

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕРНОМОРСКОГО МОРСКОГО ЕРША В УСЛОВИЯХ ДОЗИРОВАННОЙ ГИПОКСИИ

© А. Ю. Андреева,¹ А. А. Солдатов, В. С. Муханов

Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского РАН, 299011;

¹ электронный адрес: andreevaal@gmail.com

Гипоксия получила широкое распространение в водах Мирового океана. В данной работе исследовали функциональное состояние эритроцитов морского ерша *Scorpaena porcus* L. в условиях острой гипоксии в диапазоне концентраций кислорода 0.57—8.17 мг О₂/л (in vitro) по оценке интенсивности флуоресценции родамина 123 (R123) и диацетата флуоресцеина (ДАФ). В этих условиях наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции обоих красителей (R123 — на 12—60, ДАФ — на 30—184 %). В основе отмеченной реакции, возможно, лежит снижение проницаемости клеточной мембраны. Уменьшение функционально активных систем транспорта ионов в эритроцитах вызывает задержку ДАФ в цитоплазме и снижает затраты энергии, необходимые на поддержание трансмембранного градиента концентраций ионов, что также может приводить к увеличению интенсивности флуоресценции R123.

Ключевые слова: эритроциты, проточная цитометрия, гипоксия, *Scorpaena porcus* L., R123, ДАФ.

Принятые сокращения: ДАФ — диацетат флуоресцеина, R123 — родамин 123.

Устойчивые и значительные по площади зоны гипоксии (с концентрацией растворенного в воде О₂ менее 0.5 мг/л) обнаружены в акваториях Атлантического, Тихого и Индийского океанов, в том числе и на шельфе Черного моря (нормоксия 7—8 мг О₂/л) (Levin, 2002; Middellburg, Levin, 2009; Gewin, 2010). Особый интерес представляют организмы, постоянно обитающие в зонах кислородного минимума и способные долго выдерживать анакисические условия (McEnroe et al., 1998; Danovaro et al., 2010; Гулин, 2012). Состояние гипоксии для них является функциональной нормой, что предполагает существенную реорганизацию метаболических процессов, направленную на оптимизацию энергетических затрат организма (Noshachka, 1986). На фоне общей метаболической депрессии в их тканях повышается содержание соединений, несвойственных аэробному обмену (аланин, сукцинат) (Hughes, Johnston, 1978; Waarde, 1988), и усиливается выработка NH₄⁺ (Chew et al., 2005). При этом дыхательная цепь митохондрий приобретает некомпенсированный тип организации (Савина, 1992; Soldatov, 1996a).

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 (Солдатов и др., 2010; Soldatov et al., 2014). При этом наблюдаются характерные морфологические изменения клеток и повышается их деформируемость (Gilles, Motais, 1989). В большинстве работ констатируется факт роста объема эритроцитов (Jensen,

2004; Wells, 2009). Этот процесс контролируется катехоламинами (преимущественно норадреналином) (Tetens et al., 1988; Perry et al., 1999), взаимодействующими с поверхностными β-адренорецепторами эритроцитов (Reid, Perry, 1995) и активирующими Na⁺/H⁺ и HCO₃⁻/Cl⁻-антипорты клеток (Wood, Simmons, 1994; Jensen, 2004). Действие катехоламинов опосредуется через цАМФ (Gilles, Motais, 1989). Общее назначение этого процесса — контроль внутриклеточного pH и параметров средства 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 (моллюски) (Новицкая, Солдатов, 2011). Известно, что в условиях внешнего экстремума у них активизируются весьма эффективные механизмы автономного контроля клеточного гомеостаза, допускающие значительные изменения параметров внутренней среды. 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, пока неясно.

Настоящая работа посвящена проверке этого предположения в условиях in vitro: исследовали влияние дозированной гипоксии на мембранный потенциал митохондрий и целостность цитоплазматических мембран ядерных эритроцитов *Scorpaena porcus* L. с использованием красителей R123 и ДАФ.

Материал и методика

Материалом служили взрослые особи *S. porcus* L. (длина тела — 10.7–17.0 см, масса тела — 83.6–133.7 г) в состоянии относительного физиологического покоя (стадия зрелости гонад II–III). Представители данного вида существуют в условиях нормоксии (7–8 мг O₂/л), но способны также находиться и в гипоксической среде при 15–20%-ном насыщении воды кислородом без видимых признаков асфиксии (Shulman et al., 2003). Рыбу рассаживали в аквариумы объемом 50 л при температуре воды 18–22 °С, оборудованные проточной системой. Концентрацию кислорода поддерживали на уровне 7.5–8.0 мг/л. Продолжительность адаптации к данным условиям составляла 10–12 сут. В работе использовали подвижных, активно питающихся особей.

