

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ ТА КРІОМЕДИЦИНИ

На правах рукопису

ЩЕНЯВСЬКИЙ Іван Йосипович

ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ХОЛОДОСТІЙКОСТІ  
ЕРИТРОЦИТІВ ДОВГОХВОСТИХ ХОВРАХІВ

03.00.22 - кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата  
біологічних наук

Харків - 1994



Робота виконана в Інституті проблем кріобіології та кріомедицини АН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук,  
професор О.К.ГУЛЕВСЬКИЙ

Науковий консультант: кандидат біологічних наук,  
от.н.с. В.І.Загнойко

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,  
зав.відділом біофізики, ІПКІК АН України  
В.А.Моїсєєв,

доктор біологічних наук, професор,  
зав.кафедрою біохімії Харківського  
зоо-ветеринарного інституту А.В.Чечоткін

Ведуча організація: Інститут біохімії ім.Палладіна,  
м.Київ.

Захист відбудеться "22" Березня 1994 року в 13<sup>30</sup> год  
на засіданні спеціалізованої ради Д ЛІ6.60.01 у  
Інституті проблем кріобіології та кріомедицини АН України  
/ЗІ0015, Харків-15, вул.Пераяслівська, 23/.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці  
Інституту проблем кріобіології та кріомедицини АН України.

Автореферат розіслано "22" Лютого 1994 р.

Вчений секретар  
Спеціалізованої ради,  
доктор медичних наук

А.М.Гольцев

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Насьогодні однією з актуальних проблем кріобіології є розробка нових технологій зберігання крові та її формених елементів в умовах гіпотермії. Досягнуті за останні 10-20 років успіхи у цій галузі, головним чином, базуються на введенні до складу консервуючих середовищ похідних нуклеозидів, для яких пов'язана з забезпеченням енергетичного обміну формених елементів крові. Проте, методом гіпотермічного зберігання з застосуванням похідних нуклеозидів притаманний цілий ряд суттєвих недоліків. Перш за все, висока коштовність консервуючих середовищ, а також необхідність вилучення похідних, здатних викликати в організмі реципієнта побічні ефекти. В зв'язку з вищевикладеним, продовжуються пошуки нових підходів для вирішення задач довготривалого зберігання крові в умовах гіпотермії. В цьому відношенні одним із перспективних напрямків є дослідження механізмів резистентності до понижених температур клітин зимостійких тварин / *Kimchi S.L., Willis J.S., 1977*; Лаєвский М.М., Когунов Г.Ф., 1987/.

Як відомо для виживання клітин за низьких температур критичне значення має їхня здатність підтримувати іонний баланс, складовими якого є високий внутрішньоклітинний вміст  $K^+$  та низькі вміста  $Mg^{2+}$  і  $Ca^{2+}$ . Втрата внутрішньоклітинного  $K^+$  та неоподірне надходження до цитоплазми  $Mg^{2+}$  і  $Ca^{2+}$  призводить до небухання клітин та втрати клітинних функцій, в кінці-кінців до гемолізу.

Показано, що тканини та клітини гібернаторів демонструють більшу холододову толерантність ніж тканини та клітини негібернаторів, що виражається, зокрема, у кращому збереженні ними внутрішньоклітинного  $K^+$  після кількох днів зберігання при  $5^{\circ}C$  / *Willis J.S., 1979*/. Досить переконливо показано, що однією з головних причин холододової толерантності еритроцитів / *Ellery J.S., Willis J.S., 1982*/, а також і інших клітин / *Willis J.S., Ellery J.C., Jagers A.R., 1981*/ гібернаторів є збереження ними досить високої активності  $Mg^{2+}/K^+$ -насосу. Досить багато уваги приділяється також вивченню впливу низької температури на різні складові частини пасивної проницності еритроцитарних мембран гібернаторів в порівнянні з негібернаторами / *Hall A.C., Willis J.S., 1981*/. Проте механізми, які за умов гіпотермії

забезпечують клітинам гібернаторів в порівнянні з клітинами негібернаторів, скажімо, менше зниження активності  $Na^+$ /  $K^+$ -наосу, чи більше зниження пасивної проникності, до цього часу не відомі. Очевидно, найбільш важливим для з'ясування механізму резистентності еритроцитів до гіпотермії є вивчення структурно-функціонального стану мембран і, зокрема, стану їх цитоскелету, білкового та ліпідного складу.

