

притока крови к калия в области 10—15 ммоль мембранны может выделяющегося яризации ионами ил покоя мемб- электрогенного Однако, к настоящ- льных данных в

ы, сопровождаю- естия ионов ка- вязано с тем, что выем, концентра- повышается посте- вих концентраций

smooth muscles of the muscle cell membrane response of muscle increase in K<sup>+</sup> ion action. It is supposed that Ca<sup>2+</sup> ions which dependent Ca channels and voltage-dependent time the K-containing the cells through the cell membrane.

локального крово- град, 1977. 22 с. нонов калия в регу- 61, № 4, с. 577—

калия на электро- курн. ССР, 1980,

activation or contrac- muscle. Berlin, 1976,

activation of cont- coupling in smooth

mm and pH as de- N 2, p. 240—247. s contracted with

ила в редакцию 22.V 1981 г.

и 1982) методом с определением концентрации CO<sub>2</sub> в изолированной мембране (методом дыхания). УДК 616—003.725:576.8.094.7:577.152

А. В. Шевченко, Г. В. Тюленева

## СТАБИЛИЗИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ СПЛЕНИНА НА МЕМБРАНЫ ЛИЗОСОМ ПЕЧЕНИ КРЫС

При изучении механизма действия спленина важное значение имеет исследование его влияния на мембранны клеточных структур. Нами ранее установлено стабилизирующее действие спленина на мембранны эритроцитов в опытах *in vitro* [14]. Исследование влияния спленина на экскреторную, антитоксическую и секреторную функцию печени у облученных животных дало возможность предположить, что этот препарат стабилизирует мембранны гепатоцитов [15].

Развитие любого патологического процесса, как известно, тесно связано с функциональным состоянием лизосомальных мембран. Исходя из предположения, что лечебный эффект спленина в какой-то мере обусловлен его действием на мембранные структуры клетки, мы исследовали влияние этого препарата на проницаемость мембран лизосом печени *in vivo* у интактных животных и при экспериментальном гепатите. В качестве маркерного фермента лизосом использовали кислую фосфатазу (КФ 3.1.3.2).

### Методика исследований

Исследования проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 180—250 г. Спленин вводили крысам внутримышечно в течение семи дней ежедневно в виде 10 % раствора в дозе 0,25 мл/100 г. Экспериментальный гепатит вызывали пятикратным внутрибрюшинным введением через день 0,5 мл/100 г 50 % масляного раствора CCl<sub>4</sub>. Животные были разделены на шесть групп: I — интактные крысы, контроль; II — крысы, которым вводили спленин; III — CCl<sub>4</sub>; IV — CCl<sub>4</sub> и спленин одновременно пять раз через день; V — CCl<sub>4</sub> (с забоем животных на восьмой день после окончания введения CCl<sub>4</sub>); VI — после введения CCl<sub>4</sub> вводили спленин. Животных декапитировали спустя 24 ч после прекращения введения препаратов. Перед забоем животные голодали не менее 12 ч. Печень перфузировали холодным 0,25 M раствором сахарозы *in situ*, извлекали, измельчали ножницами и гомогенизовали в стеклянном гомогенизаторе с тefлоновым пестиком для получения 10 % гомогената. Для характеристики проницаемости мембран лизосом активность кислой фосфатазы исследовали в надосадочной жидкости, которую получали центрифугированием гомогената печени в течение часа при 105 000 g (центрифуга Spinco L 2-65 B, ротор SW 25,2). Фракцию лизосом выделяли по [16]. Общую и свободную активность кислой фосфатазы во фракциях лизосом определяли по [16, 18]. Для определения активности кислой фосфатазы использовали в качестве субстрата β-глицерофосфат, натриевую соль. Неорганический фосфор определяли по [17], белок — по [19]. Все процедуры проводили при температуре 0—2°C. Чистоту фракций выделенных лизосом определяли электронномикроскопически. Для изучения влияния спленина на изолированные лизосомы была проведена специальная серия опытов, позволяющая судить о влиянии этого препарата на стабильность мембран лизосом. Выделенную лизосомальную фракцию инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C в 0,25 M растворе сахарозы (рН 7,4), содержащей 10 % раствор спленина и тритон X-100 в возрастающих концентрациях (конечные концентрации 0,025; 0,05 и 0,1 %). Общую и неседиментируемую активность лизосомальной кислой фосфатазы определяли в надосадочной жидкости, полученной центрифугированием фракции лизосом при 10 000 g в течение 25 мин. Активность фермента рассчитывали в мкмолях неорганического фосфора (P<sub>и</sub>), отщепленного от субстрата за 60 мин инкубации при температуре 37°C в расчете на 1 мг белка.

