

На правах рукописи

Андреева Александра Юрьевна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭРИТРОЦИТОВ
SCORPAENA PORCUS L. В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ
(ЭКСПЕРИМЕНТЫ *IN VITRO*)**

Специальность 03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание научной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2014

Работа выполнена в отделе физиологии животных и биохимии Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского (г.Севастополь)

Научный руководитель: **Солдатов Александр Александрович**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Маслова Марина Николаевна**
доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки Института эволюционной физиологии и
биохимии им. И.М.Сеченова Российской
академии наук

Марахова Ирина Ильинична
доктор биологических наук, главный научный
сотрудник Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
цитологии Российской академии наук

Ведущая организация: Институт биологии внутренних вод
им. И.Д. Папанина Российской академии
наук (ИБВВ РАН)

Защита диссертации состоится «11» ноября 2014 года в 11 часов на заседании Диссертационного совета Д.002.127.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук по адресу: 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИЭФБ РАН (Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44) и на сайте <http://www.iephb.ru>.

Автореферат разослан « » 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Р.Г.Парнова

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Гипоксические акватории широко представлены в шельфовой зоне Мирового океана (oxygen-minimum zones) (Levin, 2002; Middelburg, Levin, 2009; Gewin, 2010). Основными причинами их формирования являются низкая скорость диффузии кислорода в воде и ограничение процессов водообмена (Duncombe-Rae, 2000; Joyce, 2000). Особый интерес для изучения представляют организмы, образующие здесь устойчивые экосистемы, общим свойством для всех трофических уровней которых является толерантность к экстремальным (концентрация кислорода менее 1 мг л^{-1}) формам гипоксии (Fenchel, Finlay, 1995; Levin, 2002; 2010; Stoeck et al., 2003; El Albani et al., 2010; Danovaro et al., 2010).

Известно, что кислород выполняет функцию акцептора электронов в дыхательной цепи митохондрий клеток и тем самым определяет энергетический статус клеток, тканей и организма в целом. Поэтому основное внимание исследователей при изучении толерантных к гипоксии форм жизни сосредоточено на биоэнергетических процессах. Установлено, что у гидробионтов, обитающих в зонах кислородного экстремума, наблюдается существенная реорганизация метаболических процессов, направленная на оптимизацию энергетических трат организма (Nochachka, Somero, 2002; Gewin, 2010). В тканях повышается содержание аланина и сукцината, как конечных продуктов, что не свойственно аэробному обмену (Waarde, 1988), усиливается продукция NH_4^+ (Shulman, Love, 1999; Chew, Gan, 2005), растет активность аланин- и аспартатаминотрансфераз (Owen, Nochachka, 1974), активизируются процессы переаминирования аминокислот (глутамата, аланина) (Mommensen et al., 1980). Показано также, что ферментативные системы цикла Кребса могут быть задействованы в анаэробных процессах генерации энергии (Waarde, 1988), а дыхательная цепь митохондрий клеток приобретает некомпенсированный тип организации (Савина, 1992; Soldatov, Savina, 2008).

Определенные закономерности выявлены и на уровне клеточных систем. Установлено, что эритроциты толерантных к гипоксии рыб в условиях дефицита кислорода способны к сбалансированному угнетению мембранных и метаболических функций (Новицкая и др., 2011), при этом наблюдаются характерные морфологические изменения клеток и повышается их деформируемость (Gilles, Motais, 1989). В большинстве работ констатируется факт роста клеточного объема (swelling) (Cossins, Gibson, 1997; Jensen, 2004; Wells, 2009). Процесс контролируется катехоламинами (преимущественно норадреналином) (Tetens et al., 1988; Perry et al., 1999), взаимодействующими с поверхностными β -адренорецепторами эритроцитов

(Reid, Perry, 1995; Jahns et al., 1996) и активирующими Na^+/H^+ и $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ – антипорты клеток (Wood, Simmons, 1994; Jensen, 2004). Действие катехоламинов опосредуется через cAMP (Gilles, Motais, 1989). Общее назначение процесса – контроль величины внутриклеточной pH и параметров сродства гемоглобина к кислороду. Считается, что эта последовательность реакций имеет адаптивное значение и может быть реализована только на системном уровне. Однако подобные реакции клеточных систем установлены и для организмов-конформеров (Солдатов и др., 2012; Новицкая, Солдатов, 2011). При этом известно, в условиях внешнего экстремума они допускают значительные изменения параметров внутренней среды, но имеют весьма эффективные механизмы автономного контроля клеточного гомеостаза. Такая стратегия позволяет им выдерживать условия аноксии на протяжении многих месяцев (Vaquer-Sunyer, Duarte, 2008). Сохраняют ли подобные реликтовые механизмы при адаптации к гипоксии и аноксии организмы-регуляторы, не ясно. Проверить это можно только в условиях *in vitro*, чему и посвящена настоящая работа.

В качестве объекта исследования выбраны ядерные эритроциты толерантного к гипоксии морского вида донной рыбы *Scorpaena porcus* L., Этот тип клеток используется как модель во многих экспериментальных работах (Phillips et al., 2000). Они обладают развитыми системами переноса органических и неорганических ионов через клеточную мембрану, что позволяет осуществлять адаптивную регуляцию объема клетки (Cossins, Gibson, 1997). У них обнаружены митохондрии, ферменты цикла Кребса (Boutilier, Ferguson, 1989; Phillips et al., 2000), что делает их функционально ближе к клеткам соматических тканей.

Цель и задачи исследования. Цель работы – исследовать влияние гипоксии (в условиях *in vitro*) на ядерные эритроциты *Scorpaena porcus* L. при помощи методов функциональной морфологии и проточной цитометрии.

Задачи исследования:

- Разработать метод прижизненной морфометрии клеток красной крови для низших позвоночных.
- Оценить в условиях *in vitro* влияние ранжированной гипоксии на морфометрические характеристики эритроцитов *Scorpaena porcus* L.
- Изучить в условиях эксперимента влияние дефицита кислорода на функциональную активность клеточных ядер эритроцитов по интенсивности флуоресценции SYBR Green I.
- Исследовать влияние гипоксии на изменение потенциала митохондрий эритроцитов при помощи флуорохрома родамина 123 (R123).

- Оценить состояние мембран эритроцитов в условиях экспериментальной гипоксии по включению витальных красителей пропидиум йодида (PI) и диацетата флуоресцеина (FDA).

Объект исследования – ядерные эритроциты *Scorpaena porcus* L.

Предмет исследования – морфометрические показатели ядерных эритроцитов, функциональное состояние ядер эритроцитов, клеточной мембраны, изменения мембранного потенциала митохондрий.

