

ПРОВ 2010

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ

Карадагский природный заповедник

ПРОВ 2020

КАРАДАГ

ИСТОРИЯ, БИОЛОГИЯ, АРХЕОЛОГИЯ

Сборник научных трудов,
посвященный 85-летию Карадагской научной станции

Институт биологии
южных морей АН УССР

БИБЛИОТЕКА

№ 38807

Симферополь
СОНАТ
2001

ТРАНСПОРТ ИОНОВ НАТРИЯ И КАЛИЯ В ЭРИТРОЦИТАХ ХРЯЩЕВЫХ И КОСТИСТЫХ РЫБ ЧЕРНОГО МОРЯ

Ю. А. Силкин

Карадагский природный заповедник НАН Украины

Введение

Исследованию транспорта натрия и калия в эритроцитах посвящено огромное число работ. Однако подавляющее количество данных получено на эритроцитах млекопитающих и главным образом, на эритроцитах человека. Тем не менее, даже в пределах одного класса позвоночных обнаружено большое разнообразие, как в ионном составе эритроцитов, так и в механизмах транспорта ионов. Так, например, по неизвестным до сих пор причинам в эритроцитах некоторых видов млекопитающих (кошка, собака, корова, овца) практически не действует убаинчувствительный Na^+ , K^+ насос. В результате этого в эритроцитах указанных видов животных концентрации натрия и калия близки их концентрациям в плазме.

Поскольку зрелые эритроциты млекопитающих не содержат ядра, можно предположить, что феномен возникновения «натриевых» эритроцитов допустим только для безъядерных клеток, тогда как для нормального функционирования ядерных эритроцитов всегда необходимы K^+/Na^+ градиенты на плазматической мембране с преобладанием ионов калия над натрием в цитоплазме. В этой связи представляется важным изучение ядерных эритроцитов, которые присущи всем позвоночным, за исключением млекопитающих.

Особый интерес представляет исследование эритроцитов низших позвоночных, поскольку окружающая их плазма не обладает тем постоянством ионного состава, которое характерно для плазмы млекопитающих. Кроме того, некоторые естественные факторы (соленость и температура воды — для обитающих в ней рыб, потеря воды с испарением — у амфибий и рептилий) оказывают заметное влияние на осмолярность плазмы в процессе жизнедеятельности организма. Соответственно, и содержание, и транспорт ионов в эритроцитах низших позвоночных должны иметь свои особенности.

На базе Карадагской биологической станции, расположенной на восточном побережье Крымского полуострова, впервые были проведены исследования транспорта ионов через мембрану эритроцитов на черноморских рыбах. Вначале работы проводились совместно с сотрудниками института Эволюционной физиологии и биохимии им. Сеченова (Санкт-Петербург) — д. б. н. И. А. Скульским, к. б. н. Г. П. Гусевым, к. б. н. А. А. Солюс и др., затем исследования проводились самостоятельно в лабораторных условиях заповедника. За более, чем 10-ти летний (1985—1996 гг.) период исследований были получены сведения о содержании важнейших неорганических катионов (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) в эритроцитах некоторых широко распространенных черноморских рыб, различающихся по типу осморегуляции и, соответственно, по ионному составу плазмы. Кроме этого, изучали транспорт ионов натрия и калия в эритроцитах рыб, помещенных в среды, различающихся по содержанию электролитов и, как следствие, ионной силой.

Хорошо известно, что в среде с низкой ионной силой проницаемость эритроцитов человека для одновалентных катионов значительно возрастает (Bolingbroke, Maizels, 1959; LaCelle, Rothstein, 1966; Donlon, Rothstein, 1969; Bernhardt et al., 1982; Bernhardt, Glaser, 1982; Bernhardt et al., 1984). Подобное увеличение ионной прони-

цаемости в низкоэлектролитных средах также наблюдалось в эритроцитах морской свинки, кошки, собаки, крысы, но у некоторых видов животных (кролик, свинья, овца, корова) эритроциты сохраняли низкую проницаемость для катионов при этих условиях (Zeidler, Kim, 1979; Erdmann et al., 1990).

В литературе отсутствуют данные о влиянии низкой ионной силы на мембраны эритроцитов рыб. В средах нормальной ионной силы особенностью ядерных эритроцитов птиц, амфибий и рыб является высокая гормональная чувствительность их ионтранспортирующих систем (Nikinmaa, Huestis, 1984; Nikinmaa, Tufts, 1989). Исследования на эритроцитах рыб касаются, главным образом, гормончувствительного Na^+/H^+ обмена и выполнены в основном на представителе одного вида — радужной форели (Bourne, Cossins, 1982; Cossins, Kilbey, 1990).

В настоящей работе будут представлены данные о содержании одновалентных катионов в системе плазма-эритроциты хрящевых и костистых рыб Черного моря, их сезонные колебания. Изложены результаты о транспорте Na^+ и K^+ через мембрану эритроцитов некоторых черноморских рыб. Исследовано участие Na^+ , K^+ насоса в переносе ионов, влияние температуры, а также влияние на катионную проницаемость ионов Ca^{2+} и Cd^{2+} .

Материал и методика

Исследования по изучению ионного состава выполнены на 12-ти видах рыб:

хрящевые

морская лисица — *Raja clavata* L.
морской кот — *Dasyatis pastinaca* L.
катран — *Squalus acanthias* L.

костистые

ставрида — *Trachurus mediterraneus ponticus* Aleev
ласкирь — *Diplodus annularis* (L.)
смарида — *Spicara flexuosa* Rafinesque
барабуля — *Mullus barbatus ponticus* Essipov
скорпена — *Scorpaena porcus* L.
кефаль — *Liza aurata* (Risso)
сельдь — *Alosa kessleri pontica* (Eichwald)
камбала — калкан — *Psetta maxima maeotica* (Pallas)
ошибень — *Ophidion rochei* Muller

Катионная проницаемость эритроцитов, помещенных в среды низкой ионной силы, изучена на 4-х видах: морская лисица, катран, скорпена, барабуля. Транспорт Na^+ и K^+ в красных клетках крови, инкубированных в средах нормальной ионной силы, исследован на 2-х видах, морской лисице и скорпене.

Животных перед опытом содержали в аквариумах с проточной морской водой в течение 2—4 суток. У скатов кровь получали пункцией желудочка сердца, у катрана — после отсечения хвоста, у костистых рыб — пункцией хвостовой артерии стеклянной пипеткой. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (50 ед/мл).

Определение ионного состава плазмы крови и эритроцитов

Полученную после взятия кровь рыб помещали в запаянные с одной стороны полиэтиленовые трубки длиной 11—12 см и внутренним диаметром 1,5 мм. Полиэтиленовые трубки центрифугировали при 1800g в течение 20 минут и после этой операции их разрезали на блоки, содержащие плазму и форменные элементы. Для определения доли задержанной плазмы, предварительно в кровь добавляли не-

проникающий в клетки маркер — ^{65}Zn ЭДТА, в объеме 20 мкл на 1—2 мл крови. Долю задержанной плазмы определяли по соотношению концентраций ^{65}Zn ЭДТА во фракции эритроцитов и концентрации маркера в плазме крови. Измерение ^{65}Zn ЭДТА осуществляли на сцинтилляционном γ -спектрометре. Детектором служил кристалл $\text{NaI}(\text{Ti})$ с колодцем. Концентрацию Na^+ и K^+ определяли методом пламенной фотометрии на фотометре Карл Цейс-III. Для исследования брали весовые количества эритроцитов, полагая их удельный вес равным 1,09.