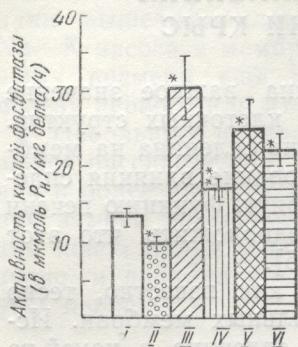
Полученные данные обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

### Результаты исследований

Опыты *in vivo* показали, что спленин не влиял на активность кислой фосфатазы в лизосомальной фракции печени интактных крыс (II группа), хотя в надосадочной жидкости отмечалось некото-

рое снижение ее активности по сравнению с контролем (табл. 1 и рисунок).

Выраженные изменения активности фермента отмечались при  $\text{CCl}_4$  гепатите (III группа). Они состояли в уменьшении общей активности кислой фосфатазы (на 33 % по сравнению с контрольной группой) и повышении свободной активности этого фермента (в 3,5 раза по сравнению с нормой). Активность кислой фосфатазы в надосадочной



Влияние спленина на активность кислой фосфатазы в надосадочной жидкости гомогената печени крыс.

I — контроль; II — спленин; III —  $\text{CCl}_4$ ; IV —  $\text{CCl}_4$ +спленин (одновременное введение); V —  $\text{CCl}_4$  (забой на восьмой день); VI —  $\text{CCl}_4$ +спленин (введение спленина после окончания затравки). Одна звездочка у вершины столбика — достоверность изменений по сравнению с контролем ( $p<0,05$ ); две звездочки — достоверность изменений IV группы по сравнению с III группой ( $p<0,05$ ).

жидкости гомогената печени животных этой группы была почти в три раза выше нормы (см. рисунок). Несколько иная картина распределения активности фермента отмечалась у животных V группы. В лизосомальной фракции общая активность фермента не снижалась, а напротив, значительно увеличивалась (в 1,9 раза) по сравнению с III группой и в 1,3 раза — по сравнению с контролем. Свободная активность фермента была ниже, чем у животных III группы, но превышала норму в 2,4 раза. В надосадочной жидкости гомогената печени крыс этой группы не было выявлено достоверных изменений по сравнению с III группой, а по сравнению с контролем активность фермента была увеличена в два раза.

Таблица 1  
Влияние спленина на активность кислой фосфатазы во фракции лизосом печени крыс *in vivo* ( $M \pm m$ )

