

Архив журнала

## Вопросы медицинской химии

*ISSN 0042-8809*

1990

Том 36 выпуск 2

**Внимание!** Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

## Voprosy meditsinskoi khimii

*ISSN 0042-8809*

1990

Volume 36 issue 2

**Attention!** OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

1. Лабораторные методы исследования системы гемостаза / Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг Е. Д.— Томск, 1980.
2. Садыков Э. С., Барабанщикова Н. А., Шувалова И. А., Юкельсон Л. Я. // Химия природ. соединений.— 1985.— № 6.— С. 851—852.
3. Цыпкина Л. П., Колтакова С. И., Бакрадзе М. А. // Вопросы герпетологии.— Л., 1977.— С. 222—223.
4. Юкельсон Л. Я., Садыков Э. С., Барабанщикова Н. А., Сахибов Д. Н. // Химия природ. соединений.— 1985.— № 6.— С. 850—851.
5. Seegers W. H., Ouyang C. // Snake Venoms / Ed. Ch. Yu. Lee.— New York, 1979.— P. 684—750.
6. Stocker K. // Natural Toxins / Eds D. Eaker, T. Wadström.— New York, 1980.— P. 111—123.

Поступила 29.08.89

#### HEMOCOAGULATION PROPERTIES OF VENOM AND ITS THROMBIN-LIKE FRACTION FROM AGKISTRODON HALYS HALYS

I. B. Kalmykova, O. B. Zaychenko, E. S. Sadykov, N. A. Barabantschikova, L. Ya. Yukelson

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Ministry of Public Health of the Uzbek SSR, Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

Venom and its fraction with hemocoagulation properties from *Agkistrodon halys halys* exhibited dissimilar effects on blood plasma and fibrinogen preparation. The major component of this fraction proved to be a thrombin-like enzyme, properties of which were studied by means of several coagulation tests. Dissimilarity in coagulating effects of the venom and its thrombin-like fraction as well as different physical properties of blood clots formed after their action suggest that the venom from *Agkistrodon halys halys* contained other protein factors affecting blood coagulation besides the thrombin-like proteases.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.356:577.161.3].015.2:[615.216.2+615.214.2].015.4:616.36-018.1.576:314

В. И. Шаранов, О. Р. Грек, А. А. Зыков

#### ВЛИЯНИЕ $\alpha$ -ТОКОФЕРОЛА И ЛИДОКАИНА НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ ПЕРЕСТРОЙКУ МЕМБРАН ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА ПЕЧЕНИ ПРИ ИНДУКЦИИ ФЕНОБАРБИТАЛОМ В ПОСТИШЕМИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ

Новосибирский медицинский институт, Институт физиологии Сибирского отделения АМН СССР

В проведенных ранее исследованиях показано, что транзиторная ишемия печени сопровождается ингибированием активности ферментов монооксигеназной системы и ограничением индуктивного ответа на фенобарбитал (ФБ) в постишемическом периоде [4, 6, 14]. Снижение активности микросомальных гидроксилазных реакций сопряжено с изменениями жирно-кислотного состава, гидрофобных свойств и структурной организации эндоплазматического ретикулума гепатоцитов в восстановительном периоде после ишемии [13, 14].

Пусковыми факторами в повреждении фосфолипидов микросомальных мембран при ишемии являются активация перекисного окисления липидов и эндогенных фосфолипаз [1, 8, 11]. В связи с этим профилактическое введение совместных антиоксидантов и ингибиторов фосфолипаз предупреждало значительные нарушения гидроксилаз-

ной активности монооксигеназных ферментов печени после ишемического воздействия [4, 7, 12]. Однако механизмы, лежащие в основе нарушения индуктивного ответа микросомальных монооксигеназ на ФБ в постишемическом периоде, остаются неизученными.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния комбинированного введения  $\alpha$ -токоферола и лидокаина на изменения жирно-кислотного состава, гидрофобных свойств микросомальных мембран и индуцируемости монооксигеназных ферментов при введении ФБ в восстановительном периоде после 30-минутной тотальной ишемии печени.

#### Методика

Эксперименты выполнены на 350 крысах-самцах линии Вистар массой 200—250 г. Тотальную ишемию печени создавали пережатием печеночной артерии и воротной вены на 30 мин как описано ранее [6].