Кровь получали из хвостовой артерии путем отсечения хвостового стебля. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (Richter, Венгрия). Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования при 1000 g в течение 15 мин, после чего трижды отмывали в эквивалентном объеме среды (128 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 15 mM Трис и 2.2 mM D-глюкозы, pH 7.8), предварительно стерилизованной при 95 °С в течение 3 ч (Tiihonen, Nikinmaa, 1991). После последнего отмывания осевшую эритроцитарную массу использовали в экспериментах.

Гипоксические условия создавали путем барботажа инкубационной среды газообразным азотом в течение 15–120 с непосредственно перед внесением в вакуумные пробирки. Исследовали концентрационный диапазон 0.57–8.17 мг O₂/л. Контроль за концентрацией кислорода осуществляли потенциометрически (Светличный, Уманская, 1991).

Эритроцитарную массу в объеме 0.15 мл помещали в пластиковые вакуумные пробирки Vacuette (Greiner Bio-One, США) объемом 6.0 мл и затем заполняли их инкубационной средой с заданной концентрацией кислорода под крышку, избегая появления пузырьков воздуха. Аналогично готовили контрольную пробу, где сохраняли концентрацию 7.5–8.0 O₂/л. Эритроциты инкубировали в гипоксической среде 4 ч при 18–20 °С. В момент отбора проб эритроцитарных взвесей для проточной цитометрии пробирку объединяли в особую систему (рис. 1).

Экспериментальную пробирку (1) последовательно соединяли с двумя пробирками с инкубационной средой с заданной концентрацией кислорода (2); для контрольной пробы (4) использовали одну пробирку с инкубационной средой (3). Такая система, соединенная шприцевыми иглами (6) (толщина 0.7 мм) и полихлорвиниловыми трубками (диаметр 5 мм) (8) предотвращает попадание пузырьков воздуха в образцы. При отборе материала со дна пробирки суспензия эритроцитов автоматически разбавлялась раствором инкубационной среды с той же концентрацией кислорода. Наличие для экспериментальной пробы двух запасных пробирок с инкубационной средой обеспечивает более точное соблюдение условий гипоксии внутри вакуумной пробирки. Таким образом исключали возможность реоксигенации.

Из пробирок отбирали равные объемы взвеси, которые разводили в 100 раз инкубационной средой с заданной концентрацией кислорода. Окрашивание эритроцитов R123 и ДАФ (Molecular Probes, США) проводили в течение 10 и 30 мин соответственно. Финальная концентрация R123 в растворе составляла 2.5 мкл/мл, ДАФ —

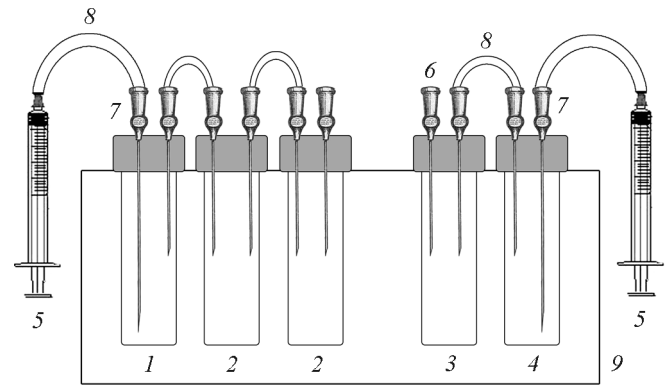


Рис. 1. Схема экспериментальной установки.

1 — вакуумная пробирка VACUETTE™ с опытной пробой, 2 — вакуумная пробирка VACUETTE™ с инкубационной средой с заданной концентрацией кислорода, 3 — вакуумная пробирка VACUETTE™ с инкубационной средой полностью насыщенной кислородом (контроль), 4 — вакуумная пробирка VACUETTE™ с контрольной пробой, 5 — инсулиновый стеклянный шприц емкостью 1 мл, 6 — шприцевая игла (толщина 0.7 мм), 7 — игла для отбора образцов взвесей на проточную цитометрию, 8 — полихлорвиниловая трубка диаметром 5 мм, 9 — штатив.

10 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.