Методы исследования. Методы световой и люминесцентной микроскопии для проведения микрофотосъемки суспензии ядерных эритроцитов. Гематологические методы. Цитофлюориметрические методы для определения мембранного потенциала митохондрий, функциональной активности ядер эритроцитов, а также состояния клеточной мембраны красных клеток крови. Статистические методы анализа цифровой информации.

Научная новизна результатов. Впервые установлено, что экстремально низкие (менее $1,76 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) концентрации кислорода повышают степень поляризации внутренней мембраны митохондрий клеток, о чем свидетельствует увеличение интенсивности флуоресценции родамина (R123). Это является следствием ограничения процессов трансмембранного обмена, что отражает задержка полярной флуоресцирующей формы FDA в цитоплазме клетки в условиях гипоксии.

Определена последовательность изменений морфофункциональных характеристик ядерных эритроцитов скорпены при снижении концентрации кислорода в инкубационной среде в диапазоне $0,57\text{-}4,03 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$. Вначале наблюдается уменьшение объема, рост удельной поверхности клетки и снижение толщины ее диффузионного слоя. Затем (менее $1,73 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) процессы приобретают противоположную направленность. Изменение формы эритроцита происходит за счет всех его линейных параметров: толщины, большой и малой осей клетки. При этом в условиях низкой концентрации кислорода преобладает рост малой оси, что придает клетке более округлую форму.

Впервые показано, что экстремальные формы гипоксии (менее $1,76 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) индуцируют рост функциональной активности ядер эритроцитов. Это нашло отражение в увеличении объема данной структуры и повышении интенсивности свечения красителя SYBR Green I ассоциированного с хроматином ($R^2 - 0,810$).

Установлено, что гипоксия не оказывает влияния на жизнеспособность и целостность мембран ядерных эритроцитов скорпены. Интенсивность флуоресценции FDA эритроцитарных взвесей растет, а пропидиум йодида (PI) – сохраняется на уровне контрольных значений.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведение исследований с применением методов проточной цитометрии, которые широко используются для определения размеров клеток, показало, что изменение значений прямого и бокового рассеяния для неокрашенных взвесей ядерных эритроцитов не позволяют дать адекватную оценку морфологических и функциональных реакций клеток; изменения этих показателей не подтверждаются данными световой микроскопии.

При проведении работы был разработан метод прижизненной морфометрии ядерных эритроцитов низших позвоночных (патент Украины-Андреева А.Ю., Муханов В.С. «Спосіб вимірювання морфометричних показників інтактних ядерних еритроцитів риб» (№ а201309689 от 05.08.2013). Он позволяет ускорить процесс проведения морфометрического анализа клеток, снизить аппаратную погрешность измерений а также регистрировать линейные размеры не только клеток (длину, ширины, толщину), но и их ядер. Последнее достигается применением витальных красителей (SYBR Green I).

Теоретические положения и прикладные аспекты диссертации могут быть использованы при работе в области рыбоводства.

Результаты исследований применимы при подготовке лекционных курсов по клеточной физиологии и биохимии животных для студентов биологических специальностей высших учебных заведений.

Положения, выносимые на защиту

- Эритроциты толерантного к гипоксии вида *Scorpaena porcus* L. сохраняют в условиях *in vitro* способность к направленной волюмрегуляции и адаптивному изменению удельной поверхности клетки.
- Экстремальные формы гипоксии (менее 1,76 мгО₂ л⁻¹) индуцируют рост объема и функциональной активности ядерных структур эритроцитов условиях *in vitro*.

Гипоксия повышает степень поляризации внутренней мембраны митохондрий ядерных эритроцитов, что является следствием ограничения процессов трансмембранного обмена на уровне цитоплазматической мембраны клетки.

Апробация результатов исследования. Результаты исследований, включенные в диссертационную работу, были представлены на следующих научных форумах: 4th International Symposium “Crossroads in biology” (Cologne, Germany, 2012); 10th International congress on the biology of fish, (Madison, USA, 2012); X Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Шевченковская весна 2012»: биологические науки (Киев, Украина, 2012), VIII Международная научно-техническая конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии БФФХ-2012»

(Севастополь, Украина, 2012); Международная конференция «Современные проблемы гидроэкологии. Перспективы, пути и методы исследований» (Херсон, Украина, 2012); V Международная научно-практическая конференция «Сучасні проблеми теоретичної і практичної іхтіології» (Черновцы, Украина, 2012); VIII Всероссийская конференция с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, Россия, 2012), II Международная научная конференция «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Днепропетровск, Украина, 2013); VIII Международная научно-практическая конференция молодых ученых «Понт Эвксинский», (Севастополь, Украина, 2013).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 научных работ. Основные результаты изложены в 6 статьях, 1 патенте и 9 материалах отечественных и международных научных конференций. 2 статьи опубликованы в периодических научных изданиях, входящих в профессиональный перечень, рекомендованных ВАК РФ для размещения материалов кандидатских диссертаций. Три статьи входят в наукометрическую базу данных Scopus.

В статьях, опубликованных в соавторстве, соискателю принадлежат: проведение экспериментальных исследований, лабораторная обработка проб, статистический анализ полученных результатов, совместная подготовка текстов статей. Права соавторов публикаций не нарушены.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 6-ти разделов, заключения, выводов списка использованных источников. Работа изложена на 162 страницах, содержит 6 таблиц и 53 рисунка. Список литературы включает 263 источника, из них - 248 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю, доктору биологических наук А. А. Солдатову, за всестороннюю помощь в процессе работы над рукописью, искреннюю признательность сотрудникам отдела физиологии животных и биохимии, кандидату биологических наук Л. С. Светличному за помощь в подборе аппаратуры для экспериментальной работы, а также кандидату биологических наук В. С. Муханову за методическую помощь, ценные рекомендации и консультации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований. Работа выполнена в ИнБЮМ НАН Украины в течение 2009-2012 г.г. В качестве донора циркулирующей эритроцитарной массы использовали донный морской

вид *Scorpaena porcus* L. Рыбу отлавливали в мае-июне ставным неводом в бухте Казачьей (р-н Севастополя, Крым). Для проведения эксперимента использовали взрослых особей (длина тела: 10,7-17,0 см, вес: 83,6-133,7 г) в состоянии относительного покоя (стадия зрелости гонад II – III). Продолжительность адаптации к лабораторным условиям составляла 14 дней.