В I серии опытов животным в постишемическом периоде вводили ФБ в дозе 50 мг/кг 1 раз в сутки в течение 4 дней до декапитации на 7, 14, 21-е сутки. Во II серии опытов предварительно до окклюзии сосудов печени животным вводили  $\alpha$ -токоферол (100 мг/кг внутривенно за 12 ч) и лидокаин (10 мг/кг внутривенно за 1 ч до операции). ФБ в постишемическом периоде вводили по указанной выше схеме до декапитации животных на 7-е и 14-е сутки. Контролем в этих сериях служили индуцированные ФБ крысы. В III серии опытов после предварительного совместного введения  $\alpha$ -токоферола и лидокаина в аналогичных дозах животных декапитировали на 1, 3, 7, 14, 21-е сутки постишемического периода. Контролем в этой серии служили животные, получавшие до операции физиологический раствор.

Микросомальную фракцию печени выделяли дифференциальным центрифугированием [2]. Структурные перестройки мембран эндоплазматического ретикулума (ЭР) регистрировали по изменению жирно-кислотного состава и параметров связывания гидрофобного флуоресцентного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната (1,8-АНС<sup>-</sup>) с мембранами микросом. Общую фракцию микросомальных липидов экстрагировали по методу Folch и соавт. [16]. Жирно-кислотный состав липидной фракции микросом определяли методом газовой хроматографии на приборе «Хром-4» как описано ранее [13]. Рассчитывали относительное содержание индивидуальных жирных кислот, суммарное содержание насыщенных и ненасыщенных жирных кислот и индекс насыщенности — ИИ (отношение суммы насыщенных жирных кислот к сумме ненасыщенных). Способность микросомальных мембран связывать 1,8-АНС<sup>-</sup> изучали методом двойных обратных величин [3] как описано ранее [13]. Рассчитывали константу связывания для 1,8-АНС<sup>-</sup> ( $K_s$ ), концентрацию центров связывания для 1,8-АНС<sup>-</sup> на мембране (N) и суммарное сродство зонда ( $K_s N$ ) к мембране микросом. Флуоресценцию связанного зонда измеряли на флуоресцентном спектрофотометре MPF-4 («Hitachi», Япония). Длина волны возбуждения 360 нм, флуоресценции 480 нм.

О функциональной перестройке микросомальных мембран судили по изменению активности ферментов монооксигеназной системы печени после введения ФБ. В микросомальной фракции определяли концентрацию цитохромов P-450 и  $\beta_5$  [22], скорость амидопирин-N-деметилазной и анилин-*n*-гидроксилазной реакций [9] в указанные выше периоды после ишемии. Спектральную константу диссоциации ( $K_s$ ) для анилина, характеризующую сродство цитохрома P-450 к субстрату, определяли по методу Schenkman и соавт. [26]. Определение максимального связывания анилина с цитохромом P-450 ( $\Delta A_{\max}$ ), отражающего концентрацию «связывающего белка» цитохрома, проводили согласно описанию Kato и соавт. [18]. Измерения выполняли на спектрофотометре «Hitachi-356» (Япония). Концентрацию белка в микросомах определяли методом Lowry и соавт. [19]. Полученные результаты обработаны общепринятыми статистическими методами с использованием критерия *t* Стьюдента.

#### Результаты и обсуждение

У интактных животных введение ФБ вызывало увеличение суммарного содержания ненасыщенных жирных кислот в липидах микросом и сни-

Жирно-кислотный состав (в %) липидной фракции микросомальных мембран у индуцированных ФБ крыс ( $M \pm m$ ;  $n=6-8$ )

