

чения возможных механизмов изменения заряда мембраны исследовано действие блокатора кальциевых каналов финоптина (верапамила) и трифтазина — вещества, угнетающего действие кальмодулина. Как видно из табл. 3, финоптин, трифтазин и совместное применение этих препаратов вызвали значительное увеличение ЭФП эритроцитов. Выяснение всех возможных механизмов влияния липоксигеназных метаболитов арахидоновой кислоты на поверхностный заряд мембраны эритроцитов требует дальнейшего изучения.

S. L. Sashenkov, A. L. Khshivo, N. V. Egorova,
A. S. Nekrasov, V. Z. Lankin

THE INFLUENCE OF LIPOXYGENASE METABOLITES OF ARACHIDONIC ACIDS ON THE SURFACE CHARGE OF THE ERYTHROCYTE MEMBRANES

The influence of metabolites of arachidonic acids on the electrophoretic mobility of the rat erythrocytes has been investigated. It is found that they can increase or decrease the surface charge of the erythrocyte membranes.

Medical Institute, Ministry of Public Health
of the RSFSR, Chelyabinsk

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захаров Ю. М., Глазырина П. В., Бордуновская В. П. и др. О некоторых морфо-функциональных свойствах эритроцитов акклиматизированных к теплу животных // Физиол. журн. СССР. — 1986. — 72, № 12. — С. 1647—1652.
2. Козинец Г. И., Зоделава М. М., Борзова Л. В., Кульман Р. А. Электрофорез клеток гомопатической ткани. — Тбилиси: Сабчота Сакартвело, 1986. — 150 с.
3. Ларионов Н. П. Кальмодулин. — Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1984. — 84 с.
4. Харамоненко С. С., Ракитянская А. А. Электрофорез клеток крови в норме и патологии. — Минск: Беларусь, 1973. — 143 с.
5. Bate A. I., Deeley I. O. T., Pritchard I. A. V. Anevaluation of a video image correlation technique for the estimation of electrophoretic mobilities of human blood cells // Electrophoresis '83. — Berlin; New York. — 1984. — P. 301—308.
6. Seaman J. V. F. Electrokinetic behavior of red cells // Red blood cell. — New York etc.: Acad. press., 1979. — P. 1145—1229.

Челябин. мед. ин-т
М-ва здравоохранения РСФСР

Материал поступил
в редакцию 15.07.88

УДК 612.015.6:539.227

В. А. Элькина, А. Я. Розанов

Динамика поглощения ¹⁴C-биотина клетками крови и связывание белками плазмы в онтогенезе

Биохимические функции биотина (его участие в карбоксилировании и синтезе жирных кислот) достаточно изучены, однако практически не известны механизмы его транспорта в животном организме, поступления в клетки крови и проникновения через клеточные мембраны и гистогематические барьеры. Также совершенно не изучены возрастные особенности транспорта биотина в клетки и ткани высших организмов. Только для микроорганизмов (*Lactobacillus arabinosus* и *Saccharomyces cerevisiae*) показано существование активного транспорта этого витамина [8, 10]. На клетках *E. coli* (штамм K — 12 (Y10—1), не нуждающийся в биотине) обнаружены регуляторные механизмы транспортной системы биотина по типу репрессии [9].

Цель нашей работы — изучение возрастных особенностей транспорта биотина *in vitro* в клетки крови и роли белков плазмы в этом процессе.

Методика

Исследование проведено *in vitro* групп: I группа — молодые (2–10 мес, масса 150–280 г); III — взрослых декапитировали, кровь (1:3) с добавлением гепарина титрования и стабилизации форм во меченного по углероду каршам», Великобритания), кото 1 мкмоль, что сопоставимо с После инкубации при температурбы по 1 мл и разделяли фот 5 000 г). Белки плазмы из концентрации 80 % с последующияли, осадки белков и клеток 0,5 мл (около 15 мг плотного цальной крови.

В специальных экспериментах и очищенную фракцию лейкоц 4, 7] и изучали динамику погло растворе при том же конечном лейкоцитов использовали кровь

Радиоактивность всех образцов плазмы подсчитывали на газорасчетных приборах с использованием [5] с использованием кривых в крови *in vitro* в данных тодом на бумаге в системе координат (рис. 1).

