

Влияние ацетона на физиологические и биохимические показатели эритроцитов крыс и их коррекция экстрактом из калины (*Viburnum sargentii*)

КУШНЕРОВА Н.Ф.¹

д.б.н., профессор, зав. лабораторией биохимии; e-mail: pacific@vlad.ru

ФОМЕНКО С.Е.¹

к.б.н., вед.н.с. лаборатории биохимии

КУШНЕРОВА Т.В.

к.м.н., научный сотрудник лаборатории фармакологии,

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток; e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

ДРУГОВА Е.С.¹

старший лаборант-исследователь лаборатории биохимии

¹ Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН, Владивосток

*Показана возможность восстановления мембран эритроцитов, поврежденных ацетоном, с помощью препарата «калифен», выделенного из калины (*Viburnum sargentii* Koeschne). Биологически активная добавка "калифен" позволяет восстановить антиоксидантный статус, нормализовать соотношение индивидуальных липидных компонентов в мембранах эритроцитов, средний объем и диаметр эритроцита. Восстановление липидных компонентов мембран эритроцитов обусловило нормализацию их осмотической резистентности и повышение гемолитической устойчивости.*

Ключевые слова: ацетон, эритроциты, антиоксидантная защита, осмотическая резистентность, липиды, калифен

Введение

В последние годы среди молодежи и подростков отмечается повышенный интерес к вдыханию летучих веществ, в частности ацетона и средств, его содержащих (клей, лакокрасочные материалы и др.), вызывающих токсикоманию [5]. По фармакологическим свойствам ацетон относится к числу веществ, проявляющих наркотическое действие. В организм поступает с вдыхаемым воздухом, а также через пищевой тракт и кожу [19]. Он обладает кумулятивными свойствами и медленно выводится из организма. Наряду с молекулярной формой ацетон также присутствует в организме в виде кето-енольных таутомеров, являющихся нуклеофилами, что приводит к образованию токсических метаболитов и формированию токсического гепатита. То есть, в качестве основного поражающего агента при интоксикации ксенобиотиком является как сам ксенобиотик, так и продукты его метаболизма в организме. В литературе накопилось много информации о случаях острых и хронических отравлений ацетоном, которые сопровождаются развитием неврологических, гематологических нарушений, дисфункции печени [21]. Вместе с тем, использование эритроцитов как модели для исследования токсической нагрузки на биомембраны не получило должного развития. В то же время, такие свойства, как деформируемость, осмотическая резистентность и способность к агрегации, обеспечивающие продвижение эритроцитов по кровяному

руслу, а, следовательно, транспорт кислорода к органам и тканям определяются лабильностью эритроцитарной мембраны [6]. Последняя, в свою очередь, регулируется комплексом взаимосвязанных изменений в структуре липидного бислоя биомембран, важное значение в котором имеет соотношение фосфо- и нейтральных липидов, а также отношение холестерина/фосфолипиды [16]. В результате массового образования свободных радикалов токсиканта активизируется процесс оксидативного распада липидов, нарушается структурная организация мембран эритроцитов и, соответственно, развивается тканевая гипоксия [8]. Это делает актуальным изучение глубоких биохимических механизмов влияния органических растворителей на липидную составляющую мембран и их коррекцию с помощью природных биологически активных веществ. Наиболее интересными, с точки зрения фармакологии и биохимии являются представители групп катехинов и лейкоантоцианидинов, относящихся к флавоноидам. Именно они широко распространены в растениях и плодах, традиционно употребляемых в пищу. Особенно много катехинов в молодых побегах чая, гребнях и ягодах винограда. Однако данные литературы, касающиеся роли флавоноидов, свидетельствуют о том, что до сих пор многие вопросы их мембраностабилизирующего эффекта остаются неясными, в частности вопросы влияния данного вида структур на липидные показатели клеточных элементов и их физиологические характеристики.

Ранее нами были опубликованы данные, свидетельствующие о широком спектре биологической активности растительных биологически активных добавок (БАД), выделенных из отходов переработки дикорастущих видов Дальневосточной тайги, и о проявлении ими антиоксидантных, мембрано- и гепатопротекторных, антирадикальных свойств [13]. В связи с этим была создана и предлагается к употреблению БАД к пище «калифен» (патент RU №2199249, ТУ 9168-079-00480052-07, свидетельство на товарный знак RU №228327), которая была выделена из калины Саржента (*Viburnum sargentii* Koehne). Химический состав препарата был исследован с помощью жидкостного хроматографа «Controller LCC 500» (Pharmacia) [10]. Калифен — водно-спиртовой (40%) экстракт, который представляет собой композицию веществ различных классов: лейкоантоцианов, катехинов и их полимерных форм, олигомерных танинов, лигнина, флавонолов, органических кислот (фумаровой, аскорбиновой, глицериновой, галактуроновой и др.), свободных аминокислот (гистидина, аргинина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, треонина, серина, глицина, цистеина, метионина, изолейцина, тирозина и др.), сахаров (сахарозы, рафинозы) и других органических соединений. Полифенолы составляют свыше 60% сухого остатка экстракта. В качестве сравнения использовали растительный полифенольный препарат «Легалон»TM (Германия), содержащий комплекс флавоноидов из плодов расторопши пятнистой (*Silybum marianum*).