Жирная кислота	Контроль	Группа животных	Индукция ФБ		
			постиншемический период, сутки		
			7-е	14-е	21-е
Миристиновая C <sub>14:0</sub>	0,11±0,01 (0,18±0,02*)	I II	0,18±0,01* 0,20±0,02*	0,30±0,01* 0,18±0,01***	0,15±0,01* —
Пентадекановая C <sub>15:0</sub>	0,10±0,02 (0,13±0,01*)	I II	0,16±0,02* 0,18±0,03*	0,22±0,01* 0,17±0,01***	0,13±0,01* —
Пальмитиновая C <sub>16:0</sub>	11,92±0,57 (18,31±1,29*)	I II	15,01±0,82* 13,30±0,57	17,92±1,43* 15,45±0,79*	14,99±0,64* —
Пальмитолеиновая C <sub>16:1</sub>	1,13±0,06 (1,61±0,12*)	I II	1,01±0,09 1,39±0,11***	1,87±0,14* 1,25±0,07**	1,21±0,06 —
Стеариновая C <sub>18:0</sub>	21,38±0,76 (25,09±0,75*)	I II	24,12±0,65* 21,33±0,83	26,85±0,98* 23,64±0,50***	21,56±0,69 —
Олеиновая C <sub>18:1</sub>	7,58±0,35 (10,95±0,25*)	I II	8,62±0,34 10,4±0,79***	10,27±0,32* 9,77±0,61*	10,78±0,97* —
Линолевая C <sub>18:2</sub>	20,55±0,82 (15,33±0,53*)	I II	21,02±0,33 18,68±0,45*	17,77±0,70* 21,16±0,60**	21,66±0,97 —
Арахидоновая C <sub>20:4</sub>	33,85±1,04 (28,09±1,28*)	I II	27,62±0,97* 32,0±1,14**	21,81±1,56* 26,15±0,85***	22,13±0,84* —
Сумма насыщенных жирных кислот	33,36±1,30 (43,71±1,72*)	I II	39,47±1,33* 35,02±0,66**	45,28±2,09* 39,43±0,86***	36,86±1,26 —
Сумма ненасыщенных жирных кислот	66,64±1,3 (56,29±1,72*)	I II	60,53±1,33* 64,98±0,66**	54,72±2,09* 60,57±0,86***	63,14±1,26 —
Индекс насыщенности	0,50 (0,78)	I II	0,65 0,54	0,65 0,65	0,58 —

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: одна звездочка — различия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (интактные животные + ФБ), две — между I и II группами. I группа — «ишемия + ФБ», II группа — « $\alpha$ -токоферол + ишемия + ФБ». В скобках — показатели интактных животных.

жение суммарного содержания насыщенных жирных кислот (ИН снижалось до 0,5 по сравнению с 0,78 — показателем интактных животных;  $p < 0,05$ ). Изменение ИН микросомальных липидов при индукции ФБ, отмеченное и другими авторами [17], определялось снижением в липидах количества насыщенных жирных кислот — миристиновой, пентадекановой, пальмитиновой, стеариновой и повышением уровня ненасыщенных кислот — линолевой и арахидоновой. Содержание мононенасыщенных жирных кислот — пальмитолеиновой и олеиновой — в липидах микросом индуцированных крыс снижалось (табл. 1).

В постиншемическом периоде при введении ФБ перестройка жирно-кислотного состава липидов ЭР существенно изменялась. Так, на 7-е и 14-е сутки после ишемического воздействия тормозилось увеличение суммарного содержания ненасыщенных жирных кислот, а сумма насыщенных кислот оставалась на уровне, достоверно превышающем контрольный (см. табл. 1). В результате ограничения изменений состава жирных кислот в липид-

ном компоненте микросом ИН на 7-е и 14-е сутки оставался выше, чем в контроле, и нормализовалась лишь на 21-е сутки постиншемического периода. В липидах микросом оставалось повышенным содержание насыщенных жирных кислот — миристиновой, пентадекановой, стеариновой, максимальные изменения отмечались на 14-е сутки. Содержание арахидоновой кислоты, напротив, было сниженным по сравнению с контролем во все изученные периоды после ишемии. Количество линолевой кислоты существенно уменьшалось только на 14-е сутки постиншемического периода. Содержание ненасыщенных жирных кислот с одной двойной связью — пальмитолеиновой и олеиновой — было значительно выше, чем в контроле, на 14-е сутки после ишемии (содержание олеиновой кислоты оставалось повышенным и на 21-е сутки).

Ограничение перестройки жирно-кислотного состава микросомальных липидов нашло отражение и в изменении параметров связывания 1,8-АНС — с микросомами индуцированных крыс.

Таблица 2

Изменение параметров связывания 1,8-АНС<sup>-</sup> с микросомальными мембранами индуцированных в постиншемическом периоде крыс ( $M \pm m$ )

Параметр	Контроль	Группа животных	Индукция ФБ	
			постиншемический период, сутки	
			7-е	14-е
K <sub>c</sub> , мМ <sup>-1</sup>	70,17±2,65 (40,67±2,68*)	I II	78,50±6,05 80,0±4,25	84,67±3,85* 92,17±5,55*
N, мкмоль на 1 мг белка	28,02±0,59 (28,48±0,98)	I II	14,46±1,38* 22,75±1,10***	28,54±1,38 32,03±1,83
K <sub>c</sub> N·10 <sup>3</sup> мМ <sup>-1</sup>	2,51±0,11 (1,427±0,08*)	I II	5,771±0,86* 3,59±0,35***	3,014±0,24 2,893±0,15

Примечание. K<sub>c</sub> — константа связывания для 1,8-АНС<sup>-</sup>, N — концентрация центров связывания для 1,8-АНС<sup>-</sup> на мембране, K<sub>c</sub>N — суммарное сродство зонда к мембране ( $n=6$ ).