Исследуемые группы	n	Кислая фосфатаза	
		Общая активность (мкмоль $P_i$ /мг белка/ч)	Свободная активность (в % от общей активности)
I Интактные	12	$2,66 \pm 0,14$	$13,0 \pm 1,0^{**}$
II Спленин	8	$2,33 \pm 0,09$ $p > 0,05$	$12,4 \pm 1,2$ $p > 0,5$
III $\text{CCl}_4$	11	$1,79 \pm 0,06$ $p < 0,001$	$45,4 \pm 5,0$ $p < 0,001$
IV $\text{CCl}_4$ +спленин (одновременное введение)	7	$2,42 \pm 0,10$ $p > 0,2$ $p_{(3-4)} < 0,001$	$20,0 \pm 2,4$ $p < 0,02$ $p_{(3-4)} < 0,001$
V $\text{CCl}_4$ (забой на восьмой день)	10	$3,39 \pm 0,11$ $p < 0,001$ $p_{(3-5)} < 0,001$	$31,2 \pm 4,0$ $p < 0,001$ $p_{(3-5)} < 0,02$
VI $\text{CCl}_4$ +спленин после окончания затравки	11	$2,09 \pm 0,14$ $p < 0,01$ $p_{(4-6)} > 0,05$ $p_{(5-6)} < 0,001$	$25,3 \pm 2,9$ $p < 0,001$ $p_{(4-6)} > 0,1$ $p_{(5-6)} > 0,2$

Примечание.  $p$  — в скобках — достоверность различий сравниваемых групп животных, без скобок — достоверность различий по отношению к контролю (интактные животные).

Одновременное введение  $\text{CCl}_4$  и спленина (IV группа) не выявило достоверных изменений в общей активности фермента лизосомальной фракции и надосадочной жидкости гомогената печени крыс по сравнению с контролем, тогда как свободная активность фермента во фракции лизосом превышала норму в 1,5 раза.

Введение спленина на активность фермента не оставалась ниже фермента превышавшая активность в надосадочной жидкости на 33 % по сравнению с контролем.

Полученные результаты показывают, что действие  $\text{CCl}_4$  на активность фермента не оставалась ниже фермента превышавшая активность в надосадочной жидкости на 33 % по сравнению с контролем.

Сравнивая показанные в таблице данные можно видеть, что мембранные лизосомы зосомальной фракции III группы в 2,2 раза превышают контролем. Введение спленина в VI группы не оказывает влияния на мембранные лизосомы, как при одновременном введении спленина и  $\text{CCl}_4$ .

Известно, что ферменты в цитоплазме для оценки влияния спленина на зосомальную фракцию печени крыс, исследование методом Х-100. Было показано, что спленин, с последующей концентрацией 0,05 и 0,1 мг/мл, не оказывает влияния на ферменты в цитоплазме.

Полученные данные подтверждают положения о стабилизации мембранных лизосом.

Ряд авторов считают, что спленин оказывает действие на функцию печени [1, 5], в какой-то степени предполагая, что спленин оказывает действие на мембранные и препятствует им восприятию со стороны печени.

лем (табл. 1 и  
чались при  $\text{CCl}_4$   
щей активности  
ной группой) и  
в 3,5 раза по  
в надосадочной

активности в  
та печени крыс.

IV —  $\text{CCl}_4 +$  спленин  
забоем на восьмой  
дня после окончания  
затравки — достоверность  
 $p < 0,05$ ; две звездочки —  
сравнению с III группой

ла почти в три  
тина распределение  
группы. В лизосомах  
нижалась, а на-  
правлению с III  
свободная активи-  
ти, но превышала  
та печени крыс  
и по сравнению  
ферmenta была

Таблица 1  
активности ферментов  
лиzosом

активность (в %  
общей активности)

$\pm 1,0$	
$\pm 1,2$	$p > 0,5$
$\pm 5,0$	$p < 0,001$
$\pm 2,4$	$p < 0,02$
$p_{(3-4)}$	$< 0,001$
$\pm 4,0$	$p < 0,001$
$p_{(3-5)}$	$< 0,02$
$\pm 2,9$	$p < 0,001$
$p_{(4-6)}$	$> 0,1$
$p_{(5-6)}$	$> 0,2$

х групп животных,  
ные животные).

(а) не выявило  
лизосомальной  
крыс по сравнению  
фермента во фрак-

Введение спленина животным VI группы не оказывало такого действия на активность фермента, как в IV группе. У этих животных общая активность кислой фосфатазы в лизосомальной фракции печени оставалась ниже контрольного уровня, тогда как свободная активность фермента превышала норму почти в два раза. Активность фермента в надосадочной жидкости гомогената была также выше нормы.

