

## Изучение влияния экстракта плаценты и нейроткани на мембрано-метаболическую функцию митохондрий и микросом из печени крыс в системе *in vitro*

В.И. Строна, Т.Н. Юрченко, В.В. Рязанцев, В.И. Шепитько, О.С. Прокопюк, А.И. Гордиенко

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г.Харьков*

## Studying the Effect of Placenta and Neurotissue on Membrane Metabolic Function of Rat's Liver Mitochondria and Microsomes *in vitro*

Strona V.I., Yurchenko T.N., Ryazantsev V.V., Shepitko V.I., Prokopyuk O.S., Gordienko A.I.

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov*

На моделях ферментативного и аскорбатзависимого перекисного окисления липидов (ПОЛ) микросом и с помощью оценки метаболического состояния митохондрий печени крыс в системе *in vitro* были изучены антиоксидантные (АО) свойства препаратов плаценты и нейроткани. Существующая криотехнология получения и сохранения биопрепаратов на основе плаценты и нервной ткани обеспечивает высокое содержание биологически активных веществ.

На моделях ферментативного та аскорбатзалежного ПОЛ микросом і за допомогою оцінки метаболічного стану митохондрій печінки щурів у системі *in vitro* були вивчені антиоксидантні властивості препаратів плаценти і нейротканини. Існуюча криотехнологія одержання і зберігання біопрепаратів на основі плаценти і нервової тканини забезпечує високий вміст біологічно активних речовин.

In the models of enzymic ascorbate-dependent lipid peroxidation (LPO) of microsomes and using the estimation of metabolic state of rat's liver mitochondria *in vitro* the authors have studied antioxidative properties of placenta and neurotissue preparations. Existing cryotechnology of obtaining and storage of biopreparations based on placenta and nerve tissue provides a high content of

Использование тканей и клеток фетоплацентарного комплекса предусматривает введение реципиенту не только клеток, сохранивших свой метаболический потенциал, но и большого количества биологически активных веществ, которые обеспечивают рост и развитие эмбриона. Под влиянием биологически активных веществ, в том числе и тех, которые находятся в составе биопрепаратов, могут изменяться свойства мембран митохондриальных и микросомальных клеток, а затем их функциональная активность [2]. Поскольку митохондрии выполняют главную роль в энергообеспечении клетки, а микросомы – в биотрансформации веществ и в других биохимических процессах, представляет научный интерес изучение влияния препаратов экстракта плаценты и нейроткани плода человека на метаболическое состояние интактных митохондрий и процессы ферментативного НАДФ-Н и аскорбатзависимого ПОЛ интактных микросом и обработанных  $CCl_4$  в системе *in vitro*. Для предварительной оценки качества получаемых препаратов, их биологической активности и токсичности в скрининговых исследованиях в качестве биомоделей используют субклеточные органеллы – митохондрии и микросомы [5,9,10]. Это особенно важно для биопрепаратов, получаемых с применением криобиологических

Usage of tissues and cells of fetoplacental complex foresees the introduction to a recipient of not only the cells kept their metabolic potential but also biologically active substances, providing the growth and the development of an embryo. Under the effect of biologically active substances including those being the part of biopreparations the changes of cell membranes, mitochondrial and microsomal, can vary and afterwards their functional activity as well [2]. Since the mitochondria act the main role in energy-providing for a cell, and microsomes do in biotransformation of substances and in other biochemical processes, the studying of the effect of placenta extract and human foetus neurotissue preparations on metabolic state of intact mitochondria and the processes of enzymic NADP-H and ascorbate-dependent LPO of intact microsomes and those of  $CCl_4$ -treated *in vitro* is of scientific interest. For preliminary estimation of the quality of the preparations being obtained, their biological activity and toxicity in screening investigations as biomodels the subcellular organellas, mitochondria and microsomes, are used [5,9,10]. This is particularly important for the biopreparations, obtained using cryobiological technologies, because the question about their effect on biological activity of physical and chemical factors, accompanying the freezing processes, as well as isolation media, freezing procedure, storage and thawing has

биотехнологий, так как остается неясным вопрос влияния на их биологическую активность физико-химических факторов, сопровождающих процесс замораживания, а также сред выделения, процедуры замораживания, хранения и отогрева.