Максимальное связывание анилина цитохромом P-450 индуцированных ФБ крыс в постшемическом периоде ( $M \pm m$ )

$\Delta A_{\text{max}}$	Контроль	Группа животных	Индукция ФБ		
			постшемический период, сутки		
			7-е	14-е	21-е
Анилин	79,83 ± 1,79 (28,05 ± 1,90)*	I II	34,81 ± 0,69* 63,67 ± 1,86*,**	34,19 ± 0,99* 54,25 ± 0,63*,**	57,44 ± 2,3*

Примечание. Показатели выражены:  $OP_{430} - OP_{500} \cdot 10^3$  на 1 мг белка в 1 мл среды, где ОП — оптическая плотность суспензии при соответствующей длине волны ( $n=4-6$ ).

На 7-е сутки постшемического периода на 48 % уменьшалась концентрация центров связывания (N) для 1,8-АНС<sup>-</sup> на мембране, возрастало суммарное средство ( $K_N$ ) зонда к мембране. На 14-е сутки показатели N и  $K_N$  не отличались от контрольных величин, а константа связывания ( $K_s$ ) для 1,8-АНС<sup>-</sup> была больше, чем в контроле (табл. 2).

При изучении кинетики связывания анилина индуцированным цитохромом P-450 в постшемическом периоде обнаружено снижение средства гемопротеида к анилину, что выражалось в увеличении  $K_s$  для данного субстрата на 7-е ( $K_s = 2,87 \pm 0,24$  мМ) и 14-е ( $K_s = 2,86 \pm 0,29$  мМ) сутки по сравнению с контролем ( $K_s = 2,17 \pm 0,08$  мМ;  $p < 0,05$ ). В препаратах микросом индуцированных в постшемическом периоде крыс также отмечалось значительное снижение в указанные сроки концентрации «связывающего белка» для анилина, выразившееся в уменьшении  $\Delta A_{\text{max}}$  на 51 и 52 % соответственно на 7-е и 14-е сутки после ишемии печени (табл. 3).

Профилактическое совместное введение  $\alpha$ -токоферола и лидокаина сохраняло на 7-е сутки постшемического периода реакцию липидов ЭР на введение ФБ. Однако в липидах микросом оставалось повышенным содержание миристиновой и пентадекановой кислот. Превышало контрольные показатели и количество мононенасыщенных жирных кислот — пальмитолеиновой, олеиновой. Эти изменения жирно-кислотного состава на фоне фармакологической защиты, по-видимому, и явились причиной сохранения изменений параметров связывания (N и  $K_N$ ) 1,8-АНС<sup>-</sup> с мембранами микросом на 7-е сутки постшемического периода. После предварительного введения препаратов на 14-е сутки постшемического периода ИН липидной фракции микросом оставался выше соответствующего показателя в контроле. Ограничение перестройки состава жирных кислот при индук-

ции ФБ на 14-е сутки выразилось в изменении содержания их индивидуальных представителей. Так, на фоне введения препаратов содержание насыщенных жирных кислот оставалось увеличенным за счет миристиновой, пентадекановой, пальмитиновой, стеариновой кислот. Недостаточное увеличение содержания ненасыщенных жирных кислот определялось сниженным содержанием арахидоновой кислоты (см. табл. 1). Ограничение индуцированной ФБ перестройки жирно-кислотного спектра на 14-е сутки проявилось и в сохранении после введения  $\alpha$ -токоферола и лидокаина изменений константы связывания для 1,8-АНС<sup>-</sup> с мембранами микросом (см. табл. 2).

