

И.К. Проскурина, А.В. Титовский

**Фракционный состав гемоглобина
крысы при экспериментальной
дегидратации**

Молекулярная гетерогенность гемоглобина тестирована у целого ряда высших и низших форм, относящихся к различным систематическим группам. В крови собаки, лошади, кошки содержатся два вида фракций, соотношение которых от эмбриональной к постнатальной жизни различно [1, 2]. Гемоглобин взрослых крыс состоит из шести фракций, которые различаются по количественному соотношению [3]. У крысы молекулярные формы гемоглобина состоят из двух вариантов α -цепи и нескольких (до трех) вариантов β -цепи, различие между которыми не идентифицировано. Считают, что разнообразие форм гемоглобина дает определенные преимущества организму в процессе его приспособления к условиям среды [4]. В литературе отсутствуют данные о фракционном составе гемоглобина крысы в старых, зрелых и молодых эритроцитах в норме и при обезвоживании организма.

Материал и методы исследования

Работа выполнена на крысах-самцах весом 240-270 г. Эксперимент проводился в одном помещении с постоянной температурой (18° — 20°C) и влажностью. За две недели до начала эксперимента животных размещали по 5 — 7 в клетку. Режим контрольной группы оставался без изменений, а режим животных, подвергнутых экспериментальному обезвоживанию, был изменен (животные содержались в клетке по 1-2 особям для исключения агрессивного поведения). За основу была взята модель дегидратации, подробно описанная А.Н. Тихомировым [5]. Согласно этой модели крыс содержали на безводной диете (сухой овес с полным исключением воды из рациона) в течение 3, 6 и 10 суток, по окончании которых прово-

дили исследования.

Кровь брали из нижней трети правой дорзальной вены хвоста шприцем. В качестве антикоагулянта использовали гепарин 5000 единиц. Полученную кровь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут, удаляли плазму и лейкоцитарную пленку и дважды отмывали в растворе Дюльбенко в соотношении 1: 2. Эритроцитарной массой заполняли пластиковые трубочки, перегибали их и помещали в пластиковый стакан центрифуги. Образцы центрифугировали при 12000 g на центрифуге К-24 (Германия) в течение 15 минут. Трубочки с разделенной эритроцитарной массой извлекали и разрезали острым лезвием таким образом, чтобы получить 10% верхней, средней и нижней фракции, которые впоследствии считали молодыми (М), зрелыми (З) и старыми (С) фракциями эритроцитов. Полученные фракции извлекали экстракцией воздухом.

Фракции эритроцитов взвешивали в буфере в количестве 1,6 10 с подсчетом в камере Горяева, после чего их осаждали в центрифуге при 3000 об/мин, удаляли буфер и добавляли такой же объем дистиллированной воды.

Гемолиз эритроцитов проводили методом замораживания-оттаивания [6].

Затем гемолизованные эритроциты центрифугировали при 8000 об/мин на центрифуге ОПН-8 в течение 15 минут. Надосадочную жидкость использовали для проведения биохимического эксперимента.

Фракционирование белков эритроцитов проводили на колонках 7,5%-ного полиакриламидного геля по Дэвису. На одну колонку наносили 500-700 мкг белка, определенного по методу Лоури [7]. Длина разделяющего геля составляла 6 см. Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере (рН 8,6) при силе тока 2,5 мА на каждую колонку в течение 10 минут и 5 мА в последующие 1,5 часа при температуре 4 С.

Фракции гемоглобина выявляли бензидиновым методом [4]. Гелевые колонки помещали в 7%-ный раствор уксусной кислоты на 5 минут. Затем помещали в бензидиновый краситель, приготовленный непосредственно перед экспериментом (0,1 г. бензидина растворяли в 50 мл дистиллированной воды при кипячении, после чего быстро охлаждали в ледяной бане. Перед окрашиванием в бензидиновый раствор добавляли 0,25 мл ледяной уксусной кислоты и 0.1 мл 33%-ной перекиси водорода). Проявление зон гемоглобина происходило в течение 7-10 минут.

Все исследования выполнены в трех биологических и не менее чем в трех аналитических последовательностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение количественного содержания белка в молодых, зрелых и старых эритроцитах при дегидратации организма крысы показало уменьшение содержания общего белка во всех исследуемых фракциях по сравнению с контролем.

