны эндоплазматического ретикулума, где, связываясь в качестве субстрата с цитохромом P-450, метаболизируется с образованием свободных радикалов трихлорметина и хлорина. Свободные радикалы реагируют с макромолекулами внутриклеточных и цитоплазматических мембран, нарушая их проницаемость. Этот процесс сопряжен с гиперпродукцией супероксиданионов, которые индуцируют перекисное окисление липидов и формируют окислительный стресс (Владимиров, 2000).

Для фармакологической коррекции нарушенной структуры мембран перспективными являются комплексные растительные препараты, в состав которых входят полифенольные соединения. В качестве примера можно привести препараты "Карсил", "Легалон", "Лив 52" и другие на основе экстрактов из плодов расторопши пятнистой *Silybum marianum* Gaerth., содержащие силимарин (Катикова и др., 2002). Фармакодинамика

силимарина определяется его мембраностабилизирующими и метаболическими свойствами. Однако препараты, содержащие силимарин, производятся за рубежом, поэтому очевидны актуальность и необходимость поиска новых источников сырья для получения препаратов с антиоксидантными и мембранопротекторными свойствами на территории Российской Федерации. В последние годы появились публикации об антиоксидантных свойствах природного полифенольного препарата "Максар", выделенного из маакии амурской *Maackia amurensis* (см.: Федорев и др., 2004), который разработан в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН. Из солянки холмовой *Salsola collina* получен флавоноидный препарат лохейн (Венгеровский и др., 2004). Терапевтическая эффективность этого препарата обусловлена ингибированием свободно-радикального окисления, усилением антирадикальной защиты липидов мембран, а также способностью сохранять основной компонент мембран – фосфатидилхолин. Однако лишь в единичных работах (например, Спрыгин и др., 2009) обсуждается возможность применения в качестве мембранопротекторов полифенольных

комплексов из морских водорослей. В связи с этим из ламинарии японской *Laminaria japonica* нами был выделен экстракт, в состав которого входят полифенольные соединения (флоротаннины и их олигомерные и полимерные формы), полиненасыщенные жирные кислоты семейства n-3 и n-6, фосфолипиды, липофильные вещества, аминокислоты (из них 7 незаменимых), белки, витамины, минералы и т.д. (Kostetsky et al., 2004; Sanina et al., 2008; Имбс и др., 2009; Спрыгин и др., 2009). Полифенольные соединения (флоротаннины и их олигомерные и полимерные формы) представляют собой одну из наиболее значимых групп биологически активных веществ, обеспечивающих фармакологическую ценность водорослей.

Целью работы явилось изучение антиоксидантных и мембранопротекторных свойств экстракта из ламинарии японской при интоксикации четыреххлористым углеродом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Бурую водоросль *Laminaria japonica* собирали в 2008 г. в б. Западная о-ва Попова (зал. Петра Великого Японского моря) и высушивали при температуре, не превышавшей 50°C. Для освобождения от альгинатов измельченное сырье экстрагировали методом реперколяции 70% этиловым спиртом при соотношении сырья к экстрагенту 1 : 1 (по объему). Выход экстракта из 1 кг сырья в процессе реперколяции составил 1 л. Полученный экстракт упаривали в вакууме до сухого остатка и ресуспендировали в воде. Содержание общих полифенолов (ОПФ) определяли с помощью реактива Фолина–Чокальтеу (Singleton et al., 1999). Полифенолы составляли 35% от сухого остатка экстракта.