Кровь получали из хвостовой артерии путем отсечения хвостового стебля. Перед приготовлением эритроцитарных взвесей, которые использовали в эксперименте, полученные образцы крови исследовали на наличие клеточных аномалий.

Морфологические исследования выполнены на мазках крови. Их окрашивали по комбинированному методу Паппенгейма (Золотницкая, 1987). На мазках подсчитывали процентное содержание аномальных клеток и незрелых эритроидных форм. В работе применяли светооптический микроскоп «Биолар» (Польша). О функциональных характеристиках клеток судили по эритроцитарным индексам: среднеклеточный объем (*MCV*), среднеклеточное содержание (*MCH*) и среднеклеточную концентрацию гемоглобина (*MCHC*) (Золотницкая, 1987). Для этого предварительно определяли концентрацию гемоглобина, число эритроцитов и гематокритную величину (Золотницкая, 1987).

Для приготовления эритроцитарной взвеси, используемой в эксперименте, красные клетки крови трижды отмывали от плазмы с применением центрифугирования образцов при 1000 g в течение 15 мин. В работе использовали центрифугу MPW-310 (Польша). Клетки ресуспензировали в инкубационной среде (pH 7,8) (Tiihonen, Nikinmaa, 1991), предварительно стерилизованной при 95°C в течение 3 часов. После последнего отмывания осевшую эритроцитарную массу использовали при проведении экспериментов *in vitro*.

Гипоксические условия создавали барботажем инкубационной среды газообразным азотом в течение 15-120 с непосредственно перед внесением ее в вакуумные пробирки. Контроль за концентрацией кислорода осуществляли потенциометрически (Svetlichny, Hubareva, 2005). Эритроцитарную массу в количестве 0,15 мл помещали в пластиковые вакуумные пробирки «VACUETTE»TM (объем 6,0 мл) и затем заполняли их инкубационной средой с заданной концентрацией кислорода под крышку, избегая появления пузырьков воздуха. Аналогичным образом готовилась контрольная пробирка, где поддерживалась концентрация кислорода 7,5-8,0 мг O₂ л⁻¹. Экспозиция – 4 часа. Температура – 15,0±0,5°C.

После окончания времени экспозиции параллельно осуществлялось измерение трех групп показателей: размерных характеристик эритроцитов, интенсивности флуоресценции суспензии клеток, окрашенных витальными красителями, а также величины рассеяния неокрашенных проб.

Все измерения цитометрических показателей эритроцитов проводились на проточном цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США), оборудованном однофазным аргоновым лазером (длина волны 488 нм).

Для определения размеров и степени гранулярности эритроцитов изучали прямое (FS) и боковое рассеяние (SS) неокрашенных проб. Долю поврежденных эритроцитов в суспензии при гипоксии анализировали, используя краситель пропидиум йодид (PI). Окрашивание суспензии эритроцитов проводили в течение 20 мин. Изменения потенциала митохондрий в эритроцитах контролировали путем измерения интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных красителем родамин 123 (R123). Время окрашивания эритроцитов R123 составляло 10 минут. Для оценки общей метаболической активности и изменений проницаемости клеточной мембраны эритроцитов применяли диацетат флуоресцеина (FDA). Окраску суспензии эритроцитов проводили при комнатной температуре в темноте в течение 10 мин. Оценка изменений состояний ДНК проводилась при помощи витального красителя SYBR Green I. Время окрашивания суспензии клеток составляло 20 мин непосредственно перед измерением флуоресценции.

Морфометрический анализ ядерных эритроцитов осуществляли с применением метода прижизненной морфометрии ядерных эритроцитов рыб, разработанным в ходе выполнения диссертационной работы (подробности см. раздел 3). При проведении анализа использовали лабораторный инвертированный микроскоп для светлого поля и флуоресценции Nikon Eclipse TS100, оборудованный камерой Ikegami ICD-848P.

Линейные размеры клеток крови определяли по фотографиям в компьютерной программе ImageJ 1.44p (Girish, Vijayalakshmi, 2004). Измеряли следующие характеристики: длина большой и малой оси клетки (C_1 и C_2 соответственно), длина большой и малой оси ядра (N_1 и N_2 соответственно). На основании полученных результатов рассчитывали ряд морфофункциональных характеристик клеток красной крови: показатель формы клетки (MS), объем клетки (V_c) с учетом объема ядра (V_n) (Ташкэ, 1980; Houchin et al., 1958), площадь поверхности клетки (S_c) (Ташкэ, 1980) и ее ядра (S_n) (Houchin et al.,

1958), величину ядерно-плазматического отношения (NCR), удельную поверхность эритроцитов (SS_c) и их ядер (SS_n).

Статистическая обработка цифровых массивов и графическое представление результатов исследований выполнено в программе Grapher 7.0. Нормальность распределения цифровых массивов проверяли, используя критерий Пирсона. Достоверность отличий оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$. Корреляционный анализ проб проводился путем расчета коэффициента детерминации R^2 и определения параметров уравнений регрессии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метод прижизненной цитоморфометрии ядерных эритроцитов рыб. В настоящей работе разработан метод прижизненной морфометрии ядерных эритроцитов. Он позволяет регистрировать линейные размеры нативных клеток (длину, ширины, толщину) и их ядер. Последнее достигается применением витальных красителей. Для идентификации ядер эритроцитов был использован витальный краситель SYBR Green I (Molecular Probes, США). В виду ограниченного числа данных о процедуре окрашивания ядер клеток этим красителем, концентрация его подбиралась экспериментально. Оптимальное разведение флуорохрома составило 10000 раз. Окрашивание клеточных взвесей проводилось в течение 20 минут.

Затем на предметное стекло наносилась капля взвеси, и после оседания клеток проводили их фотографирование. В работе использовали лабораторный инвертированный микроскоп для светлого поля и флуоресценции Nikon Eclipse TS100, оборудованный камерой Ikegami ICD-848P. Применяли световой и люминесцентный режимы работы. В последнем случае использовали набор светофильтров для возбуждения SYBR Green I в синей области спектра.

Съемка проводилась в двух вариантах: на освещенном и затемненном полях микроскопа. При освещении поля микроскопа наблюдались клетки, а при затемнении – ядра. Дальнейшая обработка фотографий велась в графическом редакторе Adobe® Photoshop® CS3 EXTENDED, Version 10.0. Фотографии совмещались путем наложения темного снимка на светлый, и установкой прозрачности верхнего слоя 20-40 %. Таким образом, были получены изображения эритроцитов с флуоресцирующими ядрами (рис. 1).