**Мета роботи.** Метою даних досліджень було вивчення механізмів резистентності еритроцитів зимосплячких тварин до гіпотермії.

**Задачі досліджень.** Згідно з поставленою метою роботи, передбачали вирішати такі експериментальні задачі:

1. Провести спостереження за внутрішньоклітинним вмістом і за станом систем транспорту  $K^+$  та  $Na^+$  в еритроцитах *C. undulatus* протягом зимового та літнього сезонів.

2. Дослідити вплив гіпотермічного зберігання на внутрішньоклітинний вміст  $K^+$  та  $Na^+$ , і на роботу систем транспорту  $K^+$ ,  $Na^+$  і  $Ca^{2+}$  еритроцитів довгохвостих ховрахів, в залежності від функціонального стану гібернатора під час взяття крові.

3. Вивчити зміни цитоскелету мембран еритроцитів ховраха *C. undulatus* під впливом гіпотермічного зберігання за даними гел'електрофорезу з застосуванням зшиваючих агентів, в залежності від функціонального стану тварини в момент взяття крові.

4. Дослідити властивості ліпідного бішару мембран еритроцитів гібернуючих ховрахів в порівнянні з ліпідами негібернаторів.

**Наукова новизна.** В роботі вперше здійснено спостереження за змінами іонного складу еритроцитів гібернуючої тварини у різних її функціональних станах на протязі року.

Робота є однією із праць, які містять докази кращої регуляції за низьких температур внутрішньоклітинного вмісту  $Ca^{2+}$  у гібернуючих тварин порівняно не тільки з негібернаторами, а й з гібернаторами в активному стані. Завдяки проведеним у роботі дослідженням впливу гіпотермічного зберігання /2-4°C/ на структуру білків цитоскелету еритроцитів довгохвостих ховрахів, робота є кроком до з'ясування механізмів холодової резистентності клітин гетеротермних тварин.

Теоретичне та практичне значення роботи. В теоретичному плані важливим є результати дослідження впливу низької температури на адатність еритроцитів гібернаторів та негібернаторів підтримувати низьку внутрішньоклітинну концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$ , оскільки, як відомо, саме  $\text{Ca}^{2+}$  - залежний вихід  $\text{K}^+$  із клітин є однією з головних причин порушення іонного балансу за умов гіпотермії в еритроцитах гомеотермів, на відміну від клітин гібернаторів, де цього не спостерігається. Крім того, шляхом дослідження впливу гіпотермічного зберігання на структуру білків цитоскелету еритроцитів гібернаторів, перебуваючих у різних функціональних станах, та негібернаторів, було отримано нові факти щодо адаптивних механізмів, які діють на клітинному та молекулярному рівнях у зимосплячних тварин.

Практичне значення проведених досліджень полягає в тому, що на їх основі можуть бути сформовані нові підходи до розробки принципово нових методів довгочасного зберігання еритроцитів в умовах гіпотермії.

Основні висновки, винесені на захист:

1. Для еритроцитів гібернатора *Citellus undulatus* характерні сезонні зміни у внутрішньоклітинному іонному складові та у роботі систем його підтримки /  $\text{Na}^+$  /  $\text{K}^+$ -насос і пасивний транспорт  $\text{K}^+$  та  $\text{Na}^+$  /, які не пов'язані з функціональним станом /"сплячка", чи "активність"/ тварина.

2. Еритроцити гібернуючих довгохвостих ховрахів значно менше потерпають від впливу довгочасного гіпотермічного зберігання, порівняно з клітинами цього ж виду в інших функціональних станах та з клітинами негібернаторів, що проявляється у кращому збереженні ними за час дії гіпотермії іонного гомеостазу /внутрішньоклітинний вміст  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ / та дієвості систем його підтримки /  $\text{Na}^+$  /  $\text{K}^+$ -насос,  $\text{Ca}^{2+}$ -насос, пасивна проникність для іонів/.

3. Краща холодовитривалість еритроцитів гібернуючих гібернаторів, порівняно з клітинами активних гібернаторів та тварин негібернуючих видів, має місце внаслідок змін у кількісному вмістові в їхніх мембранах деяких білків, які відбуваються з настанням сезону гібернації, та завдяки високій стабільності структури білків цитоскелету.