Диаметр эритроцитов в мазках крови, окрашенных азуриновой смесью, определяли с помощью окуляр-микрометра. Средний объем и средний диаметр эритроцитов рассчитывали по методу Гольдберга с соавторами (1973). Выделяли эритроциты и выявляли их осмотическую резистентность в соответствии с методом, предложенным Новгородцевой с соавторами (2003). Состояние антиоксидантной системы в эритроцитах оценивали по величине активности супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1), глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2), глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) и по уровню восстановленного глутатиона, перекисное окисление липидов – по концентрации малонового диальдегида (МДА) (Новгородцева и др., 2003). Экстракты общих липидов из эритроцитов готовили с использованием системы растворителей хлороформ : метанол (2 : 1; по объему) (Folch et al., 1957). Определение общих фосфолипидов (ФЛ) в экстрактах проводили спектрофотометрически с помощью молибдатного реактива (Vaskovsky et al., 1975). Фракционное разделение ФЛ осуществляли методом двумерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле (Svetachev, Vaskovsky, 1972), а их количественное определение – по методу Васковского с соавторами (Vaskovsky et al., 1975). Использовали следующие системы растворителей (Rouser et al., 1967): 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). Для обнаружения холинсодержащих фосфолипидов – фосфатидилхолина (ФХ), лизофосфатидилхолина (ЛФХ), сфингомиелина (СМ) – использовали реактив Драгендорфа (Wagner et al., 1961); липиды проявлялись в виде оранжевых пятен на желтом фоне.

Для обнаружения фосфолипидов, содержащих аминогруппу – фосфатидилэтаноламина (ФЭ), лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ), фосфатидилсерина, – пластинки опрыскивали 5% раствором нингидрина в ацетоне (Rouser et al., 1967), затем нагревали в течение 2–3 мин над парами воды до появления розовых пятен на белом фоне. Фосфолипиды, содержащие гидроксильную группу (фосфатидилинозит – ФИ), обнаруживали с помощью периодатного реактива Шиффа (Кейтс, 1975): пятна липидов имели розово-сиреневый цвет. Для проявления всех фосфолипидных фракций применяли молибдатный реактив (Vaskovsky et al., 1975) и реагент на основе малахитового зеленого (Vaskovsky, Latyshev, 1975). При этом липиды проявлялись в виде синих или зеленых пятен на белом фоне. Хроматографическое распределение нейтральных липидов и их количественное содержание определяли методом одномерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле в системе растворителей гексан : серный эфир : уксусная кислота в соотношении 90 : 10 : 1 (по объему) (Amenta, 1964). Пятна нейтральных липидов обнаруживали с помощью паров йода. Количественное содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы нейтральных липидов и ФЛ соответственно. Результаты обрабатывали по параметрическому критерию Стьюдента (*t*), используя статистическую программу Instat (Graph Pad Software Inc. USA, 2005). Исследование одобрено Комиссией по вопросам этики Владивостокского государственного медицинского университета.

В эксперименте использовали белых крыс-самцов линии Вистар массой 180–200 г, которых содержали в стандартных условиях вивария на стандартном рационе. Экспериментальную модель интоксикации четыреххлористым углеродом (ЧХУ) на животных разрабатывали согласно существующему руководству (Венгеровский и др., 1999). Животным в дорсальную шейную складку в течение 6 дней вводили 50% раствор ЧХУ на оливковом масле в дозе 2 мл/кг. В качестве препарата сравнения использовали коммерческий полифенольный препарат "Легалон" (MADAUS AG, Германия). Экстракт из ламинарии вводили внутривенно через зонд в виде водного раствора в дозе 100 мг общих полифенолов/кг массы животного. "Легалон" вводили через зонд в той же дозе в виде взвеси в 1% крахмальном клейстере. Доза в 100 мг/кг соответствует известной терапевтической дозе для полифенольных гепатопротекторов (Венгеровский и др., 1999). Животные были разделены на 5 групп по 6 крыс в каждой: 1-я группа – контроль (интактные, стандартный рацион); 2-я группа – ЧХУ; 3-я группа – депривация (прекращение введения токсиканта) после введения ЧХУ в течение 7 дней; 4-я группа – депривация + экстракт из ламинарии в течение 7 дней; 5-я группа – депривация + "Легалон" в течение 7 дней. Животных 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 г.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Введение ЧХУ в течение 6 дней вызвало у животных типичную картину мембранотоксического эффекта с изменением размерных характеристик эритроцитов, их осмотической резистентности к гемолизирующему агенту, а также биохимических показателей, характеризующих состояние системы антиоксидантной защиты (САОЗ) и липидных составляющих мембран. Так, в эритроцитах крыс увеличилось содержание МДА на 28% (9.00 ± 0.25 мкмоль/мл против 6.51 ± 0.20 мкмоль/мл