Проницаемость эритроцитов для одновалентных катионов в средах низкой ионной силы

После взятия крови форменные элементы отмывали. Для отмывания эритроцитов использовали изотоничные плазме крови растворы следующего состава (мМ): для костистых рыб 120 MgCl_2 , 50 трис- HCl (pH 7,4) и для хрящевых рыб — 120 MgCl_2 , 350 мочевины, 50 трис- HCl (pH 7,4). Эти растворы выбраны в соответствии с данными о том, что осмоляльность плазмы крови костистых рыб Черного моря составляет величину порядка 360 — 400 мосМ/кг H_2O , а для хрящевых рыб — около 750 мосМ/кг H_2O , из-за высокой концентрации мочевины в плазме крови. Эритроциты отделяли центрифугированием на центрифуге К-23 (1800g, 10 мин, 4°C). Надосадочную жидкость удаляли, фильтровальной бумагой аккуратно собирали верхний слой клеток, а оставшиеся эритроциты промывали еще раз. После этого клетки отмывали раствором, содержащим (мМ): для костистых — 180 трис- HCl (pH 7,4) и для хрящевых — 300 мочевины, 250 трис- HCl (pH 7,4). Суспензии эритроцитов (30—40%) на этих растворах сохраняли при 4°C, гематокрит определяли на гематокритной центрифуге. Аликвоты этих суспензий разбавляли дистиллированной водой для определения ионного состава.

Для исследования транспорта ионов полученную суспензию отмытых эритроцитов вносили в инкубационные среды с низкой ионной силой до конечной концентрации около 0,1—2%. Все среды содержали (мМ): для костистых — 400 сахара, для хрящевых — 400 сахара, 350 мочевины. Буферный раствор (трис- HCl) вносился вместе с суспензией клеток до конечной концентрации 0,2—0,5 мМ или 5—7,5 мМ. Суспензии инкубировали в ультратермостате МК-70 (Германия) при 10 или 20°C и отбирали пробы через различные промежутки времени в пределах 1—90 минут. Пробы немедленно центрифугировали, отбирали надосадочную жидкость и эритроциты лизировали бидистиллированной водой. В среде и лизате определяли концентрацию ионов Na^+ и K^+ на пламенном фотометре. Выход ионов рассчитывали по уменьшению концентрации в клетках и по накоплению их в среде инкубации. Как показали эксперименты, выход ионов из эритроцитов в низкоэлектролитных средах описывается моноэкспоненциальным уравнением и может быть охарактеризован константой скорости выхода. Расчет констант скорости выхода проводился методом наименьших квадратов.

Транспорт ионов Na^+ и K^+ в средах нормальной ионной силы

Для исследования транспорта ионов в средах нормальной ионной силы отмытые эритроциты (см. предыдущий раздел) инкубировали в течение 1—2 ч в средах различного состава. К 5 мл каждой инкубационной среды добавляли 0,2 мл суспензии эритроцитов (конечный гематокрит равнялся 1—2%). Инкубацию клеток ската проводили при температуре +10°C, а скорпены при +10 и +20°C в ультротермостате МК-70 (Германия). Все среды готовили из базовых растворов следующего состава (мМ): для хрящевых — 220 NaCl , 320 мочевины, 10 трис- HCl (pH 7,4), 10 глюкозы; для костистых — 180 NaCl , 5 трис- HCl (pH 7,4), 5 глюкозы. Эти растворы использовали в качестве контрольной среды. В остальные среды

прибавляли по 0,05 мл одного из растворов, содержащих убаин, KCl, CaCl₂, Na₂ЭДТА, или CdCl₂, до заданной конечной концентрации (см. таблицы). После инкубации эритроциты отделяли от среды центрифугированием и промывали холодным магниевым отмывающим раствором. Концентрацию Na⁺ и K⁺ в гемолизатах отмывых эритроцитов определяли на пламенном фотометре. Все данные обработаны статистически и представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$.

Результаты и обсуждение

Ионный состав эритроцитов

Видовой состав ихтиофауны в районе Карадага характеризуется наибольшим разнообразием в весенний период (апрель, май). Соответствующие этому периоду результаты исследований по содержанию одновалентных катионов в плазме и эритроцитах рыб представлены в табл. 1.

Таблица 1
Содержание Na⁺ и K⁺ (ммоль/л) в крови рыб Черного моря ($\bar{x} \pm S_x$)

Вид	Плазма		Эритроциты	
	Na ⁺	K ⁺	Na ⁺	K ⁺
Катран	237,0 ± 4,0 (4)	5,0 ± 0,6 (4)	11,4 ± 3,2 (8)	126,8 ± 1,4 (4)
М. Лисица	216,3 ± 5,2 (6)	5,3 ± 0,9 (6)	18,1 ± 3,8 (8)	123,9 ± 4,5 (9)
М. Кот	216,7 ± 2,1 (7)	2,9 ± 0,2 (7)	12,0 ± 1,5 (11)	119,0 ± 3,9 (7)
Ставрида	171,6 ± 3,7 (42)	3,0 ± 0,2 (42)	17,6 ± 3,6 (9)	92,5 ± 1,7 (7)
Кефаль	167,2 ± 7,2 (6)	7,2 ± 0,6 (6)	13,2 ± 2,0 (9)	90,7 ± 2,2 (9)
Сельдь	216,0 ± 3,3 (3)	1,9 ± 0,2 (3)	14,2 ± 0,8 (3)	146,8 ± 3,1 (3)
Смарида	168,5 ± 2,4 (22)	3,5 ± 0,2 (18)	42,3 ± 2,0 (12)	70,9 ± 1,3 (13)
Ласкирь*	165,2 ± 3,6 (30)	4,7 ± 0,3 (15)	35,0 ± 3,5 (6)	87,2 ± 2,6 (17)
Барабуля	170,2 ± 2,3 (13)	1,3 ± 0,1 (12)	21,4 ± 1,6 (13)	95,6 ± 2,4 (10)
Камбала	173,4 ± 2,6 (5)	4,5 ± 0,2 (5)	21,9 ± 1,0 (3)	89,0 ± 4,8 (3)
Скорпена	165,3 ± 4,0 (19)	4,6 ± 0,3 (19)	19,0 ± 3,2 (10)	103,4 ± 3,5 (13)
Ошибень	165,0 ± 1,1 (2)	3,8 ± 0,4 (2)	8,7 ± 1,0 (2)	80,0 ± 2,0 (2)

Примечание: цифры в скобках — число исследованных рыб; * — в преднерестовый период найдена группа ласкирей, отличающаяся по содержанию Na⁺ в эритроцитах 14,8 ± 2,2 (7).

Наши результаты (табл. 1) в основном сходны с немногочисленными литературными данными о содержании электролитов в эритроцитах морских рыб (Foster, Goldstein, 1976; Fugelli, Zachariassen, 1976; Флейшман и др., 1981; Bedford, 1983). Суммарные количества неорганических катионов в эритроцитах пластиножаберных и костистых рыб примерно равны, несмотря на то, что плазма первых содержит почти в 1,5 раза больше неорганических катионов по сравнению с плазмой вторых. Естественно, возникающее предположение о более высоком содержании органических веществ в эритроцитах пластиножаберных рыб хорошо согласуется с последними данными о важной роли аминокислот в осморегуляции этих животных (Bedford, 1983).