Апробація роботи. Матеріали роботи доповідались на VI Українському біохімічному з'їзді /Київ, 1992/ та на Конференції молодих вчених ІШКІК АН України /Харків, 1992/.

Публікації. По матеріалах дисертації опубліковано 6 робіт.

Структура дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, 3 глав власних досліджень та їх обговорення, закінчення, виводів та списку літератури, який включає 130 робіт закордонних авторів та 40 робіт вітчизняних авторів. Робота викладена на 100 сторінках, містить 2 таблиці та 29 малюнків.

#### Матеріали та методи досліджень.

Головним об'єктом досліджень правили еритроцити довгохвостих ховрахів *Citellus undulatus*. Кров брали шляхом декапітації у тварин, які перебували у різних функціональних станах - в активному, під час зимової сплячки, або після штучного пробудження. В деяких експериментах у ролі об'єктів порівняння використовувалися кров та еритроцити щурів лінії *Wistar* та донорські.

Білі тіні еритроцитів отримували як описано в роботі / *Fairbanks B. et al*, 1971/. Концентрацію білку в пробах визначали по / *Lowry O. H. et al*, 1951/. Електрофорез мембранних білків та ідентифікацію білкових полос в гелях здійснювали за методом / *Fairbanks B. et al*, 1971/. Де зитометрію гелів провадили на пристрої *SDS-200* /США/. Обробку мембран діамідом здійснювали за методом / *Haest C.W. m. et al*, 1977/.

Бміст  $K^+$  та  $Na^+$  в еритроцитах та  $K^+$  в плазмі крові визначали методом полум'яної фотометрії / *Eilam V., Stein W. D.*, 1974/. Швидкість активного транспорту  $^{86}Rb^+$  до еритроцитів вимірювали по / *Лашко В.К. и др.*, 1974/. Для порівняння активності за умов гіпотермії  $Ca^{2+}$ -насосу еритроцитів гомеотермних та гетеротермних тварин, до частини проб, котрі підлягали гіпотермічному зберіганню з  $^{45}Ca^{2+}$ , вносили інгібітор  $Ca^{2+}$ -насосу -  $La^{3+}$ . Різниця у рівнях накопичення еритроцитами  $^{45}Ca^{2+}$  в присутності  $La^{3+}$  та в його відсутності відображала роботу  $Ca^{2+}$ -насосу.

Екстракцію ліпідів провадили по / *Кейтс М.*, 1975/.

Мультивітамелярні ліпосоми отримували за методикою / *Bangham et al*, 1974/.

Вимірювання радіоактивності здійснювали на лічильнику радіоактивності німецької фірми „*Beckman*“

Статистичну обробку результатів проводили по методу Стюдента-Фішера з деякими модифікаціями /Бейлі Н., 1983/ з урахуванням малих розмірів вибірок.

В експериментах використовували реагенти для проведення електрофорезу та фарбування білків угелі, діамід, суабайн, додецилоульфат натрію виробництва фірми „*Zeiss*“/ФРГ/,  $^3\text{H}$ -інулін - „*Amersham*“ /Англія/,  $^{14}\text{C}$ -глікозу, отриману з інституту по дослідженню, виробництву та застосуванню радіоактивних препаратів ЧСФР, а також вітчизняні реактиви кваліфікації "ч.д.а" або "х.ч."

#### РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Дослідження сезонних змін в іонному балансі еритроцитів довгохвостих ховрахів та в роботі систем, які забезпечують його підтримку.

Не було виявлено достовірних відмінностей у внутрішньому вмістові як  $\text{Na}^+$ , так і  $\text{K}^+$  /що узгоджувалось з даними, отриманими на цьому ж об'єкті раніш/ /Дювелький М.М., Шегунов Г.Ф., 1987/. Показники швидкостей суабайнзалежного та суабайннезалежного входу  $^{86}\text{Rb}^+$ , відображаючих, відповідно, роботу  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -насосу та пасивну проникність еритроцитарної мембрани для  $^{86}\text{Rb}^+$  також не мали достовірних відмінностей, хоча, як і у попередньому випадку, маля місце досить очевидна тенденція до зміни цих показників у активних тварин порівняно зі сплячими та штучнопробудженими. Проте, спостереження за сезонними змінами вмісту одновалентних катіонів в еритроцитах довгохвостих ховрахів *Citellus undulatus* переконливо показали, що по мірі наближення весняно-літнього сезону спостерігається поступове збільшення вмісту  $\text{K}^+$ , як в клітинах тварин, що знаходились під час взяття крові в стані сплячки, так і в еритроцитах отриманих від штучно пробуджених тварин.

