



УДК [576.31+576.32/.36]:612.22:597.556.31

© 2011

В. Н. Новицкая, А. А. Солдатов, И. А. Парфенова

Функциональная морфология, сопряжение мембранных и метаболических функций у ядерных эритроцитов *Scorpaena porcus* P. в условиях экспериментальной гипоксии

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Г. Е. Шульманом)

В умовах експерименту досліджено вплив гіпоксії на морфологію і метаболізм ядерних еритроцитів скорпени (*Scorpaena porcus* P.). Риб утримували при концентрації кисню у воді 1,7–1,8 мг/л (20% насичення) і температурі $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 40 діб. Встановлено, що гіпоксія викликає свелінг у ядерних еритроцитів скорпени. Це приводить до зниження питомої поверхні клітин і їхніх ядер на тлі збалансованого зниження мембранних і метаболічних функцій. Активність Na^+ , K^+ -АТФази і гексокінази зменшується при збереженні рівня АТФ і балансу одновалентних катіонів (Na^+ , K^+) на мембрані клітин. Обговорюються механізми, що лежать в основі відзначених змін.

Зоны экстремальной гипоксии широко представлены в Мировом океане [1]. Их населяют организмы, для которых внешний дефицит кислорода является функциональной нормой. Установлено, что они имеют специфику в организации систем кислородного обеспечения и тканевого метаболизма [2, 3]. Особое внимание уделяется функционированию клеточных систем. Удобным объектом для изучения являются ядерные эритроциты морских рыб и моллюсков. У них обнаружены митохондрии, ферменты цикла Кребса [4], что делает их ближе к клеткам соматических тканей. Как показывают исследования, эти клеточные системы непосредственно вовлечены в адаптационные процессы и претерпевают выраженные морфофункциональные изменения в условиях внешней гипоксии [5, 6].

В настоящей работе приведены результаты изучения в условиях эксперимента *in vivo* влияния гипоксии на морфологические характеристики, особенности сопряжения мембранных и метаболических процессов в эритроцитах скорпены — одного из наиболее толерантных к дефициту кислорода видов черноморских рыб.

В исследовании использовали взрослых особей *Scorpaena porcus* P. (длина тела — 10,7–17,0 см, масса — 83,6–133,7 г) в состоянии относительного покоя (стадия зрелости гонад

II–III). При постановке экспериментов применяли специально изготовленный стенд, позволяющий длительно поддерживать заданную температуру и концентрацию кислорода в воде. Опытные группы рыб в количестве 3–4 особей помещали в камеру объемом 13,5 л. Содержание кислорода в воде снижали в течение 2,5–3,0 ч прокачиванием азота с 8,5–9,0 мг/л до 1,7–1,8 мг/л (20% насыщения). Температуру воды поддерживали на уровне $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$. Экспозиция — 40 сут. Контрольные группы рыб содержали при 100% насыщении воды кислородом. Смену воды в камерах проводили ежедневно для удаления остатков пищи и метаболитов. В момент изъятия особей из камеры применяли уретановый наркоз [7]. Кровь получали путем отсечения хвостового стебля. В качестве антикоагулянта использовали гепарин.

Концентрацию гемоглобина в крови контролировали при помощи гемиглобинцианидного метода. Число эритроцитов в крови подсчитывали в камере Горяева. Гематокрит определяли путем центрифугирования (750 г; 30 мин). На основании полученных значений рассчитывали эритроцитарные индексы: MCV , MCH , $MCHC$. Мазки крови окрашивали по комбинированному методу Паппенгейма. При помощи окуляр-микрометра на мазках измеряли большой и малый диаметры у зрелых эритроцитов и их ядер. Объем выборки — 100 клеток на один мазок. На основании полученных значений рассчитывали объем и площадь поверхности у отдельных клеток (V_c , S_c) и их ядер (V_n , S_n) [8]. Это позволило оценить также удельную поверхность этих структур — (S_c/V_c) и (S_n/V_n) соответственно, а также рассчитать величину ядерно-плазменного отношения (V_n/V_c).