Целью работы было использование БАД «калифен» из калины для коррекции нарушений физиологических и структурных характеристик мембран эритроцитов после интоксикации ацетоном.

Материалы и методы исследования

Эксперимент проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 180—200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Животных помещали в специальную затравочную камеру в условиях относительной влажности воздуха (40—60%), заданных параметров температуры, с автономной системой очистки и регенерации воздуха, при концентрации ацетона 300 мг/м³ (значение ПДК составляет 200 мг/м³). Ингаляцию осуществляли ежедневно в течение 6 ч на протяжении трех недель. После интоксикации ацетоном животных разделили на 3 группы. Одну группу животных поместили в обычные клетки и в течение семи дней они находились в стандартных условиях вивария (период депривации). Другой группе животных в течение семи дней внутрижелудочно через зонд вводили водный раствор сухого остатка калифена, предварительно освобожденный от спирта путем упаривания в вакууме, в эффективной терапевтической дозе (100 мг общих полифенолов/1 кг массы), разработанной для полифе-

нольных гепатопротекторов [2]. Третьей группе вводили препарат сравнения «Легалон»TM (Германия) в виде суспензии на крахмальной слизи в той же дозе. Контролем служили интактные животные, содержащиеся в стандартных условиях вивария. Использована схема эксперимента, разработанная А. Gajdos [17]. Таким образом, в ходе эксперимента были выделены следующие группы по 8 животных в каждой:

- 1) контроль (интактные);
- 2) ингаляция ацетоном;
- 3) ингаляция ацетоном с последующей отменой (депривация) в течение 7 дней;
- 4) введение калифена в течение 7 дней (в период депривации) после ингаляции ацетоном;
- 5) введение легалона в течение 7 дней (в период депривации) после ингаляции ацетоном.

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.

В мазках крови, окрашенных азур-эозиновой смесью, с помощью окуляр-микрометра определяли диаметр эритроцитов (мкм). Выделение эритроцитов из крови, их средний объем и осмотическую резистентность к снижению концентраций NaCl определяли по общепринятым методам. Состояние антиоксидантной системы в эритроцитах оценивали по активности супероксиддисмутазы (СОД; КФ 1.15.1.1) и уровню восстановленного глутатиона [9]. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) по концентрации малонового диальдегида [4]. Фракционное разделение фосфолипидов осуществляли методом двумерной микротонкослойной хроматографии [25]. Количество общих фосфолипидов и количественное определение каждой фракции — методом [26]. Хроматографическое разделение нейтральных липидов и их количественное определение проводили методом одномерной микротонкослойной хроматографии [14]. Результаты выражали в процентах от общей суммы фракций нейтральных и фосфолипидов соответственно.

Результаты обрабатывали по параметрическому критерию Стьюдента (*t*), используя статистическую программу InStat (Graph Pad Software Inc., USA).

Результаты исследования и их обсуждение

При исследовании среднего диаметра эритроцитов (СДЭ) и их объема (СОЭр) после интоксикации ацетоном отмечались однонаправленные изменения в сторону увеличения по сравнению с таковыми значениями в контроле. Так, СДЭ превышал контрольные значения на 14% ($7,23 \pm 0,05$ мкм против $6,35 \pm 0,02$ мкм в контроле; $p < 0,001$), а СОЭр — на 48% ($75,59 \pm 2,80$ мкм³ против $51,21 \pm 2,71$ мкм³;

$p < 0,001$). Отмечался сдвиг порога начала гемолиза эритроцитов до $0,55 \pm 0,01\%$ NaCl и окончания гемолиза при концентрации NaCl $0,45 \pm 0,01\%$ (в норме гемолиз эритроцитов начинается при концентрации $0,45\%$ NaCl, завершается — при $0,35\%$ NaCl), что свидетельствует о пониженной устойчивости мембран эритроцитов к гемолизирующему агенту. Активность СОД в эритроцитах после интоксикации ацетоном возросла на 38% ($17,94 \pm 1,60$ ед/мг белка против $13,00 \pm 0,76$ ед/мг белка в контроле; $p < 0,01$). При этом величина восстановленного глутатиона (Г-SH) была снижена на 21% ($1,50 \pm 0,02$ нмоль/мг белка по сравнению с $1,90 \pm 0,05$ нмоль/мг белка в контроле; $p < 0,001$). Такое соотношение компонентов системы антиоксидантной защиты предполагает ее напряжение и тенденцию к истощению. Тот факт, что уровень МДА в эритроцитах крыс после интоксикации был на 37% выше, чем в контроле ($8,75 \pm 0,27$ мкмоль/мл против $6,39 \pm 0,28$ мкмоль/мл в контроле; $p < 0,001$), свидетельствует об активации ПОЛ в мембранах эритроцитов.