в контроле, $p < 0.001$), что свидетельствует о резкой активизации перекисного окисления липидов (ПОЛ), инициируемого супероксиданионами и трихлорметил-радикалами, которые образуются в системе цитохрома Р-450 при метаболизме ЧХУ. Активность супероксид-дисмутазы (СОД) – ключевого фермента антиоксидантной защитной системы, была в 3 раза ниже контрольного уровня (4.20 ± 0.14 ед/мг белка против 12.80 ± 0.78 ед/мг белка в контроле, $p < 0.001$). Одновременно на 13% снижалась активность глутатионпероксидазы (ГПО) (146.00 ± 2.72 нмоль/мин/мл плазмы против 168.25 ± 2.67 нмоль/мин/мл в контроле, $p < 0.001$) и на 42% глутатионредуктазы (ГР) (5.92 ± 0.52 нмоль/мин/мл плазмы против 10.21 ± 0.45 нмоль/мин/мл плазмы в контроле, $p < 0.001$) при одновременном снижении концентрации восстановленного глутатиона (Г-SH) на 32% (1.23 ± 0.03 нмоль/мг белка против 1.80 ± 0.06 нмоль/мг белка в контроле, $p < 0.001$). Такие нарушения в показателях системы антиоксидантной защиты предполагают ее истощение. Исследование среднего диаметра (СДЭ) и среднего объема эритроцитов (СОЭр) показало, что после интоксикации эти параметры увеличились. Так, СДЭ превышал контрольные значения на 35% (8.46 ± 0.06 мкм против 6.29 ± 0.04 мкм в контроле, $p < 0.001$), а СОЭр – в 2.4 раза (121.10 ± 2.36 мкм³ против 49.77 ± 1.75 мкм³, $p < 0.001$). Сдвиг порога начала гемолиза эритроцитов до $0.62 \pm 0.02\%$ NaCl и окончание гемолиза при концентрации NaCl $0.47 \pm 0.02\%$ (в норме гемолиз эритроцитов начинался и заканчивался при концентрации 0.45 и 0.35% NaCl соответственно) свидетельствовали о том, что мембрана эритроцитов обладала пониженной устойчивостью к гемолизирующему агенту. На 27% ($p < 0.001$) снизилось количество общих фосфолипидов в эритроцитах ($46.28 \pm 1.74\%$ против $63.76 \pm 1.85\%$ в контроле). Содержание холестерина (ХС) увеличилось на 19% ($p < 0.001$) (табл. 1). В связи с этим коэффициент ХС/ФЛ увеличился до 0.57 ± 0.04 (в контроле 0.35 ± 0.03 , $p < 0.001$), что свидетельствовало о повышении жесткости мембран и снижении их лабильности. Следует отметить, что после интоксикации ЧХУ в составе нейтральных липидов эритроцитов наблюдалось достоверное увеличение триацилглицеринов (ТАГ) на 19% ($p < 0.01$) и свободных жирных кислот (СЖК) на

15% ($p < 0.05$) (табл. 1). Одновременно снижался уровень эфиров холестерина (ЭХС) и эфиров жирных кислот (ЭЖК) – соответственно на 28 и 18% ($p < 0.001$). Полученные данные указывают, с одной стороны, на активизацию в мембране эритроцитов адаптационных процессов, направленных на стабилизацию мембраны за счет увеличения содержания ХС, а с другой – на увеличение интенсивности липолитических процессов в жировой ткани (стрессовая реакция) и на нарушение соотношения липидов в липопротеинах из-за поражения печени (Спрыгин и др., 2003).

