



УДК 597.556.31:591.111:612.22

© 2012

А. Ю. Андреева, А. А. Солдатов

Изменения объема ядерных эритроцитов скорпены в условиях внешней гипоксии (эксперименты *in vitro*)

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

В условиях *in vitro* исследовано влияние внешней гипоксии на цитометрические характеристики ядерных эритроцитов *Scorpaena porcus* L. Показано, что при понижении содержания кислорода в концентрационном диапазоне 1,76–8,17 мг О₂/л (температура 14–16 °С) объем клеток уменьшается на 1,5–4,5% ($p < 0,05$). При более глубокой гипоксии (диапазон 0,57–1,76 мг О₂/л) происходят противоположные изменения. Объем клеток красной крови увеличивается на 3–12% ($p < 0,05$). При этом эритроциты приобретают форму удлинённого эллипса, так как увеличение объема клетки происходит преимущественно за счет изменения значений ее продольной оси и толщины ($R^2: 0,51; 0,76$). Обсуждаются механизмы, лежащие в основе отмеченных изменений.

Эритроциты костистых рыб, в отличие от красных клеток крови млекопитающих и человека, обладают развитыми системами переноса органических и неорганических ионов через клеточную мембрану, что позволяет осуществлять адаптивную регуляцию объема клетки [1].

Гипоксия является одним из факторов, индуцирующих изменения объема ядерных эритроцитов. В большинстве работ *in vivo* констатируется факт роста объема клеток красной крови в условиях внешнего дефицита кислорода [2]. Процесс контролируется катехоламинами, взаимодействующими с поверхностными β -адренорецепторами эритроцитов, т. е. контроль осуществляется на системном уровне [3]. Это не позволяет судить о процессах, развивающихся на уровне отдельных клеточных систем. Информация по этому поводу крайне ограничена.

В настоящей работе приведены результаты исследования в условиях *in vitro* влияния гипоксии на цитометрические характеристики ядерных эритроцитов.

Объектом исследования служили эритроциты *Scorpaena porcus* L. Кровь получали из хвостовой артерии. В качестве антикоагулянта применяли гепарин ("Richter", Венгрия). Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования при 1000 g в течение 15 мин и трижды отмывали в эквивалентном объеме изотоничной среды: 128 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 1,5 мМ CaCl₂, 1,5 мМ MgCl₂, 15 мМ Трис, 2,2 мМ D-глюкозы [4].

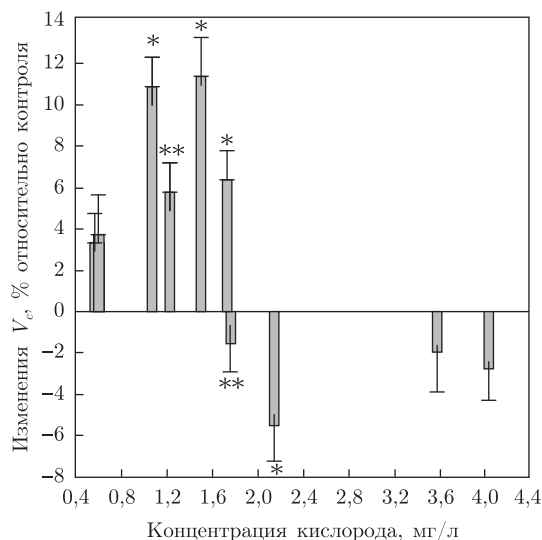


Рис. 1. Изменения объема эритроцитов скорпены в условиях экспериментальной гипоксии (* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,02$)

Инкубация эритроцитов в гипоксической среде составляла 4 ч при 14–16 °С. Понижение концентрации кислорода достигалось путем барботажа изотоничного раствора газообразным азотом. Исследовали концентрационный диапазон 0,57–8,17 мг O_2 /л. Инкубацию клеток проводили в герметичных вакуумных пробирках “Vacuette” (Greiner Bio-One GmbH).

По окончании экспозиции ядра эритроцитов окрашивались витальным красителем SYBR Green I (Molecular probes), который, связываясь с двухцепочечной нитью ДНК, флюоресцировал зеленым цветом в видимой части спектра.

Эритроциты фотографировали на инвертированном микроскопе для светлого поля и флюоресценции Nikon Eclipse TS100, оборудованном камерой Ikegami ICD-848P. Длину большой и малой осей клеток и их ядер измеряли по цифровым фотографиям в программе ImageJ 1.44r [5]. Объем клетки рассчитывали по уравнению [6] с учетом объема ядра [7]:

$$V_c = 0,7012 \left(\frac{C_1 + C_2}{2} \right)^2 h + \frac{\pi N_1 N_2^2}{6},$$

где C_1 — длина большой оси клетки; C_2 — длина малой оси клетки; h — толщина клетки ($h = 1,8 + 0,0915(C_1 - 7,5)$) [8]; N_1 — длина большой оси ядра; N_2 — длина малой оси ядра.