Литературные данные о содержании натрия и калия в эритроцитах млекопитающих позволяют разделить последних на две группы: 1) животные, эритроциты которых имеют высокие электрохимические градиенты ионов на мембране и соотношение Na^+/K^+ , не превышающее 0.2 (человек, лошадь, кролик, дельфин и др.); 2) животные, эритроциты которых имеют низкие электрохимические градиенты ионов и соотношение Na^+/K^+ , превышающее 1 (крупный рогатый скот, некоторые породы овец, собака, кошка). Эритроциты умеренно подвижных костистых рыб (смаида, ласкирь, барабуля, камбала) занимают промежуточное положение между высококалиевыми и высоконатриевыми эритроцитами млекопитающих. Хотя натрия в них всегда меньше, чем калия, соотношение Na^+/K^+ обычно выше 0.2. Пластиножаберные рыбы, согласно настоящему исследованию, вполне соответствуют млекопитающим с высококалиевыми эритроцитами. К высококалиевым эритроцитам можно отнести клетки быстроплавающих (ставрида, кефаль, сельдь) и мало подвижных рыб (скорпена, ошибень). Однако литературные данные свидетельствуют о высоком содержании натрия в эритроцитах пластиножаберных (Foster, Goldstein, 1976; Флейшман и др., 1981; Bedford, 1983), близко к тому, что мы получили у некоторых костистых рыб.

Как у пластиножаберных, так и у костистых рыб величина внутриклеточной концентрации натрия сильно варьирует от особи к особи. Столь же большую изменчивость содержания основных неорганических катионов наблюдала Флерова (Флерова, 1983) в эритроцитах и плазме пресноводных рыб. Проведенное В. И. Мартеньяновым и Р. А. Запрудновой (1982) исследование привело авторов к выводу о сильном влиянии стресса поимки на электролитный состав крови пресноводных рыб.

В настоящей работе были использованы рыбы после 2—3-дневной акклимации в аквариуме. Некоторых из них накануне взятия крови подвергали полостной операции. Мы не заметили различий в электролитном составе крови между оперированными и не оперированными рыбами, однако возможное влияние стресса нельзя, конечно, исключить.

Некоторое колебание внутриклеточной концентрации катионов в эритроцитах рыб наблюдалось в зависимости от стадии зрелости гонад. Так, в эритроцитах скорпены и смаиды отмечено значительное понижение внутриклеточной концентрации Na^+ в нерестовый период, составляющее соответственно 22% и 39%. У барабули и морской лисицы падение концентрации Na^+ эритроцитах отмечено после нереста (28% и 50%). Интересная внутривидовая гетерогенность в преднерестовый период отмечалась у ласкиря. У одних особей, вне зависимости от пола, содержание Na^+ в эритроцитах составляло 35.5 ± 3.5 ммоль/л клеток ($n=6$), а у других 14.8 ± 2.2 ммоль/л клеток ($n=7$). В отличие от Na^+ , концентрация K^+ в эритроцитах рыб, в различные периоды зрелости гонад была довольно постоянна.

Концентрация Na^+ и K^+ в плазме исследованных хрящевых и костистых рыб была достаточно стабильна на протяжении всего годового цикла. Незначительное повышение (на 9 — 10%) концентрации Na^+ наблюдали в плазме ставриды, скорпены и ласкиря при понижении температуры в море в зимний период. Это повышение, как мы полагаем, связано с адаптивным механизмом увеличения «антифризных» свойств крови.

Исследование влияния низкой ионной силы среды на транспорт Na^+ и K^+

Как уже сообщалось, в средах низкой ионной силы эритроциты некоторых видов (кошка, собака, крыса, морская свинка и др.) проявляли высокую катионную проницаемость, в то время как эритроциты других животных (кролик, свинья, овца, корова) сохраняли низкую проницаемость для катионов при этих условиях. В этой

связи особый интерес вызывало исследование влияния низкоэлектролитных условий среды на мембраны эритроцитов некоторых видов морских рыб. Исследования проводились на четырех видах. Действие этого фактора изучали в зависимости от величины ионной силы, температуры, концентрации Ca^{2+} и Cd^{2+} в среде. Известно, что в механизмах ионного транспорта через биологические мембраны ионы Cd^{2+} могут замещать ионы Ca^{2+} или блокировать процессы, связанные с Ca^{2+} (Verbost et al., 1988, 1989).

Выход ионов K^+ из эритроцитов. Эритроциты всех исследованных видов рыб в сахарозной среде, содержащей только 0,2—0,5 мМ трис- HCl , быстро теряли внутриклеточный K^+ . В клетках хрящевых рыб имела место более высокая скорость выхода K^+ , чем у костистых рыб (табл. 2). Потери K^+ из эритроцитов существенно снижались при добавлении к инкубационной среде 2 мМ CaCl_2 , напротив, при добавлении к среде 0,2 мМ CdCl_2 выход K^+ из клеток значительно ускорялся. Следует отметить низкую устойчивость красных клеток крови морской лисицы в этих средах, особенно при добавлении к среде Cd^{2+} или комплексона двухвалентных металлов (ЭДТА). Одной из причин низкой устойчивости клеток хрящевых рыб могла быть повышенная температура инкубации (20°C), поскольку в естественной среде обитания эти виды животных живут при гораздо более низких температурах.

Таблица 2

Константы скорости выхода K^+ (ч^{-1}) из эритроцитов, инкубированных при 20°C в течение 20 — 65 мин в изотоническом растворе сахарозы, содержащем 0,2 — 0,5 мМ трис- HCl

Вид	Среда инкубации			
	контроль	+2 мМ CaCl_2	+0,2 мМ EDTA	+0,2 мМ CdCl_2
Катран	1,17 ± 0,06	0,41 ± 0,03*	2,06 ± 0,02	-
Морская лисица	1,59 ± 0,27	0,21 ± 0,06*	Гемолиз	Гемолиз
Скорпена	0,77 ± 0,10	0,20 ± 0,03*	-	2,28 ± 0,35*
Барабуля	0,66 ± 0,05		0,76 ± 0,07	1,80 ± 0,07*

*Статистически достоверно отличается от контроля ($p < 0,05$); число исследованных животных каждого вида — 3—5.

В следующей серии экспериментов эритроциты рыб инкубировали при температуре 10 и 20°C, а концентрация электролита в сахарозной среде была увеличена до 5—7,5 мМ. При таком повышении ионной силы среды при одной температуре (20°C) константа скорости выхода K^+ из клеток уменьшалась в 3—5 раз: у морской лисицы до $0,32 \pm 0,05 \text{ ч}^{-1}$ ($n = 6$) и у скорпены — до $0,25 \pm 0,05 \text{ ч}^{-1}$ (табл. 3). При снижении температуры инкубации до 10°C возрастала устойчивость эритроцитарных мембран морской лисицы, и гемолиз практически отсутствовал во всех экспериментах. Выход ионов K^+ из эритроцитов скорпены уменьшался после снижения температуры инкубации.