Изменения в фосфолипидном спектре мембран эритроцитов после интоксикации ЧХУ свидетельствуют о нарушении их проницаемости (табл. 2). Оно проявлялось в увеличении содержания ЛФХ на 28% ($p < 0.01$) и ЛФЭ на 21% ($p > 0.001$) в результате активирования под действием токсиканта и продуктов его метаболизма фосфолипазы А₂. Компенсаторной реакцией на повышение проницаемости мембран явилось увеличение количества СМ, который повышает вязкость и жесткость мембраны, уменьшая при этом ее проницаемость. Интоксикация ЧХУ сопровождалась достоверным снижением содержания основных структурных компонентов мембран – ФХ на 11% ($p < 0.001$) и ФЭ на 10% ($p < 0.05$). Известно, что при активации свободно-радикальных процессов в мембранах окислению в первую очередь подвергаются полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) фосфолипидов, что и вызывает уменьшение содержания соответствующих фракций (Кушнерова и др., 2005). Обращает на себя внимание снижение количества ФИ на 31% ($p < 0.001$) и фосфатидной кислоты (ФК) на 6% ($p < 0.01$), которые необходимы для функционирования мембраносвязанного фермента Na⁺-K⁺-АТФазы (Sanz et al., 1994).

Таким образом, при интоксикации ЧХУ изменялось соотношение липидных структур в мембране эритроцитов по сравнению с нормой. Эти изменения приводили к увеличению размерных физиологических характеристик эритроцитов (СДЭ и СОЭр) за счет увеличения ХС, ТАГ и СМ, что предполагает усиление плотности и жесткости мембран, снижение их фильтрационной способности.

Через 7 дней после отмены ЧХУ (период депривации) в эритроцитах крыс 3-й группы большинство био-

Таблица 1. Влияние экстрактов из ламинарии и "Легалона" на содержание фракций нейтральных липидов в эритроцитах крыс при интоксикации четыреххлористым углеродом (в % от суммы всех фракций; $M \pm m$)

Группа животных	ТАГ	СЖК	ЭЖК	ХС	ЭХС	Остаточная фракция
1-я, контроль (интактные)	17.60±0.64	13.67±0.51	17.41±0.47	22.01±0.80	17.00±0.62	12.31±1.60
2-я, ЧХУ	21.00±0.75 ^б	15.67±0.61 ^а	14.30±0.58 ^б	26.21±0.65 ^б	12.20±0.55 ^б	10.62±1.30
3-я, депривация	20.44±0.56 ^б	15.00±0.53 ^а	14.11±0.48 ^б	26.80±0.63 ^б	12.77±0.43 ^б	10.88±1.67
4-я, ЧХУ + экстракт из ламинарии	18.00±0.59 ²	12.70±0.58 ²	17.28±0.73 ³	22.80±0.88 ²	16.40±0.47 ³	12.82±1.80
5-я, ЧХУ + "Легалон"	19.00±0.73	14.84±0.70	16.00±0.73 ¹	24.00±0.76 ^{а, 2}	14.33±0.46 ^{б, 1}	11.83±1.70

Примечание. ТАГ – триацилглицерины, СЖК – свободные жирные кислоты, ЭЖК – эфиры жирных кислот, ХС – холестерин, ЭХС – эфиры холестерина. Различия статистически достоверны при: ^а $p < 0.05$, ^б $p < 0.01$ и ^в $p < 0.001$ при сравнении с контролем; ¹ $p < 0.05$, ² $p < 0.01$, ³ $p < 0.001$ при сравнении со 2-й группой.