Результаты и их обсуждение

Значительная часть ¹⁴C-биотина: при добавлении его в раствор 2,5 до 27 % этого витамина поглощается клетками крови. 38,6% — с форменными элементами крови повышается с увеличением возраста. Характерно для I и III возрастных групп поглощения ¹⁴C-биотина составляет 61% у молодых животных. Метки связываются уже в плазме крови молодых животных. ¹⁴C-биотина, чем белки плазмы косвенным доказательством крови при старении и, следовательно, портной функции. Однако при изучении общей метки через мембраны младших возрастных групп медленнее способность плазмы.

Для обеих исследованных групп во всех трех возрастных группах связывания ¹⁴C-биотина. В крови (I группа) через мембраны поглощение ¹⁴C-биотина и половозрелых животных. Метки в сторону более позднего пика поглощения ¹⁴C-биотина плазмы и клеток крови с течением 15 и 30 мин для I группы.

заряда мембраны исследована в эритроцитах (вербамина) действие кальмодулина. Как совместное применение этих веществ ЭФП эритроцитов. Влияние липоксигеназных ферментов на заряд мембраны эритроцитов. LIPID-DEPENDENT EFFECTS OF ARACHIDONIC ACIDS ON THE ELECTROPHORETIC MOBILITY OF THE RED BLOOD CELL MEMBRANES

the electrophoretic mobility of the red blood cell membrane. It is shown that they can increase or decrease the

В. П. и др. О некоторых морфологических к телу животных // Фи-зический журнал, 1986. — 150 с.

иск. ун-та, 1984. — 84 с.

рез клеток крови в норме и пато-логии.

valuation of a video image correla-tion analysis of the electrophoretic mobilities of human blood cells // J. Clin. Lab. Invest. 1984. 54: 301—308.

// Red blood cell. — New York etc.:

Материал поступил в редакцию 15.07.88

II

астие в карбоксилировании, однако практически не изучены возрастные особенности мембраны и гиалуроновой кислоты. В тканях высших организмов, например у *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces pombe*, не изучены механизмы транспор-

ных особенностей транспор-та белков плазмы в этом про-

Методика

Исследование проведено *in vitro* на 98 крысах-самцах линии Вистар трех возрастных групп: I группа — молодые (2 мес, масса 75—100 г); II группа — половозрелые (4—10 мес, масса 150—280 г); III группа — старые (около 24 мес, масса 300—360 г). Животных декапировали, кровь от одной крысы разводили физиологическим раствором (1:3) с добавлением гепарина (1 ЕД/мл цельной крови) для предотвращения свертывания и стабилизации форменных элементов [3]. Затем добавляли такое количество меченного по углероду карбонильной группы биотина (^{14}C -биотин, фирма «Amersham», Великобритания), которое дало бы его окончательное содержание в крови 1 мкмоль, что сопоставимо с естественным содержанием биотина в крови крыс [2]. После инкубации при температуре 37 °C в течение 5, 15, 30, 60, 120 и 240 мин отбирали пробы по 1 мл и разделяли форменные элементы и плазму центрифугированием (5 мин, 5000 g). Белки плазмы из каждой пробы осаждали холодным этанолом в конечной концентрации 80 % с последующим промыванием 80 %-ным этанолом, спирты объединяли, осадки белков и клеток крови растворяли в 0,01 н NaOH, наносили на мишени по 0,5 мл (около 15 мг плотного вещества на мишень). Расчет производили на 100 мл цельной крови.

В специальных экспериментах разделяли клетки крови крыс, выделяли эритроциты и очищенную фракцию лейкоцитов методом свободной седиментации в желатине [1, 4, 7] и изучали динамику поглощения ^{14}C -биотина этими клетками в физиологическом растворе при том же конечном содержании ^{14}C -биотина (1 мкмоль). Для выделения лейкоцитов использовали кровь, взятую у крыс II возрастной группы.

Радиоактивность всех образцов цельной крови, лейкоцитов, эритроцитов и белков плазмы подсчитывали на газоплотном счетчике 2154-1-1М «Протока» с учетом коэффициентов поглощения β -излучения. Полученные результаты обрабатывали статистически [5] с использованием критерия *t* Стьюдента и Фишера. Трансформация ^{14}C -биотина в крови *in vitro* в данных условиях была проверена радиохроматографическим методом на бумаге в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (12:3:5 соответственно).