Профилактическое введение комбинации  $\alpha$ -токоферола и лидокаина сохраняло на контрольном уровне индуцированное увеличение скорости N-деметилирования амидопирина и п-гидроксилирования анилина на 7-е и 14-е сутки после ишемии. На фоне введения препаратов индуцированное увеличение концентрации цитохрома P-450 достоверно превышало показатель в группе «ишемия», но оставалось еще ниже, чем в контроле (рис. 1). Введение препаратов полностью предупреждало изменение  $K_s$  для анилина на 7-е ( $K_s = 1,93 \pm 0,09$  мМ) и 14-е ( $K_s = 2,23 \pm 0,10$  мМ) сутки постшемического периода (в контроле  $K_s = 2,17 \pm 0,08$  мМ;  $p > 0,5$ ; рис. 3). На фоне профилактического введения  $\alpha$ -токоферола и лидокаина увеличение концентрации «связывающего белка» для анилина при индукции на 7-е и 14-е сутки постшемического периода превышало этот показатель в группе «ишемия» соответственно на 41 и 28 % ( $p < 0,05$ ; см. табл. 3). Особенностью индуктивного ответа на ФБ в постшемическом периоде явилось более выраженное нарушение структурно-функциональной перестройки мембран ЭР на 14-е сутки по сравнению с 7-ми сутками. Эти изменения, по-видимому, связаны с усиленным повреждением мембранных фосфолипидов

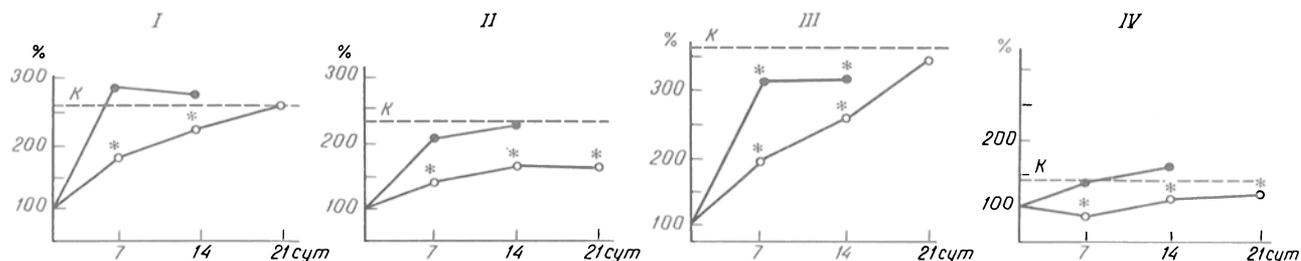


Рис. 1. Влияние  $\alpha$ -токоферола и лидокаина на индуктивный ответ монооксигеназ в постшемическом периоде.

I — N-деметилирование амидопирина; II — п-гидроксилирование анилина; III — концентрация цитохрома P-450; IV — концентрация цитохрома  $b_5$ . Светлые кружки — ишемия + ФБ, темные —  $\alpha$ -токоферол + лидокаин + ишемия + ФБ, пунктирная линия — контроль (интактные животные + ФБ). Здесь и на рис. 2: звездочка — достоверность различий по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Показатели выражены в процентах к исходному уровню (интактные животные), принятому за 100 %.

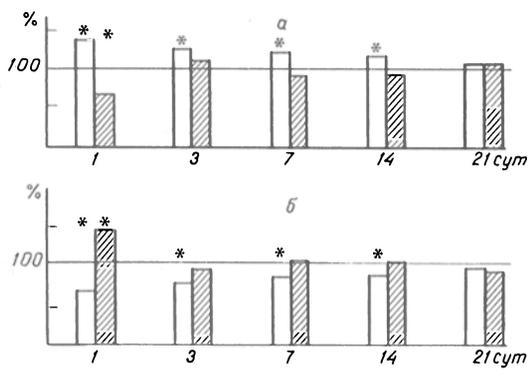


Рис. 2. Влияние  $\alpha$ -токоферола и лидокаина на изменение суммарного содержания насыщенных (а) и ненасыщенных (б) жирных кислот в липидной фракции микросомальных мембран печени в постшемическом периоде.

Светлые столбики — ишемия + ФБ, заштрихованные —  $\alpha$ -токоферол + лидокаин + ишемия + ФБ.

вследствие пероксидативных процессов в отдаленные периоды после ишемии печени [5, 13].

С целью выяснения механизма защитного действия препаратов изучено влияние  $\alpha$ -токоферола и лидокаина на изменения жирно-кислотного состава микросомальных липидов в постшемическом периоде у неиндуцированных крыс. Комбинированное введение препаратов предупреждало вызываемые ишемией нарушения жирно-кислотного состава липидной фракции микросом. С 3-х суток постшемического периода ИН не отличался от показателя у интактных животных, в то время как в группе «ишемия» нарушения жирно-кислотного спектра сохранялись до 21-х суток (рис. 2).