Таблица 2. Влияние экстрактов из ламинарии и "Легалона" на содержание фракций фосфолипидов в эритроцитах крыс при интоксикации четыреххлористым углеродом (в % от суммы всех фракций; $M \pm m$)

Группа животных	ФХ	ЛФХ	СМ	ФЭ	ЛФЭ	ФС	ФИ	ФК
1-я, контроль (интактные)	36.72±0.45	8.54±0.68	12.24±0.63	20.25±0.74	7.76±0.25	4.97±0.12	4.82±0.19	4.70±0.05
2-я, ЧХУ	32.60±0.70 ^а	10.97±0.48 ^б	14.80±0.87 ^а	18.18±0.51 ^а	9.39±0.28 ^а	6.30±0.14 ^а	3.32±0.08 ^а	4.44±0.06 ^б
3-я, депривация	33.12±0.71 ^а	10.47±0.38 ^а	15.11±0.66 ^б	17.99±0.62 ^а	9.41±0.23 ^а	5.00±0.12	4.40±0.10 ^а	4.50±0.06 ^б
4-я, ЧХУ + экстракт из ламинарии	36.12±0.68 ²	8.35±0.42 ²	12.80±0.72 ¹	19.86±0.65 ¹	7.96±0.17 ³	4.23±0.29 ^{а,1}	4.72±0.16	5.96±0.08 ^{а,3}
5-я, ЧХУ + "Легалон"	35.19±0.60 ^{а,1}	8.68±0.47 ²	12.25±0.56 ²	19.71±0.85	7.87±0.18 ³	5.37±0.16 ^{а,1}	4.46±0.17	4.48±0.07 ^б

Примечание. ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФК – фосфатидная кислота. Различия статистически достоверны при: ^а $p < 0.05$, ^б $p < 0.01$, ¹ $p < 0.001$ при сравнении с контролем; ¹ $p < 0.05$, ² $p < 0.01$, ³ $p < 0.001$ при сравнении со 2-й группой.

химических параметров не нормализовалось, к тому же было отмечено еще большее отклонение от нормы некоторых биохимических показателей, т.е. собственных защитных сил клеток было недостаточно, чтобы противостоять развитию токсической патологии. Увеличение содержания МДА на 50% по сравнению с контролем ($p < 0.001$) свидетельствовало о том, что высокий уровень ПОЛ сохранялся. Показатели антиоксидантной защитной системы в период депривации оставались на уровне величин, которые были определены во 2-й группе животных, подвергавшихся воздействию ЧХУ на протяжении всего эксперимента. Факт снижения относительно контроля активности СОД до $4.10 \pm \pm 0.07$ ед/мг белка ($p < 0.001$), ГР до $5.86 \pm \pm 0.06$ нмоль/мин/мл плазмы ($p < 0.001$), ГПО до 140.00 ± 2.05 нмоль/мин/мл плазмы ($p < 0.001$), содержания Г-SH до 1.00 ± 0.02 нмоль/мг белка ($p < 0.001$) указывал на дальнейшее развитие свободно-радикальных процессов и на истощение клеточной САОЗ. Следовательно, в период депривации окислительный стресс продолжался из-за истощения антиоксидантной защиты. При этом величины СДЭ и СОЭр оставались на уровне этих показателей во 2-й группе животных: 8.40 ± 0.05 мкм ($p < 0.001$) и 118.54 ± 5.00 мкм³ ($p < 0.001$) соответственно. На уровне 2-й группы оставалась также осмотическая резистентность эритроцитов, при которой начало гемолиза происходило при $0.60 \pm 0.02\%$ NaCl, а завершение при его содержании $0.50 \pm 0.02\%$, т.е. сохранялась высокая скорость гемолиза эритроцитов.

Содержание ХС также оставалось на уровне этого показателя во 2-й группе животных (увеличение на 22% относительно контроля, $p < 0.001$), тогда как количество общих фосфолипидов несколько возросло (до $52.30 \pm 1.57\%$, $p < 0.001$), что обусловило снижение коэффициента ХС/ФЛ до 0.51 ± 0.03 ($p < 0.001$). В спектре нейтральных липидов эритроцитов крыс 3-й группы сохранялось повышенное по сравнению с контролем содержание ТАГ, СЖК и ХС; наблюдалось достоверно низкое содержание ЭХС и ЭЖК, следовательно, этерифицирующая функция печени была подавлена и липидный состав липопротеинов (источники липидов для мембран эритроцитов) за период депривации не изменился.

