



УДК 591.111.1:597.2/.5:612.22

А. Ю. Андреева, А. А. Солдатов

Влияние гипоксии на функциональное состояние ядерных эритроцитов морских рыб (эксперименты *in vitro*)

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

Исследовано функциональное состояние ядерных эритроцитов скорпены в условиях острой гипоксии в диапазоне концентраций кислорода 0,57–8,17 мг О₂/л (in vitro). Мембранные и метаболические функции красных клеток крови оценены по изменениям интенсивности флуоресценции родамина 123 (R123) и флуоресцеин диацетата (FDA). Показано, что острая гипоксия вызывает значительное возрастание флуоресценции обоих флуорохромов (R123 – 12–60%; FDA – 30–184%). В основе данной реакции лежит вероятное снижение проницаемости клеточной мембраны эритроцитов. Уменьшение количества функционирующих ионных каналов в красных клетках крови приводит к накоплению FDA в цитоплазме и снижению затрат энергии, необходимых на поддержание ионных градиентов, что отражается в усилении флуоресценции R123.

Гипоксия является широко распространенным явлением в водах Мирового океана, что определяется низкой скоростью диффузии кислорода в водной среде [1]. Особый интерес представляют организмы, постоянно обитающие в зонах кислородного экстремума. Состояние гипоксии для них является функциональной нормой и предполагает существенную реорганизацию метаболических процессов, направленную на оптимизацию энергетических затрат организма [2].

Особый интерес представляют реакции клеточных систем на гипоксию. Удобным модельным объектом являются ядерные эритроциты низших позвоночных и беспозвоночных. У них обнаружены митохондрии, ферменты цикла Кребса [3], что делает их функционально ближе к клеткам соматических тканей. Показано, что эритроциты костистых рыб в условиях дефицита кислорода способны к сбалансированному угнетению мембранных и метаболических функций [4], в них активизируются процессы субстратного фосфорилирования, при этом наблюдаются закономерные морфологические изменения клеток (свеллинг) [5].

При интегральной характеристике функционального состояния клеточных популяций особо эффективны методы проточной цитофлюорометрии, так как они позволяют работать с нативными клеточными системами. В оценке гипоксического эффекта на эритроци-

© А. Ю. Андреева, А. А. Солдатов, 2013

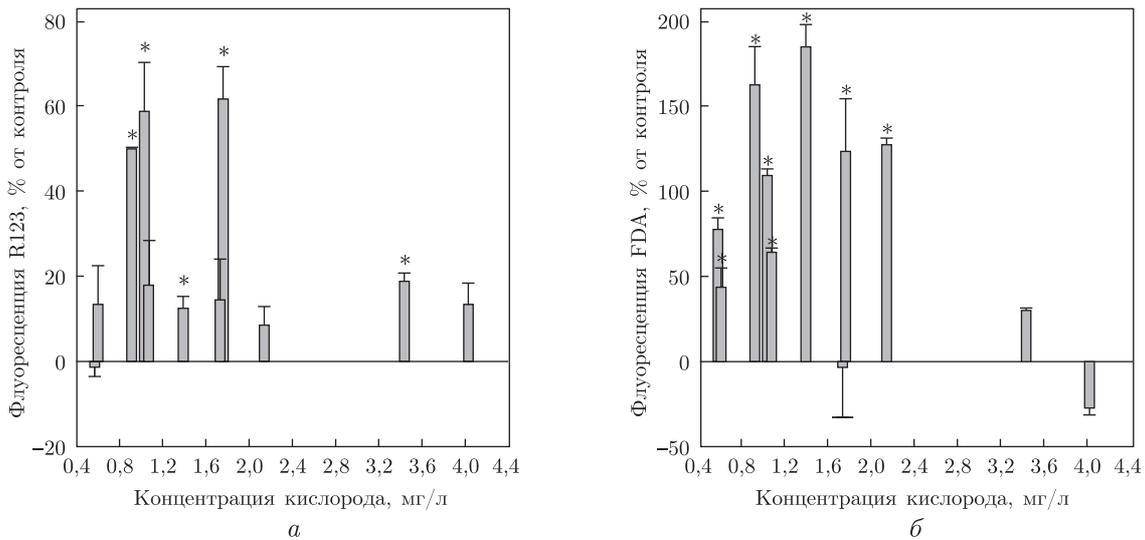


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции R123 и FDA суспензии эритроцитов скорпены в условиях гипоксии (*in vitro*, * — $p \leq 0,02$)