Полученные данные позволяют предположить, что существенную роль в ограничении индуктивного ответа на ФБ играют изменения структурной организации мембран ЭР в постшемическом периоде, касающиеся главным образом снижения доли ненасыщенных жирных кислот в составе фосфолипидного компонента мембраны. Это положение основывается на том, что полиненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов микросом являются лимитирующим фактором в величине индуцирующего действия барбитура-

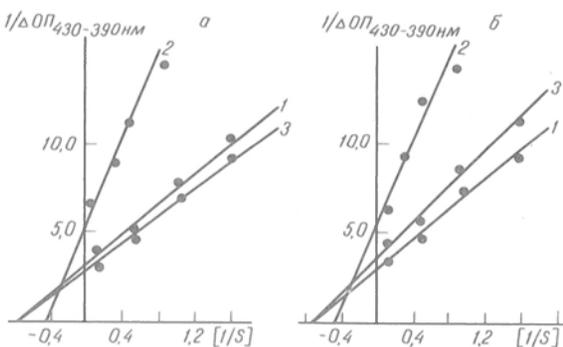


Рис. 3. Влияние профилактического совместного введения  $\alpha$ -токоферола и лидокаина на константу связывания анилина в микросомах печени крыс, индуцированных ФБ на 7-е (а) и 14-е (б) сутки постшемического периода.

1 — контроль (интактные животные + ФБ); 2 — ишемия + ФБ; 3 —  $\alpha$ -токоферол + лидокаин + ишемия + ФБ.  $K_s$  для анилина в интактных микросомах равна  $1,24 \pm 0,1$  мМ. По оси абсцисс — обратные величины концентрации субстрата (мМ); по оси ординат — разность оптической плотности (ОП) при соответствующих длинах волн.

тов [20, 25]. Во-первых, в постшемическом периоде изменения жирно-кислотного состава и гидрофобности липидного окружения цитохрома Р-450 сопровождаются нарушениями кинетики фермент-субстратных взаимодействий [4], имеющих решающее значение в индуцирующем действии ФБ [24]. Во-вторых, повреждение микросомальных мембран при ишемии печени является причиной нарушения мембранирибосомных взаимодействий [15], уменьшения количества мембранно-связанных рибосом в постшемическом периоде [14], функционирование которых необходимо в индуктивном ответе на ФБ [21]. Поэтому предупреждение  $\alpha$ -токоферолом и лидокаином повреждения микросомальных липидов при ишемии печени и перестройки их жирно-кислотного состава в постшемическом периоде исключает «мембранный» компонент в ингибировании индуктивного ответа на ФБ. Однако после ишемии печени существенно ограничивались и белоксинтетические процессы, обеспечивающие индуктивную выработку белкового компонента цитохрома Р-450 и мембран ЭР [10, 23]. Так, на 7-е сутки в группе «ишемия» прирост концентрации цитохрома Р-450 в ответ на введение ФБ составил  $304,4 \pm 7,1$  %. При введении  $\alpha$ -токоферола и лидокаина активность синтеза цитохрома в постшемическом периоде достоверно возрастала (прирост составил  $341,2 \pm 15,5$  %), однако оставалась ниже, чем в контроле (прирост в контроле  $383 \pm 7,5$ ;  $p < 0,05$ ).