Анализ фракционного состава фосфолипидов эритроцитов в период отмены ЧХУ (3-я группа) показал, что содержание ЛФХ и ЛФЭ сохранялось высоким, что свидетельствовало о дальнейшей активизации фосфолипаз. Количество основных структурных компонентов мембран ФХ и ФЭ также не изменилось по сравнению с таковым во 2-й группе (ЧХУ). Обращает на себя внимание еще большее увеличение количества СМ (на 23%, $p < 0.01$). Таким образом, полученные данные показывают, что нарушения физиолого-метаболических характеристик эритроцитов продолжают и углубляются даже в отсутствие токсического агента.

При введении животным экстракта из ламинарии (4-я группа) после отмены ЧХУ отмечена нормализация всех исследуемых биохимических показателей. Восстановился антиоксидантный статус организма: количество МДА составило 7.00 ± 0.26 мкмоль/мл, активность СОД – 10.56 ± 0.83 ед/мг белка, ГР – 8.16 ± 0.35 нмоль/мин/мл плазмы, ГПО – 156 ± 2.11 нмоль/мин/мл плазмы и Г-SH – 1.74 ± 0.04 нмоль/мг белка, что привело к формированию благоприятных условий для реконструкции мембранных структур эритроцитов. Это подтверждается восстановлением СДЭ до 6.49 ± 0.07 мкм, СОЭр до 54.67 ± 1.58 мкм³ и осмотической резистентности к гемолизирующему агенту (начало гемолиза происходило при $0.45 \pm 0.01\%$ NaCl, завершение – при его содержании $0.35 \pm 0.01\%$). Количество ХС и общих фосфолипидов полностью нормализовалось, коэффициент ХС/ФЛ снизился до контрольного уровня (0.37 ± 0.02).

При исследовании липидного спектра мембран эритроцитов у крыс 4-й группы (введение экстракта из ламинарии в период депривации) было показано, что соотношение фракций нейтральных липидов соответствовало контролю (группа 1). Увеличение содержания ЭЖК и ЭХС после введения экстракта из ламинарии указывало на восстановление этерифицирующей функции печени и, соответственно, структуры липопротеинов. До контрольных значений снизилось количество ЛФХ и ЛФЭ при одновременном увеличении ФХ и ФЭ. Обращает на себя внимание более высокий, чем в контроле, уровень ФК, что может считаться одним из механизмов репаративного действия экстракта, так как фосфатидная кислота служит основой для синтеза всех фосфолипидов. Таким образом, экстракт из ламинарии

способствовал снятию токсического стресса и активации реакций синтеза.

При введении препарата сравнения "Легалона" (5-я группа) также наблюдалась нормализация большинства биохимических показателей, причем направленность этих изменений была аналогична таковой при введении экстракта из ламинарии, но степень выраженности различалась. В первую очередь, отмечены различия в величинах показателей САОЗ. Так, содержание МДА при введении "Легалона" составляло 7.63 ± 0.30 мкмоль/мл, что на 17% ($p < 0.01$) выше контроля. Кроме того, активность СОД была ниже контрольного уровня на 29% ($p < 0.05$) и составляла 9.08 ± 0.04 ед/мг белка, ГПО – на 11% (150 ± 1.65 нмоль/мин/мл плазмы, $p < 0.01$), ГР – на 27% (7.44 ± 0.46 нмоль/мин/мл плазмы, $p < 0.05$), а уровень Г-SH – на 13% (1.56 ± 0.04 нмоль/мг белка, $p < 0.01$). Выше, чем в контроле, были параметры эритроцитов: СДЭ – на 13%, что составляло 7.11 ± 0.04 мкм ($p < 0.001$), и СОЭр – на 44%, что составляло 71.89 ± 1.40 мкм³ ($p < 0.001$). При этом осмотическая резистентность эритроцитов также была несколько ниже, чем в контроле (гемолиз начинался при $0.47 \pm 0.01\%$ NaCl и завершался при $0.38 \pm 0.01\%$ NaCl). Количество ХС было выше контрольного уровня на 9% ($p < 0.05$), а общих фосфолипидов ниже на 8% ($58.55 \pm 1.65\%$, $p < 0.05$), поэтому коэффициент ХС/ФЛ оказался выше нормы (0.41 ± 0.02). Содержание ЭХС было ниже контрольного уровня на 16% ($p < 0.01$), что говорит о недостаточном восстановлении липидного состава липопротеинов под действием "Легалона" в период депривации.

