

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ НА МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ *SCORPENA PORCUS*

Кальпа В.А.^{1,2}, Гаджи А.В.², Лантушенко А.О.²

¹ ФИЦ Морской гидрофизический институт РАН
ул. Капитанская, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: vel.kalpa@gmail.com

² Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

Поступила в редакцию: 25.08.2021

Аннотация. Гидробионты в процессе жизнедеятельности постоянно находятся под воздействием биотических и абиотических факторов. Придонные организмы и обитатели приливных зон могут испытывать недостаток кислорода (гипоксию). Кроме того, гипоксические условия могут возникать при чрезмерном разрастании (цветении) фитопланктона и водорослей, активно поглощающих растворенный в воде кислород. Гидробионты, находящиеся в приливных зонах во время отлива, также испытывают гипоксию. На клеточном уровне гипоксия может индуцировать автоокисление дыхательных пигментов, угнетает обмен веществ, а также снижает иммунные функции гемоцитов в гемолимфе. В работе моделирование гипоксических условий в экспериментах *in vitro* было реализовано воздействием на эритроциты и гемоциты раствором пероксида водорода. Также исследовано воздействие фуллерена на индукцию окислительного стресса.

Ключевые слова: гидробионты, гемолимфа, окислительный стресс, фуллерен C₆₀.

Гидробионты в процессе жизнедеятельности постоянно находятся под воздействием биотических и абиотических факторов. Придонные организмы и обитатели приливных зон могут испытывать недостаток кислорода (гипоксию). Например, скорпены при угрозе со стороны хищников располагаются на дне и замирают, фактически прекращая дыхание и сердцебиение. Кроме того, гипоксические условия могут возникать при чрезмерном разрастании (цветении) фитопланктона и водорослей, активно поглощающих растворенный в воде кислород [1].

Гидробионты, находящиеся в приливных зонах, например мидии, во время отлива также испытывают гипоксию. Гипоксия вызывает целый комплекс нарушений в организме двусторчатых моллюсков. На клеточном уровне гипоксия может индуцировать автоокисление дыхательных пигментов, угнетает обмен веществ, а также снижает иммунные функции гемоцитов в гемолимфе.

Моделирование гипоксических условий в экспериментах *in vitro* можно реализовать воздействием на эритроциты и гемоциты раствором перекиси [2].

В ряде работ было показано, что воздействие фуллерена может снижать окислительный стресс [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры являются удобной модельной системой для исследования окислительного стресса *in vitro* при различных патологических процессах, поскольку их использование позволяет исключить многие неспецифические факторы, сопровождающие индукцию свободнорадикального окисления *in vivo*. При этом пероксид водорода (H₂O₂), применяемый в моделировании окислительного стресса, способен индуцировать апоптотическую гибель клеток.

Отбор проб для эксперимента происходил следующим образом:

Из хвостовой артерии скорпены *Scorpena porcus* Linnaeus была отобрана кровь. После чего её промывали и центрифугировали 3 раза, для выпадения эритроцитов в осадок и дальнейшей работы с ними.

Далее кровь смешивалась со средой (состав среды: 128 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 15 mM HEPES, 2.2 mM glucose), для получения раствора, использовавшегося в эксперименте.

Окислительный стресс моделировался пероксидом водорода в различных концентрациях (1M и 0,3mM): брали две пробирки со средой, в одну помещали 1M пероксида водорода, в другую 0,3mM (на рис. 1 эти пробирки, с уже добавленными эритроцитами, помечены номерами 2.1 и 2.2 соответственно).

Также поступили с фуллереном C₆₀: к 100 мкл водорастворимого C₆₀ добавили 900 мкл среды (на рис. 1 пробирка под номером 3.1); к 10 мкл C₆₀ добавили 990 мкл среды (на рис. 1 пробирка под номером 3.2).

Далее, чтобы выявить наличие влияния фуллерена C₆₀ на окислительный стресс, смешали часть раствора с низкой концентрацией фуллерена C₆₀ и часть раствора с высокой концентрацией пероксида водорода (пробирки 3.2 и 2.1).

Пробирка под номером 1 – контроль: смесь эритроцитов и среды, без добавления пероксида водорода и фуллерена C₆₀.