ты важно учитывать энергетический статус клеток, состояние их митохондрий и биомембран. В этом отношении удобны флуорохромы родамин 123 (R123) и флуоресцеин диацетат (FDA). Оба красителя имеют липофильную природу, благодаря чему свободно проходят через поляризованные мембраны [6, 7].

Цель исследования состояла в изучении функционального состояния взвесей ядерных эритроцитов морских рыб в условиях дозированной гипоксии (эксперименты *in vitro*) с применением флуоресцентных зондов R123 и FDA.

Объектом исследования являлись клетки красной крови толерантного к дефициту кислорода *Scorpaena porcus* L. Кровь получали из хвостовой артерии путем отсечения хвостового стебля. Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования при 1000 g в течение 15 мин и трижды отмывали в эквивалентном объеме среды: 128 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1,5 mM MgCl₂, 15 mM Трис, 2,2 mM D-глюкозы (pH 7,8) [8].

Гипоксические условия создавали путем барботажа инкубационной среды газообразным азотом в течение 15–120 с. Исследовали концентрационный диапазон 0,57–8,17 мг O₂/л: Инкубация эритроцитов в гипоксической среде составляла 4 ч при 14–16 °С.

По окончании экспозиции эритроциты окрашивали витальными красителями FDA и R123 (“Molecular Probes”, США). Окраску проводили в течение 10 мин. Концентрация R123 в растворе составляла 2,5 мкл/мл, FDA — мкл/мл. Измерения интенсивности флуоресценции эритроцитов проводили на проточном цитометре Cytomics FC500 (“Beckman Coulter”, США), оборудованном однофазным аргоновым лазером (длина волны 488 нм).

Анализ цитограмм проводили в программе Flowing Software 2.0. Интенсивность флуоресценции оценивали на двухпараметрических цитограммах (канал FL1 в зеленой области спектра, 525 нм) по смещению максимума распределения данных. Нормальность распределений данных проверяли по критерию Пирсона. Достоверность отличий оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента ($p \leq 0,05$). Результаты представлены в виде $M \pm m$.

В условиях гипоксии отмечали рост интенсивности флуоресценции R123 (рис. 1, а). В пяти случаях (при 0,91, 1,07, 1,76, 3,33, 3,44 мг O₂/л) изменения были статистически

значимы и составляли 12–60% ($p \leq 0,05$). В остальных вариантах постановки эксперимента увеличение носило характер тенденции и не превышало 18%.

Известно, что перемещение и распределение R123 происходит в соответствии с потенциалом Нернста [6], что объясняет зависимость интенсивности флуоресценции красителя от степени поляризации мембран клеток. В большинстве исследований отмечается, что гипоксия ограничивает включение R123 в клеточные системы [9], что связывают со снижением мембранного потенциала митохондрий вследствие уменьшения активности их дыхательной цепи [10]. Увеличение интенсивности свечения клеточных взвесей, меченных R123, в условиях гипоксии, полученное в проведенном нами исследовании, ранее не отмечалось.

Наиболее вероятной причиной роста интенсивности флуоресценции R123 во взвесах эритроцитов в условиях гипоксии представляется уменьшение проницаемости цитоплазматических мембран клеток (явление “метаболического ареста”) [11]. Это выражается в ограничении числа функционирующих ионных каналов на основе их конформационных перестроек. Данная реакция характерна для организмов, толерантных к экстремальным условиям среды (гипоксия, гипотермия) [11]. Она позволяет снизить энергетические траты клеток на поддержание трансмембранных ионных градиентов и уменьшить тем самым функциональную нагрузку на митохондрии.