При исследовании фосфолипидного спектра эритроцитов крыс, которым вводили "Легалон", следует отметить достоверно пониженное содержание ФХ на 4% ($p < 0.05$) и ФК на 5% ($p < 0.01$). Таким образом, для восстановления липидной составляющей мембран эритроцитов и снятия токсического стресса "Легалон" оказался менее эффективным, чем экстракт из ламинарии.

Биохимический механизм снижения напряжения антиоксидантной и антирадикальной систем защиты эритроцитов определяется способностью полифенольных структур, входящих в "Легалон" и экстракт из ламинарии, улавливать свободные и кислородные радикалы (Pignatelli et al., 2006). Мембранопротекторный эффект объясняется тем, что молекулы полифенолов, взаимодействуя с поверхностью мембран, способны образовывать мономолекулярные слои, увеличивающие прочность поверхностного слоя клеток и, соответственно, снижающие возможность атаки радикалами (Афанасьева и др., 2007). Кроме того, полифенолы препаратов являются ингибиторами фосфолипаз (Khorasova et al., 1998), что подтверждается достоверным снижением уровня лизофракций фосфолипидов (ЛФХ и ЛФЭ). При сравнении степени выраженности восстанавливающего эффекта действия "Легалона" и экстракта из ламинарии проявляются определенные преимущества последнего, так как при его использовании

большинство исследуемых показателей были наиболее близки к контрольным значениям. Известно, что в состав "Легалона" входит активная группа изомерных флавоноидных соединений (сilibинин, силикристиин, силидианин), не образующих олигомерных форм. В составе экстракта из ламинарии присутствуют полимерные вещества (олигомерные и полимерные флоротаннины), которые демонстрируют антиоксидантные свойства в большей степени, чем мономеры "Легалона". Полученные результаты указывают на антиоксидантный и мембранопротекторный эффект экстракта из ламинарии в условиях воздействия мощного мембранотоксического агента – четыреххлористого углерода. Применение экстракта из *Laminaria japonica* при воздействии вредных экологических и производственных факторов представляется перспективным направлением.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Афанасьева Ю.Г., Фахретдинова Е.Р., Спирихин Л.В., Насибуллин Р.С. О механизме взаимодействия некоторых флавоноидов с фосфатидилхолином клеточных мембран // Хим.-фармацевт. журн. 2007. Т. 41, № 7. С. 12–14.
- Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Соросовский образов. журн. 2000. № 12. С. 13–19.
- Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. Доклиническое изучение гепатозащитных средств // Ведомости фарм. комитета. 1999. № 2. С. 9–12.
- Венгеровский А.И., Мозжельин М.Е., Суходоло И.В., Саратников А.С. Влияние гепатопротекторов, содержащих полифенолы, на метаболизм и функции поджелудочной железы и печени при экспериментальном остром панкреатите // Вопр. биол. мед. и фарм. химии. 2004. № 1. С. 29–32.
- Гольдберг Д.И., Гольдберг Е.Д., Шубин Н.Г. Гематология животных. Томск: Изд-во ТГУ. 1973. 100 с.
- Имбс Т.И., Красовская Н.П., Ермакова С.П. и др. Сравнительное исследование химического состава и противоопухолевой активности водно-этанольных экстрактов бурых водорослей *Laminaria cichorioides*, *Costaria costata* и *Fucus evanescens* // Биол. моря. 2009. Т. 35, № 2. С. 140–146.
- Катикова О.Ю., Костин Я.В., Тишкин В.С. Гепатопротекторное действие препаратов растительного происхождения // Эксперимент. и клин. фармакол. 2002. № 1. С. 41–43.
- Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир. 1975. 221 с.
- 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.
- Новгородцева Т.П., Эндакова Э.А., Янькова В.И. Руководство по методам исследования параметров системы "Перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита" в биологических жидкостях. Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та. 2003. 80 с.
- Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Рахманин Ю.А. Антиоксидантное действие олигомерных проантоцианидинов, выделенных из калины, при поражении печени четыреххлористым углеродом и профилактике его токсического эффекта // Гигиена и санитария. 2003. № 3. С. 57–60.
- Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е. и др. Гепатопротекторная активность экстракта из бурой водоросли