Полученная фотография позволяет измерить длину большой и малой оси клетки и ее ядра, а также, если клетка расположена торцом,

определить и третью величину – толщину эритроцита (рис. 1Б), что нельзя сделать на фиксированных препаратах.

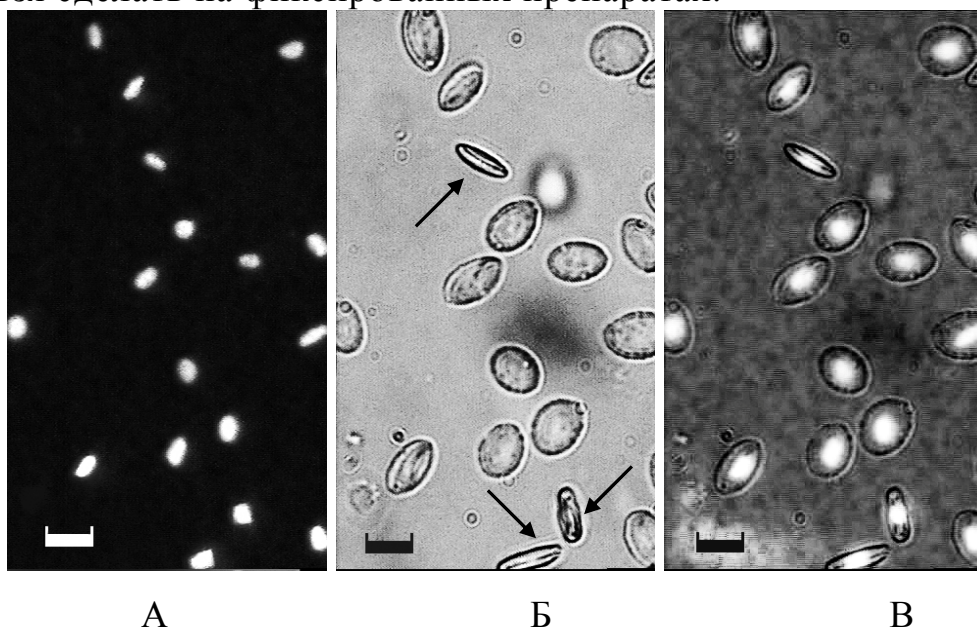


Рис. 1. Микрофотографии ядерных эритроцитов *S. porcus* в толстой капле (А – люминесцентный режим; Б – световой режим; В – совмещенный снимок; стрелками указаны клетки, расположенные торцом; размер линейки составляет 10 мкм).

В настоящей работе использована программа ImageJ 1.44р (Girish, Vijayalakshmi A., 2004).

Сравнение линейных размеров ядерных эритроцитов скорпены, полученных предложенным методом, с данными, измеренными на фиксированных мазках (Новицкая, Парфенова 2010) выявили различия между значениями ($p \leq 0,02$). Размеры клеток на микрофотографиях был больше на 7,2-12,0 %, а для ядер – на 9,4-20,0 % при уровне значимости. Обнаруженные отличия, скорее всего, связаны с дегидратацией цитоплазмы эритроцита в момент изготовления мазка крови, так как клетка подвергается воздействию фиксирующих соединений. Разница достаточно велика. Это означает, что работа с нативными клеточными взвесями позволяет с большей вероятностью обнаруживать реакцию клеток (изменение объема и формы) в ответ на те или иные экспериментальные или естественные воздействия.

Морфометрические характеристики эритроцитов в условиях экспериментальной гипоксии. Ранжированная гипоксия вызывала изменение всех линейных размеров эритроцитов (толщины (h), большой (C_1) и малой (C_2) осей клетки). При этом в условиях умеренного дефицита кислорода (1,76-4,03 мгО₂ л⁻¹) наблюдалось уменьшение значений C_1 , C_2 , и h ($p < 0,05$). При дальнейшем снижении концентрации кислорода (0,57-1,73 мгО₂ л⁻¹), напротив, в большинстве экспериментальных серий происходил адекватный рост геометрических размеров эритроцитов ($p < 0,05$). Следует отметить, что относительно контрольного уровня значения h и C_1 при экстремально низких концентрациях кислорода увеличивались на 1-3 %. При этом рост величин C_2 был более выражен и составлял 2-6 %. Это

означает, что данная линейная характеристика вносила больший вклад в изменение размеров и как следствие формы клетки.

Определение величины MS (показатель формы эритроцитов) позволяет констатировать, что при умеренной гипоксии ($4,03 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) эритроциты становились более вытянутыми. Индекс увеличивался на $4,7 \%$ ($p < 0,01$). При экстремальных концентрациях кислорода в инкубационной среде изменения в большинстве случаев были противоположны. Эритроциты приобретали более округлую форму. Значения индекса уменьшались на $3,5-5,5 \%$. Это следует рассматривать как факт снижения их функциональной активности, так как клетки красной крови становятся менее востребованными в процессах газообмена.

Изменение геометрических размеров эритроцитов нашло отражение в значениях клеточного объема (V_c). В условиях снижения концентрации кислорода в инкубационной среде в диапазоне $1,76-4,03 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$ отмечали уменьшение объема клеток на $1,5-5,0 \%$ (рис. 1). Уменьшение содержания кислорода в инкубационной среде в диапазоне $0,57-1,76 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$ вызывало прямо противоположную реакцию. Объем клеток красной крови увеличивался на $3-12 \%$. В четырех случаях (при $1,07$; $1,23$; $1,50$; $1,73 \text{ мг О}_2 \text{ л}^{-1}$) изменения были статистически значимы (рис. 2). Отмечено, что в наибольшей степени колебания объема клеток обусловлены изменениями значений толщины клетки (h) и и длины ее большой оси (C_l)

Информация об уменьшении объема клеток красной крови рыб в условиях недостатка кислорода крайне ограничена. Вместе с тем, механизмы, которые могут лежать в основе данного поведения клеток, вполне реальны. Известно, что регуляторное уменьшение объема эритроцитов может происходить благодаря деятельности K^+/Cl^- – котранспорта, а также путем выхода из клетки органических осмолитов (Jensen, 1995). Среди возможных путей активации канала наиболее вероятным представляется незначительное снижение рН внутриклеточной среды (до $7,0$), которое может быть следствием активизации анаэробных процессов и ростом внутриклеточной концентрации лактата (Adragna et al., 2004).