Добавление 2 мМ CaCl_2 или 0,1—1 мМ ЭДТА к сахарозной среде, содержащей 5—7,5 мМ трис- HCl не вызывало статистически достоверных изменений константы скорости выхода K^+ из эритроцитов у обоих исследованных видов рыб (табл. 3). Скорость выхода K^+ из клеток в среде с 5—7,5 мМ трис- HCl приближалась к

Таблица 3

Константы скорости выхода K^+ ($ч^{-1}$) из эритроцитов, инкубированных в изотоническом растворе сахарозы, содержащем 5-7,5 мМ трис-НСI

Состав среды	Морская лисица 10°C	Скорпена	
		10°C	20°C
Контроль	$0,35 \pm 0,05$	$0,11 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,05$
+2 мМ $CaCl_2$	$0,25 \pm 0,05$	$0,09 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,04$
+0.1 мМ EDTA	$0,40 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,08$
+ 1 мМ EDTA	$0,40 \pm 0,06$	$0,11 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,05$
+0.02 мМ $CdCl_2$	$0,24 \pm 0,04$	$0,17 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,08$
+0.2 мМ $CdCl_2$	$0,27 \pm 0,05$	$1,02 \pm 0,09^*$	$1,69 \pm 0,21^*$

*Статистически достоверно отличается от контроля ($p < 0,01$); число исследованных животных каждого вида — 5—7.

величине, наблюдавшейся в среде с 0,2-0,5 мМ трис-НСI + 2 мМ $CaCl_2$ (табл. 2). По всей вероятности, ионы Ca^{2+} не оказывают специфического влияния на проницаемость мембран исследованных эритроцитов в низкоэлектролитной среде. Снижение скорости выхода K^+ из клеток, по-видимому, обусловлено увеличением ионной силы среды.

Ионы Cd^{2+} в концентрации 0,2 мМ независимо от ионной силы среды значительно стимулировали потери K^+ из эритроцитов скорпены в сахарозной среде. Механизм действия Cd^{2+} неясен, но можно предполагать, что происходят изменения мембранных белков благодаря взаимодействию этих ионов с сульфгидрильными группами (Verboost et al., 1988, 1989; Skulskii et al., 1991).

При величине константы скорости 0,25—0,35 $ч^{-1}$ и исходной концентрации K^+ в эритроцитах около 150 мМ/л клеточной воды начальная скорость выхода K^+ из клеток в сахарозной среде составляет около 40—50 ммоль/л/ч. При инкубации эритроцитов некоторых видов костистых и хрящевых рыб в физиологических средах потоки ионов K^+ и Na^+ через мембрану колеблются в пределах 5—15 ммоль/л/ч (Teodore et al., 1972; Bourne, Cossins, 1982; Орлов и др., 1990). Следовательно, в сахарозной среде при концентрации электролита 5—7,5 мМ проницаемость эритроцитов рыб для одновалентных катионов остается значительно выше, чем в среде с нормальной ионной силой.

Выход ионов Na^+ из эритроцитов. Инкубация эритроцитов в средах с низкой концентрацией электролита приводила также к быстрой потере внутриклеточного Na^+ у всех исследованных рыб. Константа скорости выхода Na^+ даже превышала таковую для K^+ в 2—4 раза (табл. 4). В отличие от K^+ , скорость выхода Na^+ сохранялась столь же высокой при увеличении ионной силы среды (в присутствии 5—7,5 мМ трис-НСI): при температуре 20°C константа скорости выхода Na^+ для эритроцитов морской лисицы составила $3,6 \pm 1,3 ч^{-1}$ ($n=4$) и скорпены — $1,7 \pm 0,6 ч^{-1}$ ($n=3$). Введение в инкубационную среду ионов Ca^{2+} , Cd^{2+} или EDTA не вызывало статистически достоверных изменений скорости транспорта Na^+ из эритроцитов рыб. Таким образом, эритроциты исследованных видов хрящевых и костистых рыб проявляют высокую проницаемость для ионов Na^+ и K^+ в средах с низкой ионной силой. В этом отношении эритроциты рыб близки к эритроцитам человека, крысы, кошки и собаки (Zeidler, Kim, 1979; Erdmann et al., 1990). «Натриевые» эритроциты кошки и собаки при инкубации клеток в низкоэлектролитной среде быстро теряют внутриклеточный Na^+ . Эритроциты человека в сахарозной среде проявляют высокую проницаемость для всех щелочных катио-

Таблица 4

Константы скорости выхода Na^+ (ч^{-1}) из эритроцитов, инкубированных при 20°C в течение 25 — 30 мин в изотоническом растворе сахарозы, содержащей 0,2 — 0,5 мМ трис-HCl

Вид*	Среда инкубации		
	контроль	+2 мМ CaCl_2	+0,2 мМ EDTA
Катран	$2,50 \pm 0,55$	$2,11 \pm 1,10$	$3,77 \pm 1,00$
Морская лисица	$3,92 \pm 0,28$	-	Гемолиз
Скорпена	$1,60 \pm 0,36$	$1,66 \pm 0,50$	-
Барабуля	$2,78 \pm 0,65$	$1,37 \pm 0,43$	$2,29 \pm 0,48$

*Число исследованных животных каждого вида — 3—5.

нов (Bernhardt, Glaser, 1982; Jones, Knauf, 1985; Halperin et al., 1989). В сахарозной среде, содержащей 11 мМ электролита, константа скорости выхода ^{86}Rb из эритроцитов человека равнялась $0,36 \text{ ч}^{-1}$ (Bernhardt et al., 1982). Последняя величина сопоставима со скоростью потерь K^+ из эритроцитов исследованных рыб при близкой ионной силе среды (табл. 3).

В наших экспериментах потери катионов из эритроцитов рыб должны сопровождаться одновременным выходом анионов Cl^- и воды из клеток. Причем, если проницаемость мембраны для катионов выше, чем проводимость ее для анионов Cl^- , то последняя становится фактором, ограничивающим скорость для транспорта ионов Na^+ и K^+ из эритроцитов. На эритроцитах человека показано, что ингибитор анионного транспорта (4,4'-диизотиоцианстильбен-2,2'-дисульфокислота, ДИДС) значительно блокировал выход K^+ , Na^+ и Cl^- в сахарозной среде, содержащей 12,5 мМ электролита (Jones, Knauf, 1985). Но при этих условиях проводимость мембраны для Cl^- оставалась выше, чем для катионов, даже в присутствии ДИДС. На основании этих данных предполагают, что анионный переносчик эритроцитарной мембраны участвует в выходе катионов в среде с низкой ионной силой. Мембрана эритроцитов рыб (Romano, Passow, 1984), так же как и других видов животных, обладает высокой проницаемостью для анионов, и мембранный потенциал (E_m) при нормальных условиях не отличается от электрохимического потенциала ионов Cl^- (E_{Cl}). При уменьшении концентрации Cl^- в сахарозной среде потенциал E_m становится более положительным (с внутренней стороны), что рассматривается как причина возникновения повышенной катионной проницаемости мембраны эритроцита (Bernhardt et al., 1982, 1984; Bernhardt, Glaser, 1982; Nikinmaa, Huestis, 1984). В недавнем исследовании (Halperin et al., 1990) было обнаружено, что увеличение проницаемости для катионов в сахарозной среде наблюдается только в «высококальциевых» эритроцитах овец, но оно отсутствует в эритроцитах овец с низким содержанием K^+ . Авторы предполагают, что в низкоэлектролитной среде в мембране эритроцита открываются некоторые дискретные пути транспорта катионов.