Для оценки АО свойств различных препаратов используются микросомы (изолированная фракция эндоплазматического ретикулума), поскольку в них хорошо воспроизводятся системы ферментативного и аскорбатзависимого ПОЛ [3,4], а митохондрии – для оценки токсикологических свойств препаратов путем исследования эффекта разобщения процессов окисления и фосфорилирования или их ингибирования [5,9].

Цель настоящей работы – изучение АО свойств экстракта плаценты и нейроткани, полученных с помощью криотехнологий, на модели ферментативного и аскорбатзависимого ПОЛ микросом, а также влияния на метаболическое состояние митохондрий печени крыс в системе *in vitro*.

Эксперименты проводили на белых крысах-самцах массой 200-220 г. Исследовали влияние на биохимические показатели криоконсервированного экстракта плаценты человека и суспензии нейроткани плода.

Экстракт получали из ткани плаценты во время кесарева сечения. Ткань хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  время, необходимое для исключения бактериальной и вирусной контаминации. Суспензию церебральной ткани изготавливали из мозговой ткани плода (22 недели гестации), которая находилась при тех же условиях хранения.

Микросомы из печени крыс выделяли по методу [11]. Осадок микросом суспендировали в среде, содержащей 125 ммоль КС1 и 20 ммоль трис-НС1 (рН 7,4). Микросомы, обработанные  $\text{CCl}_4$ , получали после острого токсического гепатита, вызванного однократным введением токсиканта внутрижелудочно в дозе 2,5 мл/кг массы животного в виде 50,0 %-го раствора на подсолнечном масле [7]. Влияние препаратов плаценты и нейроткани на ферментативное и аскорбатзависимое ПОЛ в системе *in vitro* исследовали добавлением их в полярографическую ячейку к интактным и  $\text{CCl}_4$  обработанным микросомам из печени крыс (таблица). ПОЛ оценивали по скорости потребления кислорода [3,4]. Инкубационная смесь объемом 1 мл содержала: 100 ммоль трис-НС1 (рН 7,4); 0,012 ммоль  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ); 4 ммоль АДФ; 1,0-1,5 мг микросомального белка; 1 ммоль НАДФ-Н или 0,8 ммоль аскорбата.

Митохондрии из печени крыс выделяли по методу [8]. До использования в опыте полученный осадок митохондрий хранили на льду. Реакционная среда объемом 1,0 мл содержала: 100 ммоль сахарозы, 75 ммоль КС1, 10 ммоль  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (рН 7,4), 2 ммоль

remained unclear.

To evaluate the antioxidative (AO) properties of various preparations there are used the microsomes (isolated fraction of endoplasmatic reticulum), because in them the systems of enzymic and ascorbate-dependent LPO are well reproduced [3,4] and mitochondria to estimate toxicological properties of preparations by studying the effect of disintegration of oxidation processes and phosphorylation or their inhibiting [5,9].

The aim of this work was the investigation of AO properties of placenta extract and neurotissue, obtained using cryotechnologies in the model of enzymic and ascorbate-dependent LPO of microsomes as well as on metabolic state of rat's liver mitochondria *in vitro*.

The experiments were performed in white male rats of 200-220g. We have studied the effect of cryo-preserved human placenta extract and foetus neurotissue suspension on biochemical indices.

The extract was derived from placenta tissue during Cesarean section. The tissue was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  within the time necessary for excluding bacterial and virus contamination. The suspension of cerebral tissue was prepared from brain tissue of foetus (22 weeks of gestation), being at the same storage conditions.