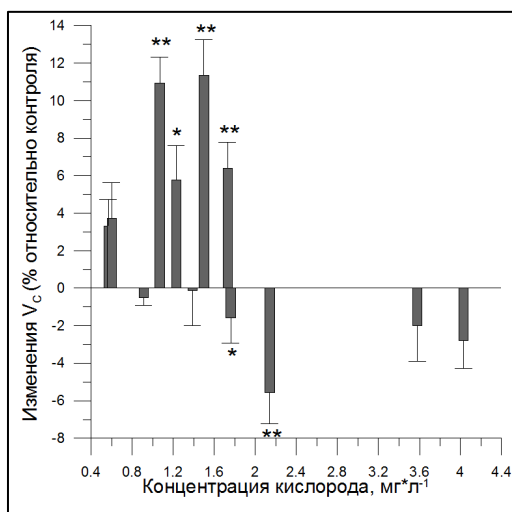


Рис. 2. Изменения объема эритроцитов (V_c) скорпены в условиях экспериментальной гипоксии (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,02$)

Свеллинг эритроцитов – более распространенная и описанная во многих работах реакция клеток красной крови рыб (Jensen, Weber, 1989). Набухание эритроцитов в условиях гипоксии происходит вследствие входа в клетку ионов Na^+ через Na^+/H^+ – антипорт. Наиболее сильным стимулом к активации транспорта являются катехоламины, которые выбрасываются в кровь при снижении концентрации доступного кислорода и вступают во взаимодействие с β -адренорецепторами эритроцитов (Borgese et. al. 1987).

Однако в условиях *in vitro* эта последовательность событий исключена. В исследованиях (Motais et. al. 1992) показано, что активность Na^+/H^+ – канала также возрастает при значительном снижении рН цитоплазмы эритроцитов и, как следствие, росте сродства внутренней стороны мембраны клеток к H^+ . Следует отметить, что ацидоз внутриклеточной среды должен ингибировать процессы K^+/Cl^- – котранспорта, что также должно способствовать гидратации цитоплазмы клетки (Adragna et al., 2004) (рис. 3). В условиях экстремальной гипоксии это состояние вполне допустимо и объясняет наблюдаемую последовательность событий.

Из рассмотренных выше аргументов следует, что наблюдаемое вначале снижение, а затем рост объема эритроцитов скорпены в условиях гипоксии, вероятно, является следствием постепенного понижения величины рН клетки. Вначале оно активирует K^+/Cl^- – котранспорт, а затем Na^+/H^+ – антипорт. Это наиболее вероятный механизм влияния гипоксии, реализуемый в условиях *in vitro* (рис. 1). В условиях *in vivo* активация K^+/Cl^- – канала маловероятна, так как поступление в кровь катехоламинов и активирование β -адренорецепторов эритроцитов практически сразу запускает Na^+/H^+ – обмен на мембране клетки.

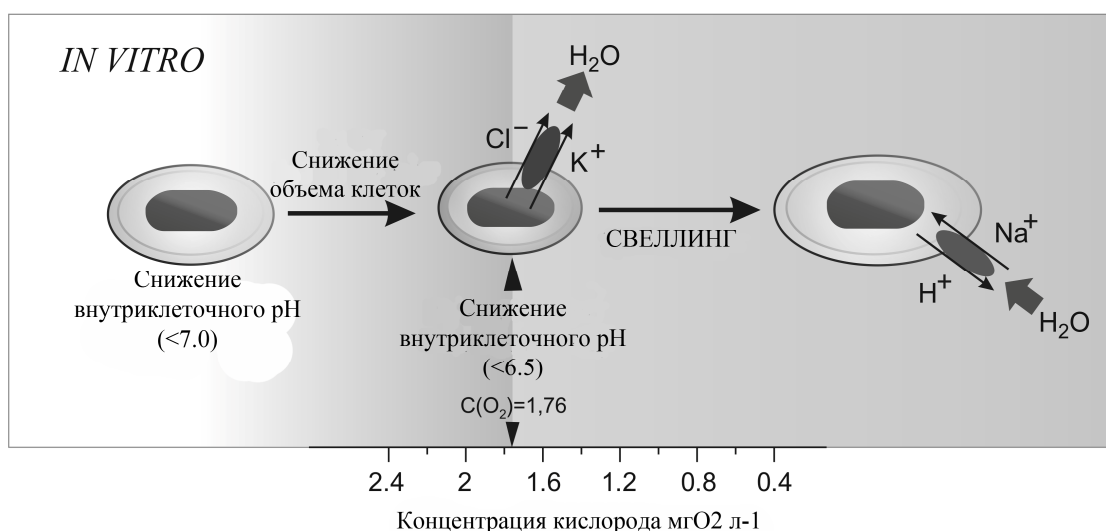


Рис. 3. Механизм изменений объема ядерных эритроцитов в условиях гипоксии *in vitro*

Изменения площади поверхности эритроцитов (S_c) в условиях экспериментальной гипоксии в значительной степени совпадали с изменениями объема клетки. При умеренной гипоксии ($1,76-4,03 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) происходило уменьшение значений показателя на $1,5-3,8 \%$. При экстремальной гипоксии ($0,57-1,76 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) площадь поверхности клетки преимущественно возрастала. Увеличение показателя составляло $3-9 \%$.

Расчет удельной поверхности (SS_c) и толщины (h) эритроцитов показал, что умеренные формы гипоксии (концентрационный диапазон – $1,76-4,03 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) инициировали уменьшение объема эритроцита, рост его удельной поверхности и снижение толщины диффузионного слоя клетки, что должно способствовать диффузионным процессам и облегчать оксигенацию гемоглобина.

Экстремальные формы гипоксии (концентрационный диапазон – $0,57-1,73 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) вызывали противоположные изменения: увеличение объема, снижение удельной поверхности и толщины диффузионного слоя клеток красной крови, что должно затруднять процесс перехода гемоглобина в окси-состояние. Снижение удельной поверхности клетки (диапазон $0,57-1,73 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) свидетельствует о вероятном угнетении метаболических процессов в ней.

Гипоксия оказывала влияние и на линейные размеры ядер эритроцитов – большой и малой осей ядра (N_1 и N_2 соответственно). Расчет средних величин показал, что изменение N_1 фактически воспроизводило изменение S_1 (рис. 4.17). Вначале при $1,76-4,03 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$ происходило снижение значений показателя на $1-4 \%$ относительно контрольных значений, а затем (при $0,57-1,73 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) рост на $1,5-4,0 \%$. Во многих случаях различия были статистически значимы при $p < 0,05$. Сходные с N_1 изменения претерпевал и параметр N_2 .