Количественное содержание белка в молодых (М), зрелых (З) и старых (С) эритроцитах в норме и при обезвоживании организма крыс

Таблица 1

День дегидратации	Количественное содержание белка в мг на 100 мкл		
	М	З	Л
Контроль	0,540±0,006	0,560±0,008	0,574±0,011
3-й	0,420±0,009	0,468±0,012	0,504±0,007
6-й	0,288±0,008	0,272±0,010	0,312±0,003
10-й	0,295±0,011	0,284±0,010	0,294±0,008

В молодых эритроцитах уменьшение содержания белка составляет 22,2%, 46,8% и 45,4% соответственно на 3-й, 6-й и 10-й день дегидратации организма животного по сравнению с контролем. В зрелых эритроцитах содержание общего белка уменьшилось на 13,2% на третий, на 51,4% — на шестой и на 49,3% — на десятый день дегидратации. Такая же тенденция сохранилась и при исследовании старых эритроцитов: уменьшение количественного содержания белка на 3-й день составило 12,2%, на 6-й — 45,6%, на 10-й — 48,8% по сравнению с контролем.

Методом электрофореза в 7,5%-ном полиакриламидном геле в молодых, зрелых и старых эритроцитах контрольных крыс было выявлено по 6 фракций гемоглобинов (рис.1) с различной электрофоретической активностью (ОЭП 0,22, 0,26, 0,28, 0,33, 0,44, и 0,48 соответственно), что согласуется с литературными данными [4]. Из рис.1 видно, что четыре фракции (1, 2, 3 и 5) гемоглобина имеют среднюю интенсивность, 4-я фракция — мажорная и 6-я — минорная.

При исследовании молекулярной гетерогенности гемоглобина крысы на 3-й, 6-й и 10-й день при общей дегидратации организма животного были выявлены те же фракции гемоглобина. При сравнении фракционного состава гемоглобина на 3-й и 6-й день дегидратации в

молодых, зрелых и старых эритроцитах не обнаружено сколько-нибудь видимых изменений по сравнению с контролем. Изменения во фракционном составе были обнаружены на 10-й (сублетальный) день дегидратации организма животного. Как видно из рис.1, в молодых и зрелых эритроцитах фракции 1 и 5 перешли из зон средней интенсивности в минорные (по сравнению с контролем), а в старых эритроцитах появилась еще одна мажорная фракция — 5-я.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при длительной дегидратации организма крысы происходят некоторые изменения в количественном соотношении молекулярных форм гемоглобина, что, вероятно, связано с изменением в белок-белковых взаимодействиях при экстремальных условиях существования животного, к которым относится и дегидратация организма. Известно, что клеточное обезвоживание, характерное для тяжелой дегидратации, наблюдается и в естественных условиях при старении эритроцитов [8]. Наши эксперименты показали, что наибольшие изменения во фракционном составе гемоглобинов происходят именно в старых эритроцитах на 10-й день дегидратации организма животного.

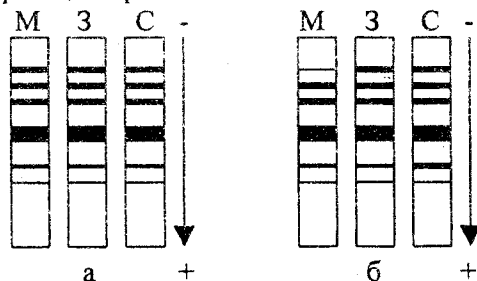


Рис 1. Электрофореграммы гемоглобинов крысы в молодых (М), зрелых (З) и старых (С) эритроцитах: а – в норме, б – на 10-й день дегидратации организма животного

Литература

1. Иржак Л.И., Качмарин Э.В. Гемоглобин кошки в онтогенезе // Доклады АН СССР, 1971. Т.197, N 3. С.695-697.
2. Иржак Л.И., Качмарин Э.В. Электрофоретическая подвижность гемоглобина кошки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1973. Т.95, N3. С. 59-61.
3. Стародуб Н.Ф., Грищак А.И. Морфогенетическая смена типов гемоглобина в онтогенезе крыс // Онтогенез. 1979. Т.10. С.567.
4. Стародуб Н.Ф. Гетерогенная система гемоглобина // Успехи современной биологии, 1985. Т.99. С.385-400.

5. Тихомиров А.Н., Соколова Б.А. Изменение микроциркуляторного русла конъюнктивы глазного яблока при экспериментальной дегидратации // Адаптивные и компенсаторные механизмы системы регуляции. М.: Изд-во 2-го мед. ин-та, 1984. С.125-130.
6. Гааль Э., Медьеша Г., Верецки Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. С.140-142.
7. Loury O.U., Rosenbringh N.Y., Farr U.L., Randall R J. Protein meagerment with Folin phenol reagent // J.Biol. Chem., 1951. V.193. P.265.
8. Williams A.R., Morris D.R. The internal viscosity of the human erythrocyte may determine its libespan in vivo// Scan. J.Haematol, 1980. V.24. P.57-62.