Навесні, з березня по травень, продовжується збільшення вмісту  $\text{K}^+$  в еритроцитах ховрахів, який потім починає зменшуватись і до початку вересня уже досягає рівня характерного для сплячих та штучно пробуджених тварин у січні-літку; що стосується вмісту в

еритроцитах іншого одновалентного катіону -  $Mg^{+}$ , то змін його внутрішньоклітинного вмісту в зимову пору встановлено не було. Помітно цей показник був знижений тільки в активних тварин з березня по травень, а потім він починає поступово зростати і вже наприкінці липня наближається до рівня, характерного для березня, а до початку вересня, коли тварини розпочинають готуватися до залітання у сплячку, стає таким же високим, як у сплячих та штучно-пробуджених тварин у січні-лютому.

Збільшення вмісту  $K^{+}$  в плазмі крові ховраха після штучного пробудження, а також більш високий його вміст у плазмі активних тварин, порівняно зі сплячими, очевидно, може пояснюватися поступанням цього йону з клітин збудливих тканин потривоженої тварини /Монин Ю.Г., Гончаревская О.А. 1987/. Показано, що, як швидкість суабінезалежного входу  $^{86}Rb^{+}$ , відображаюча роботу  $Mg^{+}$   $K^{+}$ -насосу, так і швидкість суабінезалежного входу  $^{86}Rb^{+}$ , відображаюча пасивну проникність еритроцитарної мембрани для іону  $K^{+}$ , поступово збільшувались з наближенням весни і у сплячих, і у штучнопробуджених тварин. З приближенням же осені, у активних тварин обидва ці показники паралельно знижувались. Виявивши, таким чином, сезонні зміни в іонному балансі еритроцитів довгохвостих ховрахів, а також зміни в роботі системи, забезпечуючої його підтримку, які нашою думкою на думку про можливість і інших структурно-функціональних змін еритроцитарних мембран, пов'язаних не з функціональним станом /сплячка чи активність/, а з сезонними ритмами, ми в наших подальших дослідях /в 92-93 рр./ використовували лише кров ховрахів, взятую або ж у лютому /в випадку стану сплячки чи штучного пробудження/, або ж в кінці травня та на початку червня /в випадку активних тварин/. За таких умов еритроцити, які використовувались нами в експериментах, мали показники вмісту  $K^{+}$  та  $Mg^{+}$ , кстрі наведені у таблиці I.

Таблиця I. Вміст одновалентних катіонів в еритроцитах довгохвостих ховрахів

Показник /МЗКВ/л	Сплячі /лютий/	Пробудження між сезонами /липень/	Активні /травень-червень/
$[K^{+}]$ внутр.	$88,1 \pm 7,9^x$	$92,9 \pm 8,1^x$	$110,7 \pm 7,1$
$[Mg^{+}]$ внутр.	$27,3 \pm 4,3^x$	$25,6 \pm 2,7^x$	$19,5 \pm 3,2$

<sup>x</sup> Відмінність в порівнянні з активними тваринами достовірні /  $P < 0,05$  /.

Таким чином, отримані результати свідчать про наявність значних сезонних змін у внутрішньому йонному складі еритроцитів довгохвостих ховрахів *Citellus undulatus*, не пов'язаних з функціональним станом /сплячка чи активності/ цього гібернатора, тому розбіжності відповідних даних у різних авторів, отриманих на еритроцитах інших видів гібернучих тварин, очевидно, можуть бути пояснені тим, що вимірювання здійснювались ними в різні місяці.

Дослідження впливу гіпотермічного зберігання на йонний гомеостаз еритроцитів гетеро- та гомеотермних тварин.

Вимірювання вмісту  $K^+$  у плазмі крові ховрахів: та щура після попереднього гіпотермічного /2-4°C/ зберігання цієї крові протягом певного часу показало, що еритроцити гібернучих ховрахів значно краще, ніж еритроцити щура, зберігають в умовах гіпотермії внутрішньоклітинний  $K^+$ . Дещо швидше, ніж еритроцити сплячки, втрачали  $K^+$  еритроцити штучно пробуджених ховрахів, а еритроцити активних тварин, взяті влітку, втрачали  $K^+$  майже так само швидко, як і клітини гомеотермної тварини - щура.