Microsomes from rats' liver were isolated according to the method [11]. The microsome sediment was suspended in the medium containing 125 mM KCl and 20 mM of tris-HCl (pH 7.4).  $\text{CCl}_4$ -treated microsomes were obtained after acute toxic hepatitis, caused by single intragastrical introduction of toxicant in the dose of 2.5 ml/kg of the animal's mass as 50.0% solution on sunflower oil [7]. The effect of preparations of placenta and neurotissue on enzymic and ascorbate-dependent

Влияние препаратов плаценты и нейроткани на НАДФ-Н зависимое ферментативное ПОЛ микросом из печени крыс  
Effect of placenta and neurotissue preparations on NADP-H dependent enzymic LPO of rat's liver microsomes

Препарат Preparation	Микросомы Microsomes			
	Интактные Intact		Обработанные $\text{CCl}_4$ $\text{CCl}_4$ -treated	
	ID <sub>30</sub>	ID <sub>50</sub>	ID <sub>30</sub>	ID <sub>50</sub>
Экстракт плаценты Placenta extract	0,20	0,36	0,22	0,37
Нейроткань плода Foetus neurotissue	0,16	0,30	0,17	0,30

**Примечание:** ID<sub>30</sub> и ID<sub>50</sub> – доза исследуемых препаратов (мл/мл), ингибирующая процессы ПОЛ микросом на 30 и 50% соответственно.

**Notes:** ID<sub>30</sub> and ID<sub>50</sub> – dose of the preparations under study (ml/ml), inhibiting the LPO processes of microsomes by 30 and 50%, correspondingly.

MgCl<sub>2</sub>, 10 ммоль трис-HCl (pH 7,4). В ячейку вносили 0,05 мл митохондрий, субстратом дыхания для изолированных митохондрий служил сукцинат в концентрации 10 ммоль. Качество выделенных митохондрий контролировали добавлением АДФ в концентрации 200 мкмоль к митохондриям, потребляющим кислород на сукцинате, что стимулирует дыхание в 2,4-3,1 раза. Это свидетельствует о том, что в выделенных митохондриях активно протекают процессы окислительного фосфорилирования. Исследуемые препараты добавляли в полярографическую ячейку к митохондриям на фоне потребления ими кислорода после добавления сукцината и сукцината плюс АДФ. По кривым потребления кислорода митохондриями рассчитывали скорость дыхания в метаболических состояниях 4 и 3 по Чансу. Как правило, к митохондриям и микросомам добавляли от 0,01 до 0,4 мл препаратов; при этом pH реакционных сред не изменялся.

Потребление кислорода суспензиями митохондрий и микросом регистрировали на полярографе LP-7e (Чехия) с использованием закрытого платинового электрода типа Кларка при 30°C.

Микросомы печени являются удобным объектом для изучения АО свойств биологически активных веществ и лекарственных препаратов, поскольку в них хорошо воспроизводятся системы ферментативного и неферментативного ПОЛ, из-за наличия в их мембранах большого количества ненасыщенных фосфолипидов как основных субстратов ПОЛ и фермента P-450, с участием которого протекают реакции ферментативного ПОЛ [1].

Из данных, представленных в таблице, следует, что препараты плаценты и нейроткани ингибируют процессы ферментативного ПОЛ интактных микросом и микросом, обработанных CCl<sub>4</sub>, т.е. они проявляют АО эффект. Следует отметить, что эффект ингибирования ПОЛ (показатели ID<sub>30</sub> и ID<sub>50</sub>) указанными препаратами был одинаков как для интактных микросом, так и для микросом, обработанных CCl<sub>4</sub>, что свидетельствует о существенном содержании биологически активных веществ, имеющих АО свойства и компенсирующих токсическую активацию ПОЛ. Добавление исследуемых препаратов в концентрации от 0,1 до 0,3 мл/мл к микросомам не ингибировало аскорбат-зависимое ПОЛ микросом, т.е. в данной системе ПОЛ указанные препараты не проявляли АО эффекта. Таким образом, из результатов проведенных исследований можно сделать вывод, что АО свойствами данные препараты обладают в условиях ферментзависимого ПОЛ.