Химическая структура мембраны, в частности ее липидный состав, является другим важным фактором, влияющим на ионную проницаемость эритроцитов в низкоэлектролитной среде (Bernhardt et al., 1984). Структурными особенностями мембраны, по-видимому, объясняется сохранение низкой ионной проницаемости эритроцитов некоторых видов животных (кролика, свиньи, коровы, овцы) в низкоэлектролитной среде. В наших экспериментах более высокая проницаемость для

K⁺ в сахарозной среде эритроцитов хрящевых рыб по сравнению с костистыми (табл. 2, 3) также, по-видимому, связана с особенностями липидного состава мембран (Силкин, Круглова, 1991).

Транспорт Na⁺ и K⁺ в средах нормальной ионной силы

Исследование транспорта катионов в эритроцитах рыб в средах нормальной ионной силы осуществляли на двух видах: представителе хрящевых рыб — морской лисице (*R. clavata* L.) и представителе костистых рыб — скорпене (*S. porcus* L.).

Особенности транспорта катионов в эритроцитах морской лисицы

В отмытых эритроцитах морских лисич исходная концентрация натрия и калия перед инкубацией составили соответственно 8.2 ± 1.2 и 99.8 ± 2.7 ммоль/л ($\bar{x} \pm S_x$). Инкубация клеток в течение 1 ч во всех средах приводила к значительному изменению концентрации ионов в эритроцитах скатов (табл. 5); наблюдалось накопление натрия и потеря калия. После 2-го ч инкубации отмечался лишь небольшой вход Na⁺ в эритроциты в контрольной среде и в присутствии убаина, выход же K⁺ из клеток сохранялся на прежнем уровне во всех средах. Добавление 5 ммоль/л K⁺ к исходному физиологическому раствору полностью предохраняло потерю K⁺ из эритроцитов в 1-й ч инкубации и снижало выход K⁺ в течение 2-го ч. Транспорт Na⁺ в эритроциты в 1-й ч инкубации не зависел от присутствия K⁺ в среде, но существенно уменьшался при добавлении в среду 1 ммоль/л убаина. Выход K⁺ из эритроцитов в присутствии убаина не отличался достоверно по отношению к контрольной бескалевой среде, но значительно увеличивался под влиянием убаина при сравнении с калиевой средой (табл. 5, среды II и III).

Таблица 5

Концентрация ионов в эритроцитах морских лисич после инкубации клеток в различных средах ($\bar{x} \pm S_x$, ммоль/л)

Среда	Состав среды (мМ)	Инкубация (ч)			
		1		2	
		Натрий	калий	натрий	калий
I	Контроль	29.6 ± 1.6	90.6 ± 4.1	38.8 ± 4.9	77.1 ± 3.4
II	+5 KCl	27.8 ± 2.5	100 ± 4.0	$24.0 \pm 4.2^*$	$91.7 \pm 3.5^*$
III	+1 убаина	$43.3 \pm 2.6^{***}$	85.3 ± 4.9	$51.8 \pm 5.7^*$	72.3 ± 3.8
IV	+2 CaCl ₂	$20.2 \pm 2.1^{**}$	95.3 ± 3.0	$23.0 \pm 1.7^{**}$	$86.8 \pm 2.7^*$
V	+0.1 ЭДТА	$57.2 \pm 3.6^{***}$	84.3 ± 3.4	$56.7 \pm 8.6^*$	72.2 ± 5.0
VI	+1.0 ЭДТА	$85.8 \pm 2.6^{***}$	85.7 ± 4.7	$89.0 \pm 8.3^{***}$	68.5 ± 6.5
VII	+0.02 CdCl ₂	33.7 ± 2.6	90.0 ± 4.2	37.5 ± 3.2	78.6 ± 3.2
VIII	+0.2 CdCl ₂	28.4 ± 2.6	91.8 ± 3.5	$25.3 \pm 3.0^*$	82.9 ± 3.9

Примечание. Число исследованных животных — 7; температура инкубации эритроцитов +10°C; концентрация ионов в исходных отмытых эритроцитах Na⁺ 8.2 ± 1.2 и K⁺ 99.8 ± 2.7 ммоль/л. Звездочками обозначена достоверность различий по сравнению с контрольной средой: * — < 0,05, ** — < 0,01 и *** — < 0,001.

Введение в инкубационную среду 2 ммоль/л Ca²⁺ значительно ингибировало вход Na⁺ в эритроциты скатов и потерю K⁺. В присутствии в среде 0,02—0,2 ммоль/л Cd²⁺ отмечалось только статистически достоверное снижение накопления Na⁺ в эритроцитах за 2 ч инкубации. Добавление к контрольному раствору комплексона

(натриевой соли ЭДТА) приводило к резкому повышению входа Na^+ в эритроциты морских лисиц в 1-й ч инкубации. Дальнейшего накопления Na^+ во 2-й ч инкубации не наблюдалось (табл. 5, среды V и VI). Выход K^+ из клеток в присутствии ЭДТА не отличался статистически достоверно от транспорта K^+ при инкубации эритроцитов в контрольном растворе.

Эритроциты морской лисицы по содержанию Na^+ и K^+ близки к эритроцитам человека и животных. Полученные нами данные показали, что эритроциты ската в отличие от эритроцитов млекопитающих обладают высокой проницаемостью для одновалентных катионов. Действительно, при инкубации эритроцитов морской лисицы в физиологическом растворе (NaCl , мочевины, глюкоза, трис- HCl) константы скорости входа Na^+ и выхода K^+ из клеток составляли около 0.1 ч^{-1} . Как свидетельствуют многочисленные данные (Glynn, 1957; Kirk, 1977; Muller-Soyano, Glader, 1977; Bernhardt et al., 1984), константы проницаемости для одновалентных катионов в эритроцитах человека и других млекопитающих при инкубации клеток в физиологическом растворе не превышают $2 \cdot 10^{-2} \text{ ч}^{-1}$. Проницаемость эритроцитов млекопитающих для Na^+ и K^+ практически не зависит от присутствия в среде инкубации ионов Ca^{2+} или ЭДТА. Напротив, проницаемость эритроцитов ската для катионов уменьшалась при добавлении к среде Ca^{2+} , а при введении ЭДТА значительно возрастал вход Na^+ в клетки. По-видимому, в эритроцитах морской лисицы ионы Ca^{2+} связаны с плазматической мембраной менее прочно, чем в эритроцитах человека. По данным Майзельса (Maizels, 1956), рыхлой связью Ca^{2+} с мембраной отличаются эритроциты черепахи и некоторых видов рыб, о которых лишь упоминается в цитируемой работе, но данные не приводятся.

Следует отметить, что в 1-й ч инкубации эритроцитов ската вход Na^+ превышал выход K^+ из клеток и наблюдалось повышение суммарной концентрации ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) во всех средах: минимальное изменение (+ 7,5%) наблюдалось в среде с Ca^{2+} и максимальное в присутствии 1 ммоль/л ЭДТА (+58%). По-видимому, при добавлении ЭДТА значительный вход Na^+ в клетки сопровождается их набуханием. Во 2-й ч инкубации суммарное содержание ионов ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) в эритроцитах во всех средах уменьшалось за счет большей потери K^+ по сравнению со входом Na^+ .