Полученные результаты *in vivo*, указывающие на стабилизирующее действие  $\text{CCl}_4$  на мембранные лизосомы печени, согласуются с данными ряда авторов [4, 6, 13], выявивших достоверное повышение свободной активности фермента при введении крысам  $\text{CCl}_4$ . Введение в организм  $\text{CCl}_4$  вызывает нарушение стабильности, в первую очередь мембранных лизосом, что сопровождается выходом в цитоплазму лизосомальных гидролаз [20]. Изменение стабильности лизосомальных мембран, как известно, выражается в нарастании свободной или неседиментируемой активности лизосомальных ферментов, в том числе и кислой фосфатазы [9, 12]. Значительное повышение свободной активности кислой фосфатазы в лизосомальной фракции печени крыс при экспериментальном гепатите (III группа), по-видимому, можно объяснить повышенной проницаемостью мембран лизосом в результате разрушающего действия  $\text{CCl}_4$ . О разрушении мембран лизосом свидетельствует и уменьшение общей активности кислой фосфатазы. Так, показано [20], что при введении крысам  $\text{CCl}_4$  снижение общей и связанной активности кислой фосфатазы происходило одновременно с появлением некроза клеток печени. Повышение общей активности фермента в лизосомальной фракции печени крыс V группы на восьмой день после окончания затравки обусловлено, на наш взгляд, регенерационными процессами печени, где лабилизация лизосом способствует выделению в окружающую среду кислых гидролаз, функция которых направлена на очищение печеночной ткани от некротических обломков клеток. По мнению некоторых авторов [2, 3], в ранние сроки восстановительного периода в печени тесно переплетаются деструктивные и восстановительные процессы, и последствия в дальнейшем определяются преобладанием одного из них.

Сравнивая показатели активности фермента в III и IV группах, можно видеть, что спленин оказывает стабилизирующе действие на мембранные лизосомы. Так, свободная активность кислой фосфатазы в лизосомальной фракции печени крыс IV группы ниже по сравнению с III группой в 2,2 раза, хотя и остается повышенной по сравнению с контролем. Введение спленина после окончания затравки животным VI группы не оказывало такого эффективного действия на мембранные лизосомы, как при одновременном введении спленина и  $\text{CCl}_4$ . Это объясняется, по-видимому, более выраженным деструктивным изменениями мембран лизосом печени, вызванными действием  $\text{CCl}_4$ .

Известно, что тритон X-100 способствует выходу лизосомальных ферментов в цитоплазму, в том числе и кислой фосфатазы [8]. Поэтому для оценки влияния спленина *in vitro* на стабильность мембранных лизосом печени крыс, изучали изменение проницаемости мембран под воздействием постепенно возрастающих концентраций детергента тритона X-100. Было показано, что инкубация лизосом в среде, содержащей спленин, с последующей инкубацией их с тритоном X-100 в конечной концентрации 0,05 и 0,1% приводила к достоверному снижению неседиментируемой активности кислой фосфатазы (табл. 2).

Полученные данные *in vitro* подтверждают справедливость предположения о стабилизирующем мембранные лизосомы действии спленина.

Ряд авторов считает, что спленин усиливает антитоксическую функцию печени [1, 5, 7]. Полученные нами данные *in vivo* и *in vitro* в какой-то степени подтверждают этот вывод. Можно предположить, что спленин оказывает лечебный эффект, стабилизируя лизосомальные мембранны и препятствуя выделению гидролаз в цитоплазму. Принимая во внимание то, что плазматические мембранны регулируют про-

цессы поступления лекарственных веществ в клетки [10], а взаимодействие фармакологических веществ с мембранами определяет одно из основных свойств их — проницаемость для ионов, аминокислот и метаболитов [11], можно заключить, что фармакологическое действие спленина обусловлено его взаимодействием с биологическими мембранами.

