

УДК 615.36:576.31:616.36—002—08

А. В. Шевченко, Н. М. Дорошенко

К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ СПЛЕНИНА

Клиническое и экспериментальное изучение спленина показало, что его терапевтический эффект в значительной степени связан с влиянием на печень [6], но механизм действия спленина на функцию этого органа, а также на организм в целом еще не полностью выяснен. Наши эксперименты направлены на раскрытие некоторых звеньев этого механизма.

Исследования начали с изучения влияния спленина на показатели функционального состояния печени (элиминацию из крови бромсульфофталеина, скорость секреции желчи, скорость выведения с желчью бромсульфофталеина, активность щелочной фосфатазы сыворотки крови) при экспериментальном гепатите. Полученные данные сопоставили с результатами исследования действия спленина на функциональные характеристики клеточных мембран (оболочек эритроцитов) *in vitro*.

Методика исследований

Опыты проведены на 46 крысах-самцах линии Вистар массой 200—250 г. Животных разделили на четыре группы: I группа — контроль; II и III группы — крысы, которым подкожно вводили 0,5 мл/100 г CCl_4 в разведении 1:1 сливовым маслом пять раз через день (исследовали показатели у животных II группы на следующий день после последней инъекции CCl_4 , у животных III группы — через 10 дней); IV группа — животные, которым после инъекции CCl_4 внутримышечно вводили спленин (0,25 мл/100 г) в течение 10 дней. Активность щелочной фосфатазы [КФ 3.1.3.1] сыворотки крови определяли по [8]. Скорость очищения крови от бромсульфофталеина (БСФ) — по [14]. Интенсивность желчеотделения и экскрецию бромсульфофталеина с желчью изучали в остром опыте. Для этого голодавших 18 ч крыс наркотизировали барбиталом (внутрибрюшинно 1 мл/100 г 1 % раствора), фиксировали в станках и помещали на подогре-

Влияние спленина на показатели функционального состояния

Группа животных	Воздействие	Статистический показатель	Щелочная фосфатаза мг/100 мл час при 37°С	Клиренс БСФ
I	n = 10 Контроль	$M \pm m$	22,1±1,64	0,0886±0,0033
II	n = 12 CCl_4	$M \pm m$	56,0±3,66	0,0564±0,0030
		p	<0,001	<0,001
III	n = 12 CCl_4 + 10 дней	$M \pm m$	33,4±1,74	0,0688±0,0048
		p	<0,001	<0,01
IV	n = 12 CCl_4 + 10 дней спленин	$M \pm m$	21,0±1,97	0,1048±0,0038
		p	>0,5	<0,001
		p_1	<0,001	<0,001

p — достоверность различий по отношению к I группе животных; p_1 — достоверность раз-

К вопросу о механизме дейс

ваемую подстилку, затем в Желчь собирали в течение 1 мин/100 г. В пробах желчи определяли интенсивность ж-ра БСФ. Интенсивность ж-ра БСФ за 1 мин/100 г. Гемолиз эритроцитов, ствием (встряхиванием), из тов (ОРЭ) исследовали по

Результ

Результаты исслед-но, что введение CCl_4 а также уменьшает ск-торой остается норма-воротке при этом увели-после последнего введе-но выраженность их не-после введения CCl_4 б-нина, изучаемые показ-лись от нормы, а клире-

Как известно, бро-что введенный внутри-ватывается клетками п-Рядом исследователей-БСФ печенью осущест-верхностной зоны пари-ного связывания БСФ-виями нормального те-количество альбумино-вотока в печени; 3) со-ментов печени [10]. П-нарушение проницаемо-изменение клиренса БС-

печени крыс с экспериментал

Скорость секреция желчи мг/мин/100 г	
5,5±0,31	1,08
5,9±0,26	0,62
>0,25	<
4,9±0,23	0,60
>0,1	<
5,6±0,23	1,09
>0,5	>
<0,05	<

личий между III и IV групп

Дорошенко

ДЕЙСТВИЯ СПЛЕНИНА

Изучение спленина показало, что степень связи с влиянием спленина на функцию этого еще не полностью выяснен.крытие некоторых звеньев это-

изучения спленина на показатели аминацию из крови бромсульфоскорость выведения с желчью той фосфатазы сыворотки кро-полученные данные сопоставили спленина на функциональные (мочек эритроцитов) *in vitro*.