Не следует исключать из внимания и другие процессы. Рост интенсивности свечения R123 может являться следствием начальных этапов развития реакции эритроцитов на гипоксию, а именно: синтеза факторов транскрипции адаптивных генов (HIF) и перехода клетки на анаэробный метаболизм. Это допущение вполне вероятно, поскольку известно, что экспрессия кислородного сенсора HIF-1 α в клетках происходит в течение нескольких часов после снижения содержания кислорода в среде [12], что соизмеримо с временными масштабами наших экспериментов.

Интенсивность флуоресценции эритроцитарных взвесей, меченных FDA, в условиях экспериментальной гипоксии, также возрастала (см. рис. 1, б). В 9 из 11 вариантов постановки эксперимента они повышались на 27–184% ($p \leq 0,02$). За этой реакцией может стоять следующая совокупность процессов:

- увеличение активности клеточных эстераз;
- рост величины рН внутриклеточной среды;
- изменение проницаемости цитоплазматических мембран.

Поскольку перевод красителя в светящуюся форму осуществляется эстеразами [13], то интенсивность флуоресценции FDA может свидетельствовать об изменениях активности комплекса ферментов липидного обмена. Поэтому рост флуоресценции красителя часто связывают с увеличением общей интенсивности метаболизма в клетках [14]. Подобная трактовка может быть принята для объяснения наблюдаемых нами эффектов, поскольку направленность изменения интенсивности свечения эритроцитарных взвесей, меченных R123 и FDA, в условиях гипоксии совпадает. Однако между этими процессами отсутствует какая-либо связь. Величина коэффициента детерминации (R^2) не превышала 0,15. Это означает, что интенсивность свечения R123 и FDA отражает совокупность самостоятельных процессов, реализуемых в клетках красной крови в условиях дефицита кислорода.

Маловероятно также и то, что в условиях экспериментальной гипоксии рост величины рН цитоплазмы эритроцитов вносил существенный вклад в изменения интенсивности флуоресценции FDA эритроцитарных взвесей. Общеизвестно, что усиление анаэробных процессов в клетке приводит к накоплению лактата и развитию локального ацидоза, что исключает увеличение значений рН [15].

Более вероятной причиной роста интенсивности флуоресценции FDA во взвесах эритроцитов в условиях гипоксии представляется уменьшение проницаемости цитоплазматической мембраны клетки, которое обсуждалось ранее в отношении R123. Известно, что полярная флуоресцирующая форма FDA, образующаяся в клетке, неспособна быстро проходить через ее внешнюю мембрану и в случае ограничения ее проницаемости краситель должен накапливаться в клетках [13].

Таким образом, экспериментальная гипоксия в условиях *in vitro* существенно индуцирует рост интенсивности флуоресценции R123 и FDA в эритроцитарных взвесах скорпены. В основе данного явления, по-видимому, лежит процесс снижения числа функционирующих ионных каналов на уровне цитоплазматической мембраны клеток. Оно способствует задержке полярной флуоресцирующей формы FDA в цитоплазме и одновременно снижает энергетические траты на поддержание трансмембранных катионных градиентов. Последнее находит отражение в увеличении мембранного потенциала митохондрий, на что указывает рост флуоресценции R123 эритроцитарных взвесей.