R123 является одним из самых широко используемых в анализе состояния митохондрий красителей. Благодаря своей липофильной природе он свободно проходит через поляризованные мембраны, специфично накапливаясь в митохондриях и не окрашивая при этом другие мембраны клетки (Shapiro, 2000; Toescu, Verkhatsky, 2000). Накопление флуорохрома в клетках является результатом внутримолекулярных взаимодействий между красителем и мембранными белками митохондрий (Weinberg et al., 2000). R123 в небольших концентрациях нетоксичен для клеток (Chen, 1988). Его накопление и флуоресценция в клетках стабильны во времени, что позволяет следить за изменениями мембранного потенциала митохондрий (Hagen et al., 1997). Интенсивность флуоресценции R123 напрямую зависит от величины потенциала мембран митохондрий (Davis et al., 1985). Известно, что при деполаризации митохондрий краситель высвобождается из органелл, что приводит к снижению интенсивности флуоресценции (Davis et al., 1985; Chen, 1988; Hagen et al., 1997; Toescu, Verkhatsky, 2000).

Витальный краситель ДАФ применяют для оценки общей метаболической активности клеток (Diaper et al., 1992; Jochem, 1999; Stauber et al., 2002). Как и R123, данный флуорохром относится к липофильным красителям, благодаря чему он пассивно проходит через цитоплазматическую мембрану. Перевод красителя в светящуюся форму осуществляется неспецифическими эстеразами (Jochem, 1999). Известно также, что ДАФ позволяет оценить целостность мембран. Скорость выведения флуоресцирующего ДАФ из клеток ниже скорости его поступления, потому уменьшение свечения свидетельствует о мембранных повреждениях (Proserpi et al., 1985).

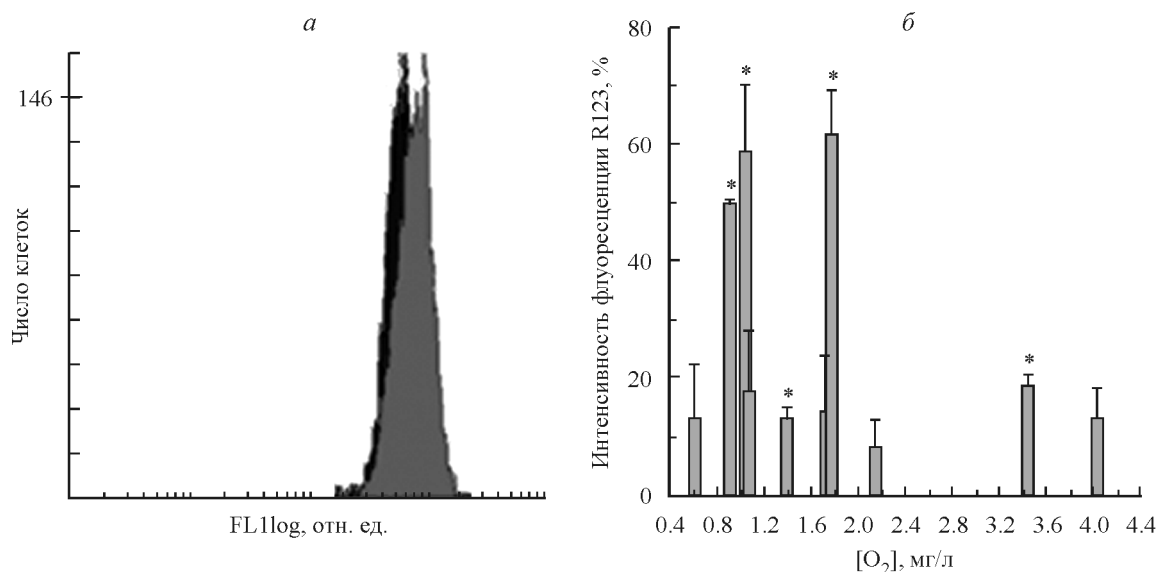


Рис. 2. Флуоресценция эритроцитарных взвесей, меченных R123, в условиях гипоксии.

a — распределение интенсивности флуоресценции R123 в эритроцитарных взвешах морского ерша. Здесь и на рис. 3: *черный цвет* — при нормоксии ($[O_2]$ — 7.5–8.0 мг $O_2/л$), *серый цвет* — при гипоксии ($[O_2]$ — 1.03 мг $O_2/л$), FL1log — флуоресценция в зеленой области спектра, выраженная в условных единицах. *б* — интенсивность флуоресценции R123 в клетках в исследуемом диапазоне концентраций кислорода; *звездочка* — $P \leq 0.05$.