исследований

и Вистар массой 200—250 г. Живот-роль; II и III группы — крысы, кото-дении 1:1 сливовым маслом пять раз II группы на следующий день после — через 10 дней); IV группа — живот-но вводили спленин (0,25 мл/100 г) атазы [КФ 3.1.3.1] сыворотки крови ромсульфоталейна (БСФ) — по [14]. сульфоталейна с желчью изучали в аркотизировали барбамилом (внутри-и в станках и помещали на подогре-

показатели функционального состояния

Щелочная фосфатаза мг/100/мл час при 37°C	Клиренс БСФ
22,1±1,64	0,0886± 0,0033
56,0±3,66	0,0564± 0,0030
<0,001	<0,001
33,4±1,74	0,0688± 0,0048
<0,001	<0,01
21,0±1,97	0,1048± 0,0038
>0,5	<0,001
<0,001	<0,001

не животных; p_1 — достоверность раз

ваемую подстилку, затем в общий желчный проток вставляли полиэтиленовую канюлю. Желчь собирали в течение 3 ч после внутривенного введения 0,1 мл/100 г 5 % раство-ра БСФ. Интенсивность желчеотделения выражали в мг желчи, выделившейся за 1 мин/100 г. В пробах желчи, которую собирали через 30, 60, 120 и 180 мин после ве-дения красителя, определяли количество экскретированного БСФ спектрофотометри-чески при длине волны 575 нм. Скорость экскреции БСФ выражали в мг выведенного БСФ за 1 мин/100 г.

Гемолиз эритроцитов, вызванный гипотоничностью среды и механическим воздей-ствием (встряхиванием), изучали по [11, 13]. Осмотическую резистентность эритроци-тов (ОРЭ) исследовали по [2], позволяющим получить кривые динамики гемолиза.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты исследований представлены в таблице, из которой вид-но, что введение CCl_4 на 11 день эксперимента снижает клиренс БСФ, а также уменьшает скорость выведения красителя с желчью, отток ко-торой остается нормальным. Активность щелочной фосфатазы в сы-воротке при этом увеличивается более чем в два раза. Через 10 дней после последнего введения CCl_4 перечисленные изменения сохраняются, но выраженность их несколько уменьшается. У животных же, которым после введения CCl_4 был проведен десятидневный курс инъекций спле-нина, изучаемые показатели функции печени существенно не отлича-лись от нормы, а клиренс БСФ был даже несколько увеличен.

Как известно, бромсульфоталейновая проба базируется на том, что введенный внутривенно бромсульфоталейн почти полностью зах-ватывается клетками паренхимы печени и затем выделяется с желчью. Рядом исследователей [7, 9] было показано, что процесс поглощений БСФ печенью осуществляется при участии транспортной системы по-верхностной зоны паринхиматозных клеток печени после предваритель-ного связывания БСФ с альбуминами плазмы крови. Основными усло-виями нормального течения этого процесса являются: 1) достаточное количество альбуминов в плазме крови; 2) отсутствие нарушения кро-вотока в печени; 3) сохранение целостности структуры клеточных эле-ментов печени [10]. Поскольку [12] было показано, что CCl_4 вызывает нарушение проницаемости клеточной оболочки, можно полагать, что изменение клиренса БСФ при отравлении CCl_4 связано в значительной