Результаты и их обсуждение

Значительная часть ^{14}C -биотина в крови находится в связанном состоянии: при добавлении его в кровь в физиологической концентрации от 2,5 до 27 % этого витамина связывается с белками плазмы и от 3,25 до 38,6 % — с форменными элементами крови. Связывание ^{14}C -биотина повышается с увеличением времени инкубации, что в особенности характерно для I и III возрастных групп животных. Максимум суммарного поглощения ^{14}C -биотина клетками и белками плазмы крови составляет 61 % у молодых животных (у старых — 27 %), при этом до 50 % метки связывается уже через 15 мин инкубации (таблица). Белки плазмы крови молодых животных связывают в 2—5 раз больше ^{14}C -биотина, чем белки плазмы крови старых животных, что является косвенным доказательством замедления обновления белков плазмы крови при старении и, следовательно, снижения с возрастом их транспортной функции. Однако в клетках крови старых животных накопление общей метки через 240 мин инкубации почти достигает уровня младших возрастных групп. Таким образом, у старых животных замедляется способность поглощения ^{14}C -биотина клетками крови из плазмы.

Для обеих исследуемых фракций крови (клеток и белков плазмы) во всех трех возрастных группах наблюдалась двухфазная динамика связывания ^{14}C -биотина. Включение метки максимально у молодых животных (I группа) через 30 мин инкубации. У старых крыс (III группа) поглощение ^{14}C -биотина замедлено по сравнению с таковым молодых и половозрелых животных, и пики максимумов радиоактивности сдвинуты в сторону более поздних сроков. В частности, в III группе первый пик поглощения ^{14}C -биотина отмечен через 30 и 60 мин (для белков плазмы и клеток крови соответственно), а второй — через 240 мин, против 15 и 30 мин для I группы и 15 мин — для II группы (первый пик

Распределение общей метки добавленного к крови крыс ^{14}C -биотина (1 мкмоль) на форменные элементы и белки плазмы ($M \pm m$)

Фракция инкубационной среды	Время инкубации		
	5 мин	15 мин	30 мин
I. Молодые животные (30 крыс)			
Форменные элементы			
нмоль/100 мл	$28,12 \pm 1,6^{**}$	$32,58 \pm 1,24^{**}$	$36,67 \pm 1,61^{**}$
% добавленной дозы	29,6	34,3	38,6
Белки плазмы			
нмоль/100 мл	$18,89 \pm 2,42^{**}$	$25,47 \pm 0,06^{**}$	$14,92 \pm 1,76^{**}$
% добавленной дозы	19,88	26,81	15,7
Свободный ^{14}C -биотин			
нмоль/100 мл	$47,99 \pm 4,0^{**}$	$36,95 \pm 1,3^{**}$	$43,41 \pm 5,1^{**}$
% добавленной дозы	50,52	38,9	45,7

II. Половозрелые животные (44 крысы)

Форменные элементы			
нмоль/100 мл	$9,07 \pm 0,5$	$16,98 \pm 0,68$	$9,45 \pm 1,02$
% добавленной дозы	9,55	17,9	9,95
Белки плазмы			
нмоль/100 мл	$5,66 \pm 0,31$	$10,07 \pm 0,6$	$4,3 \pm 0,23$
% добавленной дозы	5,96	10,6	4,53
Свободный ^{14}C -биотин			
нмоль/100 мл	$80,27 \pm 0,76$	$67,95 \pm 1,3$	$81,24 \pm 1,25$
% добавленной дозы	84,49	71,5	85,52

III. Старые животные (24 крысы)

Форменные элементы			
нмоль/100 мл	$10,11 \pm 1,2$	$8,54 \pm 1,1^{**}$	$7,49 \pm 0,75^{**}$
% добавленной дозы	10,64	8,9	7,9
Белки плазмы			
нмоль/100 мл	$6,0 \pm 1,1$	$4,74 \pm 0,04^{**}$	$6,55 \pm 0,57^{**}$
% добавленной дозы	6,32	4,9	6,9
Свободный ^{14}C -биотин			
нмоль/100 мл	$78,89 \pm 2,32$	$81,72 \pm 1,4^{**}$	$80,95 \pm 1,32^{**}$
% добавленной дозы	83,04	86,03	85,2