Плазму отделяли от форменных элементов посредством центрифугирования (750 г, 30 мин). В ней определяли концентрацию Na^+ и K^+ . Эритроциты трижды отмывали от плазмы в изотонических растворах MgCl_2 . Полученную эритроцитарную массу лизировали двумя объемами охлажденного бидистиллята. Мембраны эритроцитов осаждали при 9000 г в течение 30 мин. Гемолизат использовали для определения внутриэритроцитарной концентрации Na^+ , K^+ , АТФ и активности гексокиназы (ГК). Фрагменты эритроцитарных мембран трижды отмывали от гемоглобина в среде следующего состава: 100 мМ NaCl , 20 мМ KCl , 3 мМ MgCl_2 , 10 мМ гистидина (рН 7,4), и использовали при определении активности Na^+ , K^+ -АТФазы. Все операции проводили при 4°C .

Концентрацию Na^+ и K^+ в плазме крови и гемолизатах определяли на пламенном фотометре ПАЖ-3 в смеси пропан–воздух. Содержание АТФ в эритроцитах оценивали химилюминисцентным методом с применением АТР-Luminometer (LKB-1250, Швеция).

Активность Na^+ , K^+ -АТФазы определяли по выделению неорганического фосфата (P_i). В качестве ингибитора Na^+ , K^+ -АТФазы применяли убаин. Освобожденный неорганический фосфат (P_i) в пробе определяли по методу Фиске–Суббароу. Активность ГК оценивали по сопряжению с реакцией катализируемой глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой.

Результаты представлены в виде $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$. Достоверность различий оценивали при помощи t -критерия Стьюдента.

Согласно полученным результатам, содержание особей скорпены при концентрации кислорода в воде 1,7–1,8 мг/л (20% насыщения) в течение 40 сут не оказывало существенного влияния на кислородную емкость крови данного вида. Концентрация гемоглобина и число эритроцитов в крови не претерпевали статистически значимых изменений (табл. 1). Гематокритная величина, напротив, увеличивалась на 38,3% ($p < 0,01$). Расчет эритроцитарных индексов показал, что MCV при этом повышался на 19,9% ($p < 0,05$), $MCHC$ снижался на 20,1% ($p < 0,001$), а MCH оставался на уровне контрольных значений. Такое соотношение процессов указывает на набухание (свеллинг) клеток красной крови.

Увеличение объема эритроцитов (V_c) в условиях гипоксии было отмечено и на основе цитометрических измерений (табл. 2). Оно составило 14,6% ($p < 0,05$). Одновременно отмечали тенденцию увеличения площади поверхности эритроцитов (S_c), однако она не была статистически выражена. Удельная поверхность клеток красной крови при этом уменьшалась на 3,9% ($p < 0,05$).

Случаи свеллинга клеток красной крови в условиях внешней гипоксии были описаны ранее для многих рыб [9, 10]. В основе данного явления лежит трансмембранный обмен Na^+/H^+ , который индуцируется повышением концентрации катехоламинов в крови [11]. Выход H^+ из клетки предотвращает значительное изменение рН эритроцита в условиях плазматического ацидоза, что способствует нормальному функционированию его молекулярных систем, прежде всего гемоглобина. Одновременно происходит поступление Na^+ в клетку, что повышает осмотическое давление и сопровождается оводнением эритроцита. По-видимому, эти процессы и определяли увеличение объема клеток красной крови у скорпены в условиях дефицита кислорода. Доказательством тому является тенденция роста содержания Na^+ в ее эритроцитах, отмеченная нами и количественно сопоставимая с увеличением объема клеток — 12,1% (табл. 3). Следует отметить, что гидратация цитоплазмы должна ухудшать диффузионные процессы и негативно влиять на течение обменных процессов в клетке.