Изучение липидных показателей в эритроцитарных мембранах после интоксикации ацетоном выявило их значительные изменения по сравнению с таковыми в контроле. Так, в спектре нейтральных липидов (табл. 1) отмечалось статистически достоверное повышение уровня триацилглицеринов (ТАГ) на 12% ($p < 0,05$), холестерина (ХС) на 11% ($p < 0,01$) и снижение эфиров холестерина (ЭХС) на 14% ($p < 0,01$). На фоне высокой концентрации ТАГ количество общих фосфолипидов (ОФЛ) уменьшилось в среднем на 11% ($55,38 \pm 1,26\%$ против $62,44 \pm 1,23\%$ в контроле, $p < 0,001$).

Считается, что компенсаторным ответом на повреждающее действие ксенобиотика является увеличение содержания ХС в мембране, обеспечивающее поддержание упорядоченности ее структуры и сохранение целостности. Это повышение сопровождалось увеличением коэффициента ХС/ОФЛ до $0,45 \pm 0,02$ (в контроле — $0,36 \pm 0,01$; $p < 0,001$). Известно, что в результате встраивания холестерина в мембрану эритроцитов увеличиваются их размеры и изменяется форма: происходит превращение двояковыпуклых дисков в сфероциты и эхиноциты [20].

Анализ фосфолипидного спектра (табл. 2) показал высокий уровень лизофосфатидилхолина (ЛФХ) и лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ) (рост на 23 и 35% соответственно по сравнению с контролем; $p < 0,01$), что обусловлено высокой активностью фосфолипаз. Достоверно снизилось количество основного структурного компонента мембран — фосфатидилхолина (ФХ) на 11% ($p < 0,001$) и метаболически активной фракции — фосфатидилинозита (ФИ) на 36% ($p < 0,001$). Обращают на себя внимание повышение уровня сфингомие-

лина (СМ), являющегося стабилизатором мембран, на 26% ($p < 0,01$), и фосфатидной кислоты (ФК), образующейся при окислении фосфолипидов, на 40% ($p < 0,001$). Известно, что ФИ и ФК необходимы для функционирования мембраносвязанного фермента $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+ \text{-} \text{АТФазы}$ [24], т.е. нарушения их соотношения снижают его активность.

Перераспределение фосфолипидных фракций внутри мембранного бислоя характеризуется расчетом коэффициента ФХ/СМ (наружный монослой), который показал отличия от нормы. Так, после интоксикации ацетоном $K_{\text{ФХ/СМ}} = 2,12$ (в контроле — $2,99$), что предполагает снижение жидкостных свойств (в мембранах с высоким содержанием холестерина низкое содержание воды) и увеличение микровязкости липидного бислоя [15]. При исследовании изменений фосфолипидных фракций, характеризующих внутренний монослой мембраны эритроцитов, таких, как фосфатидилэтаноламин (ФЭ), лизофосфатидилэтаноламин (ЛФЭ) и фосфатидилсерин (ФС), также отмечались рассогласования в их соотношении. Расчет коэффициента ФЭ/ФС показал, что в эритроцитах после интоксикации ацетоном $K_{\text{ФЭ/ФС}} = 2,65$ (в контроле — $3,03$). Эти коэффициенты выявляют перераспределение отдельных классов фосфолипидов внутри мембранного бислоя эритроцитарной мембраны, которое свидетельствует о наличии в нем глубоких структурно-функциональных нарушений. Другой характеристикой лабильности липидного бислоя является его асимметрия. ФХ совместно с СМ преимущественно располагаются во внешнем монослое липидного бислоя мембраны и относятся к холинсодержащим фосфолипидам. В их составе в положении 2 содержится ненасыщенная жирная кислота, а в положении 1 — насыщенная жирная кислота. ФЭ и ФС преимущественно располагаются во внутреннем монослое и относятся к аминсодержащим фосфолипидам. В их составе в обоих положениях содержатся ненасыщенные жирные кислоты. Расчет коэффициента $(\text{ФЭ} + \text{ФС}) / (\text{ФХ} + \text{СМ})$, который отражает отношение суммы фосфолипидов с меньшей насыщенностью жирных кислот к фосфолипидам с большей насыщенностью, позволяет получить представление о жидкостности мембраны. Расчет коэффициента асимметрии показал, что в мембране эритроцитов после интоксикации ацетоном $K = 0,50$ (в контроле — $0,53$). Таким образом, коэффициент асимметрии был ниже контрольной величины, что обуславливает повышение насыщенности липидного бислоя и соответственно потерю воды и увеличение свойства микровязкости. Асимметрия липидного бислоя проявляется не только на структурном, но и функциональном уровне. ФХ, основной структурный фосфолипид, относится к числу нейтральных. Сбалансированность электростатического заряда полярной головки ФХ детерминирована эфирной связью между положительно заряженным холином и