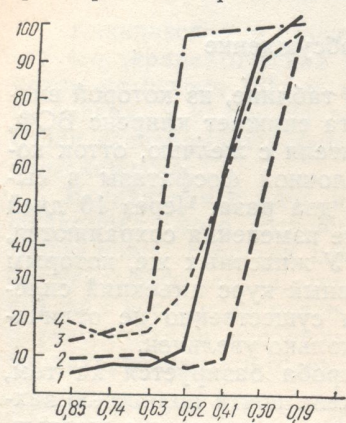
печени крыс с экспериментальным гепатитом

Скорость секрeции желчи мг/мин/100 г	Скорость экскреции БСФ с желчью мг/мин/100 г.			
	Время исследования			
	30 мин	60 мин	120 мин	180 мин
5,5±0,31	1,08±0,17	0,60±0,04	0,13±0,01	0,02± 0,004
5,9±0,26	0,62±0,06	0,57±0,04	0,21±0,02	0,06± 0,004
>0,25	<0,05	>0,5	<0,002	<0,001
4,9±0,23	0,60±0,05	0,58±0,04	0,30±0,04	0,08±0,01
>0,1	<0,02	>0,5	<0,001	<0,001
5,6±0,23	1,09±0,08	0,66±0,08	0,18±0,02	0,08±0,01
>0,5	>0,5	>0,5	<0,05	<0,001
<0,05	<0,001	>0,25	<0,01	>0,5

личий между III и IV группами животных.

степени именно с этим нарушением. Поэтому нормальные показатели функционального состояния печени у животных, получавших после за-
травки CCl_4 спленин, можно расценивать как результат восстановления мембранных характеристик гепатоцитов под действием спленина.

Этому предположению мы попытались найти подкрепление в опы-
тах *in vitro*. Была использована экспериментальная модель, широко при-
меняющаяся в фармакологических исследованиях для выявления мем-
бранотропности различных веществ. Суть ее состоит в том, что эритро-



циты подвергаются воздействию различ-
ных гемолизирующих факторов (гипото-
ничности среды, встряхивания и др.) в
присутствии исследуемых веществ или
после предварительного контакта с ними.
Результаты исследований оцениваются
по характеру и степени изменений гемо-
лиза. На основе аналогичности физико-
химических свойств мембранных образо-

Влияние спленина на осмотическую резистентность
эритроцитов в норме и при воздействии на них
ионов кадмия.

По вертикали — процент гемолиза; по горизонтали —
концентрация хлористого натрия (в %). 1 — физиологи-
ческий раствор; 2 — спленин; 3 — кадмий+физиологи-
ческий раствор; 4 — кадмий+спленин.

ваний всех клеток допускается экстраполяция данных, полученных на
эритроцитарных моделях, и на другие клетки.

Нами было обнаружено, что спленин уменьшает гемолиз эритроци-
тов крыс в гипотонической среде на 40—60 % ($p < 0,01$). При механи-
ческом воздействии на эритроциты (встряхивание в шуттель-аппара-
те) задержка гемолиза в присутствии спленина составляла 60—85 %
($p < 0,01$).

Обнаруженная далее способность спленина ингибировать на 60—
75 % ($p < 0,001$) термокоагуляцию альбумина дала основание предпо-
ложить, что его антигемолизирующее действие обусловлено влиянием
на белковый компонент (апопротеин) липопротеиновых (ЛП) ком-
плексов мембран.

Для проверки этого предположения мы провели исследование влия-
ния спленина на осмотическую резистентность эритроцитов в условиях
действия одного из гемолитических ядов — двухлористого кадмия. Как
известно [3, 5], ионы тяжелых металлов уменьшают ОРЭ вследствие
вызываемых ими химических изменений липопротеинового каркаса
мембраны [1], стабильность которого зависит от реакционной способ-
ности и состояния тиоловых группировок апопротеиновой части ЛП
комплексов [4]. Тяжелые металлы, являясь тиоловыми ядами, блоки-
руют SH-группы и тем самым вызывают деструктивные изменения кле-
точной мембраны.