Фракция инкубационной среды	Время инкубации		
	60 мин	120 мин	240 мин

I. Молодые животные (30 крыс)

Форменные элементы			
нмоль/100 мл	$27,85 \pm 1,66^{**}$	$31,68 \pm 2,18^{**}$	$23,75 \pm 0,3^{*}$
% добавленной дозы	29,31	33,35	25,0
Белки плазмы			
нмоль/100 мл	$18,15 \pm 1,7^{*}$	$9,42 \pm 1,2^{**}$	$14,25 \pm 0,2^{*}$
% добавленной дозы	19,1	9,91	15,0
Свободный ^{14}C -биотин			
нмоль/100 мл	$49,01 \pm 3,37^{**}$	$53,9 \pm 3,4^{**}$	$57,0 \pm 2,4^{*}$
% добавленной дозы	51,59	56,74	60,0

II. Половозрелые животные (44 крысы)

Форменные элементы			
нмоль/100 мл	$8,21 \pm 1,04$	$12,64 \pm 1,33$	$7,02 \pm 1,16$
% добавленной дозы	8,64	13,3	7,39
Белки плазмы			
нмоль/100 мл	$3,4 \pm 0,68$	$4,8 \pm 0,18$	$3,09 \pm 0,6$
% добавленной дозы	3,6	5,05	3,25
Свободный ^{14}C -биотин			
нмоль/100 мл	$83,37 \pm 1,7$	$77,57 \pm 1,5$	$84,89 \pm 1,76$
% добавленной дозы	87,76	81,65	89,36

Фракция инкубационной

Форменные элементы
нмоль/100 мл
% добавленной дозы
Белки плазмы
нмоль/100 мл
% добавленной дозы
Свободный ^{14}C -биотин
нмоль/100 мл
% добавленной дозы

Примечание. Достоверных по сравнению с таковыми $< 0,01$.

радиоактивности) и 1. Это свидетельствует о спортивной функции белков и является, возможно, кровью в их органы.

В исследованиях, и эритроцитов, обнаружено биотина через 5 поглощают в 7—20 раз миллион клеток). На ^{14}C -биотина неразделенной радиоактивности) и вными фракциями (трдиоактивности) обусловленных, лишь частичлированием изучаемого в среде, лишенной мственных компонентов во-вторых, неоднородном эритрона (а также цитарным составом кр

Динамика поглощения ^{14}C -биотина инкубационной среды (3 1 мкмоль ^{14}C -биотина), лей и эритроцитами (2) крови 1 пкмоль/10⁶ клеток.

Таким образом, п ^{14}C -биотина (аналогичных этот факт хорошо тельствует о наличии и специфических механизмов ферментов. Трансформация ^{14}C (за 15—60 мин инкубации) плазмы выявлен таковому исходного ^{14}C

ис ^{14}C -биотина (1 мкмоль)

Время инкубации	
15 мин	30 мин

крысы)	
32,58±1,24** 34,3	36,67±1,61** 38,6
25,47±0,06** 26,81	14,92±1,76** 15,7
36,95±1,3** 38,9	43,41±5,1** 45,7

14 крысы)	
16,98±0,68 17,9	9,45±1,02 9,95
10,07±0,6 10,6	4,3±0,23 4,53
67,95±1,3 71,5	81,24±1,25 85,52

крысы)	
8,54±1,1** 8,9	7,49±0,75** 7,9
4,74±0,04** 4,9	6,55±0,57** 6,9
81,72±1,4** 86,03	80,95±1,32** 85,2

Время инкубации	
120 мин	240 мин

крысы)	
31,68±2,18** 33,35	23,75±0,3* 25,0
9,42±1,2** 9,91	14,25±0,2* 15,0
53,9±3,4** 56,74	57,0±2,4* 60,0

4 крысы)	
12,64±1,33 13,3	7,02±1,16 7,39
4,8±0,18 5,05	3,09±0,6 3,25
77,57±1,5 81,65	84,89±1,76 89,36