Свеллинг клеток красной крови происходил на фоне роста объема их ядер (V_n) — 30,9% ($p < 0,05$) (см. табл. 2). Эти процессы были количественно сопоставимы, о чем свидетельствует отсутствие статистически значимых различий V_n/V_c между контрольной и опытной группами рыб. Площадь поверхности ядер (S_n) увеличивалась менее значительно — 20,7% ($p < 0,02$), что приводило к снижению удельной поверхности (S_n/V_n) данной структуры на 10,0% ($p < 0,02$).

АТФазная активность препаратов эритроцитарных мембран скорпены в условиях гипоксии снижалась (рис. 1). В сравнении с контролем при 15%-ном насыщении воды кисло-

Таблица 1. Гематологические характеристики и эритроцитные индексы скорпены в условиях нормо- и гипоксии, $n = 8$, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$

Показатель	Нормоксия	Гипоксия
Гемоглобин, г/л	$33,8 \pm 1,6$	$36,1 \pm 2,2$
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	$0,58 \pm 0,03$	$0,63 \pm 0,03$
Гематокрит, %	$14,4 \pm 0,8$	$19,2 \pm 1,6$
MCH , пг	$58,9 \pm 2,3$	$57,5 \pm 1,7$
$MCHC$, %	$23,6 \pm 0,4$	$19,2 \pm 0,7$
MCV , мкм^3	$250,7 \pm 12,7$	$307,4 \pm 17,5$

Таблица 2. Цитометрические характеристики циркулирующих эритроцитов скорпены в условиях нормо- и гипоксии, $n = 8$, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$

Показатель	Нормоксия	Гипоксия
S_c , мкм^2	$379,86 \pm 12,01$	$420,29 \pm 14,99$
V_c , мкм^3	$257,36 \pm 10,25$	$294,81 \pm 10,49$
S_c/V_c , мкм^{-1}	$1,480 \pm 0,019$	$1,422 \pm 0,013$
S_n , мкм^2	$56,96 \pm 3,59$	$68,73 \pm 2,23$
V_n , мкм^3	$39,84 \pm 3,88$	$52,17 \pm 2,61$
S_n/V_n , мкм^{-1}	$1,491 \pm 0,048$	$1,339 \pm 0,023$
V_c/V_n	$0,163 \pm 0,019$	$0,173 \pm 0,011$

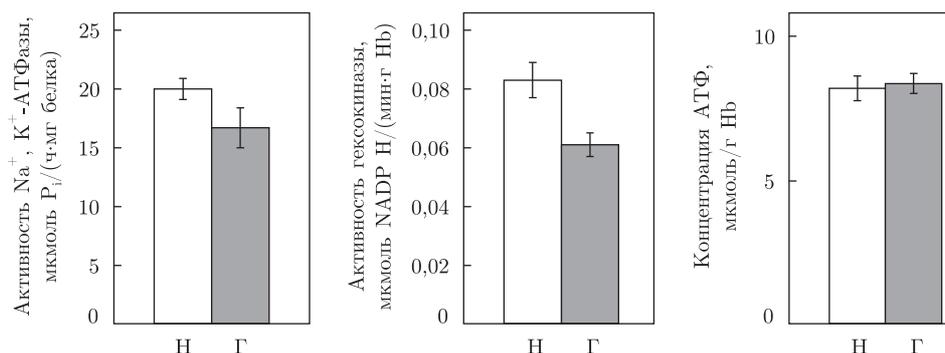


Рис. 1. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы, ГК и содержание АТФ в эритроцитах скорпены в условиях нормоксии (Н) и гипоксии (Г)

родом различия составили 29,6% ($p < 0,001$). На долю Na^+ , K^+ -АТФазы (уабаинзависимая компонента) приходилось 66,0% ($p < 0,001$) снижения. Остальное определялось падением активности АТФаз, нечувствительных к уабаину. Изменение ферментативной активности эритроцитарных мембран не оказывало значимого влияния на баланс одновалентных катионов в клетках красной крови (см. табл. 3). Концентрации Na^+ и K^+ во вне- и внутриклеточной среде оставались без изменений. Отношения $\text{Na}_b^+ / \text{Na}_c^+$ и $\text{K}_b^+ / \text{K}_c^+$ совпадали у контрольной и опытной групп рыб. Такое соотношение процессов указывает на снижение проницаемости эритроцитарных мембран.