1. Middelburg J. J., Levin L. A. Coastal hypoxia and sediment biogeochemistry // Biogeosciences. – 2009. – **6**. – P. 1273–1293.
2. Gewin V. Oceanography: Dead in the water // Nature. – 2010. – **466**. – P. 812–814.
3. 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.
4. Новицкая В. Н., Солдатов А. А., Парфенова И. А. Функциональная морфология, сопряжение мембранных и метаболических функций у ядерных эритроцитов *Scorpaena porcus* L. в условиях экспериментальной гипоксии // Доп. НАН України. – 2011. – № 10. – С. 131–136.
5. Cossins A. R., Gibson J. S. Volume-sensitive transport systems and volume homeostasis invertebrate red blood cells // J. Exp. Biol. – 1997. – **200**. – P. 343–352.
6. Toescu E. C., Verkhatsky A. Assessment of mitochondrial polarization status in living cells based on analysis of the spatial heterogeneity of rhodamine 123 fluorescence staining // Eur. J. Physiol. – 2000. – **440**. – P. 941–947.
7. Jochem F. J. Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with Fluorescein diacetate // Mar. Biol. – 1999. – **135**. – P. 721–728.
8. Tiihonen K., Nikinmaa M. Short communication substrate utilization by carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes // J. Exp. Biol. – 1991. – **161**. – P. 509–514.
9. Wang T., Zhang Z. X., Xu Y. J. Effect of mitochondrial KATP channel on voltage-gated K⁺ channel in 24 hour-hypoxic human pulmonary artery smooth muscle cells // Chinese Med. J-Peking. – 2005. – **118**, No 1. – P. 12–19.
10. Weinberg J. M., Venkatachalam M. A., Roeser N. F. et al. Mitochondrial dysfunction during hypoxia and reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – **97**, No 6. – P. 2826–2831.
11. Hochachka P. Defence strategies against hypoxia and hypothermia // Science. – 1986. – **231**. – P. 324–341.
12. Rus A., Del Moral M. L., Molina F. et al. Upregulation of cardiac NO/NOS system during short-term hypoxia and the subsequent reoxygenation period // Eur. J. Histochem. – 2011. – **55**, No 2. – P. 91–96.
13. Prosperi E. Intracellular turnover of Fluorescein diacetate. Influence of membrane ionic gradients on Fluorescein efflux // Histochem. J. – 1990. – **22**. – P. 227–233.
14. Heslop-Harrison J., Heslop-Harrison Y. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate // Stain Technol. – 1970. – **45**, No 3. – P. 115–120.
15. Baldisserotto B., Chippari-Gomes A. R., Lopes N. P. et al. Ion fluxes and hematological parameters of two teleosts from the Rio Negro, Amazon, exposed to hypoxia // Braz. J. Biol. – 2008. – **68**, No 3. – P. 571–575.

О. Ю. Андреева, О. О. Солдатов

Вплив гіпоксії на функціональний стан ядерних еритроцитів морських риб (експерименти *in vitro*)

Досліджено функціональний стан ядерних еритроцитів скорпени в умовах гострої гіпоксії в діапазоні концентрацій кисню 0,57–8,17 мг O₂/л (*in vitro*). Мембранні та метаболічні функції червоних клітин крові оцінено за змінами інтенсивності флуоресценції родаміну 123 (R123) і флуоресцеїн діацетату (FDA). Показано, що гостра гіпоксія викликає значне зростання флуоресценції обох флуорохромів (R123 – 12–60%; FDA – 30–184%). В основі даної реакції лежить ймовірне зниження проникності клітинної мембрани еритроцитів. Зменшення кількості функціонуючих іонних каналів у червоних клітинах крові спричинює накопичення FDA в цитоплазмі і зниження витрат енергії, необхідних на підтримку іонних градієнтів, що виявляється в посиленні флуоресценції R123.

O. Yu. Andriieva, A. A. Soldatov

The influence of hypoxia on the functional state of nucleated erythrocytes in marine fish (*in vitro* experiments)

This paper investigates the functional state of scorpaena red blood cells under acute hypoxia between 0.57–8.17 mg O₂/l (*in vitro*) and also incorporates an evaluation of the intensity of Rhodamine 123 (R123) and Fluorescein diacetate (FDA). Acute hypoxia induced a significant increase in the fluorescence of both fluorochromes (R123 – 12–60%; FDA – 30–184%). This reaction is based on a probable decrease in erythrocyte membrane permeability. The reduction of functional ionic channels in red blood cells delays FDA in the cytoplasm and lowers the energy costs required for transmembrane cationic gradient maintenance, which reflects an intensification of R123 fluorescence.