Митохондрии как модельный объект исследования используются для изучения механизма действия биологически активных веществ на

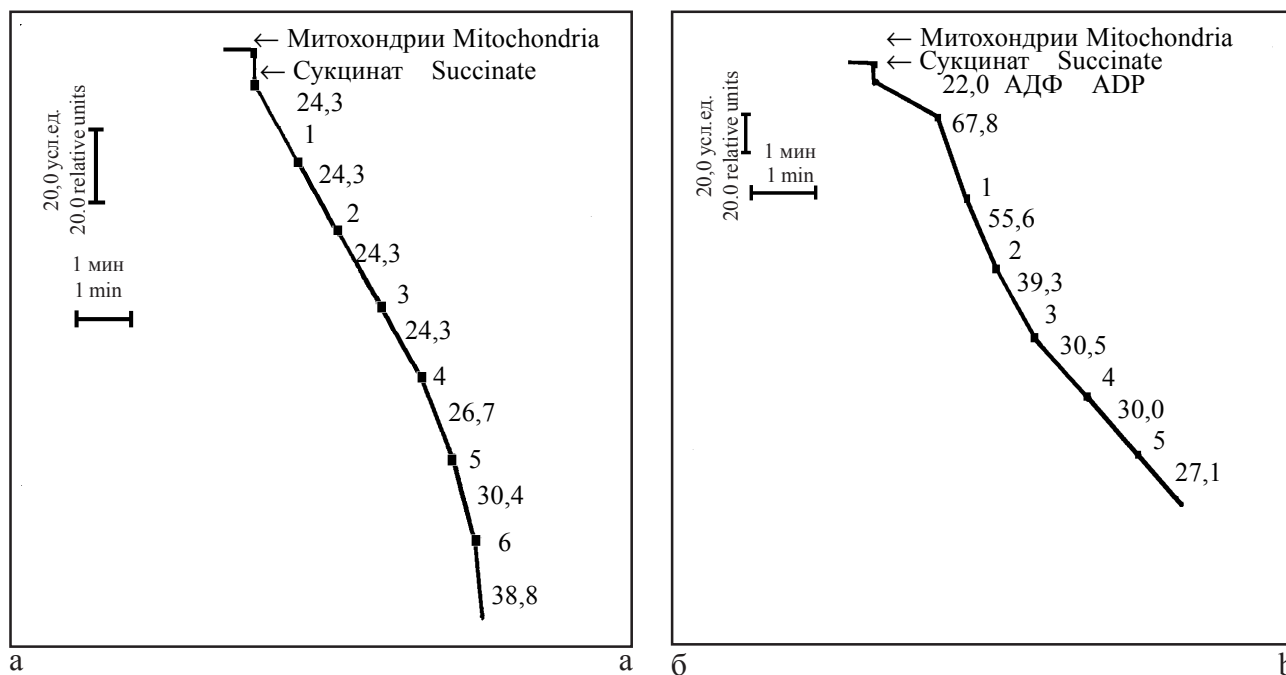
LPO was estimated on the rate of oxygen consumption [3,4]. Incubational mixture of 1ml volume comprised: 100 mM of tris-HCl (pH 7.4); 0.012 mM Fe<sup>2+</sup>(Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>H<sub>2</sub>O); 4 mM ADP; 1.0-1.5 mg of microsomal protein; 1mM NADP-H or 0.8 mM of ascorbate.

Mitochondria from rat liver were isolated according to the method [8]. Before being used in the experiment the reaction medium of 1.0 ml volume contained: 100 mM of sucrose, 75 mM of KCl, 10 mM of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.4), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM tris-HCl (pH 7.4). To the well 0.05 ml of mitochondria was introduced, succinate under concentration of 10 mM served as respiration substrate for isolated mitochondria. The quality of isolated mitochondria was controlled by adding ADP under concentration of 200 mcM to the mitochondria, consuming oxygen with succinate, by stimulating the respiration in 2.4-3.1 times. This testifies to the fact, that in isolated mitochondria the processes of oxidative phosphorylation proceed actively. The preparations under study were added into polarographic well to mitochondria on the background of oxygen consumption by them after adding succinate and succinate plus ADP. On the curves of oxygen consumption by mitochondria the respiration rate was calculated in metabolic states 4 and 3 according to Chance. As a rule, from 0,01 to 0,4 ml of preparations were added to mitochondria; in this case pH of reaction media did not change.

Oxygen consumption by mitochondria suspensions and microsomes was recorded with polarographer LP-7e (Czechia) using closed platinum Clark's electrode at 30°C.