- Laminaria japonica* // Бюл. МОИП. Отдел биол. 2009. Т. 114, вып. 3. С. 380–383.
- Федореев С.А., Кулеш Н.И., Глебоко Л.И. и др. Препарат Максар из дальневосточного растения маакии амурской // Хим.-фармацевт. журн. 2004. Т. 38, № 11. С. 22–26.
- Amenta J.S. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography // J. Lipid Res. 1964. Vol. 5, no. 2. P. 270–272.
- 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. P. 497–509.
- Kostetsky E.Y., Goncharova S.N., Sanina N.M., Shnyrov V.L. Season influence on lipid composition of marine macrophytes // Bot. Mar. 2004. Vol. 47. P. 134–139.
- Kropacova K., Misurova E., Hakova H. Protective and therapeutic effect of silymarin on the development of latent liver damage // Radiats. Biol. Radioecol. 1998. Vol. 38, no. 3. P. 411–415.
- Pignatelli P., Ghiselli A., Buchetti B. et al. Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine // Atherosclerosis. 2006. Vol. 188, no. 1. P. 77–83.
- Rouser G., Kritchevsky G., Yamamoto A. Column chromatographic and associated procedures for separation and determination of phosphatides and glycolipids // Lipid chromatography analysis. New York: Dekker. 1967. Vol. 1. P. 99–162.
- Sanina N.M., Goncharova S.N., Kostetsky E.Y. Season changes of fatty acid composition and thermotropic behavior of polar lipids from marine macrophytes // Phytochemistry. 2008. Vol. 69. P. 1517–1527.
- Sanz M.J., Ferrandiz M.L., Cejudo M. et al. Influence of a series of natural flavonoids on free-radical generating systems and oxidative stress // Xenobiotica. 1994. Vol. 24, no. 7. P. 689–699.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent // Methods in Enzymology: Oxidants and antioxidants. Academic Press: San Diego. 1999. Vol. 299. Pt. A. P. 152–178.
- Svetachev V.I., Vaskovsky V.E. A simplified technique for thin layer microchromatography of lipids // J. Chromatogr. 1972. Vol. 67, no. 2. P. 376–378.
- Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasenden I.M. A universal reagent for phospholipid analysis // J. Chromatogr. 1975. Vol. 114, no. 1. P. 129–141.
- Vaskovsky V.E., Latyshev N.A. Modified Jungnickel's reagent for detecting phospholipids and other phosphorus compounds on thin-layer chromatograms // J. Chromatogr. 1975. Vol. 115, no. 1. P. 246–249.
- Wagner H., Horhammer L., Wolff F. Thin-layer chromatography of phosphatides and glycolipids // Biochem. Z. 1961. Bd. 334. S. 175–184.