Достоверность различий оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента. Нормальность распределения данных проверяли по критерию Пирсона. Результаты представлены в виде средней и ошибки средней ($M \pm m$).

Результаты

В условиях гипоксии отмечали рост интенсивности флуоресценции R123 в эритроцитарной взвеси скорпены. Максимумы распределения смещались вправо (рис. 2, *a*). Диапазон вариации значений (FL1log) не изменялся, т. е. однородность распределения популяции клеток красной крови по данному критерию сохранялась.

Величины, отражающие рост интенсивности флуоресценции R123 относительно контрольного уровня при изменении концентрации O_2 в инкубационной среде, представлены на рис. 2, *б*. В пяти случаях (при 0.91, 1.03, 1.39, 1.76, 3.44 мг $O_2/л$) увеличение составляло от 8 до 61 % ($P \leq 0.05$). В остальных вариантах постановки эксперимента изменения отсутствовали. Следует отметить, что концентрационная зависимость интенсивности флуоресценции R123 от величины гипоксического воздействия также не была выражена. Это, по-видимому, связано с тем, что для каждого отдельного эксперимента эритроцитарную массу получали у нового животного, функциональное состояние которого могло быть специфичным: различия в интенсивности эритропоэза, особенностях

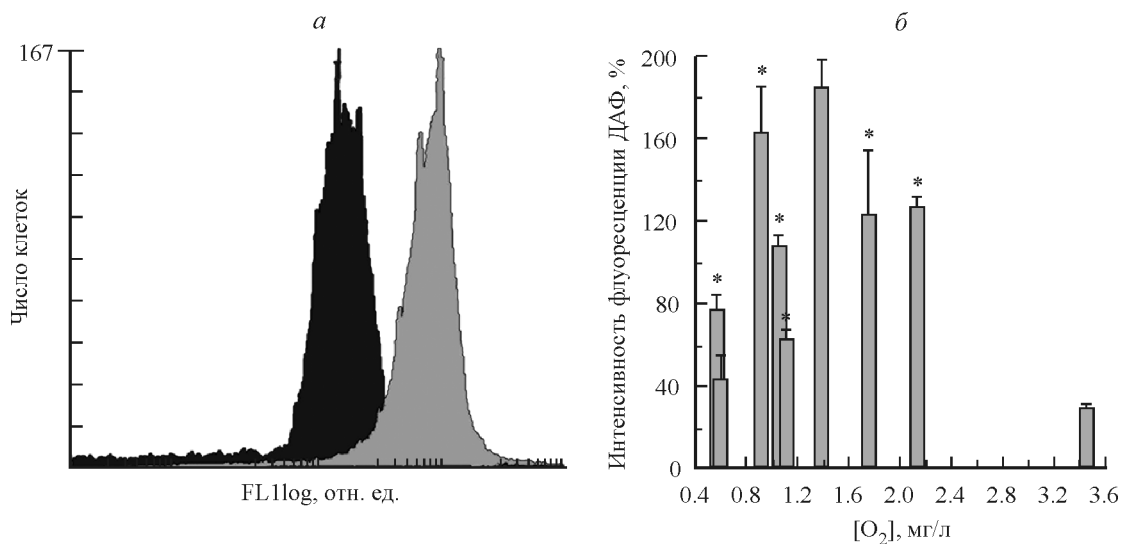


Рис. 3. Флуоресценция эритроцитарных взвесей, меченных ДАФ, в условиях гипоксии.

a — распределение интенсивности флуоресценции ДАФ в эритроцитарных взвешах морского ерша. *б* — интенсивность флуоресценции ДАФ в клетках в исследуемом диапазоне концентраций кислорода; *звездочка* — $P \leq 0.05$.