Количество измерений составляло 100 клеток на одну пробу. Нормальность распределения цифровых массивов проверяли, используя критерий Пирсона. Достоверность отличий оценивали при помощи t -критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде $\bar{x} \pm S\bar{x}$.

При понижении концентрации кислорода в инкубационной среде в концентрационном диапазоне 1,76–4,03 мг O_2 /л отмечали уменьшение объема эритроцитов на 1,5–4,5% (рис. 1). При 1,76 и 2,14 мг O_2 /л различия были статистически выражены (см. рис. 1).

Уменьшение содержания кислорода в инкубационной среде в диапазоне 0,57–1,76 мг O_2 /л вызывало прямо противоположную реакцию. Объем клеток красной крови увеличивался на 3–12%. В четырех случаях (при 1,07; 1,23; 1,50; 1,73 мг O_2 /л) изменения были статистически значимы (см. рис. 1).

Эритроциты рыб имеют эллипсоидную форму. Объем клеток зависит от изменения их линейных характеристик: C_1 , C_2 , h . Оценка коррелятивных связей показала, что эти вели-

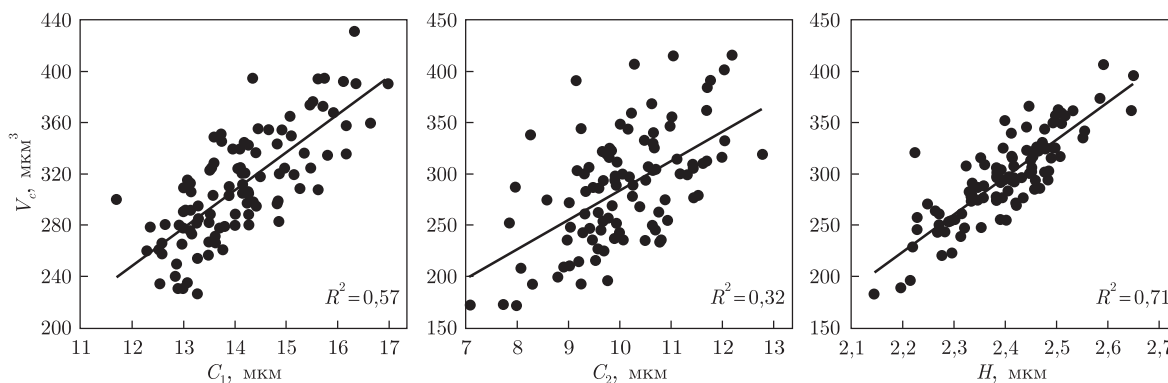


Рис. 2. Коррелятивные связи между линейными и объемными характеристиками ядерных эритроцитов скорпены

чины изменяются независимо друг от друга (R^2 0,003–0,006). Это означает, что каждая из них может вносить свой вклад в изменение объема клеток.

Рост объема клетки происходил преимущественно за счет изменения значений C_1 и h . Об этом свидетельствуют более высокие значения коэффициентов R^2 (0,51; 0,76) в сравнении с C_2 (0,10–0,32) (рис. 2). Это означает, что в условиях гипоксии эритроциты приобретают форму удлинённого эллипса, что подтверждается данными световой микроскопии.

Таким образом, объем эритроцитов скорпены в условиях внешней гипоксии претерпевает ряд последовательных изменений. Вначале (диапазон 1,76–4,03 мг O_2 /л) значения данного показателя снижались, затем существенно возрастали (диапазон 0,57–1,76 мг O_2 /л).

Информация об уменьшении объема клеток красной крови рыб в условиях недостатка кислорода крайне ограничена. Описан случай подобного поведения эритроцитов у скорпены в условиях кратковременной гипоксии (90 мин, эксперимент *in vivo*) [9]. 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 [10]. Среди возможных путей активации канала наиболее вероятным представляется незначительное снижение pH внутриклеточной среды (до 7,0), которое может быть следствием активизации анаэробных процессов и увеличения внутриклеточной концентрации лактата [11]. Известно, что ядерные эритроциты низших позвоночных способны при наступлении неблагоприятных условий переходить на анаэробные режимы функционирования [12].

Свеллинг эритроцитов — более распространенная и описанная во многих работах реакция клеток красной крови рыб [13]. 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 [14]. Однако в условиях *in vitro* эта последовательность событий исключена. В работе [15] показано, что активность Na^+/H^+ -канала также возрастает при значительном снижении pH цитоплазмы эритроцитов и, как следствие, повышение сродства внутренней стороны мембраны клеток к H^+ . В условиях экстремальной гипоксии это состояние клеток вполне допустимо и объясняет наблюдаемую последовательность событий.

Из рассмотренных выше аргументов следует, что наблюдаемое вначале снижение, а затем увеличение 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*. 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.