Активность ГК в эритроцитах скорпены в условиях гипоксии снижалась на 26,5% ($p < 0,01$) (см. рис. 1). При этом концентрация АТФ не изменялась, оставаясь на уровне контрольных значений.

Известно, что ГК ограничивает скорость утилизации глюкозы в ядерных эритроцитах. В сравнении с другими ферментами гликолиза активность ее минимальна. Согласно данным [12], более 20% энергии ядерного эритроцита расходуется на поддержание трансмембранного градиента концентрации Na^+ и K^+ . Снижение проницаемости клеточных мембран, отмеченное нами, предполагает уменьшение энергоемкости процессов катионного обмена. В этом, по-видимому, следует усматривать основную причину подавления внутриклеточного метаболизма ядерных эритроцитов скорпены при низких концентрациях кислорода.

Сходные изменения были отмечены в условиях аноксии в нейронах головного мозга рептилий [12]. Предполагается, что переход к суббазальным скоростям метаболизма при действии экстремальных факторов: гипоксия, гипотермия и голод, достигается за счет со-

Таблица 3. Баланс одновалентных катионов на мембранах циркулирующих эритроцитов скорпены в условиях нормо- и гипоксии, $n = 7$, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$

Показатель	Нормоксия	Гипоксия
Na_b^+ , ммоль/л	$161,5 \pm 3,4$	$162,6 \pm 3,0$
K_b^+ , ммоль/л	$3,3 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,3$
Na_c^+ , ммоль/л	$20,6 \pm 1,0$	$23,1 \pm 1,4$
K_c^+ , ммоль/л	$99,8 \pm 3,1$	$103,9 \pm 3,5$
$\text{Na}_b^+ / \text{Na}_c^+$	$7,95 \pm 0,45$	$7,24 \pm 0,56$
$\text{K}_b^+ / \text{K}_c^+$	$0,034 \pm 0,005$	$0,033 \pm 0,003$

Примечание. Na_b^+ , K_b^+ — концентрация Na^+ и K^+ в плазме крови; Na_c^+ , K_c^+ — концентрация Na^+ и K^+ в эритроцитах.

кращения числа функционирующих ионных каналов [13]. Принципиальное значение имеет выявление механизма направленной коррекции плотности функционирующих ионных каналов. Установлено, что при гипоксии снижается реабсорбция воды в почках и жабрах гидробионтов [14]. Допускается, что это связано с низкой продукцией альдостерона и вазопрессина. Известно, что альдостерон индуцирует синтез белка в клетках, который участвует в активном транспорте Na^+ через эпителиальную мембрану. В связи с этим можно предположить, что гипоксия, ограничивая продукцию альдостерона, снижает и проницаемость клеточных мембран. Недавно установлено, что пусковым сигналом для перехода клеток к суббазальным скоростям метаболизма на основе уменьшения числа функционирующих ионных каналов является высвобождение аденозина [15].

Таким образом, гипоксия вызывает свеллинг у ядерных эритроцитов скорпены. Это приводит к снижению удельной поверхности клеток и их ядер на фоне сбалансированного угнетения мембранных и метаболических функций. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы и гексокиназы снижается при сохранении уровня АТФ и баланса одновалентных катионов (Na^+ , K^+) на мембране клеток.