Рассмотренные выше механизмы транспорта ионов (накопление Na^+ и потеря K^+) являются пассивными процессами. Поддержание концентрационных градиентов ионов в эритроцитах обеспечивается системами активного транспорта. Активный транспорт Na^+ из клеток ингибируется во время инкубации эритроцитов в бескальевой среде. Добавление K^+ к контрольной среде стимулировало активный транспорт Na^+ из клеток в обмен на K^+ , в результате чего уменьшались накопление Na^+ и потеря K^+ . Ингибитор Na,K-ATФазы убаин в среде инкубации влиял на потерю K^+ так же, как влияла инкубация в бескальевой среде. Убаин-чувствительная потеря K^+ по сравнению с калиевой средой составила 14,7 ммоль/л/ч и 19,4 ммоль/л/2 ч. Убаин вызывал значительно большее накопление Na^+ в клетках не только по сравнению с калиевой средой (15,5 ммоль/л/ч и 27,8 ммоль/л/2 ч), но и по отношению к бескальевой среде (13,7 ммоль/л/ч и 13,0 ммоль/л/2 ч). В целом эти данные свидетельствуют об участии Na,K-ATФазы в активном транспорте ионов и о его высоком уровне в эритроцитах морской лисицы. Фактически в стационарном состоянии активный транспорт ионов уравнивает пассивные противоположно направленные потоки ионов. Более высокие величины пассивного и активного транспорта Na^+ и K^+ по сравнению с эритроцитами млекопитающих найдены другими авторами (Bricker et al., 1968; Theodore et al., 1972) при исследовании эритроцитов других видов хрящевых рыб.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о существенных особенностях транспорта ионов через мембрану эритроцитов морской лисицы по сравнению с эритроцитами млекопитающих. Во время инкубации эритроциты ската проявляли высокую проницаемость для Na^+ и K^+ , которая зависела от присутствия Ca^{2+} в среде. Связывание Ca^{2+} мембран эритроцитов (добавление ЭДТА) приводило к увеличению проницаемости для Na^+ . Поддержание концентрационных градиентов ионов при значительных потоках обуславливало высокий уровень убаин-чувствительного (активного) транспорта Na^+ и K^+ в эритроцитах ската.

Особенности транспорта катионов в эритроцитах скорпены

В отмытых эритроцитах скорпены перед инкубацией выявлялось высокое содержание ионов K^+ и низкая концентрация Na^+ (табл. 6). По ионному составу эритроциты скорпены не отличались существенно от красных клеток крови человека (Tosteson, 1967; Cumberbatch, Morgan, 1978, 1981; Орлов, 1985). В отличие от эритроцитов морской лисицы, которые были чувствительны к температурам выше 10°C , эритроциты скорпены инкубировали как при 10°C , так и при 20°C .

Таблица 6

Концентрация ионов в эритроцитах скорпены после инкубации клеток в различных средах (ммоль/л клеток)

Среда	Температура 10°C		Температура 20°C	
	натрий	Калий	Натрий	Калий
До инкубации	5.8 ± 0.5	101 ± 2.4	8.9 ± 1.9	102 ± 2.5
I контроль	8.8 ± 1.1	93.3 ± 2.5	14.3 ± 2.3	86.8 ± 2.2
II I+5.0 KCl	9.2 ± 0.9	93.3 ± 4.1	12.0 ± 2.5	87.3 ± 3.3
III I+1.0 убаин	9.1 ± 1.6	91.3 ± 2.1	$19.3 \pm 1.2^*$	85.6 ± 5.4
IV I+1-2.0 CaCl_2	8.0 ± 1.3	91.3 ± 0.4	14.4 ± 2.1	86.0 ± 4.2
V I+0.1 ЭДТА	9.4 ± 0.6	93.9 ± 0.5	14.8 ± 2.2	87.3 ± 3.3
VI I+1.0 ЭДТА	9.5 ± 1.3	92.6 ± 1.8	15.5 ± 2.4	87.7 ± 1.9
VII I+0.02 CdCl_2	9.5 ± 1.3	$88.0 \pm 0.7^*$	14.6 ± 1.8	82.7 ± 2.8
VIII I+0.2 CdCl_2	$18.5 \pm 1.4^{**}$	$75.2 \pm 4.0^{**}$	$20.9 \pm 1.9^*$	$73.1 \pm 3.2^{**}$

Примечание. Число исследованных животных в каждой серии при 10 и 20°C — 3—5; состав контрольной среды (ммоль/л): 180 NaCl, 5 трис-HCl, 5 глюкозы (pH 7,4); продолжительность инкубации 2 ч. Звездочками обозначена достоверность отличий по сравнению с контролем: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,001$.

Транспорт ионов при температуре 10°C . Транспорт ионов через мембраны эритроцитов скорпены оценивали по изменению содержания Na^+ и K^+ в клетках после двухчасовой инкубации их в различных средах (табл. 6). Добавление к среде 5 ммоль/л K^+ должно активировать, а убаина ингибировать перенос ионов Na, K-насосом. Подобный метод для определения активного транспорта по убаин-зависимому накоплению Na^+ в клетках разработан для эритроцитов человека (Cumberbatch, Morgan, 1978). При температуре 10°C содержание обоих ионов не зависело от добавления к основной физиологической среде K^+ , убаина, Ca^{2+} или комплекса двухвалентных катионов, ЭДТА (табл. 6). Отсутствие влияния K^+ и убаина на накопление Na^+ в клетках свидетельствовало о том, что, по всей вероятности, при 10°C в эритроцитах не функционирует Na,K-насос. Рыб перед опытом содержали в аквариумах с морской водой при температуре 20— 22°C . Возможно, требуется дополнительное время для адаптации Na,K-АТФазы к пониженной темпе-

ратуре. Существенное влияние на мембраны эритроцитов скорпены оказывали ионы Cd^{2+} . В концентрации 0,02 ммоль/л ионы Cd^{2+} вызывали достоверное увеличение потери K^+ из клеток, а в концентрации 0,2 ммоль/л — значительные сдвиги содержания Na^+ и K^+ .

Транспорт ионов при 20°C. Более значительные изменения ионного состава эритроцитов скорпены наблюдались во время инкубации клеток при температуре 20°C. При этих условиях накопление Na^+ в эритроцитах существенно возрастало в присутствии убаина. Убаин-чувствительная компонента, представляющая разность между транспортом Na^+ в физиологической среде с 5 ммоль/л K^+ и в присутствии убаина (табл. 6, среды II и III), составила в среднем 7,3 ммоль/л клеток/2 ч или 3,65 ммоль/л/ч. В эритроцитах человека величина убаин-чувствительного транспорта, рассчитанная по накоплению Na^+ в эритроцитах, находится в пределах 1,7—1,8 ммоль/л/ч (Cumberbatch, Morgan, 1981; Arumanayagam et al., 1987). Сдвиги в содержании ионов в эритроцитах после двухчасовой инкубации при 20°C были выше, чем в результате инкубации клеток при 10°C (табл. 6). Эти данные свидетельствуют о более высокой проницаемости эритроцитов скорпены для Na^+ и K^+ при температуре 20°C по сравнению с 10°C. Обращает на себя внимание изменение ионного состава клеток при инкубации их в нормальной физиологической среде с 5 ммоль/л K^+ . Для эритроцитов форели также наблюдалась нестабильность ионного состава во время инкубации клеток в физиологических средах независимо от присутствия в среде метаболитов и Ca^{2+} (Bourne, Cossins, 1982; Houston et al., 1985). Относительное постоянство концентрации ионов в эритроцитах форели обеспечивалось только при добавлении к среде инкубации адреналина.