Рисунок 1. Основные пробы, задействованные в эксперименте

1 (Контроль) – смесь эритроцитов и среды;

2.1 – смесь высокой (1M) концентрации пероксида водорода со средой;

2.2 – смесь низкой (0,3 mM) концентрации пероксида водорода со средой;

3.1 – смесь высокой концентрации фуллерена C_{60} со средой;

3.2 – смесь низкой концентрации фуллерена C_{60} со средой;

4.1 – смесь раствора с низкой концентрацией фуллерена C_{60} и раствора с высокой концентрацией пероксида водорода.

В кювету наливали 1 мл среды, после чего добавляли клетки, чтобы выйти на первую точку при светопропускании 50-60%. Далее добавляли в 4 раза меньше клеток и 250 мкл воды при, помимо этого, после каждого разбавления, происходил отбор проб объемом 100 мкл для осмотического теста.

При титровании концентрация клеток остаётся постоянной, а так как титрование осуществляется водой, меняется осмолярность среды и, соответственно, осмотическое давление клеток, приводящее к лизису.

Цельная кровь (суспензия эритроцитов в белковом растворе - плазме) является неньютоновской жидкостью вследствие агрегации эритроцитов.

Эритроцит в норме имеет форму двояковогнутого диска диаметром около 8 мкм. Он может существенно менять свою форму, например, при различной осмолярности среды (рис.2) [4].

В неподвижной крови эритроциты агрегируют, образуя так называемые «монетные столбики», состоящие из 6-8 эритроцитов. Электронно-микроскопическое исследование тончайших срезов монетных столбиков выявило параллельность поверхностей прилегающих эритроцитов и постоянное межэритроцитарное расстояние при агрегации (рис. 3).

На рисунке 3 показана (зарисовка) агрегация цельной крови во влажных мазках, которая представляет собой большие конгломераты, состоящие из многих монетных столбиков. При перемешивании крови агрегаты разрушаются, а после прекращения перемешивания вновь восстанавливаются [4].

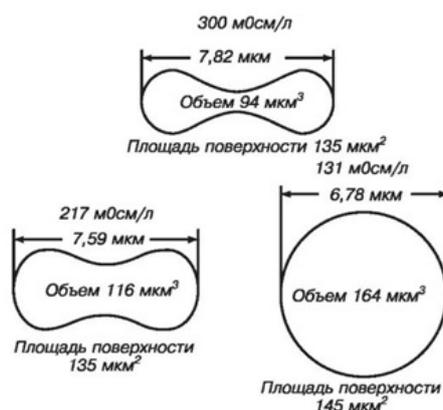


Рисунок 2. Вариации формы эритроцитов



Рисунок 3. Агрегация цельной крови во влажных мазках, «монетные столбики»

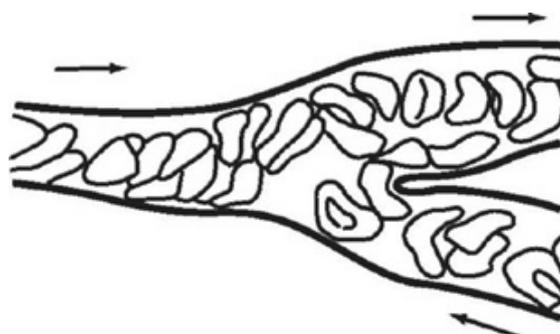


Рисунок 4. Течение крови в капиллярах

При протекании крови по капиллярам агрегаты эритроцитов распадаются и вязкость падает.

Вживление специальных прозрачных окошек в кожные складки позволило сфотографировать течение крови в капиллярах. На рисунке 4, выполненном по такой фотографии, отчетливо видна деформация кровяных клеток [4].

Деформируясь, эритроциты могут продвигаться один за другим в капиллярах диаметром всего 3 мкм. Именно в таких тонких капиллярных сосудах и происходит газообмен между кровью и тканями [4].

В ходе эксперимента было показано, что пероксид водорода влияет на мембраны эритроцитов, моделируя окислительный стресс, что приводит к апоптозу эритроцитов. Фуллерен C_{60} же, в свою очередь, компенсирует влияние пероксида водорода на мембраны эритроцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБУЖДЕНИЕ

Эксперимент с эритроцитами проводился с помощью анализатора «Ласка-ТМ» и были получены следующие данные.