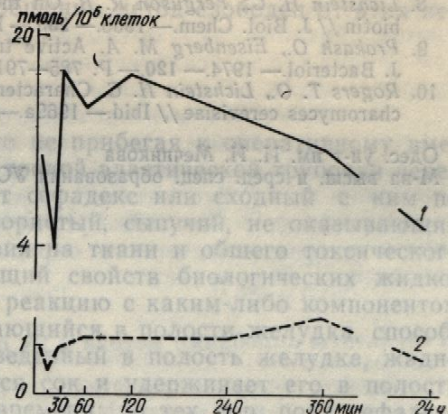
Фракция инкубационной среды	Время инкубации		
	60 мин	120 мин	240 мин
III. Старые животные (24 крысы)			
Форменные элементы			
нмоль/100 мл	8,57±1,5*	5,30±1,24*	18,11±0,34*
% добавленной дозы	9,02	10,81	19,06
Белки плазмы			
нмоль/100 мл	2,37±0,34**	3,29±0,05*	8,21±4,13*
% добавленной дозы	2,5	3,47	8,64
Свободный ^{14}C -биотин			
нмоль/100 мл	84,05±1,86**	86,4±1,28*	68,69±4,47*
% добавленной дозы	88,5	85,7	72,3

Примечание. Достоверность различий значений показателей половозрелых животных по сравнению с таковыми животных других возрастных групп: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

радиоактивности) и 120 мин (второй пик) для I и II групп животных. Это свидетельствует об ослаблении связывающей (а, возможно, и транспортной) функции белков плазмы и клеток крови у старых животных и является, возможно, причиной замедления поступления биотина из крови в их органы.

В исследованиях, проведенных на очищенных фракциях лейкоцитов и эритроцитов, обнаружилась трехфазная динамика поглощения меченого биотина через 5, 30 и 120 мин (рисунок), причем лейкоциты поглощают в 7—20 раз больше метки, чем эритроциты (в пересчете на миллион клеток). Некоторое несовпадение динамики поглощения ^{14}C -биотина неразделенными форменными элементами крови (два пика радиоактивности) и их очищенными фракциями (три пика радиоактивности) обусловлено, во-первых, лишь частичным моделированием изучаемого процесса в среде, лишенной многих естественных компонентов крови, а во-вторых, неоднородным составом эритронов (а также и лейкоцитарным составом крови).

Динамика поглощения ^{14}C -биотина из инкубационной среды (37°C, 15 мин, 1 мкмоль ^{14}C -биотина), лейкоцитами (1) и эритроцитами (2) крови крыс in vitro, пкмоль/10⁶ клеток.



Таким образом, подтверждается фазовая динамика связывания ^{14}C -биотина (аналогично другим водорастворимым витаминам, для которых этот факт хорошо известен [6]), что, по всей вероятности, свидетельствует о наличии неспецифических (первый пик радиоактивности) и специфических механизмов транспорта этого витамина в составе биотинзависимых ферментов и биотинсвязывающих белков.

Трансформация ^{14}C -биотина в крови in vitro в данных условиях (за 15—60 мин инкубации) не обнаружена. В крови после удаления липидов плазмы выявлен только один пик радиоактивности, идентичный таковому исходного ^{14}C -биотина.

ABSORPTION DYNAMICS OF ¹⁴C-BIOTIN BY THE BLOOD CELLS AND BINDING BY PLASMA PROTEINS IN ONTOGENESIS

Age peculiarities of absorption of ¹⁴C-biotin by the blood cells and plasma proteins in vitro are studied. The phase dynamics of ¹⁴C-biotin absorption by the blood cells and binding by plasma proteins is found. The reliable ontogenetic differences in absorption of ¹⁴C-biotin by the blood cells and plasma proteins are determined. The biotin-binding in vitro by the blood cells and plasma proteins decreases and becomes slower in old rats as compared with young ones.