Используя значения N_1 и N_2 , рассчитали объем (V_n) и площадь поверхности ядра (S_n). В целом характер изменения V_n и S_n совпадал с изменениями размеров клеток. В условиях умеренной гипоксии ($1,76-4,03 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) происходило уменьшение объема (V_n) и площади поверхности (S_n) ядер эритроцитов. Экстремально низкие концентрации кислорода ($0,57-1,76 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) оказывали прямо противоположный эффект и вызывали увеличение значений V_n и S_n . В основе данной реакции лежали пропорциональные изменения линейных характеристик ядра (N_1 и N_2).

Удельная поверхность ядер эритроцитов при дефиците кислорода снижалась на $2-8 \%$. Концентрационная зависимость этого процесса была слабо выражена.

Изменение геометрических характеристик эритроцитов и их ядер в целом было однонаправлено ($R^2 = 0,67$), что позволяет искать общие

процессы, лежащие в их основе. Допускается, что это является, как следствием гидратации цитоплазмы эритроцита, так и функциональной активации данной структуры.

Цитофлюориметрические показатели суспензий эритроцитов в условиях экспериментальной гипоксии. При характеристике метаболической активности клеток и состояния клеточных мембран применяли флуоресцеин диацетат (FDA) и пропидиум йодид (PI). Мембранный потенциал митохондрий оценивали по интенсивности флуоресценции родамина 123 (R123), а состояние ядер по флуоресценции SYBR Green I.

Экспериментальная гипоксия в условиях *in vitro* индуцирует рост интенсивности флуоресценции R123 и FDA в эритроцитарных взвесах скорпены на 5-60 % и 30-184 % соответственно ($p < 0,02$). Интенсивность флуоресценции красителей для эритроцитарной взвеси не зависела от степени гипоксического воздействия (рис. 4).

Хотя направленность изменения интенсивности свечения эритроцитарных взвесей, меченных R123 и FDA, в условиях гипоксии совпадала, между этими процессами отсутствует какая-либо связь. Величина коэффициента детерминации (R^2) не превышала 0,15. Это означает, что изменение интенсивности свечения красителей в условиях гипоксии отражают совокупности самостоятельных процессов, реализуемых в клетках красной крови в условиях дефицита кислорода.

Увеличение интенсивности свечения клеточных взвесей, меченных R123, в условиях гипоксии, полученное в настоящей работе, ранее не отмечалось. Наиболее вероятной причиной роста интенсивности флуоресценции R123 во взвесах эритроцитов в условиях гипоксии представляется уменьшение проницаемости цитоплазматических мембран клеток. Оно выражается в ограничении числа функционирующих ионных каналов на основе их конформационных перестроек. Это позволяет снизить энергетические траты клеток на поддержание трансмембранных ионных градиентов и уменьшить тем самым функциональную нагрузку на митохондрии. Последнее должно приводить к увеличению степени поляризации органоида, что и отражает рост интенсивности флуоресценции R123. 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 – фактор индукции генов при гипоксии) и перехода клетки на анаэробный метаболизм (Rus et al. 2011).

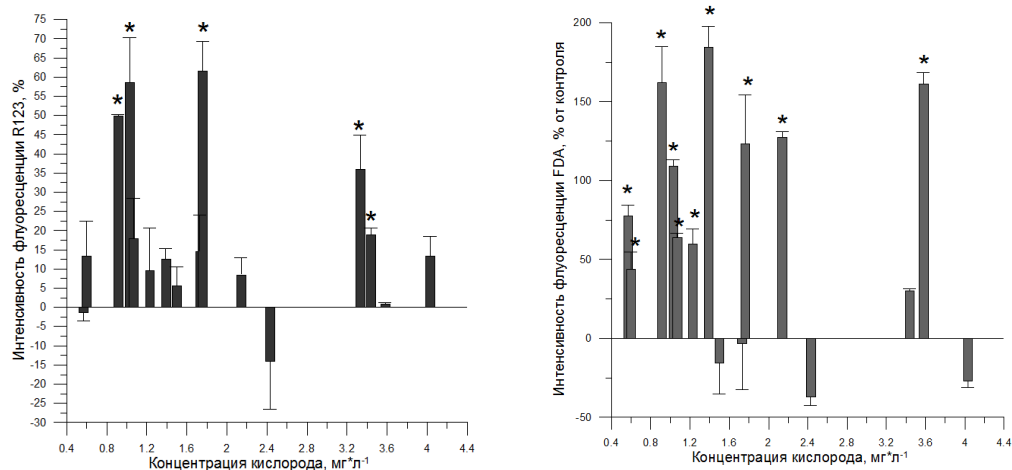
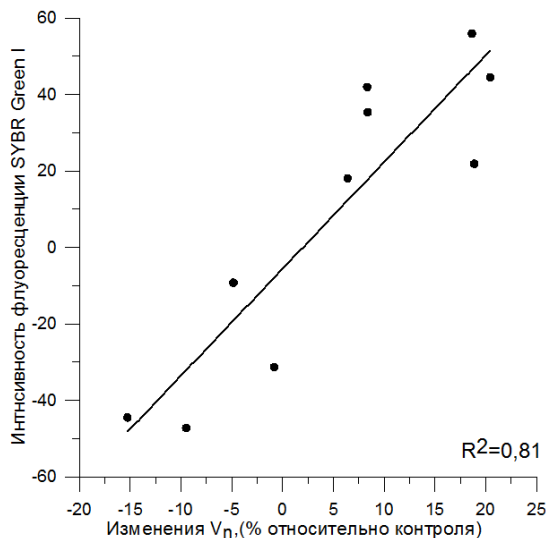


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции R123 и FDA у эритроцитов скорпены в условиях ранжированной гипоксии (* - $p < 0,02$).

Наиболее вероятной причиной роста интенсивности флуоресценции FDA представляется уменьшение проницаемости клеточной мембраны, так как полярная флуоресцирующая форма FDA, образующаяся в клетке, неспособна быстро проходить через биологическую мембрану и, в случае снижения ее проницаемости, краситель накапливается в клетках (Prosperi, 1990). Подобные изменения проницаемости мембраны могут наблюдаться у толерантных к гипоксии видов, о чем говорилось выше (явление «метаболического ареста») (Ночачка, 1986). Уменьшение количества ионных каналов происходит путем конформационных перестроек белка-переносчика, что позволяет сэкономить энергию, необходимую на поддержание ионных градиентов в условиях дефицита кислорода (Ночачка, 1986).