1. Joyce S. The dead zones: oxygen-starved coastal waters // Environ. Health Perspect. – 2000. – **108**, No 3. – P. A120–A125.
2. Chew S. F., Gan J., Ip Y. K. Nitrogen metabolism and excretion in the swamp eel, *Monopterus albus*, during 6 or 40 days of estivation in mud // Physiol. Biochem. Zool. – 2005. – **78**, No 4. – P. 620–629.
3. Waarde A. Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production // Comp. Biochem. and Physiol. – 1988. – **91B**, No 2. – P. 207–228.
4. Phillips M. C. L., Moyes C. D., Tufts B. L. The effects of cell ageing on metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells // J. Exp. Biol. – 2000. – **203**, No 6. – P. 1039–1045.
5. Jensen F. B. Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O_2 and CO_2 transport (review) // Acta Physiol. Scand. – 2004. – **182**, No 3. – P. 215–227.
6. Солдатов А. А., Парфенова И. А., Новицкая В. Н. Содержание одновалентных катионов и АТФ в эритроцитах морских рыб при экспериментальной гипоксии // Укр. биохим. журн. – 2010. – **82**, № 2. – С. 36–41.
7. Солдатов А. А. Физиологические аспекты действия уретанового наркоза на организм морских рыб // Гидробиол. журн. – 2003. – **39**, № 1. – С. 51–63.
8. Hoachin D. N., Munn J. I., Parnell B. L. A method for the measurement of red cell dimensions and calculation of mean corpuscular volume and surface area // Blood. – 1958. – **13**. – P. 1185–1191.
9. Baldisserotto B., Chippari-Games A. R., Lopes N. P. et al. Ion fluxes and haematological parameters of two teleosts from the Rio Negro, Amazon exposed to hypoxia // Brazil. J. Biol. – 2008. – **68**, No 3. – P. 336–345.
10. Chapman C. A., Renshaw G. M. Hematological responses of the grey carpet shark (*Chiloscyllium punctatum*) and the epaulette shark (*Hemiscyllium ocellatum*) to anoxia and re-oxygenation // J. Exp. Zool. Part A. – 2009. – **311**, No 6. – P. 422–438.
11. Perry S. F., Thomas S. The effects of endogenous of exogenous catecholamines on blood respiratory status during acute hypoxia in rainbow trout // J. Comp. Physiol. – 1991. – **161B**. – P. 489–497.
12. Bickler P. E., Buck L. T. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability // Annu. Rev. Physiol. – 2007. – **69**. – P. 145–170.
13. Tufts B. L., Boutilier R. G. Interactions between ion exchange and metabolism in erythrocytes of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* // J. Exp. Biol. – 1991. – **231**. – P. 139–151.
14. Soulier P., Peyraud-Waitzenegger M., Peyraud C. Respiratory and cardiovascular effects of hypoxia in the european eel // Arch. Int. Physiol., Biochem. et Biophys. – 1991. – **99**, No 5. – P. 124–132.
15. Buck L. T. Adenosine as a signal for ion channel arrest in anoxia-tolerant organisms // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. – 2004. – **139**, No 3. – P. 401–414.

V. N. Novitskaja, A. A. Soldatov, I. A. Parfyonova

Functional morphology, coupling of membrane and metabolic functions in *Scorpaena porcus* P. nuclear erythrocytes under experimental hypoxia conditions

The effect of hypoxia on the morphology and the metabolism of Scorpaene porcus nuclear erythrocytes is investigated under experimental conditions. Fishes were kept under an oxygen concentration in water of 1.7–1.8 mg/l (20% of saturation) and temperature of 15 ± 1 °C during 40 days. It is shown that hypoxia caused the swelling of scorpion fish nuclear erythrocytes. This resulted in a decrease of specific surfaces of cells and their nuclei on the background of the balanced depression of membrane and metabolic functions. Activities of Na^+ , K^+ -ATPase and hexokinase decreased at the preservation of ATP level and balance of monovalent cations (Na^+ , K^+) on a membrane of cells. The mechanisms of marked changes are discussed.