Осмотическую резистентность эритроцитов мы исследовали мето-
дом, позволяющим получить кривые динамики гемолиза. Из рисунка
следует, что сам спленин увеличивает резистентность эритроцитов
(сдвиг кривой вправо), ионы же кадмия снижают их резистентность
(сдвиг кривой влево).

При инкубации эритроцитов одновременно с солями кадмия и
спленином характерного для солей кадмия сдвига влево не наблюда-
ется, — кривая гемолиза проходит на уровне контроля. На этом осно-

вании можно счита-
и ионы кадмия, но

Таким образом
ют предположение
тические мембраны
является предотвра
и реакционной спос
протениновых компл

А.

ON T

Splenin administrat
rats with toxic hepatitis
splenin increases consid
and osmotic resistance (u
Comparison of these fact
the splenin therapeutic a
cell membranes which is
proteins.

Institute of Endocrinology
Metabolism, Kiev

1. Атянина Т. Ф. О роли
ции тканевых липоп
1972. 27 с.
2. Василевская Н. Л. М
сперим. биологии и ме
3. Лизлун Т. Б., Михай
цитов при действии с
Атеросклероз и мембр
4. Соколовский В. В., А
групп в конъюгирова
с. 738—741.
5. Соколовский В. В., Д
эритроцитарной мемб
склероз и мембранная
6. Шевченко А. В. Спле
вое о гормонах и меха
7. Baker R., Bradley S. I
min. Its role in hepati
8. Bodansky A. Phosphat
influencing the accurac
9. Goldstein J., Combes E
talyzes sulfobromophth
№ 5, p. 830—833.
10. Goresky C. A. The hep
Canad. Med. Assoc. J.,
11. Inglot A. D., Wolna I
erythrocyte membrane
12. Limmerman H., Mao K
cellular enzymes to s
p. 688—692.
13. Mizushima Y., Sakai,
matory drugs.—Bioche
14. Rosenthal S., White E.
tic function.—J. Amer.

Киевский институт эндокр
и обмена веществ

Поэтому нормальные показатели животных, получавших после заваривания как результат восстановления эритроцитов под действием спленина. Мы нашли подкрепление в экспериментальной модели, широко применяемой для выявления мембранной ее состоит в том, что эритроциты подвергаются воздействию различных стабилизирующих факторов (гипотонии среды, встряхивания и др.) в присутствии исследуемых веществ или предварительного контакта с ними. Результаты исследований оцениваются по характеру и степени изменений гемоглобина на основе аналогичности физико-химических свойств мембранных образований.

спленина на осмотическую резистентность эритроцитов в норме и при воздействии на них ионов кадмия.

1 — процент гемолиза; по горизонтали — концентрация хлористого натрия (в %). 1 — физиологический раствор; 2 — спленин; 3 — кадмий+физиологический раствор; 4 — кадмий+спленин.

поляция данных, полученных на эритроциты.

спленин уменьшает гемолиз эритроцитов до 60% ($p < 0,01$). При механическом встряхивании в шуттель-аппарате спленина составляла 60—85%

спленина ингибировать на 60—85% бумина дала основание предположить, что действие обусловлено влиянием липопротеиновых (ЛП) комплексов.

Мы провели исследование влияния спленина на эритроциты в условиях воздействия двуххлористого кадмия. Как известно, ионы кадмия уменьшают ОРЭ вследствие нарушения липопротеинового каркаса, который зависит от реакционной способности апопротеиновой части ЛП. Влияя тиоловыми ядами, блокируя деструктивные изменения клеточной мембраны.

Эритроциты мы исследовали методами гемолиза. Из рисунка видно, что резистентность эритроцитов снижается при действии кадмия.

Вместе с солями кадмия и при сдвиге влево не наблюдается сдвиг вправо. На этом основании можно считать, что спленин имеет ту же точку приложения, что и ионы кадмия, но действует в противоположном направлении.