Таблица 2

Влияние спленина *in vitro* на неседиментируемую активность кислой фосфатазы лизосом печени крыс при воздействии различных концентраций тритона X-100, в % от общей активности (средние данные шести опытов)

Конечная концентрация тритона X-100 (%)	Контроль	Спленин	<i>p</i>
0	2,4	2,0	
0,025	14,3	12,1	>0,05
0,05	66,0	56,8	<0,01
0,1	100,0	92,3	<0,05

Наши данные позволяют предположить, что в механизме противовоспалительного действия спленина определенное значение имеет стабилизация этим препаратом лизосомальных мембран.

A. V. Shevchenko, G. V. Tyuleneva

### A STABILIZING EFFECT OF SPLENIN ON THE RAT LIVER LYSOSOME MEMBRANE

#### Summary

Results of *in vivo* experimental studies have shown that  $\text{CCl}_4$ -induced toxic hepatitis brings about a considerable increase of the acid phosphatase free activity in the lysosomal fraction and nonsedimentable activity in the supernatant fluid of the rat liver homogenate. A simultaneous administration of splenin and  $\text{CCl}_4$  decreases both free and nonsedimentable activity of the enzyme and has a more efficient influence on the activity of the studied enzyme is compared with splenin administration after  $\text{CCl}_4$ . *In vitro* experiments have shown that lysosoma incubation in the medium with splenin and triton X-100 in 0.05 and 0.1 % final concentration decreases the acid phosphatase nonsedimentable activity.

Institute of Endocrinology and Metabolism, Kiev

#### Список литературы

1. Апелтова Н. Н. Применение спленина для лечения больных хроническими гепатитами и циррозами печени.— Врачеб. дело, 1963, № 9, с. 26—30.
2. Вакулин Г. М., Якобсон Г. С. Ультраструктурные изменения гепатоцитов в динамике развития экспериментального цирроза печени у крыс.— Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1975, № 9, с. 103—107.
3. Громашевская Л. Л., Шкурова О. С., Касаткина М. Г. и др. Изучение активности ферментов в печени в процессе регенерации при остром и хроническом поражении  $\text{CCl}_4$ .— Укр. биохим. журн., 1978, № 4, с. 465—470.
4. Короленко Т. А., Цилли Е. И., Русова Т. В. Влияние меллерила на лизосомы печени крыс с острым токсическим гепатитом.— Фармакология и токсикология, 1976, № 4, с. 467—470.
5. Кравченко И. А., Кишко А. М. Лечение спленином в сочетании с делагилом больных болезнью Боткина.— Врачеб. дело, 1976, № 2, с. 123—125.
6. Мансурова И. Д., Чернышев В. Г., Стосман Р. З. Влияние  $\text{CCl}_4$  и альдокатона на активность кислых гидролаз и некоторых ферментов дезаминирования в печени крыс.— Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1973, № 9, с. 49—51.
7. Олейник Б. В. Спленин в восстановлении экспериментального поражения печени.—

- В кн.: Тез. докл. с. 82—83.
8. Покровский А. А., ности мембран лизосом.— Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1976, № 4, с. 437—440.
  9. Покровский А. А., Северин С. Е. Материалы конференции АМН СССР, 1968, № 11.
  10. Сергеев П. В. Свойства и функции лизосом и мембран лизосом.— Фармакология и биохимия, 1976, № 4, с. 437—440.
  11. Цилли Е. И., Титов В. А. Стабилизирующие свойства мембран лизосом.— Фармакология и биохимия, 1976, № 4, с. 437—440.
  12. Хомутовский О. А. Установление функций лизосом и мембран лизосом.— Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1976, № 4, с. 437—440.
  13. Цилли Е. И., Титов В. А. Стабилизирующие свойства мембран лизосом.— Фармакология и биохимия, 1976, № 4, с. 437—440.
  14. Шевченко А. В. Стабилизирующие свойства гормональных гормонов и механического действия спленина.— Докторская диссертация, 1976.
  15. Шевченко А. В., Кравченко И. А. Стабилизирующее действие спленина на лизосомы печени.— Докторская диссертация, 1976.
  16. Duve de Ch., Press, chem. J., 1955, 60, N 1.
  17. Fiske C. H., Subbarow A., Biochem., 1925, 66, N 1.
  18. Gianetto R., de Duve de Ch., Press, chem. J., 1955, 60, N 1.
  19. Lowry O., Rosenblum S. M. The phenol reagent.— J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
  20. Szlamka I., Menyailo O. V. The effect of carbon tetrachloride on the lysosomes of rat liver.— Biochim. et Biophys. Acta, 1965, 102, 51—57.