отрицательно заряженным радикалом фосфорной кислоты. СМ (как и ФХ), который локализован во внешнем монослое липидного бислоя и при биосинтезе которого используется фосфорилхолиновая группа, также нейтрален. Нейтральные фосфолипиды представляют группу трудноокисляемых соединений. ФЭ, ФС, ФИ и ФК, расположенные на внутренней стороне бислоя, несут отрицательный заряд. Вследствие действия электростатических сил наличие отрицательно заряженных фосфолипидов приводит к разрыхлению бислоя. Отрицательно заряженные головки фосфолипидов притягивают положительно заряженные ионы H^+ и отталкивают отрицательно заряженные гидроксильные группы из водной среды, что обуславливает легкую окисляемость фосфолипидов этой группы.

Расчет коэффициента окисляемости, характеризующего отношение легкоокисляемых фосфолипидов к трудноокисляемым $(ФЭ+ФС+ФК+ФИ)/(ФХ+СМ)$, показал, что его величина снижалась. Так, в мембране эритроцитов после интоксикации ацетоном $K=0,71$ (в

контроле — 0,74). Уменьшение коэффициента окисляемости, как и коэффициента асимметрии, принято рассматривать в качестве критерия повышения микровязкости и жесткости мембраны [11].

Из вышеизложенного следует, что действие ацетона сопровождается неспецифической реакцией организма, которая проявляется в истощении антиоксидантной защиты, рассогласовании липидной составляющей мембран эритроцитов, что обуславливает увеличение их размерных характеристик, а также сдвиг осмотической резистентности в сторону снижения устойчивости к гемолизирующему агенту. Изменение соотношения фосфолипидных фракций в мембране эритроцитов косвенно предполагает потерю воды, повышение вязкости и жесткости мембран эритроцитов.

В период депривации (3-я группа) средний диаметр эритроцита был равен $6,68 \pm 0,03$ мкм, а $СОЭ_p$ — $59,62 \pm 292$ мм³, что говорит о сохранении макроцитоза. Начало гемолиза происходило при концентрации

Таблица 1

Влияние калифена и легалона на содержание нейтральных липидов в эритроцитах крыс после интоксикации ацетоном ($M \pm m$)

Показатели	1-я группа (контроль)	2-я группа (ацетон)	3-я группа (депривация)	4-я группа (депривация + калифен)	5-я группа (депривация + легалон)
ТАГ	$16,11 \pm 0,58$	$18,00 \pm 0,46^*$	$17,82 \pm 0,42^*$	$16,00 \pm 0,62^{\#}$	$16,02 \pm 0,51^{\#}$
СЖК	$15,00 \pm 0,76$	$17,47 \pm 0,37^{**}$	$16,00 \pm 0,61$	$15,18 \pm 0,43$	$16,38 \pm 0,73$
ЭЖК	$17,78 \pm 0,49$	$17,11 \pm 0,39$	$17,05 \pm 0,54$	$17,69 \pm 0,71$	$17,39 \pm 0,42$
ХС	$22,00 \pm 0,64$	$24,49 \pm 0,51^{**}$	$24,27 \pm 0,42^{**}$	$22,36 \pm 0,69^{\#}$	$21,91 \pm 0,44^{\# \#}$
ЭХС	$18,95 \pm 0,62$	$16,22 \pm 0,68^{**}$	$17,11 \pm 0,56^*$	$18,70 \pm 0,46^{\#}$	$18,86 \pm 0,59^{\#}$
Остаточная фракция	$10,16 \pm 1,17$	$6,71 \pm 0,53$	$7,75 \pm 0,73$	$10,07 \pm 0,62$	$9,44 \pm 1,17$

Примечание. ТАГ — триацилглицерины; СЖК — свободные жирные кислоты; ЭЖК — эфиры жирных кислот; ХС — холестерин; ЭХС — эфиры холестерина.
Различия статистически значимы: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ по сравнению с контролем; # — $p < 0,05$; ## — $p < 0,01$; ### — $p < 0,001$ по сравнению с 3-й группой