Таким образом, полученные в экспериментах данные подтверждают предположение о стабилизирующем действии спленина на плазматические мембраны клеток. Основой этого действия, вероятнее всего, является предотвращение конформационных изменений апопротеинов и реакционной способности сульфгидрильных групп мембранных липопротеиновых комплексов.

A. V. Shevchenko, N. M. Doroshenko ON THE MECHANISM OF SPLENIN ACTION

Summary

Splenin administration favours essentially indices of the liver function tests in rats with toxic hepatitis resulted from CCl_4 injection. The in vitro experiments show that splenin increases considerably erythrocyte membrane resistance to mechanical damage and osmotic resistance (under conditions of cadmium ions' simultaneous action included). Comparison of these facts permits a supposition to be advanced that the mechanism of the splenin therapeutic action is considerably related to its stabilizing effect on surface cell membranes which is based on the property to avert conformational changes in apo-proteins.

Institute of Endocrinology and Metabolism, Kiev

Список литературы

- Атянина Т. Ф. О роли тиоловых группировок в механизме образования и диссоциации тканевых липопротеиновых комплексов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Л., 1972. 27 с.
- Василевская Н. Л. Методика определения резистентности эритроцитов. — Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1955, № 12, с. 68—72.
- Лизлун Т. Б., Михайлова Т. А., Устрадзева Л. Г. Резистентность мембран эритроцитов при действии окислителей. — В кн.: Тр. Ленинград. сан. гиг. мед. института. Атеросклероз и мембранная проницаемость. Л., 1974, т. 106, с. 45—48.
- Соколовский В. В., Атянина Т. Ф., Сорокин А. И. Об участии сульфгидрильных групп в конъюгировании белков с липидами. — Докл. АН СССР, 1973, 209, № 3, с. 738—741.
- Соколовский В. В., Давлетов Э. Г. О влиянии ртути и кадмия на проницаемость эритроцитарной мембраны. — В кн.: Тр. Ленинград. сан. гиг. мед. института. Атеросклероз и мембранная проницаемость, 1974, т. 106, с. 42—44.
- Шевченко А. В. Спленин — биологически активный фактор селезенки. — В кн.: Новое о гормонах и механизме их действия. Киев, 1977, с. 350—359.
- Baker R., Bradley S. Binding of sulfobromophthalein (BSP) sodium by plasma albumin. Its role in hepatic BSP extraction. — J. Clin. Invest. 1966, 45, p. 281—287.
- Bodansky A. Phosphatase studies. II. Determination of serum phosphatase: factors influencing the accuracy of the determination. — J. Biol. Chem., 1933, 101, p. 93—95.
- Goldstein J., Combes B. The effect of steroids on the activity of the enzyme that catalyzes sulfobromophthalein glutathione conjugation. — J. Lab. and Clin. Med., 1966, 67, № 5, p. 830—833.
- Goresky C. A. The hepatic uptake and excretion of sulfobromophthalein and bilirubin. — Canad. Med. Assoc. J., 1969, 92, № 16, p. 851—857.
- Inglot A. D., Wolna E. Reactions of non-steroidal anti-inflammatory drugs with the erythrocyte membrane. — Biochem. Pharmacol., 1968, 17, N 2, p. 269—279.
- Limmerman H., Mao R. Cytotoxicity of carbon tetrachloride as measured by loss of cellular enzymes to surrounding medium. — Amer. J. Med. Sci., 1965, 250, N 6, p. 688—692.
- Mizushima Y., Sakai, Yamaura. Mode of stabilizing action of nonsteroid anti-inflammatory drugs. — Biochem. Pharmacol., 1970, 19, p. 227—234.
- Rosenthal S., White E. Clinical application of the bromsulfophthalein test for hepatic function. — J. Amer. Med. Assoc., 1925, 84, N 15, p. 1112—1114.

Киевский институт эндокринологии и обмена веществ

Поступила в редакцию 23.V 1979 г.