Таким образом, профилактическое комбинированное введение  $\alpha$ -токоферола и лидокаина предупреждало значительное ограничение индуцированных ФБ структурных перестроек фосфолипидного компонента микросомальных мембран и ингибирование синтеза ферментов монооксигеназной системы печени в постшемическом периоде.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Алесенко А. В., Андреева Л. Б., Слесарева Л. Д., Биленко М. В. // Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека. — Л., 1978. — С. 19.
- Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975.
- Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флюоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. — М., 1980.
- Грек О. Р., Шаронов В. И. // Фармакол. и токсикол. — 1987. — № 5. — С. 60—64.
- Грек О. Р., Шаронов В. И., Зыков А. А. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 4. — С. 57—63.
- Грек О. Р., Шаронов В. И., Литвинов В. С., Долгов А. В. // Фармакол. и токсикол. — 1984. — № 3. — С. 114—118.
- Грек О. Р., Шаронов В. И., Сокирченко И. А., Шкурный В. А. // Бюл. exper. биол. — 1987. — № 12. — С. 669—671.
- Дудник Л. Б., Биленко М. В., Алесенко А. В. и др. // Там же. — 1980. — № 5. — С. 556—558.
- Карузина И. И., Арчаков А. И. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 49—62.
- Ляхович В. В., Цырлов И. Б. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков. — Новосибирск, 1981.
- Шаронов В. И., Грек О. Р., Долгов А. В. // Фармакол. и токсикол. — 1986. — № 2. — С. 64—68.
- Шаронов В. И., Грек О. Р., Долгов А. В. // Там же. — 1987. — № 2. — С. 107—110.
- Шаронов В. И., Грек О. Р., Зыков А. А. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 1. — С. 25—29.
- Шаронов В. И., Сокирченко И. А., Грек О. Р. и др. // Бюл. exper. биол. — 1986. — № 3. — С. 277—279.
- Cajone F., Schiaffonati L., Piccoletti R. // Exp. molec. Path. — 1974. — Vol. 21, N 1. — P. 40—51.
- Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226, N 1. — P. 497—509.

17. Ilyas M. S., Iglesia F. A. D., Feuer G. // Toxicol. appl. Pharmacol.— 1978.— Vol. 45, N 1.— P. 69—77.
18. Kato R., Takanaka A., Onoda K. // Biochem. Pharmacol.— 1971.— Vol. 20.— P. 447—458.
19. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193, N 1.— P. 265—275.
20. Marshall W. J., McLean A. E. M. // Biochem. J.— 1971.— Vol. 122, N 4.— P. 569—573.
21. McCauley R., Couri D. // Biochim. biophys. Acta.— 1971.— Vol. 238, N 2.— P. 233—244.
22. Omura T., Sato R. // J. biol. Chem.— 1964.— Vol. 239, N 7.— P. 2370—2378.
23. Orrenius S., Ericsson J. L. E., Ernster L. // J. Cell. Biol.— 1965.— Vol. 25, N 3.— P. 627—633.
24. Pelkonen O., Karki N. T. // Chem.-Biol. Interact.— 1973.— Vol. 7, N 1.— P. 93—99.
25. Saito R., Estes L. W., Lombardi B. // Biochim. biophys. Acta.— 1975.— Vol. 381, N 1.— P. 185—194.
26. Schenkman J. B., Remmer H., Estabrook R. W. // Molec. Pharmacol.— 1967.— Vol. 3.— P. 113—123.

Поступила 06.02.89

EFFECT OF  $\alpha$ -TOCOPHEROL AND LIDOCAINE ON STRUCTURE-FUNCTIONAL ALTERATIONS IN LIVER TISSUE ENDOPLASMIC RETICULUM MEMBRANES AFTER INDUCTION WITH PHENOBARBITAL DURING POSTISCHEMIC PERIOD

V. I. Sharapov, O. R. Grek, A. A. Zykov

Institute of Physiology, Siberian Branch of the Academy of Medical Sciences of the USSR, Medical School, Novosibirsk

Inhibition of an increase in total content of unsaturated fatty acids in microsomal lipids induced by phenobarbital, alterations of parameters of the fluorescent probe 1,8-ANS<sup>-</sup> binding with membranes as well as restrictions in induction of liver microsomal monooxygenase enzymatic system were detected during postischemic period after total liver tissue ischemia. Preadministration of  $\alpha$ -tocopherol and lidocaine prevented distinctly the structure-functional alterations induced by phenobarbital in liver microsomal membranes during postischemic period. Possible factors responsible for limitations of the phenobarbital inducing effect during postischemic period are discussed.

© Л. С. ДОЛМАТОВА, 1990

УДК 615.276.3.015.2:615.919:579.843.11.015.4:616.344-018.73-008.94:577.175.8591.076.9

Л. С. Долматова

ВЛИЯНИЕ ИНДОМЕТАЦИНА НА АКТИВНОСТЬ  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - И  $\text{HCO}_3^-$ -АТФаз И СОДЕРЖАНИЕ ПРОСТАГЛАНДИНОВ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ПОДВЗДОШНОЙ КИШКИ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ХОЛЕРНОГО ЭКЗОТОКСИНА