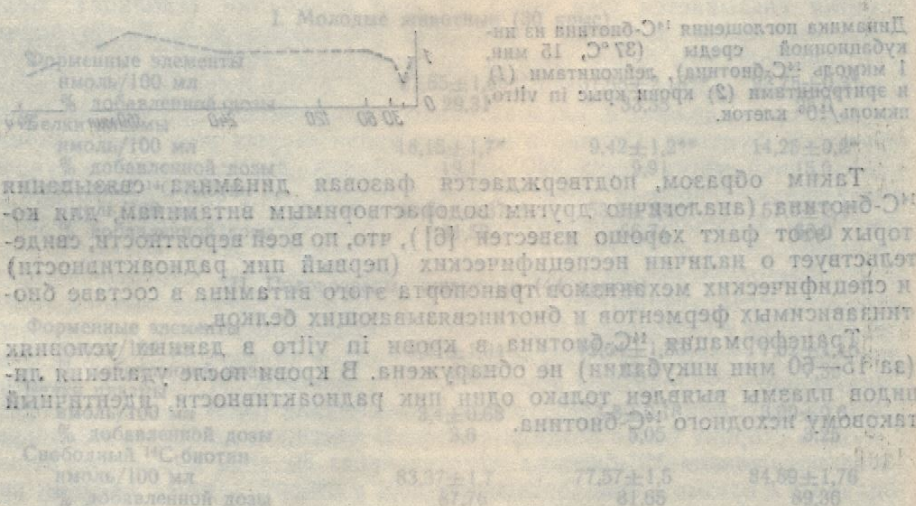
I. I. Mechnikov University, Ministry of Higher and Secondary Special Education of the Ukrainian SSR, Odessa

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Емешина Л. И. Микрометод лейкоконцентрации // Лаб. дело.— 1966.— № 3.— С. 169—170.
2. Западнюк И. П., Западнюк В. И., Захария Е. А., Западнюк Б. В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте.— Киев: Виш. шк., 1983.— 383 с.
3. Казначеев В. П., Пестовская Л. Г., Скальская Е. А. Изучение гемолиза эритроцитов в связи с влиянием гепарина // Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов.— Красноярск, 1960.— С. 251—256.
4. Луганова И. С., Сейц И. Ф. Методы выделения лейкоцитов и тромбоцитов из крови человека // Лаб. дело.— 1967.— № 9.— С. 521—526.
5. Мерков А. М. Общая теория и методика санитарно-статистического исследования.— М., 1969.— 224 с.
6. Розанов А. Я. Фазовая динамика метаболизма в печени коферментных витаминов, ее механизмы и биологическое значение // Витамины.— Вып. IX.— Киев: Наук. думка, 1976.— С. 34—42.
7. Слизовская К. С. Взаимодействие витаминов в организме при связывании ³⁵S-липота тканями, клетками и белками крови: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Одесса, 1976.— 28 с.
8. Lichstein H. C., Ferguson R. B. On the permeability of Lactobacillus arabinosus to biotin // J. Biol. Chem.— 1958.— 233.— P. 243—244.
9. Prakash O., Eisenberg M. A. Active transport of biotin in Escherichia coli K-12 // J. Bacteriol.— 1974.— 120.— P. 785—791.
10. Rogers T. O., Lichstein H. C. Characterization of the biotin transport system in Saccharomyces cerevisiae // Ibid.— 1969a.— 100.— P. 557—564.

Одес. ун-т им. И. И. Мечникова
М-ва высш. и сред. спец. образования УССР

Материал поступил
в редакцию 16.05.89



Методики

УДК 612.02(088.8)

И. А. Франков, Т. Н. Сокол

Новая методика пожелудочного сока у

Получение в физиологии желудка мелких животных определенными трудными методами, неотъемлемым вмешательством, предшествующим. Это относится к пищеварительного сока, которые рассчитаны на [1, 3]. Наркотическое вмешательство искажают работу нейрореции сока и его состав. Предлагаемый в достатков.

Описание метода

Сущность метода состоит в том, что животному вводится в полость желудка в течение 30 минут, не превратится в гель, в кишечник. Это свойство позволяет собирать в полости через определенное время с сефадексом.

Для воспроизведения и материалы: шприц, эластичная трубка, которую легко вводить в желудок животных проста и состоит в том, что трубочки срезают под углом 45° к оси желудка. Заполняют трубочку раствором в кончике, при этом в кончике, находящемся