Таблиця 2. Вплив гіпотермічного зберігання протягом місяця на показники йонного гомеостазу еритроцитів довгохвостих ховрахів /1 - свіжа кров, 2 - кров після одного місяця зберігання/.

Стан тварин Показник Йонного гомеостазу	Гібернучі /п=10/			Штучно пробуджені /п=10/			Активні /п=8/		
	1	1	2	1	1	2	1	1	2
Внутрішня концентрація $K^+$	88,1 $\pm$ 7,91	45,6 $\pm$ 3,2	92,9 $\pm$ 8,1	40,4 $\pm$ 1,6	110,7 $\pm$ 7,1	23,0 $\pm$ 2,7			
Внутрішня концентрація $Mg^{2+}$	27,3 $\pm$ 4,31	41,4 $\pm$ 3,81	25,6 $\pm$ 2,7	51,2 $\pm$ 3,3	19,5 $\pm$ 3,2	61,1 $\pm$ 3,9			
Суабайнеазотний ахід $85 K^+$	0,535 $\pm$ 0,060	0,230 $\pm$ 0,040	0,570 $\pm$ 0,065	0,095 $\pm$ 0,020	0,075 $\pm$ 0,055	0,035 $\pm$ 0,015			
Суабайнеазотний ахід $86 K^+$	0,575 $\pm$ 0,070	0,500 $\pm$ 0,085	0,485 $\pm$ 0,065	0,765 $\pm$ 0,075	0,715 $\pm$ 0,055	0,355 $\pm$ 0,045			

З таблиці 2 видно, що зниження внутрішньоклітинної концентрації  $K^+$  менш значне в еритроцитах з крові спличих тварин. Дещо нижчий рівень  $K^+$  спостерігається в еритроцитах, взятих на зберігання ліоля штучного пробудження тварин, а найдуше він знижується в еритроцитах активних тварин. Накопичення  $Mg^{2+}$  в еритроцитах у процесі гіпотермічного зберігання протягом одного місяця має зворотню тенденцію.

Вимірювання оубаїнзалежного накопичення клітинами  $^{86}Rb^+$ , яке проводилось на цойноваділєнах еритроцитах та на еритроцитах, які зберігались протягом одного місяця в умовах гіпотермії /2-4°C/, показало, що при перенесенні з холодильника в середовище інкубації з температурою 37°C, еритроцити з крові спличих ховрахів могли відновлювати швидкість оубаїнзалежного транспорту  $^{86}Rb^+$  до найбільш високого рівня. Дещо нижчою ця здатність виявилась у штучнопробуджєних ховрахів, а в клітинах активних тварин, які перед початком гіпотермічного зберігання демонстрували найбільш високий показник, при поверненні в умови нормотермії активний транспорт залишався пригніченим. Про краще збереження при гіпотермічному зберіганні бар'єрних властивостей мембранами еритроцитів спличих ховрахів свідчать також дані вимірювання швидкості оубаїнечутливого /пасивного/ накопичення  $^{86}Rb^+$ . Нами також було здійснено спробу вивчати вплив гіпотермічного зберігання на здатність еритроцитів довгохвостих ховрахів, які знаходились у різних функціональних станах, та гомеотермію тварини - шкура підтримувати внутрішньоклітинну концентрацію  $Ca^{2+}$ , оскільки на думку багатьох авторів, саме  $Ca^{2+}$  - залежний витік  $K^+$  є, поруч з пригніченням роботи  $Mg^{2+}/K^+$ -наосу основною причиною порушення йонного балансу та загибелі клітин тварин-негібернаторів на холоді. /Hall A.C., Willis J.S., 1984/. Показано, що тоді як в еритроцитах гібернущих ховрахів, котрі зберігались 2 тижні при 2-4°C, не спостерігалось помітного накопичення  $^{45}Ca^{2+}$  цими клітинами у відсутності у середовищі інкубації інгібітора  $Ca^{2+}$ -наосу  $La^{3+}$ , в аналогічних пробах, які містили  $2,5 \cdot 10^{-4} M La(NO_3)_3$ , цей показник був значним, що свідчить про відсутність помітного пригнічення низькою температурою активнього відкачування  $Ca^{2+}$  з цих клітин. В той же час, в еритроцитах активних ховрахів, взятих влітку, та в еритроцитах шурів робота  $Ca^{2+}$ -наосу інгібувалась при перенесенні їх в умови гіпотермії майже повністю, хоча