Присутствие в инкубационной среде ионов Ca^{2+} или ЭДТА при 20°C не оказывало влияния на ионный состав эритроцитов скорпены (табл. 6). В этом отношении эритроциты скорпены похожи на эритроциты человека, проницаемость которых для одновалентных катионов также не зависит от присутствия Ca^{2+} или ЭДТА в среде (Garay, Nazaret, 1985). Так же как и при 10°C, Cd^{2+} в концентрации 0,2 ммоль/л при температуре 20°C значительно стимулировал накопление Na^+ и потерю K^+ из эритроцитов (табл. 6). На эритроцитах человека показано, что Cd^{2+} может транспортироваться внутрь клетки, но данные о нарушении транспорта одновалентных катионов отсутствуют (Haas, Schmidt, 1985). Одним из механизмов действия Cd^{2+} может быть его взаимодействие с сульфгидрильными группами белков эритроцитарных мембран. Некоторые хорошо известные сульфгидрильные реагенты, такие как парахлорртутьбензоат, могут значительно повышать проницаемость эритроцитов человека для Na^+ и K^+ (Nguyen, Chien, 1989). Интересно отметить, что у представителя хрящевых рыб — морской лисицы — Cd^{2+} не только не увеличивает проницаемость эритроцитов для одновалентных катионов, но и, подобно Ca^{2+} , снижает проницаемость (табл. 5).

Величина активного транспорта Na^+ в эритроцитах скорпены (3,65 ммоль/л/ч) не отличалась существенно от данных, полученных при исследовании эритроцитов некоторых видов рыб. В работах Орлова с соавторами (Орлов и др., 1990; Орлов, Скрябин, 1991) на эритроцитах карпа убаин-ингибируемая компонента входа K^+ (^{86}Rb) составила в среднем 1,9—2,0 ммоль/л/ч, а убаин-зависимое накопление Na^+ равнялось 3,4 ммоль/л/ч. Авторы также показали, что активный транспорт ионов в эритроцитах карпа стимулировался присутствием в инкубационной среде норадреналина. В эритроцитах форели при внутриклеточной концентрации Na^+ , равной 10 ммоль/л, величина убаин-чувствительного входа K^+ (^{42}K) при 20°C составила около 2 ммоль/л/ч (Raynard, Cossins, 1991). Охлаждение суспензии эритроцитов форели от 20 до 0°C приводило к снижению активного транспорта K^+ на

82%. При насыщающей внутриклеточной концентрации в эритроцитах форели активный транспорт выявлялся даже при 0°C. Эти авторы (Raynard, Cossins, 1991) обнаружили, что предварительная акклимация рыб при различных температурах также оказывает существенное влияние на активный транспорт K^+ через мембрану эритроцита. В условиях наших экспериментов при 10°C не происходило активного транспорта Na^+ в эритроцитах скорпены при инкубации клеток. Эти данные подтверждают представление о широкой вариабельности температурной адаптации Na,K -АТФазы среди различных видов даже в пределах одного класса (Kimzey, Willis, 1971).

Заключение

Эритроциты являются прекрасными модельными объектами для изучения ионного транспорта. Многочисленные исследования на различных видах животных, включая и человека, обнаружили удивительное многообразие путей ионного переноса через эритроцитарную мембрану. К настоящему времени их насчитывается более 10-ти (Орлов, 1985; Bernhardt et al., 1993). Причины столь значительного многообразия механизмов переноса ионов, по-видимому, кроются в «тонкой» регуляции концентрации ионов в различных компартментах клетки в процессе ее жизнедеятельности. Контуры этой картины еще очень размыты и неопределенны. Существенные успехи в понимании ион-транспортирующих систем одновалентных катионов в эритроцитах земноводных и миног достигнуты группой Гусева Г. П. (Институт эволюционной физиологии и биохимии им. Сеченова, Санкт-Петербург), где с помощью радиоактивных изотопов исследованы потоки ионов и факторы, на них влияющие.

Эритроциты рыб относятся к слабоизученному объекту, и поэтому предлагаемые данные необходимо рассматривать как основу для более широких и углубленных исследований механизмов трансмембранного переноса ионов. Без сомнения, на этом пути нас ждут еще удивительные открытия.

Литература

- Мартимьянов В. И., Запруднова Р. А. Динамика концентрации электролитов в плазме крови, эритроцитах и мышечной ткани пресноводных рыб при стрессе // Биол. науки. — 1982. — №10. — С. 44—49.
- Орлов С. Н. Транспорт одновалентных катионов через плазматическую мембрану клеток электрически невозбудимых тканей // Усп. совр. биол. — 1985. — Т. 100. — С. 203—218.
- Орлов С. Н., Скрябин Г. А. β -Адренергические катехоламины активируют Na^+ , K^+ — насос эритроцитов карпа независимо от стимуляции Na^+/H^+ -обмена // ДАН СССР. — 1991. — Т. 316. — С. 997—1000.
- Орлов С. Н., Скрябин Г. А., Котельцов С. В., Козлов Ю. П. Рецептор- и объемзависимая регуляция Na^+/H^+ насоса и ионных переносчиков в эритроцитах рыб // Биол. науки. — 1990. — №6. — С. 27—38.
- Силкин Ю. А., Круглова Э. Э. Белково-липидный состав плазматических мембран эритроцитов рыб — морской лисицы и скорпены // Ж. эвол. биохим. и физиол. — 1991. — Т. 27. — С. 422—426.
- Флейшман Д. Г., Солюс А. А., Бакланова С. М. Влияние градиентов концентраций ионов натрия на распределение лития между клетками и плазмой крови у рыб // Ж. эвол. биохим. и физиол. — 1981. — Т. 17. — С. 403—406.

Флерова Г. А. Внутривидовые и межвидовые различия катионного состава плазмы крови и эритроцитов некоторых пресноводных рыб // *Вопр. ихтиол.* — 1983. — Т. 23. — №1. — С. 126—134.

Arumanayagam M., McDonald D., Swaminathan R. Differences in erythrocyte cation (sodium) transport between chinese and non chinese males // *Clin. Exp. Hypertension.* — 1987. — V. A9. — P. 719—739.

Bedford J. J. The composition of the fluid compartments of two chondrichthyes *Callorhincus millii* and *Squalus acanthias* // *Comp. Biochem. and Physiol.* — 1983. — V. 76. — №1. — P. 75—84.

Bernhardt I., Borning M., Glaser R. Investigations of the control of ion transport in human erythrocytes. I. Passive ^{86}Rb efflux and possibilities of its influence // *Acta Biol. et med. Germ.* — 1982. — V. 41. — №6. — P. 531—539.

Bernhardt I., Donath E., Glaser R. Influence of surface change and transmembrane potential on rubidium-86 efflux of human red blood cells // *J. Membrane Biol.* — 1984a. — V. 78. — P. 249—255.

Bernhardt I., Erdmann A., Glaser R. Factors influencing the passive cation through the erythrocyte membrane // *Biomed. Biochem. Acta.* — 1984b. — V. 43. — №3. — P. 15—16.