Liver microsomes are convenient objects for studying the AO properties of biologically active substances and medicinal preparations, because due to the presence of a big number of non-saturated phospholipids the systems of enzymic and non-enzymic LPO are well reproduced in their membranes as main substrates of LPO and P-450 enzyme with the participation of which the reactions of enzymic LPO proceed [1].

The data shown in the Table demonstrate that preparations of placenta and neurotissue inhibit the processes of enzymic LPO of intact microsomes and those CCl<sub>4</sub>-treated, i.e. they manifest AO effect. It should be noted that the effect of LPO inhibiting (ID<sub>30</sub> and ID<sub>50</sub> indices) by the mentioned preparations was the same both for intact microsomes and for CCl<sub>4</sub>-treated ones, that testifies to a significant content of biologically active substances with AO properties and compensating the toxic LPO activation. Adding the preparations under study under the concentration from 0.1 to 0.3 ml/ml to microsomes did not inhibit ascorbate-dependent LPO of microsomes, i.e. in this system of LPO the mentioned preparations did not



**Рис.1.** Поглощение кислорода изолированными митохондриями: **а** – в состоянии 4 по Чансу под влиянием экстракта плаценты (добавки: сукцината - 10 ммоль): 1 – добавка препарата - 0,02 мл, 2,3,4,5,6 – по 0,05 мл. **б** – в состоянии 3 по Чансу под влиянием экстракта плаценты (добавки: сукцината - 10 ммоль, АДФ – 20 мкмоль): 1,2,3,4,5 – добавки препарата по 0,05 мл. Цифры над кривыми обозначают скорость поглощения кислорода (в усл. ед. мин<sup>-1</sup> 0,05 мл митохондрий).

**Fig. 1.** Oxygen consumption by isolated mitochondria: **a** – in the state 4 according to Chance under the effect of placenta extract (additives: 10 mM of succinate): 1 – adding the preparation by 0.02 ml, 2,3,4,5,6 – by 0.05 ml. **b** – in the state 3 according to Chance under the effect of placenta extract (additives: 10mM of succinate, 20 mcM of ADP): 1,2,3,4,5 – additives of preparation by 0.05 ml. Figures under curves mean the rates of oxygen consumption (in relative units min<sup>-1</sup> 0.05 ml of mitochondria).