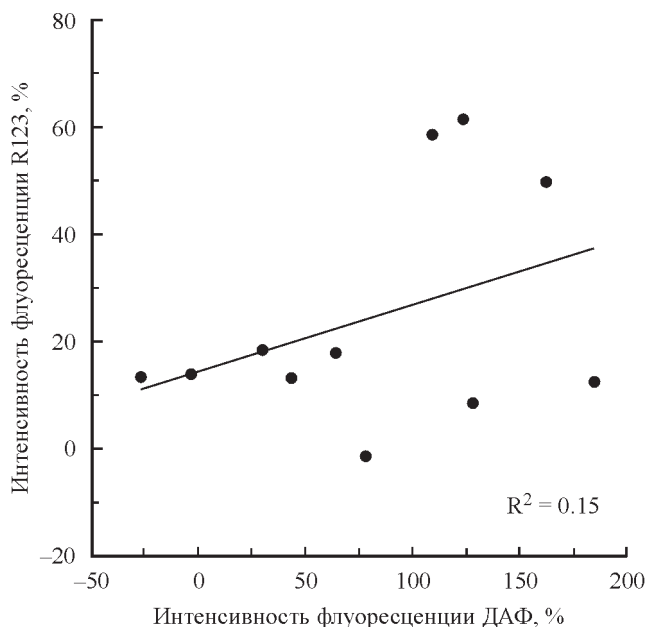


Рис. 4. Зависимость между интенсивностью флуоресценции эритроцитов морского ерша, окрашенных R123 и ДАФ, в условиях экспериментальной гипоксии *in vitro*.

эритрокинетики, возрасте циркулирующих эритроцитов и т. д.

Интенсивность флуоресценции эритроцитарных взвесей, меченных ДАФ, в условиях экспериментальной гипоксии также возрастала. Максимумы распределения смещались в область более высоких значений относительно контроля (рис. 3, а). Как и в случае с R123, изменения диапазона вариации значений (FL1log) в большинстве случаев не отмечали.

Усреднение полученных значений позволило оценить величины роста интенсивности флуоресценции эритроцитарных взвесей, меченных ДАФ, в условиях экспериментальной гипоксии (рис. 3, б). В 9 из 11 вариантов постановки эксперимента интенсивность флуоресценции повышалась на 27—184 % ($P \leq 0.02$). Концентрационная же зависимость интенсивности флуоресценции ДАФ от содержания O_2 в инкубационной среде, как и в случае с R123, отсутствовала. Причины этого рассмотрены выше.

Из представленных результатов видно, что направленность изменений интенсивности флуоресценции эритроцитарных взвесей в условиях гипоксии, меченных R123 и ДАФ, совпадает. Однако между этими процессами отсутствует какая-либо связь. Величина коэффициента детерминации (R^2) не превышала 0.15 (рис. 4). Это означает, что за отмеченными выше изменениями стоят самостоятельные, никак не связанные между собой процессы.

Обсуждение

В большинстве исследований отмечается, что гипоксия ограничивает включение R123 в клеточные системы, что связывают со снижением мембранного потенциала митохондрий вследствие уменьшения активности ее дыхательной цепи (Weinberg et al., 2000). Это показано в работах, выполненных на чувствительных к дефициту кислорода нейронах крыс и гладкомышечных волокнах че-

ловека (Bahar et al., 2000; Perez Velazquez et al., 2000; Wang et al., 2005).

Увеличения интенсивности флуоресценции эритроцитов, меченных R123, в условиях гипоксии, показанное в настоящей работе, по литературным данным, ранее не отмечали. Наиболее вероятной причиной роста интенсивности флуоресценции R123 во взвесах эритроцитов в условиях гипоксии представляется уменьшение проницаемости цитоплазматических мембран клеток. Это вытекает из работ П. Очачка, который впервые описал явление, именуемое «метаболическим арестом». Оно выражается в ограничении числа функционирующих ионных каналов на основе их конформационных перестроек, что позволяет снизить энергетические затраты клеток на поддержание трансмембранных ионных градиентов и уменьшить тем самым функциональную нагрузку на митохондрии. Подобные реакции клеточных систем отмечены у организмов, толерантных к экстремальным условиям среды (гипоксия, гипотермия) (Hochachka, 1986).

Ранее нами было показано, что эритроциты *S. porcus* способны к сбалансированному угнетению мембранных и метаболических функций в условиях дефицита кислорода (Солдатов и др., 2010). Этим, по всей видимости, и можно объяснить факт роста флуоресценции R123 эритроцитарных взвесей при гипоксии.

Не следует исключать из внимания и другие процессы. Рост интенсивности флуоресценции R123 может являться следствием начальных этапов развития реакции эритроцитов на гипоксию, а именно синтеза факторов транскрипции адаптивных генов 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 (Rus et al., 2011), что соизмеримо с временными масштабами наших экспериментов.

Установлено также, что при гипоксии происходит кратковременная интенсификация процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях, связанная с образованием ферментов анаэробного метаболизма (Портниченко и др., 2012). Отмечена прямая корреляционная связь между интенсивностью флуоресценции R123 и количеством РНК в клетке (Darzynkiewicz et al., 1982). Гипоксия может индуцировать и amitotический цитокinesis эритроцитов, который также может стать причиной интенсификации аэробных процессов (Soldatov, 1996b).