Таблица 2

Влияние калифена и легалона на содержание фосфолипидов в эритроцитах крыс после интоксикации ацетоном ($M \pm m$)

Показатели	1-я группа (контроль)	2-я группа (ацетон)	3-я группа (депривация)	4-я группа (депривация + калифен)	5-я группа (депривация + легалон)
ФХ	$39,46 \pm 0,44$	$35,26 \pm 0,61^{***}$	$36,00 \pm 0,57^{***}$	$38,78 \pm 0,59^{\# \#}$	$38,19 \pm 0,54^{\#}$
ЛФХ	$6,72 \pm 0,35$	$8,96 \pm 0,47^{**}$	$9,00 \pm 0,41^{**}$	$6,84 \pm 0,14^{###}$	$7,68 \pm 0,19^{* \# \#}$
СМ	$13,23 \pm 0,51$	$16,67 \pm 0,81^{**}$	$16,33 \pm 0,27^{***}$	$13,79 \pm 0,65^{\# \#}$	$14,25 \pm 0,57^{\# \#}$
ФЭ	$20,66 \pm 0,44$	$18,81 \pm 0,53^*$	$18,43 \pm 0,35^{***}$	$20,32 \pm 0,68^{\#}$	$20,70 \pm 0,96^{\#}$
ЛФЭ	$1,78 \pm 0,11$	$2,40 \pm 0,13^{**}$	$1,96 \pm 0,14$	$1,80 \pm 0,20$	$1,87 \pm 0,23$
ФС	$6,83 \pm 0,12$	$7,12 \pm 0,11$	$7,03 \pm 0,16$	$6,91 \pm 0,24$	$6,37 \pm 0,18^{\#}$
ФИ	$6,72 \pm 0,23$	$4,33 \pm 0,15^{***}$	$4,69 \pm 0,24^{***}$	$6,98 \pm 0,36^{###}$	$6,46 \pm 0,37^{###}$
ФК	$4,61 \pm 0,07$	$6,45 \pm 0,06^{***}$	$6,56 \pm 0,05^{***}$	$4,58 \pm 0,08^{###}$	$4,48 \pm 0,14^{###}$

Примечание. ФХ — фосфатидилхолин; ЛФХ — лизофосфатидилхолин; СМ — сфингомиелин; ФЭ — фосфатидилэтаноламин; ЛФЭ — лизофосфатидилэтаноламин; ФС — фосфатидилсерин; ФИ — фосфатидилинозит; ФК — фосфатидная кислота.
Различия статистически значимы: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ по сравнению с контролем; # — $p < 0,05$; ## — $p < 0,01$; ### — $p < 0,001$ по сравнению с 3-й группой

NaCl $0,50 \pm 0,01\%$, а полный гемолиз наблюдался при концентрации NaCl $0,40 \pm 0,01\%$, что определяет сохранение сниженной устойчивости к гемолизирующему агенту даже в отсутствие ксенобиотика. Активность СОД стала еще выше, чем во 2-й группе ($19,17 \pm 1,80$ ед/мг белка), а по сравнению с контролем — выше на 47% ($p < 0,01$). Также уменьшилось содержание Г-SH до $1,33 \pm 0,05$ нмоль/мг белка, что на 30% ($p < 0,001$) ниже контроля. В то же время, концентрация МДА была выше таковой в контроле на 41% ($9,00 \pm 0,81$ мкмоль/мл; $p < 0,001$). То есть период депривации усугубил разбалансировку компонентов антиоксидантной защиты и усилил процессы ПОЛ. Также период депривации сопровождался более высоким уровнем ХС, чем у крыс 2-й группы, который достоверно превышал и контрольную величину на 21% ($p < 0,01$). Количество общих фосфолипидов стало еще меньше, чем у крыс 2-й группы, и составляло $49,26 \pm 1,34\%$ ($p < 0,001$). Это обусловило повышение коэффициента ХС/ФЛ до $0,51 \pm 0,02$ ($p < 0,001$).