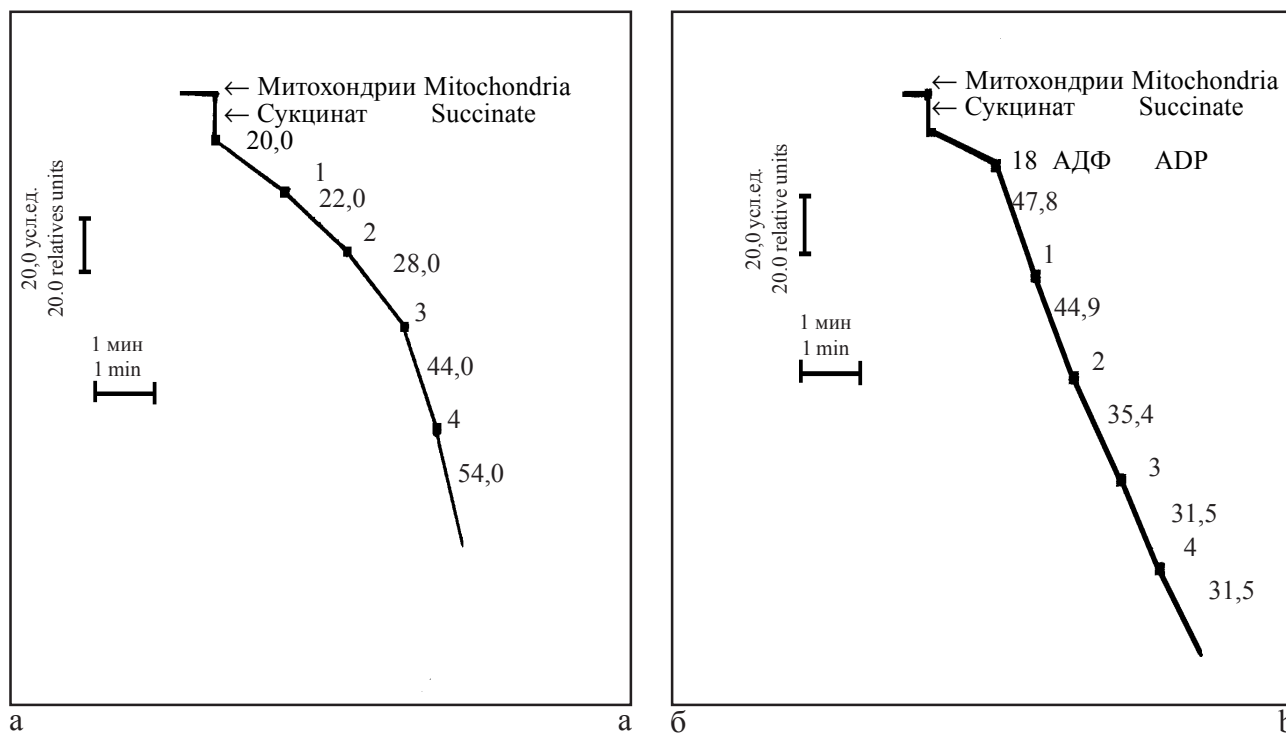
биоэнергетические процессы, сопряженные с мембранами, и определения токсических характеристик в системе *in vitro* различных по природе биологически активных препаратов. Добавление препарата плаценты в концентрации от 0,02 до 0,15 мл/мл не влияет на скорость дыхания в состоянии 4 по Чансу, т.е. препарат не разобщает процессы окисления и фосфорилирования митохондрий (рис. 1,а). В дозе 0,22 мл/мл препарат ускоряет дыхание митохондрий на 25,1%, а в дозе 0,27 мл/мл – на 50,2%, что может свидетельствовать о разобщении процессов окисления и фосфорилирования (рис.1,б). В состоянии 3 по Чансу препарат плаценты в дозе 0,05 мл/мл ингибировал дыхание на 18,0; в дозе 0,1 мл/мл – на 42,0; в дозе 0,15 мл/мл – на 55,0 %, что может отражать замедление скорости синтеза АТФ.

Добавление препарата нейроткани в концентрации 0,01 мл/мл не влияло на скорость дыхания в состоянии 4 по Чансу (рис. 2, а). В дозе 0,03 мл/мл препарат ускорял дыхание митохондрий в 1,4; в дозе 0,08 мл/мл - в 2,2, а в дозе 0,13 мл/мл - в 2,7 раза, что свидетельствует о разобщении процессов окисления и фосфорилирования митохондрий (рис. 2,б). В состоянии 3 по Чансу препарат нейроткани в дозе 0,02 мл/мл ингибировал дыхание на 6,1; в дозе 0,07 мл/мл - на 26,0, в дозе 0,12 мл/мл - на 34,2 %.

manifest AO effect. Thus from the results of presented investigations we can conclude that these preparations have AO properties under conditions of enzyme-dependent LPO.

Mitochondria as a model object of studies are used for the studying the mechanism of action of biologically active substances on bioenergetic processes, related to membranes, and determination of toxic characteristics *in vitro* which differ by origin of biologically active preparations. Adding the placenta preparation under the concentration from 0.02 to 0.15 ml/ml does not affect the respiration rate in the state 4 according to Chance, i.e. the preparation does not disintegrate the processes of oxidation and phosphorylation for mitochondria (Fig. 1,a). In the dose of 0.22 ml/ml the preparation accelerates the respiration of mitochondria by 25.1% and in the dose 0.27 ml/ml by 50.2%, testifying to the disintegration of oxidation and phosphorylation processes (Fig. 1,b). In the state 3 according to Chance the placenta preparation in the dose of 0.05 ml/ml inhibited the respiration by 18%, in the dose of 0.1 ml/ml by 42%, in the dose of 0.15 ml/ml by 55%, that can reflect the slowing down of the ATP synthesis rate.