Горнотаежная станция Дальневосточного научного центра АН СССР, Владивосток

Важными регуляторами процессов транспорта электролитов и воды в кишечнике являются простагландины (ПГ) [13]. Попытки исследования их роли в диареогенном действии холерного экзотоксина (ХТ) с использованием ингибиторов биосинтеза ПГ привели к противоречивым результатам [4, 6]. Показано, что индометацин снижает секрецию, вызываемую ХТ, примерно на 80 % [15], увеличивает всасывание жидкости в контрольной петле [15]. Когда индометацин подавляет эффекты ХТ, снижения уровня цАМФ не происходит [9, 15]. Предполагают, что либо индометацин ингибирует ПГ-зависимое звено в секреторном про-

цессе, по времени следующее за синтезом цАМФ, либо оказывает свое влияние на другие механизмы, вовлеченные в секреторный процесс, не зависящие от ПГ-синтеза [9, 15]. Так, полагают [5], что ингибиторы биосинтеза ПГ могут действовать непосредственно на мембрану или ион-транспортные насосы.

Цель настоящей работы — изучение действия ХТ на активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - и  $\text{HCO}_3^-$ -АТФаз в сопоставлении с уровнями ПГ в ткани слизистой оболочки подвздошной кишки крыс на фоне предварительно введенного индометацина.

Методика

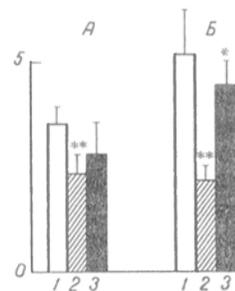
Опыты проводили на беспородных крысах-самцах массой 180—220 г. Холерную диарею вызывали по ранее описанному методу [2] без перевязки кишки. ХТ («Schwarzmann», ФРГ) вводили в дозе 100 мкг на животное внутрикниечно. Операцию производили под тиопенталовым наркозом (60 мг/кг). Контрольные животные получали внутрикниечно физиологический раствор. В отдельной группе опытов за 1 ч до введения ХТ животные получали индометацин («Sigma», США) в дозе 10 мг/кг. Животных забивали путем декапитации через 1 ч после введения токсина или физиологического раствора. Дальнейшую работу проводили при 4 °С. Для определения активности ферментов слизистую оболочку подвздошной кишки соскребали и гомогенизировали в 5 мМ растворе ЭДТА (рН 7,4) с использованием механического гомогенизатора Поттера с тефлоновым пестиком («Wgap», ФРГ). Активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы измеряли на основе метода [7],  $\text{HCO}_3^-$ -АТФазы — по модифицированному методу [8] с использованием 50 мМ  $\text{HCO}_3^-$ . Содержание неорганического фосфата ( $\text{P}_i$ ) определяли по методу [12], белка — по [10].

Для определения содержания ПГ часть подвздошной кишки вырезали и опускали в сосуд Дьюара с жидким азотом. Замороженный таким образом материал хранили при —40 °С до проведения анализа. Затем ткань растрепали в фарфоровой ступке в жидком азоте, быстро взвешивали определенное количество (200 мг) и помещали в пробирку с 2 мл охлажденной смеси этанол — вода в соотношении 1:2 (вес:объем). Пробу подкисляли муравьиной кислотой до рН 3,5 [2]. После центрифугирования объединенные органические фракции выпаривали в вакууме при температуре 55 °С до полного исчезновения запаха. К осадку добавляли 0,2 мл 2,5 % раствора метанола в хлороформе. Для разделения суммарного экстракта ПГ на группы использовали колоночную хроматографию на кремниевой кислоте, как описано в работе [3]. Определение содержания ПГ в пробах осуществляли радиоиммунным методом с использованием наборов «Clinical Assays» и «New England Nuclear» (США). Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием критерия *t*-Стьюдента.

Результаты и обсуждение

На рисунке показано, что ХТ через 1 ч опыта ингибирует активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы на 29 % ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем. Премедикация же индометацином полностью предотвращает этот эффект ХТ.

ХТ вызывает также ингибирование активности  $\text{HCO}_3^-$ -АТФазы на 57 % ( $p < 0,01$ ; см. рисунок), на фоне индометацина — только на 23 % по сравнению с контролем. Эффект индометацина по сниже-



Активность АТФаз у контрольных оперированных крыс (1), при действии ХТ (2) и ХТ на фоне индометацина (3).

По оси ординат — активность АТФаз (в мкмоль  $\text{P}_i$ /ч на 1 мг белка). а —  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза, б —  $\text{HCO}_3^-$ -АТФаза. Одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$  по сравнению с контролем.