После отмены ацетона (депривация) многие показатели липидного состава эритроцитов к норме не возвратились. Так, показатель ТАГ остался на уровне, зарегистрированном при интоксикации ацетоном. Аналогичная картина отмечалась и для ЛФХ, что говорит о сохраняющейся высокой активности фосфолипаз. Кроме того, на 42% ($p < 0,001$) по сравнению с контролем увеличилось содержание ФК, а СМ и ФИ — осталось на уровне 2-й группы (снижение на 23 и 30% соответственно; $p < 0,01—0,001$). Следовательно, в период отмены токсиканта в течение семи дней полного восстановления физиологических характеристик, показателей антиоксидантной защиты, липидной составляющей мембран эритроцитов не наблюдалось, что определяет сохранение стрессовой реакции после воздействия токсического агента (в частности, ацетона), радикальных реакций и оксидативного поражения мембран. Изменения в липидном составе мембран эритроцитов также могут быть обусловлены устойчивостью патологических сдвигов в соотношении групп липопротеинов плазмы крови. О сохранении сдвигов в соотношении липидных составляющих в мембране эритроцитов и их размерных характеристик в период депривации после интоксикации этиловым спиртом сообщалось ранее [7]. Кроме этого, показано, что в печени крыс в период депривации после интоксикации этиловым спиртом проявляются характерные для стрессовой реакции (химический стресс) глубокие нарушения в липидном обмене печени (рост лизофракций фосфолипидов, СЖК, ТАГ, снижение количества ЭХС, ФХ, ФС) [12], что определяет нарушение структуры липопротеинов, являющихся источником липидов для эритроцитов.

Введение калифена или легалона в течение семи дней после интоксикации ацетоном (соответственно 4-я и 5-я

группы) способствовало нормализации практически всех изученных физиологических и биохимических характеристик эритроцитов. Однако степень выраженности нормализующего эффекта различалась в зависимости от использованного растительного полифенольного комплекса. Так, при введении калифена и легалона соответственно значения СДЭ ($6,33 \pm 0,03$ и $6,70 \pm 0,03$ мкм) и СО-Эр ($50,73 \pm 1,94$ и $60,14 \pm 2,11$ мкм³) были на уровне контроля. Начало гемолиза эритроцитов в обеих группах снизилось до $0,45 \pm 0,01\%$ NaCl, а завершение гемолиза до $0,30 \pm 0,01\%$ NaCl при введении калифена и $0,35 \pm 0,01\%$ NaCl при введении легалона. То есть при введении калифена отмечалась более сильная устойчивость эритроцитов к понижению концентрации NaCl: границы устойчивости выросли на $0,05\%$ NaCl по сравнению с таковыми величинами в контроле. Обращает на себя внимание факт достоверно низкого относительно контроля значения ОФЛ в 5-й группе ($57,43 \pm 1,44\%$; $p < 0,05$), тогда как при введении калифена величина ОФЛ составляла $61,35 \pm 1,33\%$. Количество ХС при введении калифена или легалона относительно 3-й группы (депривация) снизилось на $8—10\%$ ($p < 0,05—0,01$), в связи с чем коэффициент ХС/ФЛ оказался равнозначно сниженным (в среднем $0,37 \pm 0,02$, $p < 0,001$) и соответствовал контрольному уровню. При анализе показателей системы антиоксидантной защиты в 4-й и 5-й группах относительно 3-й группы выделяется группа с введением калифена. Так, активность СОД в 4-й и 5-й группах была ниже таковой в 3-й группе соответственно на 34 и 28% ($12,72 \pm 0,84$ и $13,79 \pm 0,71$ ед/мг белка; $p < 0,01$) при одновременном увеличении Г-SH на 44 и 22% ($1,91 \pm 0,08$ и $1,62 \pm 0,09$ нмоль/мг белка; $p < 0,05—0,001$). В то же время, количество МДА относительно 3-й группы (депривация) при введении калифена было сильнее снижено (на 28% , что составляло $6,52 \pm 0,33$ мкмоль/мл, $p < 0,001$), чем при введении легалона (на 19% , что составляло $7,30 \pm 0,26$ мкмоль/мл, $p < 0,05$).

Введение калифена и легалона сопровождалось восстановлением фракций нейтральных липидов до контрольных величин. Также относительно группы депривации особых различий в действии препаратов не проявлялось: равнозначно снизился уровень ТАГ (в среднем на 10% , $p < 0,05$), ХС (на $8—10\%$, $p < 0,05—0,01$) и увеличился ЭХС (на $9—10\%$, $p < 0,05$).

При сравнении уровней фосфолипидов в эритроцитах 4-й и 5-й групп с таковыми в контроле следует отметить нормализацию практически всех исследованных параметров. Однако обращает на себя внимание факт статистически достоверно высокого содержания ЛФХ в группе с введением легалона (на 14% , $p < 0,05$), т.е. сохранялась повышенная активность фосфолипаз. В то же время при сравнении с группой депривации (3-я группа) показатели всех исследованных фракций в 4-й

и 5-й группах (с введением препаратов) статистически достоверно различались. Так, при введении калифена и легалона количество ФХ увеличилось соответственно на 8% ($p < 0,01$) и 6% ($p < 0,05$) при одновременном снижении ЛФХ на 24% ($p < 0,001$) и 15% ($p < 0,01$) и СМ — на 13—16% ($p < 0,01$). Количество ФИ соответственно возросло на 49% ($p < 0,001$) и 38% ($p < 0,001$), а ФК — уменьшилось в среднем на 30—32% ($p < 0,001$).