Все-таки мали місце деякі достовірні відмінності у рівневі на-  
чнення  $\text{Ca}^{2+}$  цими клітинами в присутності  $\text{Ca}^{3+}$  та в його від-  
сутність, які нашоують на думку, що і в цих випадках деяка  
частина  $\text{Ca}^{2+}$ , поступаючого у клітину, може активно відкачуватись.  
Звертає на себе увагу також і те, що навіть в присутності  $\text{Ca}^{3+}$ ,  
тобто при подавленні активного відкачування  $\text{Ca}^{2+}$  шляхом інгібу-  
вання  $\text{Ca}^{2+}$ -наосу, накопичення цього іону еритроцитами сплячих  
гібернаторів було дещо нижчим, ніж клітинами активних гібернато-  
рів та гомеотермної тварини в тих самих умовах. Напевно, це обу-  
мовлено більшим подавленням при зниженні температури пасивної  
проникності  $\text{Ca}^{2+}$ .

При перенесенні еритроцитів сплячих і активних ховрахів та  
щура, які зберігались на холоді, в нормотермні умови /37°C/ вота-  
новлено, що клітини гібернуючих тварин демонструють високу здат-  
ність підтримання низького вмісту цитоплазматичного  $\text{Ca}^{2+}$ , тоді  
як в клітинах активних гібернаторів та негібернаторів ця здатність  
не відновлюється /принаймні протягом однієї година/, тобто, вони,  
за два тижні впливу білянульових температур /2-4°C/ втрачають її  
безповоротно, головним чином, внаслідок збільшення пасивної про-  
никності для  $\text{Ca}^{2+}$ .

Що стосується зміни загального вмісту  $\text{K}^+$  та  $\text{Mg}^{2+}$ , то, якщо  
в еритроцитах активних ховрахів воно достовірно знижується на  
фоні недостовірного зниження в еритроцитах гібернуючого гіберна-  
тора, еритроцити морської свинки демонструють достовірне збіль-  
шення сумарного вмісту цих катіонів.

Це говорить про те, що в еритроцитах морської свинки на  
відміну від еритроцитів гібернуючого та активного ховрахів нако-  
пичення  $\text{Mg}^{2+}$  відбувається швидше, ніж втрата  $\text{K}^+$ , і, отже, в клі-  
тинах негібернаторів порушення іонного балансу має також якийсь  
інший шлях, відмінний від спільних з клітинами активних гіберна-  
торів. Можливо він пов'язаний з механізмом  $\text{Mg}^{2+}/\text{H}^+$ -обміну.

Таким чином, головна причина більшої холодоцутливості клі-  
тин гомеотермів, в порівнянні з холодорезистентними клітинами  
гетеротермних тварин, очевидно, криється у відсутності у них  
здатності підтримувати низький вміст  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$  та високу кон-  
центрацію  $\text{K}^+$  через більш сильне ніж у гібернаторів прищичення

низькою температурою активного перекачування іонів /  $Mg^{2+}$  /  $K^{+}$ -насос та  $Ca^{2+}$ -насос/, на фоні меншого зчуження пасивної проникності мембран /значне місце в порушенні іонного балансу в клітинах гомеотермних тварин за дії білянульових температур /2-4°C/ займає  $Ca^{2+}$ -залежний витік  $K^{+}$  та, напевно, активація  $Mg^{2+}/H^{+}$  осміну/.

Дослідження білкового складу мембран еритроцитів довгохвостих ховрахів в різних функціональних станах та властивостей їх мембранних ліпідів в порівнянні з гомеотермними тваринами

Таблиця 3. Процентний вміст основних білків в еритроцитарних мембранах довгохвостих ховрахів за даними електрофорезу.