Недостаток кислорода в инкубационной среде индуцировал разнонаправленные изменения интенсивности флуоресценции SYBR Green I. В характере изменения флуоресценции ядер наблюдалась некоторая двухфазность. В случае экстремальных форм гипоксии в диапазоне концентрации кислорода $0,57-1,76 \text{ мгO}_2 \text{ л}^{-1}$ происходил достоверный рост значений интенсивности флуоресценции SYBR Green I. Он составил 18-55 % от уровня контрольных значений ($p < 0,05$). Умеренные формы гипоксии – $1,76-4,03 \text{ мгO}_2 \text{ л}^{-1}$, вызывали преимущественно противоположный эффект. Снижение интенсивности флуоресценции SYBR Green I составляло 10-45 % ($p < 0,05$). Направление изменений интенсивности свечения красителя, в целом, совпадало с колебаниями объема клеток и ядер эритроцитов (рис. 5). При этом связь объема ядра с интенсивностью флуоресценции красителя была более выражена. Об этом свидетельствовали более высокие значения коэффициента детерминации в системе «SYBR Green I – V_n » ($R^2 - 0,810$) (рис. 5).

Рис. 5. Корреляционная связь в системе: «SYBR Green I – V_n ».



Данный факт позволяет предположить наличие процесса реактивации данной структуры в условиях экстремально низких концентраций кислорода, поскольку изменение объема ядра зависит от степени конденсации хроматина (Hyde, 1982), а усиление интенсивности флуоресценции данного красителя практически всегда сопряжено с увеличением функциональной активности клеток и их ядер (Cerca et. al., 2011).

Гипоксия не оказывала влияния на жизнеспособность и целостность ядерных эритроцитов скорпены. Интенсивность флуоресценции FDA, определенная для эритроцитарных взвесей, повышалась, а PI сохранялась на уровне контрольных величин.

Прямое и боковое рассеяние неокрашенных суспензий эритроцитов. Изменения прямого (FS) и бокового (SS) рассеяния неокрашенных суспензий эритроцитов позволяют оценить, соответственно, размерные параметры и характер внутренней структуры (зернистости) клеток. Анализ цитограмм неокрашенных суспензий эритроцитов показал факт достоверного увеличения значений индексов FS (3-65 %) и SS (8-64 %) ($p < 0,02$).

Рост значений FS в исследуемых пробах, как правило, свидетельствует об увеличении размеров клеток (Taylor et. al., 2008; Bortner, Cidlowski, 2001). Однако результаты проточной цитометрии совпадают с морфометрическими измерениями и расчетами лишь отчасти.

Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о том, что величина FS слабо связана с морфометрическими характеристиками клеток, определенными прямым путем, то есть фактически их не отражают.

Несовпадение значений FS с прямыми измерениями линейных характеристик клеток объясняется, вероятно, особенностью метода проточной цитометрии. В ходе анализа проб невозможно установить, в каком положении клетка находилась при прохождении через лазерный анализатор.

Это не имеет значения для исследования популяций клеток шаровидной формы. Однако эритроциты рыб, как известно, имеют форму эллипса (Phillips et al., 2000). Отсюда следует, что значения прямого рассеяния отражают величину усредненного диаметра клетки. Кроме того, многочисленные исследования свидетельствуют, что значения FS не всегда являются линейной функцией изменений размера исследуемых частиц (Becker et. al., 2002; Shapiro, 2003).

Изменение значений индекса SS, в свою очередь, может зависеть от:

1. числа митохондрий в клетках и их объема (Petit, 1992; Shapiro, 2003);
2. структурных перестроек ядер (Shapiro, 2003);
3. размеров клеток (Shapiro, 2003);
4. изменения плотности внутриклеточной среды (Bortner, Cidlowski, 1991) и др.

Из результатов, представленных в предыдущих разделах, следует, что экспериментальная гипоксия вызывала ряд характерных изменений в структуре и функциональной активности клеток, их митохондрий, ядер, клеточных мембран. Однако корреляционный анализ между значениями SS и перечисленными выше характеристиками ядерных эритроцитов скорпены выявил крайне низкую степень взаимосвязи между показателями ($R^2 < 0,150$). Изменения размеров и функционального состояния ядер эритроцитов скорпены в условиях гипоксии *in vitro* не оказывают значительного влияния на изменения бокового рассеяния неокрашенных проб.

Высокий коэффициент детерминации был обнаружен между FS и SS ($R^2=0,71$). Наличие такой взаимосвязи подтверждается рядом исследований (Shapiro, 2003). Однако физиологический смысл указанной зависимости трудно интерпретировать.

Очевидно, что изменения бокового рассеяния эритроцитов при гипоксии является чрезвычайно чувствительным показателем, находящимся под влиянием различных процессов. Использование показателей FS и SS для оценки размеров и «гранулярности» эритроцитарных взвесей в условиях гипоксии имеет ряд ограничений. Они не всегда адекватно отражают процессы, происходящие в клетке. Это означает, что морфометрические характеристики клеток, полученные на основе светооптических методов исследования более целесообразны в оценке размерных характеристик эритроцитарных популяций.

Выводы

На основе комплекса современных методов функциональной морфологии и проточной цитометрии изучено в условиях *in vitro* влияние ранжированной гипоксии на ядерные эритроциты морской донной рыбы *Scorpaena porcus* L.

1. Разработан метод прижизненной морфометрии клеток с применением витального флуорохрома SYBR Green I и фотографирования нативных образцов крови в световом и люминисцентном режимах. Он позволил исследовать морфофункциональные характеристики ядерных эритроцитов без предварительной фиксации и окраски проб.
2. Умеренные формы гипоксии ($1,76-4,03 \text{ мгО}_2\text{л}^{-1}$) сопровождаются уменьшением объема эритроцита, ростом его удельной поверхности и снижением толщины диффузионного слоя клетки. Экстремальные формы гипоксии ($0,57-1,73 \text{ мгО}_2\text{л}^{-1}$) вызывают противоположные реакции. Изменение формы эритроцита происходит за счет всех его линейных параметров: толщины (h), большой (C_1) и малой (C_2) осей клетки. При этом в условиях низкой концентрации кислорода преобладает рост малой оси, что придает клетке более округлую форму.
3. В условиях умеренной гипоксии ($1,76-4,03 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) происходит уменьшение объема (V_n) и площади поверхности (S_n) ядер эритроцитов. Экстремально низкие концентрации кислорода ($0,57-1,76 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) оказывают прямо противоположный эффект. Удельная поверхность ядер эритроцитов при гипоксии снижается. Изменение объема клеток и их ядер происходит пропорционально ($R^2 - 0,67$). Значения ядерно-плазматических отношений (NCR) сохраняются на уровне контрольных величин.
4. Экстремальные формы гипоксии (менее $1,76 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) индуцируют рост функциональной активности ядерных структур эритроцитов. Это нашло отражение в увеличении их объема и повышении интенсивности свечения SYBR Green I. Коэффициент детерминации (R^2), отражающий связь между этими процессами составляет 0,810.
5. Дефицит кислорода повышает степень поляризации внутренней мембраны митохондрий клеток, о чем свидетельствует увеличение интенсивности флуоресценции родамина R123. Это является следствием ограничения процессов трансмембранного обмена, что отражает задержка полярной флуоресцирующей формы диацетата флуоресцеина (FDA) в цитоплазме клетки в условиях гипоксии.
6. Гипоксия не оказывает влияния на жизнеспособность и целостность мембран ядерных эритроцитов скорены. Об этом свидетельствует отсутствие изменений во флуоресценции пропидиум йодида (PI), а также увеличение интенсивности свечения FDA в эритроцитарных взвесах.
7. Изменения значений прямого (FS) и бокового (SS) рассеяния для неокрашенных взвесей ядерных эритроцитов не дают адекватной оценки морфологических и функциональных реакций клеток на недостаток кислорода в условиях *in vitro*. Изменения этих показателей не подтверждаются данными световой микроскопии, а также характером