Итак, понижение содержания кислорода в инкубационной среде в диапазоне 0,57–8,17 мг O_2 /л вызывало неоднозначную реакцию у ядерных эритроцитов скорпены. Вначале объем клеток снижался (1,76–4,03 мг O_2 /л), а затем существенно возрастал (0,57–1,76 мг O_2 /л). При этом в конце клетки приобретали форму удлиненного эллипса, что было обусловлено возрастанием значений C_1 и h . В основе отмеченных изменений, вероятно, лежит постепенное понижение рН клетки, которое последовательно активирует K^+/Cl^- -котранспорт, а затем Na^+/H^+ -антипорт.

1. *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.
2. *Wells R. M. G.* Blood-gas transport and hemoglobin function: adaptations for functional and environmental hypoxia // *Fish Physiol.* – 2009. – **27**. – P. 255–299.
3. *Lowe T. E., Brill R. W., Cousins K. L.* Responses of the red blood cells from two high-energy-demand teleosts, yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) to catecholamines // *J. Comp. Physiol. B.* – 1998. – **168**, No 6. – P. 405–418.
4. *Tiihonen K., Nikinmaa M.* Short communication substrate utilization by carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes // *J. Exp. Biol.* – 1991. – **161**. – P. 509–514.
5. *Girish V., Vijayalakshmi A.* Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ // *Indian J. Cancer.* – 2004. – **41**, No 1. – P. 41–47.
6. *Houchin 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.
7. *Ташкэ К.* Введение в количественную цитологическую морфологию. – Бухарест: Изд-во Академии Респ. Румынии, 1980. – 291 с.
8. *Чижевский А. Л.* Структурный анализ движущейся крови. – Москва: Изд-во АН СССР, 1959. – 474 с.
9. *Солдатов А. А., Русинова О. С., Трусевич В. В. и др.* Влияние гипоксии на биохимические показатели эритроцитов скорпены // *Укр. биохим. журн.* – 1994. – **66**, № 5. – С. 115–118.
10. *Jensen F. B.* Regulatory volume decrease in carp red blood cells: mechanisms and oxygenation-dependency of volume-activated potassium and amino acid transport // *J. Exp. Biol.* – 1995. – **198**. – P. 155–165.
11. *Adragna N. C., Di Fulvio M., Lauf P. K.* Regulation of K–Cl cotransport: from function to genes // *J. Membrane Biol.* – 2004. – **201**. – P. 109–137.
12. *Walsh P. J., Wood C. M., Thomas S., Perry S. F.* Characterization of red blood cell metabolism in rainbow trout // *J. Exp. Biol.* – 1990. – **154**. – P. 475–489.
13. *Jensen F. B., Weber R. E.* Kinetics of the acclimational responses of tench to combined hypoxia and hypercapnia // *J. Comp. Physiol. B.* – 1989. – **156**, No 2. – P. 197–203.
14. *Borgese F., Garcia-Romeu F., Motais R.* Control of cell volume and ion transport by β -adrenergic catecholamines in erythrocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri* // *J. Physiol.* – 1987. – **382**. – P. 123–144.
15. *Motais R., Borgese F., Fievet B. et al.* Regulation of Na^+/H^+ exchange and pH in erythrocytes of fish // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1992. – **102a**, No 4. – P. 597–602.

О. Ю. Андреева, О. О. Солдатов

Зміни об'єму ядерних еритроцитів скорпени в умовах зовнішньої гіпоксії (експерименти *in vitro*)

В умовах in vitro досліджено вплив зовнішньої гіпоксії на цитометричні характеристики ядерних еритроцитів Scorpaena porcus L. Показано, що при зниженні вмісту кисню в концентраційному діапазоні 1,76–8,17 мг О₂/л (температура 14–16 °С) об'єм клітин зменшується на 1,5–4,5% (p < 0,05). При глибшій гіпоксії (діапазон 0,57–1,76 мг О₂/л) відбуваються протилежні зміни. Об'єм клітин червоної крові збільшується на 3–12% (p < 0,05). При цьому еритроцити набувають форми подовженого еліпса, тому що зростання об'єму клітини відбувається переважно за рахунок зміни значень її подовженої осі і товщини (R²: 0,51; 0,76). Обговорюються механізми, що лежать в основі зазначених змін.

O. Y. Andriieva, A. A. Soldatov

Changes in volume of scorpaena erythrocytes during outer hypoxia (*in vitro* experiments)

The influence of outer hypoxia on the cytometric parameters of Scorpaena porcus L. red blood cells is studied in vitro. It has been shown that a reduction of the oxygen content in a concentration range of 1.76–1.17 mg O₂/l (T = 14–16 °C) led to a decrease in the cell volume by 1.5–4.5% (p < 0.05). In case of deeper hypoxia (range of concentrations 0.57–1.76 mg O₂/l), the opposite changes are observed. Erythrocytes volume increases by 3–12% (p < 0.05). The shape of red blood cells changed to an extended ellipse, as the cell volume growth was caused by changes in the longitudinal axis and the width of erythrocytes (R²:0.51; 0.76). The mechanisms of observed changes are discussed.