Стан Білки	Гібернаюча тварина /зима/, n=10	Штучнопробуджена тварина /зима/, n=10	Активна тварина /літо/, n=6
Агрегати	4,2±2,4	4,1±1,2	4,5±0,4
Спектрин	35,4±6,0 <sup>X</sup>	34,1±3,9 <sup>X</sup>	18,0±2,1
Білок полоси 3	20,8±4,2	16,6±3,0	21,0±4,0
Анкірін	6,6±1,3	7,8±1,9	8,7±1,1
Полоси 4.1-4.2	8,9±1,1	8,9±0,4	8,1±1,0
Актин	6,8±1,1 <sup>X</sup>	6,9±0,5 <sup>X</sup>	12,8±0,5

<sup>X</sup> - відмінності достовірні в порівнянні з активними тваринами / p < 0,05/

Як видно із таблиці 3, де представлено дані денситограм НААГ, хоча якісний склад мембранних білків еритроцитів ховрахів взимку та влітку не відрізняється, було виявлено достовірні відмінності в кількісному вмісті деяких білків. Так, взимку спостерігається значне підвищення відносного вмісту спектрину в клітинних мембранах, а влітку відзначено більш високий вміст актину та тенденція збільшення вмісту білків полоси 3 /"аніон-переносний білок"/. Слід відзначити, що між мембранами еритроцитів сплячих та штучно-пробуджених взимку ховрахів значних відмінностей у кількісному білковому складі не виявлено.

Дані електрофорезу в НААГ білків із мембран еритроцитів, котрі були оброблені зшавачим агентом діамідом, свідчать, що в мембранах сплячих тварин утворюється значно менше J-N зшивок, де-що більш у штучнопробуджених, а у активних - так само багато, як і у щурів. Після двотижневого зберігання еритроцитів в умовах гіпотермії ці відмінності зростають. Це означає, що білкова структура еритроцитарних мембран гібернуючих ховрахів більш тривка та менш залежна від впливу низької температури.

Враховуючи, що бар'єрні властивості клітинних мембран залежать не тільки від білкових компонентів, але від стану ліпідного бішару, ми досліджували інтенсивність ПОМ в мембранах еритроцитів ховрахів, котрі перебували у різних функціональних станах у різні місяці. Вимірювання показали, що й спонтанне, й аскорбатзалежне, й  $Fe^{2+}$ -активоване ПОМ достовірно інтенсивніше відбувається у клітинах весняних ховрахів, і, напевно, не залежать від функціонального стану тварини /"сплячка" чи "активність"/.

З цим явищем пов'язані, очевидно, виявлені нами збіл тення навесні активностей глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази еритроцитів ховрахів.

Аналіз спектрів ЕНР - позначених карбодіновим зондом мультиламелярних ліпосом, сформованих із сумарних ліпідів еритроцитарних мембран сплячих ховрахів та з щурячих, показав, що з останньому температурним діапазоні  $-10+2^{\circ}C$  /при розігріванні замороженої суспензії/ зв'язано значно менше води, ніж з ховрачачими, що свідчать про відмінності у термостропних властивостях їх ліпідів.

Проте, проникність бішарових ліпосом, приготованих в сумарних ліпідів еритроцитарних мембран гібернучих ховрахів та щура і донорських, не відрізнялась ні для катіонів  $^{22}\text{Na}^+$  та  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , ні для молекул  $^{14}\text{C}$ -глюкоза та  $^3\text{H}$ -інсулін/. До того ж, у ліпосом всіх видів проникність знижувалась на однакову величину при перенесенні їх із середовища інкубації з температурою  $20^\circ\text{C}$  до охолодженого середовища  $5^\circ\text{C}$ /.

Із викладеного вище випливає, що з настанням сезону гібернації в еритроцитах ховрахів відбуваються зміни у білковому складі клітинних мембран, які полягають, перш за все, у збільшенні вмісту спектрину, порівняно з клітинами ховрахів влітку, внаслідок чого мембрана стає більш витривалою до дії гіпотермії, що проявляється в утворенні в них меншої кількості білкових агрегатів при обробці зшиваючим агентом після піддання гіпотермічному зберіганню.

Навесні в мембранах ховрахів відбувається зростання інтенсивності всіх видів перекисного окислення ліпідів, яка потім знижується до рівня зимових тварин. З цим явищем, напевне, пов'язані також відзначені збільшення навесні активностей глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази еритроцитів ховрахів,

Однак, відмінності в іонній проникності еритроцитарних мембран гетеро- і гомеотермних тварин в умовах гіпотермії, очевидно мало пов'язані з їх ліпідним складом, оскільки проникність для маркерних речовин ліпосом, приготованих з сумарних ліпідів мембрани еритроцитів гібернучих ховрахів, щурів та з донорських, не відрізнялась ні за  $20^\circ\text{C}$ , ні за  $5^\circ\text{C}$ .