In the dose of 0.03 ml/ml the preparation accelerated the respiration of mitochondria in 1.4 times, in the dose of 0.08 ml/ml in 2.2 times and in the dose of 0.13 ml/ml



**Рис. 2.** Поглощение кислорода изолированными митохондриями: **а** - в состоянии 4 по Чансу под влиянием препарата нейроткани (добавки: сукцината - 10 ммоль.): 1 – добавки препарата, мл - 0,01; 2 - 0,02; 3,4 - по 0,05. **б** - в состоянии 3 по Чансу под влиянием препарата нейроткани (добавки: сукцината - 10 ммоль.): 1 – добавки препарата, мл - 0,02; 2,3,4,5 - по 0,05. Цифры над кривыми обозначают скорость поглощения кислорода (в усл.ед.мин<sup>-1</sup> 0,05 мл митохондрий).

**Fig. 2.** Oxygen consumption by isolated mitochondria: **a** - in the state 4 according to Chance under the effect of neurotissue preparation (additives: 10 mM of succinate): 1 – adding the preparation by 0.01 ml, 2 – by 0.02, 3,4 - by 0.05 ml. **b** - in the state 3 according to Chance under the effect of neurotissue preparation (additives: 10mM of succinate, 20 mM of ADP): 1 – adding by 0.02; 2,3,4,5 – by 0.05 ml. Figures under curves mean the rates of oxygen consumption (in relative units min<sup>-1</sup> 0.05 ml of mitochondria).

Таким образом, наблюдается дозозависимый эффект влияния препаратов на скорость поглощения кислорода и энергетическое состояние митохондрий. Данный эффект может осуществляться за счет содержащихся в препаратах биологически активных веществ гормональной, липидной природы, обладающих разобщающими свойствами или накопившимися продуктами ПОЛ. Замедление синтеза АТФ (состояние 3 по Чансу) при повышении дозы препаратов плаценты и нейроткани может быть вызвано высоким содержанием макроэргических соединений, в частности АТФ, что при отрицательной обратной связи оказывает регулирующий эффект, выражающийся в снижении потребления кислорода митохондриями. Следовательно, исследуемые препараты в своем составе имеют в высокой концентрации биологически активные вещества, обладающие высокой АО активностью, и достаточное количество макроэргов (АТФ).

### Литература

1. Арчаков А.И. Микросомальное окисление.- М.: Наука, 975.– 327 с.

in 2.7 times, that testifies to disintegration of mitochondria oxidation and phosphorylation processes (Fig. 2b). In the state 3 according to Chance the preparation of neurotissue in the dose of 0.02 ml/ml inhibited the respiration by 6.1, in the dose of 0.07 ml/ml by 26.0 and in the dose of 0.12 ml/ml by 34.2%.

Thus we have observed a dose-dependent effect of preparation on the rate of oxygen consumption and energetic state of mitochondria. This effect can be accomplished due to containing in preparations biologically active substances of hormonal, lipid origin, possessing disintegral properties or accumulated LPO products. Slowing-down the ATP synthesis (state 3 by Chance) during exceeding the dose of placenta and neurotissue preparations may be caused by a high content of macroergic compounds in particular ATP, that by negative reverse connection causes a regulating effect, manifesting in the reduction of oxygen consumption by mitochondria. Consequently the preparations under study in their composition have biologically active substances with a high AO activity under high concentration and essential number of macroergs (ATP).