Гипоксия оказывала существенное влияние и на интенсивность флуоресценции клеточных взвесей, меченных ДАФ, — возрастание отмечали во всем исследуемом диапазоне концентраций кислорода. Это может определяться целой совокупностью процессов — увеличением активности клеточных эстераз, ростом величины рН внутриклеточной среды и изменением проницаемости цитоплазматических мембран.

Поскольку перевод красителя в активную форму (гидролиз эфирной связи и освобождение флуоресцина) осуществляется эстеразами (липазы, ацилазы) (Гамалей и др., 1989; Prosperi, 1990), возрастание интенсивности флуоресценции ДАФ может свидетельствовать об изменении активности комплекса ферментов липидного обмена и об увеличении общей интенсивности метаболизма в клетках (Heslop-Harrison, Heslop-Harrison, 1970). Подобная трактовка может быть принята для объяснения полученных нами результатов. Однако отсутствие корреляции между значениями интенсивности флуоресценции

R123 и ДАФ не позволяет окончательно принять данную точку зрения.

Мало вероятно также и то, что в условиях экспериментальной гипоксии рост величины рН цитоплазмы эритроцитов вносил существенный вклад в изменения интенсивности флуоресценции ДАФ эритроцитарных взвесей. Общеизвестно, что усиление анаэробных процессов в клетке приводит к накоплению лактата и развитию локального ацидоза, что исключает увеличение значений рН (Baldisserotto et al., 2008).

Более вероятной причиной роста интенсивности флуоресценции ДАФ во взвесах эритроцитов в условиях гипоксии представляется уменьшение проницаемости цитоплазматической мембраны клетки, которое обсуждалось ранее в отношении R123. Известно, что полярная флуоресцирующая форма ДАФ, образующаяся в клетке, неспособна быстро проходить через внешнюю мембрану и что в случае ограничения ее проницаемости краситель должен накапливаться в клетках (Proserpi, 1990).