флуоресценции красителей (R123, SYBR Green I), что проявляется в низких значениях коэффициента детерминации (не более 0,15).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Солдатов А.А. Влияние гипоксии на функциональные характеристики ядерных эритроцитов *Scorpaena porcus* L. (эксперименты *in vivo* и *in vitro*) / А.А. Солдатов, А.Ю. Андреева, В.Н. Новицкая, И.А. Парфенова // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2014. – Т. 50, № 5 (в печати).
2. Андреева А. Ю. Метод прижизненной морфометрии ядерных эритроцитов / А. Ю. Андреева, В. С. Муханов // Гидробиологический журнал. – 2012. – Т. 48, №3. – С. 115–120.
3. Андреева О. Ю. Функціональна морфологія ядерних еритроцитів в умовах гіпоксії (експерименти *in vitro*) / О. Ю. Андреева, О. О. Солдатов // Фізіологічний журнал. – 2013. – 59, №4. – С. 56–62.
4. Андреева А. Ю. Изменения объема ядерных эритроцитов скорпены в условиях внешней гипоксии (эксперименты *in vitro*) / А. Ю. Андреева, А. А. Солдатов // Доповіді НАН України. – 2012. – №10. – С. 149–153.
5. Андреева А. Ю. Влияние гипоксии на функциональное состояние ядерных эритроцитов морских рыб (эксперименты *in vitro*) / А. Ю. Андреева, А. А. Солдатов. // Доповіді НАН України. – 2013. – № 12. – С. 139-143.
6. Андреева О. Ю. Оцінка функціонального стану еритроцитів скорпени в умовах гіпоксії з використанням вітального барвника FDA (експеримент *in vitro*) / О. Ю. Андреева // Науковий вісник Чернівецького університету. Біологічні системи. – 2012. – Т. 4, № 4. – С. 490–492.
7. Патент: Андреева А.Ю., Муханов В.С. Спосіб вимірювання морфометричних показників інтактних ядерних еритроцитів риб. (№ а201309689 от 05.08.2013)
8. Andrieieva O. Changes in volume of *Scorpaena porcus* L. red blood cells during hypoxia (experiments *in vitro*) / O. Andrieieva // Crossroads in biology: Abs. book. (Cologne, 9-10 February, 2012). – Cologne, 2012. – P. 34.
9. Andrieieva O. Volume changes of *Scorpaena porcus* L. erythrocytes during hypoxia (experiments *in vitro*) / O. Andrieieva // 10th International congress on the biology of fish: Abs.book. (Madison, 15-19 July, 2012). – Madison, 2012. – P. 2.

10. **Андреева А. Ю.** Изменения ядер эритроцитов *Scorpaena porcus* L. в условиях гипоксии (эксперимент *in vitro*) / А. Ю. Андреева // Шевченковская весна 2012: биологические науки: Мат. X междунар. науч. конф. студ. и мол. уч. (Киев, 19-23 марта, 2012). – Киев, 2012. – С. 36.
11. **Андреева А. Ю.** Изменения цитометрических показателей ядерных эритроцитов рыб в условиях гипоксии (эксперимент *in vitro*) / А. Ю. Андреева // Актуальные вопросы биологической физики и химии БФФХ-2012: Мат. VIII междунар. науч.-техн. конф. (Севастополь, 23–27 апреля 2012 г.). – Севастополь, 2012. – С. 204.
12. **Андреева А. Ю.** Морфофункциональные показатели ядерных эритроцитов *Scorpaena porcus* L. в условиях внешней гипоксии (эксперимент *in vitro*) / А. Ю. Андреева // Современные проблемы гидробиологии. Перспективы, пути и методы решений: Мат. III междунар. науч. конф. (Херсон, 17-19 мая, 2012 г.). – Херсон, 2012. – С. 218.
13. **Андреева А.Ю.** Применение флуоресцеин диацетата (FDA) в определении функционального состояния эритроцитов скорпены в условиях гипоксии (эксперимент *in vitro*) / А. Ю. Андреева // Сучасні проблеми теоретичної та практичної іхтіології: Мат. V междунар. науч.-практ. конф. (Черновцы, 13-16 сент. 2012 г.). – Черновцы, 2012. – С. 15-17.
14. Солдатов А. А. Молекулярные и клеточные системы гидробионтов, толерантных к экстремальным формам гипоксии и аноксии. / А. А. Солдатов, **А. Ю. Андреева**, И. А. Парфенова, В. Н. Новицкая // Механизмы функционирования висцеральных систем: Мат. VIII Всероссийская конф. с междунар. участием. (Санкт-Петербург, 25–28 сентября 2012 г.). – Санкт-Петербург, 2012. – С. 215.
15. **Андреева А. Ю.** Проточная цитометрия в оценке функционального состояния ядерных эритроцитов в условиях гипоксии (эксперименты *in vitro*). / А. Ю. Андреева, А. А. Солдатов // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології: Мат. II междунар. науч. конф. (Днепропетровск, 24-25 сентября, 2013 г.). – Днепропетровск, 2013. – С. 40.
16. **Андреева А. Ю.** Влияние острой гипоксии на функциональное состояние эритроцитов *Scorpaena porcus* (эксперименты *in vitro*) / А. Ю. Андреева // Понт Эвксинский: Тез. VIII междунар. науч.-практ. Конф. молодых ученых. (Севастополь, 01-04 октября 2013 г.). – Севастополь, 2013. – С. 15.