Bernhardt I., Glaser R. Investigations on the control of ion transport in human erythrocytes. II. Influence of transmembrane potential exterior surface potential and intracellular pH on the ^{22}Na efflux // *Acta Biol. et med. Germ.* — 1982. — V. 41. — №6. — P. 541—547.

Bernhardt I., Ihrig I., Erdmann A. Investigation of low ionic strength effect on passive monovalent cation transport through erythrocyte membranes // *The Ukrain. Biochem. J.* — 1993. — V. 65. — №5. — P. 3—20.

Bolingbroke V., Maizels M. Calcium ions and the permeability of human erythrocytes // *J. Physiol.* — 1959. — V. 149. — P. 563—585.

Bourne P. K., Cossins A. R. On the instability of K^+ influx in erythrocytes of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and the role catecholamine hormone in maintaining in vivo influx activity // *J. Exp. Biol.* — 1982. — V. 101. — P. 93—104.

Bricker N. S., Guerra L., Klahr S. Sodium transport and metabolism by erythrocytes of the dogfish shark // *Am. J. Physiol.* — 1968. — V. 215. — №2. — P. 383—388.

Cossins A. R., Kilbey R. V. The temperature dependence of the adrenergic Na^+/H^+ exchange of the trout erythrocytes // *J. Exp. Biol.* — 1990. — V. 148. — P. 303—312.

Cumberbatch M., Morgan B. A. A simple technique for the measurement of ouabain-sensitive sodium transport in red cells // *Clin. Chim. Acta.* — 1978. — V. 89. — P. 221—226.

Cumberbatch M., Morgan D.B. Relations between sodium concentration and sodium transport in human erythrocytes in health and disease // *Clin. Sci.* — 1981. — V. 60. — P. 555—564.

Donlon J. A., Rothstein A. The cation permeability of erythrocytes in low ionic strength media of various tonicities // *J. Membrane Biol.* — 1969. — V. 1. — P. 37—52.

Erdmann A., Bernhardt I., Hermann A., Glaser R. Species-dependent differences in the influence of ionic strength on potassium transport of erythrocytes. The role of membrane fluidity and Ca^{2+} // *General Physiology and Biophysics.* — 1990. — V. 9. — P. 577—588.

Forster R. P., Goldstein L. Intracellular osmoregulatory role of amino acids and urea in marine elasmobranchs // *Am. J. Physiol.* — 1976. — V. 230. — №4. — P. 925—931.

Fugelli K., Zachariassen K. E. The distribution of taurine, gamma-aminobutyric acid and inorganic ions between plasma and erythrocytes in flounder (*Platichthys flesus*) at different plasma osmolalities // *Comp. Biochem. Physiol.* — 1976. — V. 55A. — №2. — P. 173—177.

Garay R., Nazaret C. Na^+ leak in erythrocytes from essential hypertensive patients // *Clin. Sci.* — 1985. — V. 69. — P. 613—624.

Glynn I. M. The action of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in human red cells // *J. Physiol.* — 1957. — V. 136. — №1. — P. 148—173.

- Haas M., Schmidt W. F. P-chloromercuribenzenesulfonic acid stimulation of chloride-dependent sodium and potassium transport in human red blood cells // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1985. — V. 814. — P. 43—49.
- Halperin J. A., Brugnara C., Tosteson M. F. et al. Voltage-activated cation transport in human erythrocytes // *Am. J. Physiol.* — 1989. — V. 257. — P. 986—996.
- Halperin J. A., Brugnara C., Van Ha T., Tosntson D. S. Voltage-activated cation permeability in high-potassium but not low-potassium red blood cells // *Ibid.* — 1990. — V. 258. — P. 1169—1172.
- Houston A. H., McCullough C. A., Keen J. et al. Rainbow trout red cells in vitro // *Comp. Biochem. Physiol.* — 1985. — V. 81A. — P. 555—565.
- Jones G. S., Knauf Ph. A. Mechanism of the increase in cation permeability of human erythrocytes in low-chloride media // *J. Gen. Physiol.* — 1985. — V. 86. — P. 721—738.
- Kimzey S. L., Willis J. S. Temperature adaptation of active sodium-potassium transport and passive permeability in erythrocytes of ground squirrels // *J. Gen. Physiol.* — 1971. — V. 58. — P. 634—649.
- Kirk R. G. Potassium transport and lipid composition in mammalian red blood cell membranes // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1977. — V. 464. — №2. — P. 157—164.
- LaCelle P. L., Rothstein A. The passive permeability of red blood cell to cation // *J. Gen. Physiol.* — 1966. — V. 50. — P. 176—188.
- Maizels M. Sodium transfer in tortoise erythrocytes // *J. Physiol.* — 1956. — V. 132. — №2. — P. 414—441.
- Muller-Soyano A., Glader B. E. Cation specificity of propranolol-induced changes in RBC membrane permeability, comparative effects in human, dog and cal erythrocytes // *J. Cell. Physiol.* — 1977. — V. 91. — №3. — P. 317—322.
- Nguyen Q., Chien P. K. Cadmium uptake kinetics in human erythrocytes // *Biol. Trace Elem. Res.* — 1989. — V. 22. — P. 119—129.
- Nikinmaa M., Huestis W. H. Adrenergic swelling in nucleated erythrocytes: cellular mechanisms in a bird, domestic goose and two teleosts, striped bass and rainbow trout // *J. Exp. Biol.* — 1984. — V. 113. — P. 215—224.
- Nikinmaa M., Tufts B. L., Regulation of acid and ion transfer across the membrane of nucleated erythrocytes // *Can. J. Zool.* — 1989. — V. 67. — P. 3039—3045.
- Raynard R. S., Cossins A. R. Homeoviscous adaptation and thermal compensation of sodium pump of trout erythrocytes // *Am. J. Physiol.* — 1991. — V. 260. — P. 916—924.
- Romano L., Passow H. Characterization of anion transport system in trout red blood cell // *Am. J. Physiol.* — 1984. — V. 246. — P. 330—338.
- Skulskii I. A., Glasunov V. V., Manninen V. Cadmium as a tool for studying calcium-dependent cation permeability of the human red blood cell membrane // *Gen. Physiol. and Biophys.* — 1991. — V. 10. — № 6. — P. 549 — 560.
- Teodore J., Robin E. D., Murdaugh H. V., Cross C. E. Cation transport and energy metabolism in the nucleated erythrocyte of dogfish shark *Squalus acanthias* // *Comp. Biochem. Physiol.* — 1972. — V. 42A. — P. 639—654.
- Tosteson D. C. Electrolyte composition and transport in red blood cells // *Fed. Proc.* — 1967. — V. 26. — P. 1805—1812.
- Verbost P. M., Flik G., Lock R. A. C. Cadmium inhibits plasma membrane calcium transport // *J. Membrane Biol.* — 1988. — V. 102. — №2. — P. 97—104.
- Verbost P. M., Kooij J. Van, Flik G., Lock R. A. C., Bonga S. E. W. The movement of cadmium through freshwater trout bronchial epithelium and its interference with calcium transport // *J. Exp. Biol.* — 1989. — V. 145. — P. 185—197.
- Zeidler R. B., Kim H. B. Effects of low electrolyte media on salt loss and hemolysis of mammalian red blood cells // *J. Cell Physiol.* — 1979. — V. 100. — P. 551—562.