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

Список литературы

- Гамалей И. А., Каулин А. Б., Кирпичникова К. М. 1989. Активация макрофагов синтетическими пептидами. Цитология. 31 (9) : 1050—1057. (Gamaley I. A., Kaulin A. B., Kirpichnikova K. M. 1989. Macrophages activation with synthetic peptides. Tsitologiya. 31 (9) : 1050—1057.)
- Гулин М. Б. 2012. К изучению роли гипоксии и аноксии в жизни морских эукариот. Морской экол. журн. 11 (1) : 81—98. (Gulin M. B. 2012. Studying the role of hypoxia and anoxia in life of marine eukaryotes. Morskoj Ecol. J. 11 (1) : 81—98.)
- Новицкая В. Н., Солдатов А. А. 2011. Эритроидные элементы гемолимфы *Anadara inaequalis* (Mollusca: Arcidae) в условиях экспериментальной аноксии: функциональные и морфометрические характеристики. Морской экол. журн. 10 (1) : 56—64. (Novitskaya V. N., Soldatov A. A. 2011. Erythroid elements of *Anadara inaequalis* (Mollusca: Arcidae) hemolymph in conditions of experimental anoxia: functional and morphometric parameters. Morskoj Ecol. J. 10 (1) : 56—64.)
- Портниченко В. И., Носарь В. И., Портниченко А. Г., Древицкая Т. И., Сидоренко А. М., Маньковская И. Н. 2012. Фазовые изменения энергетического метаболизма при периодической гипоксии. Рос. физиол. журн. 58 (4) : 2—12. (Portnichenko V. I., Nosar V. I., Portnichenko A. G., Drevitskaya T. I., Sidorenko A. M., Mankovskaya I. N. 2012. Phase changes of energetic metabolism under periodic hypoxia. Russ. Physiol. J. 58 (4) : 2—12.)
- Савина М. В. 1992. Механизмы адаптации тканевого дыхания в эволюции позвоночных. СПб.: Наука. 200 с. (Savina M. V. 1992. Mechanisms of adaptations in tissue respiration in vertebrates evolution. SPb.: Nauka. 200 p.)
- Светличный Л. С., Уманская А. В. 1991. Кислородная цена и локомоция *Calanus helgolandicus* (Crustacea, Copepoda). Океанология. 31 (5) : 566—571. (Svetlichny L. S., Umanskaya A. V. 1991. Oxygen cost and locomotion of *Calanus helgolandicus* (Crustacea, Copepoda). Okeanologiya. 31 (5) : 566—571.)
- Солдатов А. А., Парфенова И. А., Новицкая В. Н. 2010. Содержание одновалентных катионов и АТФ в эритроцитах морских рыб при экспериментальной гипоксии. Укр. биохим. журн. 82 (2) : 36—41. (Soldatov A. A., Parfenova I. A., Novitskaya V. N. 2010. The content of monovalent cations and ATP in marine fish red blood cells under experimental hypoxia. Ukr. Biochim. J. 82 (2) : 36—41.)
- Bahar S., Fayuk D., Somjen G. G., Aitken P. G., Turner D. A. 2000. Mitochondrial and intrinsic optical signals imaged during hypoxia and spreading depression in rat hippocampal slices. J. Neurophysiol. 84 : 311—324.
- Baldisserotto B., Chippari-Gomes A. R., Lopes N. P., Bicu-do J. E. P. W., Paula-Silva M. N., Almeida-Val V. M. F., Val A. L. 2008. Ion fluxes and hematological parameters of two teleosts from the Rio Negro, Amazon, exposed to hypoxia. Braz. J. Biol. 68 : 571—575.
- Chen L. B. 1988. Mitochondrial membrane potential in living cells. Ann. Rev. Cell. Biol. 4 : 155—181.
- Chew S. F., Gan J., Ip Y. K. 2005. Nitrogen metabolism and excretion in the swamp eel, *Monopterus albus*, during 6 or 40 days of estivation in mud. Physiol. Biochem. Zool. 78 : 620—629.
- Danovaro R., Dell'Anno A., Pusceddu A., Gambi C., Heiner I., Kristensen R. M. 2010. The first metazoa living in permanently anoxic conditions. BMC Biol. 8 : 30.
- Darzynkiewicz Z., Traganos F., Staiano-Coico L., Kapuscinski J., Melamed M. R. 1982. Interactions of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. J. Cancer Res. 42 : 799—806.
- Davis S., Weiss M. J., Wong J. R., Lampidis T. J., Chen L. B. 1985. Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of Rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells. J. Biol. Chem. 260 : 13 844—13 850.
- Diaper J. P., Tither K., Edwards C. 1992. Rapid assessment of bacterial viability by flow cytometry. Appl. Microbiol. Biot. 38 : 268—272.
- Gewin V. 2010. Oceanography: dead in the water. Nature. 466 : 812—814.
- Gilles C., Motais R. 1989. Effect of catecholamines on deformability of red cells from trout: relative roles of cyclic AMP and cell volume. J. Physiol. 412 : 321—332.
- Hagen T. M., Yowe D. L., Bartholomew J. C., Wehr C. M., Do K. L., Park J.-Y., Ames B. N. 1997. Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 : 3064—3069.
- Heslop-Harrison J., Heslop-Harrison Y. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. Stain Technol. 45 : 115—120.
- Hochachka P. 1986. Defence strategies against hypoxia and hypothermia. Science. 231 : 324—241.
- Hughes G. M., Johnston I. A. 1978. Some responses of the electric ray (*Torpedo marmorata*) to low ambient oxygen tensions. J. Exp. Biol. 73 : 107—117.
- Jensen F. B. 2004. Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport (review). Acta Physiol. Scand. 182 : 215—227.
- Jochem F. J. 1999. Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with Fluorescein diacetate. Mar. Biol. 135 : 721—728.
- Levin L. A. 2002. Deep-ocean life where oxygen is scarce. Amer. Scient. 90 : 436—444.
- McEnroe M., Woodhead P., Crocker C. 1998. Life in the extreme environment of an upwelling system physiological attributes of fishes living in extreme hypoxia in the nutrient-rich Benguela system. In: 33th Eur. Mar. Biol. Symp.: Abstracts. Wilhelmshaven (Germany). 51.
- Middelburg J. J., Levin L. A. 2009. Coastal hypoxia and sediment biogeochemistry. Biogeochemistry. 6 : 1273—1293.