Киевский институт эндокринологии и обмена веществ

[10], а взаимодействие определяет одно из минокислот и метаболическое действие спленинами мембранами.

лица 2  
ную  
ые при  
X-100,  
опытов)

>0,05  
<0,01  
<0,05

механизме противовоспалительное действие имеет статистическую значимость.

induced toxic hepatitis activity in the lysosomal rat liver homogenate both free and nonsedimentable on the activity of the enzyme. In vitro experiments with triton X-100 in nontoxic nonsedimentable

хроническими гепатитами спленоцитов в динамике эксперим. биологии и Изучение активности спленина на лизосомы печени и токсикология, 1976, № 1. с делагилом большина с CCl<sub>4</sub> и альдокатона на ингибирования в печени.—51.

8. Покровский А. А., Тутельян В. А., Кравченко Л. В. К вопросу об оценке стабильности мембран лизосом.—Биохимия, 1975, 40, вып. 3, с. 545—551.
9. Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы. М.: Наука, 1976.—378 с.
10. Северин С. Е. Молекулярные основы действия лекарственных веществ.—Вестн. АМН СССР, 1968, № 7, с. 53—59.
11. Сергеев П. В., Сейфулла Р. Д., Майский А. И. Молекулярные аспекты действия стероидных гормонов. М.: Наука, 1971. 195 с.
12. Хомутовский О. А., Миронова В. М., Дегтярьова И. И. Особливості структури й функції лізосом і пероксисом гепатоцитів щурів за рахіту.—Укр. біохім. журн., 1976, № 4, с. 437—440.
13. Цилли Е. И., Титова В. Г., Кондакова А. Е., Короленко Т. А. Изменение проницаемости мембран лизосом печени крыс при действии различных повреждающих факторов.—Фармакология и токсикология, 1973, № 6, с. 724—726.
14. Шевченко А. В. Спленин — биологически активный фактор селезенки.—В кн.: Новое о гормонах и механизме их действия. Киев, 1977, с. 350—359.
15. Шевченко А. В., Кравченко В. И., Дроздович И. И. и др. Новые данные о биологическом действии спленина.—Эндокринология, 1976, вып. 6, с. 116—121.
16. Duve de Ch., Pressman B. C., Gianetto R. et al. Tissue fractionation studies.—Biochem. J., 1955, 60, N 4, p. 604—617.
17. Fiske C. H., Subbarow J. The colorimetric determination of phosphorus.—J. Biol. Chem., 1925, 66, N 1, p. 375—400.
18. Gianetto R., de Duve C. Tissue fractionation studies.—Biochem. J., 1955, 59, N 3, p. 433—438.
19. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randell R. Protein measurement with the Folin phenol reagent.—J. Biol. Chem., 1951, 193, N 1, p. 265—275.
20. Szlamka I., Menyhart J., Somori J. Relationship between lysosomal damage, fatty infiltration and hepatocellular necrosis in the course of acute liver injury induced by carbon tetrachloride in the rat.—Acta physiol. Acad. sci. hung., 1975, 46, N 1, p. 51—57.

Киевский институт эндокринологии и обмена веществ

Поступила в редакцию 8.I 1981 г.