Заключение

Исследование физиологических и биохимических показателей эритроцитов крови крыс после интоксикации ацетоном показало выраженную картину нарушений антиоксидантной защиты и рассогласование липидной составляющей мембран. Применение БАД «Калифен» и препарата сравнения «Легалон» в течение семи дней после интоксикации нормализовало исследованные параметры. Биохимический механизм обусловлен тем, что растительные полифенолы, входящие в состав калифена и легалона, имеют способность улавливать свободные оксигенные и пероксильные радикалы, образуя при этом относительно стабильный феноксил-радикал [23], что в значительной степени сдерживает процессы перекисного окисления липидов и снимает состояние оксидативного стресса [22]. Восстановительный эффект объясняется еще и тем, что молекулы полифенолов, взаимодействуя с поверхностью мембран, способны образовывать мономолекулярные слои, увеличивающие прочность поверхностного слоя клеток и, соответственно, снижающие возможность атаки радикалами [1]. Данное свойство полифенолов способствует не только нормализации размерных характеристик эритроцитов и их осмотической резистентности, но и расширению границ устойчивости к гемолизирующему агенту, что обеспечивает большую лабильность клеток крови при прохождении через мелкие капилляры. Однако при сравнении выраженности восстановительного эффекта действия легалона и калифена проявляются определенные преимущества последнего. Известно, что в состав легалона входит активная группа изомерных флавоноидных соединений (силибинин, силикретин, силидианин), не образующих олигомерных форм. Видимо калифен, будучи комплексом олигомерных и полимерных веществ, демонстрирует антиоксидантные и антирадикальные свойства в большей степени, чем мономеры легалона.

Известно, что растительные полифенолы восстанавливают этерифицирующую функцию печени, как результат, соотношение липидных компонентов в липопротеинах (поставщики липидов в эритроцитарные мембраны) [12]. Это сопровождается снижением в мембранах эритроцитов количества ТАГ, СЖК, увеличением ФХ и метаболически активных фракций. Феномен снижения ХС и рост ЭХС объясняется тем, что молекулы поли-

фенолов активируют фермент лецитин:холестерин-ацил-трансферазу [3], который обуславливает выведение ХС из мембран и поступление в гепатоцит возросшего потока ХС в этерифицированной форме в составе липопротеинов высокой плотности. Факт достоверного снижения уровня лизофракций (ЛФХ и ЛФЭ) свидетельствует об ингибировании фосфолипаз растительными полифенолами [18].

Таким образом, полученные результаты указывают на мембранопротекторные свойства калифена и легалона в условиях интоксикации ацетоном. Проведенные исследования показали эффективность применения калифена в восстановлении физиологических характеристик, антиоксидантной защиты и липидной составляющей мембран эритроцитов, что оправдывает его использование в качестве компонента системы комплексной реабилитации во время стационарного лечения.

Список литературы

1. Афанасьева Ю.Г., Фахретдинова Е.Р., Спирихин А.В., Насибуллин Р.С. О механизме взаимодействия некоторых флавоноидов с фосфатидилхолином клеточных мембран // Хим.-фарм. журнал. — 2007. — Т. 41, №7. — С. 12—14.
2. Венгеровский А.Н., Маркова И.В., Саратиков А.С. Доклиническое изучение гепатопротективных средств // Ведомости фарм. комитета. — 1999. — №2. — С. 9—12.
3. Гаскина Т.К., Курилович С.А., Горчаков В.Н. Изменение скорости лецитинхолестеролацилтрансферазной реакции и липидных показателей сыворотки крови под влиянием катергена в условиях острого экспериментального перерождения печени // Вопр. мед. хим. — 1989. — Т. 35, №4. — С. 24—28.
4. Гончаренко М.С., Латинова А.М. Метод оценки перекисного окисления липидов // Лаб. дело. — 1985. — №1. — С. 60—61.
5. Дмитриева Т.Б., Игонин А.Л., Клименко Т.В. и др. Острая интоксикация психоактивными веществами (опьянение опиоидами, каннабиоидами, седативно-снотворными средствами, стимуляторами, галлюциногенами и летучими растворителями) // Наркология. — 2002. — №7. — С. 8—12.
6. Зинчук В.В. Деформируемость эритроцитов: Физиологические аспекты // Успехи физиол. наук. — 2001. — Т. 32, №3. — С. 66—78.
7. Кушнерова Н.Ф., Лесникова Л.Н. Влияние хаурантина на процессы восстановления липидной составляющей мембран эритроцитов после поражения этиловым спиртом // Наркология. — 2003. — №5. — С. 25—28.
8. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. — М.: Слово, 2006. — 556 с.
9. 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 Дальневосточного университета, 2003. — 78 с.
10. Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф. Калина — новый нетрадиционный источник олигомерных проантоцианидинов // Хим.-фарм. журнал. — 2004. — Т. 38, №2. — С. 41—45.
11. Титов В.Н. Нарушение транспорта в клетки насыщенных жирных кислот в патогенезе эссенциальной гипертензии // Вопр. мед. химии. — 1999. — Т. 46. — Вып. 6. — С. 613—624.
12. Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Гордейчук Т.Н. Сравнительная оценка эффективности применения растительных комплексов для восстановления метаболических процессов в печени после поражения этиловым спиртом // Наркология. — 2003. — №3. — С. 37—42.

13. Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Кушнерова Т.В. Обоснование применения проантоцианидинов в комплексной терапии хронического алкоголизма // Наркология. — 2007. — №7. — С. 46—51.
14. Amenta J.S. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography // J. Lipid. Res. — 1964. — Vol. 5, №2. — P. 270—272.
15. Broncel M., Chojnowska-Jezierska J., Koter-Mikhalak M., Franiak I. Erythrocyte fluidity in patients with hyperlipidemia during statins therapy // Pol. Arch. Med. Wewn. — 2005. — Vol. 113, №6. — P. 531—537.
16. Filippov A., Oradd G., Lindblom G. The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers // Biophys. J. — 2003. — Vol. 84, №5. — P. 3079—3086.
17. Gajdos A., Gaidos-Torok M., Horn R. Therapeutic effect of the (+)-catechin on biochemical disorders of the liver in the ethanol intoxicated rat // C.R. Seances Soc. Biol. Fil. — 1972. — Vol. 166, №2. — P. 277—279.
18. 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, №3. — P. 411—415.
19. Kumagai S., Oda H., Matsunaga I. et al. Uptake of 10 polar organic solvents during short-term respiration // Toxicol. Sci. — 1999. — Vol. 48, №2. — P. 255—263.
20. Lindi C., Montorfano G., Marciani P. Rat erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation after chronic ethanol intake // Alcohol. — 1998. — Vol. 16, №4. — P. 311—316.
21. Muttray A., Martus P., Schachtrup S. et al. Acute effects of an organic solvent mixture on the human central nervous system // Eur. J. Med. Res. — 2005. — Vol. 10, №9. — P. 381—388.
22. Pignatelli, P., Ghiselli A., Buchetti B. et al. Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine // Atherosclerosis. — 2006. — Vol. 188, №1. — P. 77—83.
23. Re R., Pellegrini N., Proteggente A. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay // Free Radic. Biol. Med. — 1999. — Vol. 26, №9—10. — P. 1231—1237.
24. Satoh T., Cohen H.T., Ratz A.I. Intracellular signaling in the regulation of renal Na⁺-K⁺-ATP-ase // Clin. Invest. — 1993. — Vol. 91. — P. 409—415.
25. Svetachev V.I., Vaskovsky V.E. A simplified technique for thin layer microchromatography of lipids // J. Chromatogr. — 1972. — Vol. 67, №2. — P. 376—378.
26. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasenden I.M. A universal reagent for phospholipid analysis // J. Chromatography. — 1975. — Vol. 114, №1. — P. 129—141.

THE INFLUENCE OF ACETONE ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF RATS ERYTHROCYTES AND THEIR CORRECTION BY THE EXTRACT FROM VIBURNUM (*VIBURNUM SARGENTII*)

KUSHNEROVA N.F.

Dr. of Biol. Sci., V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute,
Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok; e-mail: pacific@vlad.ru

FOMENKO S.E.

Cand. of Biol. Sci., principal scientific fellow of laboratory of Biochemistry,
V.I. Il'ichev Pacific Oceanologic Institute, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok

KUSHNEROVA T.V.

A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology of Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok

DRUGOVA E.S.

senior laboratory assistant of Biochemistry,
V.I. Il'ichev Pacific Oceanologic Institute, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok

*It was shown the ability of restoration of erythrocyte membranes that damaged with acetone by preparation «Kalifen» that had been secured from the guelder-rose (*Viburnum sargentii* Koechne). Biologically active food supplement «Kalifen» promotes to restore the status of antioxidants, to normalize a parity individual lipids components in erythrocyte membranes, average volume and diameter of erythrocyte. Restoration lipids components of erythrocyte membranes have caused normalization of their osmotic resistance and increase hemolytic rigidity.*

Key words: acetone, erythrocytes, system of antioxidation protection, osmotic resistance, lipids, kalifen