- Perez Velazquez J. L., Frantseva M. V., Huzar D. V., Carlen P. L. 2000. Mitochondrial porin required for ischemia-induced mitochondrial dysfunction and neuronal damage. *Neuroscience*. 97 : 363—369.
- Perry S. F., Fritsche R., Hoagland T. M., Duff D. W., Olson K. R. 1999. The control of blood pressure during external hypercapnia in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 202 : 2177—2190.
- Prosperi E. 1990. Intracellular turnover of Fluorescein diacetate. Influence of membrane ionic gradients on Fluorescein efflux. *Histochem. J.* 22 : 227—233.
- Prosperi E., Croce A. C., Bottiroli G., Supino R. 1985. Influence of daunorubicin on membrane permeability properties: detection by means of intracellular accumulation and efflux of fluorescein. *Chem.-Biol. Interact.* 54 : 271—280.
- Reid S. G., Perry S. F. 1995. Cholinergic-mediated control of catecholamine release from chromaffin cells in the American eel, *Anguilla rostrata*. *J. Comp. Physiol. B.* 165 : 464—470.
- Rus A., Del Moral M. L., Molina F., Peinado M. A. 2011. Upregulation of cardiac NO/NOS system during short-term hypoxia and the subsequent reoxygenation period. *Eur. J. Histochem.* 55 : 91—96.
- Shapiro H. M. 2000. Membrane potential estimation by flow cytometry. *Methods*. 21 : 271—279.
- Shulman G. Ye., Stolbov A. Ya., Soldatov A. A., Minyuk G. S., Ivleva Ye. V., Drobetskaya I. V. 2003. Metabolic responses of Black Sea Fishes to long-term experimental hypoxia. *Hydrobiol. J.* 39 (3) : 18—27.
- Soldatov A. A. 1996a. Cytochrome system and oxygen tension in muscle tissue of salt-water fish with different natural activity J. *Evol. Biochem. Physiol.* 32 (2) : 142—146.
- Soldatov A. A. 1996b. The effect of hypoxia on red blood cells of flounder: a morphologic and autoradiographic study. *J. Fish Biol.* 48 (3) : 321—328.
- Soldatov A. A., Andreeva A. Yu., Novitskaya V. N., Parfenova I. A. 2014. Coupling of membrane and metabolic functions in nucleated erythrocytes of *Scorpaena porcus* L. under hypoxia *in vivo* and *in vitro*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 50 (5) : 409—415.
- Stauber J. L., Franklin N. M., Adams M. S. 2002. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. *Trends Biotechnol.* 20 : 141—143.
- Tetens V., Lykkeboe G., Christensen N. J. 1988. Potency of adrenaline and noradrenaline for beta-adrenergic proton extrusion from red cells of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Biol.* 134 : 267—280.
- Tiihonen K., Nikinmaa M. 1991. Short communication substrate utilization by carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes. *J. Exp. Biol.* 161 : 509—514.
- Toescu E. C., Verkhatsky A. 2000. Assessment of mitochondrial polarization status in living cells based on analysis of the spatial heterogeneity of rhodamine 123 fluorescence staining. *Eur. J. Physiol.* 440 : 941—947.
- Vaquero-Sunyer R., Duarte C. M. 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 105 : 15 452—15 457.
- Waarde A. 1988. Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B : 207—228.
- Wang T., Zhang Z. X., Xu Y. J. 2005. Effect of mitochondrial KATP channel on voltage-gated K⁺ channel in 24 hour-hypoxic human pulmonary artery smooth muscle cells. *Chinese Med. J.-Peking.* 118 : 12—19.
- Weinberg J. M., Venkatachalam M. A., Roeser N. F., Nissim I. 2000. Mitochondrial dysfunction during hypoxia and reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 97 : 2826—2831.
- Wells R. M. G. 2009. Blood-Gas transport and hemoglobin function: adaptations for functional and environmental hypoxia. *Fish Physiol.* 27 : 255—299.
- Wood C. M., Simmons H. 1994. The conversion of plasma HCO₃⁻ to CO₂ by rainbow trout red blood cells *in vitro*: adrenergic inhibition and the influence of oxygenation status. *Fish Physiol. Biochem.* 12 : 445—454.

Поступила 12 II 2015

FUNCTIONAL STATE OF SCORPION FISH *SCORPAENA PORCUS* L.
NUCLEATED ERYTHROCYTES UNDER DOSED HYPOXIA

A. Yu. Andreeva,¹ A. A. Soldatov, V. S. Mukhanov

Institute of Marine Biological Research Named after A. O. Kovalevsky RAS, 299011;

¹ e-mail: andreevaal@gmail.com

Hypoxia is a wide spread phenomena throughout the world's aquatic systems. This paper investigates the functional state of scorpion fish red blood cells under acute hypoxia between 0.57—8.17 mg O₂/l (*in vitro*) by assessing of the fluorescence 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.

Key words: red blood cells, flow cytometry, hypoxia, *Scorpaena porcus* L., R123, FDA.