#### ВИСНОВКИ

1. Встановлені сезонні зміни іонного складу еритроцитів *C. undulatus*, які проявляються у збільшенні внутрішнього вмісту  $\text{Na}^+$  та у зниженні вмісту  $\text{K}^+$  по мірі наближення гібернаційного періоду та поглиблення гібернації, з наступним відновленням низького внутрішньоклітинного рівня  $\text{K}^+$  високого -  $\text{K}^+$  з настанням весни.

а також у зниженні швидкостей пасивного та активного транспорту  $K^+$  в мембранах еритроцитів ховрахів з настанням сезону гібернації та їх підвищенні навесні.

2. Показано, що еритроцити гібернущих ховрахів підтримують іонний гомеостаз в умовах гіпотермії краще, ніж еритроцити активних ховрахів, взяті влітку, і еритроцити щурів, що проявляється у кращому збереженні ними високої концентрації іонів  $K^+$  та в меншому накопиченні  $Na^+Ca^{2+}$ , внаслідок кращого збереження функціональної активності  $Na^+K^+$  та  $Ca^{2+}$ -насосів в умовах гіпотермії і більш сильного пригнічення пониженою температурою пасивного транспорту іонів.

3. Показано, що з настанням сезону гібернації в мембранах еритроцитів *Citellus undulatus* відбувається реорганізація мембранних білків, яка полягає у деякій зміні їх кількісного складу, а саме у збільшенні відносного вмісту спектрину та зменшенні вмісту актину, а також у зменшенні кількості білкових агрегатів, вивикаючих при обробці зшивачими агентами, що особливо помітно після гіпотермічного зберігання.

4. З'ясовано, що оповтає та індуковані процеси ПОМ в еритроцитах довгохвостих ховрахів більш інтенсивно протікають навесні, також відзначається зростання весном активностей глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази еритроцитів ховрахів.

5. Проникність для маркерних речовин ліпосом, праготованих з сумарних ліпідів мембран слячких ховрахів, не відрізнялась від такої ж для ліпосом з щурячих та донорських ліпідів, як за кімнатної температури, так і при  $5^{\circ}C$ .

Список робіт, опублікованих по темі дисертації:

1. Гулевский А.К., Щенявский И.И., Рязанцев В.В. Сезонные изменения транспорта одновалентных катионов в эритроцитах *Citellus undulatus*. Сборник научных трудов "Лечебная гипотермия", Харьков, 1992, 82-86.

2. Загнойко В.И., Гулевский А.К., Щенявский И.И., Рязанцев В.В. Структурно-функциональное состояние клеток крови гетеротермных животных в условиях гипотермического хранения. Тезисы докладов симпозиума "Механизмы зимней спячки", Махачкала, 1990, 46.

3. Загнойко В.И., Гулевский А.К., Щенявский И.И., Марковский А.Л. Ионный гомеостаз эритроцитов животных, находящихся в зимней спячке, в условиях гипотермии. Цитология, 1990, т.32, № 9, 926-927.

4. Загнойко В.И., Гулевский А.К., Щенявский И.И., Рязанцев В.В., Марковский А.Л. Особенности структурно-функционального состояния эритроцитов гомойотермных и гетеротермных животных в условиях гипотермического хранения. Ж.Эволюционной биохимии и физиологии, 1991, т.27, № 4, 432-436.

5. Загнойко В.И., Гулевський О.К., Щенявський І.І. Дослідження механізмів холодостійкості еритроцитів довгохвостих ховрахів *Citellus undulatus*. Тез. доповідей VI Українського біохімічного з'їзду, Київ, 1992, 71.

6. Gulevsky A. K., Zagnajko V. I., Shenjavsky I. I. et al. Peculiarities of structure-functional states of erythrocytes of homeothermal and heterothermal animals on hypothermal storage. Cryo-Lett., 1992, 13, 2, 109-116.

Підп. до друку 22.02.94. Формат 60 x 84 1/16.  
1,0 ум.-друк.арк., 1,0 обл.-вид.арк. Тираж 100. Зам. 519.

---

Дільниця оперативного друку ХДАУ.



462831

AB 29.974