2. Биохимическая фармакология/ Под ред. П.В. Сергеева.– М.: Высш. шк., 1982.– 342 с.
3. Гордиенко А.Д., Комиссаренко Н.Ф., Левченко В.В. и др. Экспресс-метод определения антиоксидантной активности фенольных соединений // Химико-фарм. журн.– 1988.– №1.– С. 121–123.
4. Гордиенко А.Д., Левченко В.В., Оболенцева Г.В. Влияние гепатопротекторов - флакумина и эссенциале на скорость потребления кислорода при ферментативном и аскорбатзависимом перекисном окислении липидов микросом *in vitro* и *in vivo* // Лаб. животные.– 1992.– Т. 2.– №1.– С. 5–8.
5. Гордиенко А.Д., Конев Ф.А. Влияние амниоцена на дыхательную активность митохондрий и гепатоцитов, изолированных из печени крыс // Фармация.– 1993.– Т. 43.– № 2.– С. 57–58.
6. Гордиенко А.Д., Конев Ф.А., Божков А.И. Вплив амніоцену на структурно-функціональну характеристику мікрсом із печінки щурів // Вісник фармації.– 1995.– № 1-2.– С. 108–110.
7. Добрынина О.В., Мигушина В.Л., Патинина С.З. и др. Репарация фосфолипидов мембран печени крыс при отравлении тетрахлорметаном // Бюл.эксперим. биол. и мед.– 1987.– Т. 104.– №9.– С. 301–303.
8. Мосолова И.М., Горская И.А., Шольц К.Ф. и др. Выделение интактных митохондрий из печени крыс // Методы современной биохимии. – М.: Наука, 1975.– С. 45–48.
9. Ротенберг Ю.С. Эксперименты на изолированных митохондриях и возможности количественного переноса полученных результатов на целостный организм: Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом.– М.: Наука, 1973.– С. 213–219.
10. Сергеев П.В., Галенко-Ярошевский М.Н., Шимановский Н.Л. Очерки биохимической фармакологии.– М., 1966.– 384 с.
11. Kamath S.A., Narayan K.A. Interaction of Ca with endoplasmatic reticulum of rat liver: a standardized procedure for the isolation of rat liver microsomes // *Analyt. Biochem.*– 1972.– Vol.48.– №1.– P. 53-61.

## References

1. Archakov A.I. Microsomal oxidation. M: Nauka, 1975. – 327 p.
2. Biochemical pharmacology/ Ed. By P.V. Sergeyev. – M: Vysshaya shkola, 1982.– 342 p.
3. Gordienko A.D., Komissarenko N.F., Levchenko V.V. et al. Express-method of determination of antioxidative activity of phenol compounds // *Khimiko-farm. Zhurnal.*– 1988.– N1.– P. 121-123.
4. Gordienko A.D., Levchenko V.V., Obolentseva G.V. Effect of hepatoprotectors – flacumin and essentielle on the rate of oxygen consumption ar enzymic and ascorbate-dependent peroxidation of lipids of microsomes in vitro and in vivo // *Laboratorye zhivotnye.*– 1992.– Vol. 2.– N1.– P. 5-8.
5. Gordienko A.D., Konev F.A. Effect of amniocen on respiratory activity of mitochondria and hepatocytes isolated from rat's liver // *Farmatsiya.*– 1993.– Vol. 43.– N2.– P. 57-58.
6. Gordienko A.D., Konev F.A., Bozhkov A.I. Effect of amniocen on structural and functional characteristics of rat's liver microsomes // *Visnyk farmatsii.*– 1995.– N1-2. – P. 108-110.
7. Dobrynina O.V., Migushina V.L., Patinina S.Z. et al. Reparation of phospholipids of rat's liver membranes during poisoning with tetrachlormethane // *Bul. Experim. biol. and med.*– 1987.– Vol. 104.– N9. – P. 301-303.
8. Mosolova I.M., Gorskaya I.A., Sholts K.F. et al. Isolation of intact mitochondria from rat's liver // *Methods of modern biochemistry.*– M.: Nauka, 1975.– P. 45-48.
9. Rotenberg Yu.S. Experiments on isolated mitochondria and possibility of quantitative transfer of obtained results to an integral mechanism: Manual on studying biological oxidation by polarographic method.– M: Nauka, 1973.– P. 213-219.
10. Sergeyev P.V., Galenko-Yaroshevsky M.N., Shimanovsky N.L. Sketches of biochemical pharmacology. – M.– 1966.– 384p.
11. Lamath S.A, Narayan K.A. Interaction of Ca with endoplasmatic reticulum of rat liver: a standardized procedure for the isolation of rat liver microsomes // *Analyt. Biochem.*– 1972.– Vol. 48 .– N1. – P. 53-61.

Поступила 04.06.2002

Accepted in 04.06.2002