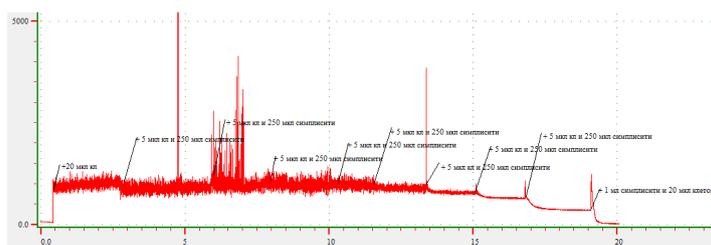


Рисунок 5. Светорассеяние суспензии эритроцитов контрольной группы при изменении осмолярности среды

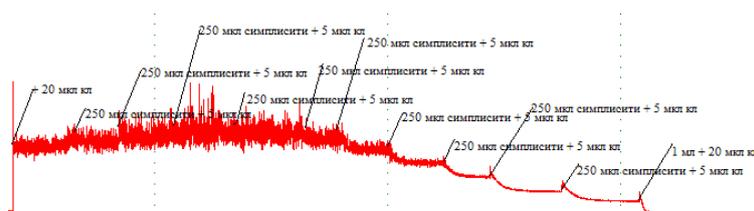


Рисунок 6. Данные по светорассеянию при взаимодействии низкой концентрации перекиси водорода с эритроцитами *Scorpaena porcus Linnaeus*

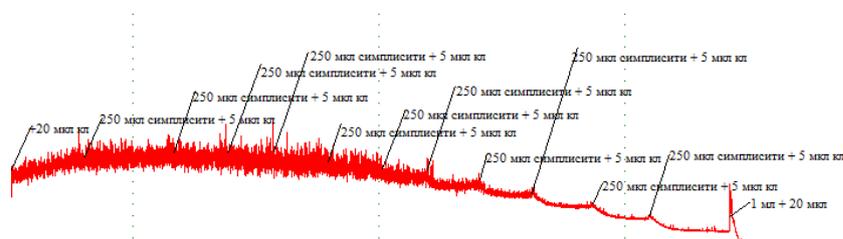


Рисунок 7. Данные по светорассеянию при взаимодействии высокой концентрации перекиси водорода с эритроцитами *Scorpaena porcus Linnaeus*

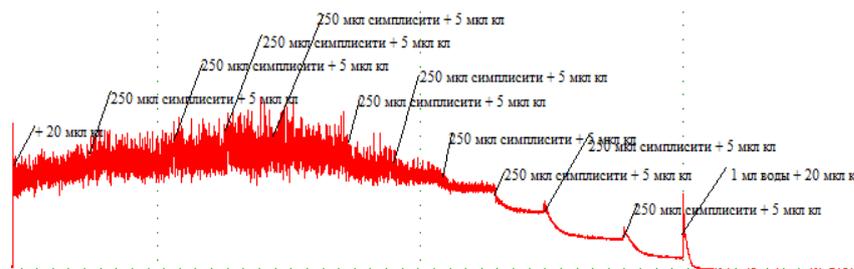


Рисунок 8. Данные по светорассеянию при взаимодействии высокой концентрации фуллерена C_{60} с эритроцитами *Scorpaena porcus Linnaeus*

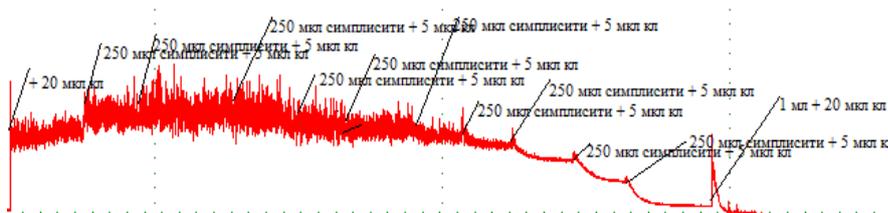


Рисунок 9. Данные по светорассеянию при взаимодействии низкой концентрации фуллерена C_{60} с эритроцитами *Scorpaena porcus Linnaeus*

По представленным на рисунках 5-9 данным можно определить начало лизиса эритроцитов *Scorpaena porcus Linnaeus*, а также построить кривые, визуализирующие осмотическую стойкость эритроцитов при воздействии (или отсутствии воздействия) внешних раздражителей.

На рисунках 5-9 отмечены точки разбавления и отбора проб для осмотеста, началом лизиса можно назвать характерный резкий спад кривой, для рисунка 6, например, лизис начался на седьмой точке, а на рисунках 7 и 8 видно, что набухание клеток происходило гораздо активнее, несмотря на то, что их разрыв тоже произошел на после седьмых точек.

Кривые, визуализирующие осмотическую стойкость эритроцитов при воздействии (или отсутствии воздействия) внешних раздражителей, приведены ниже.

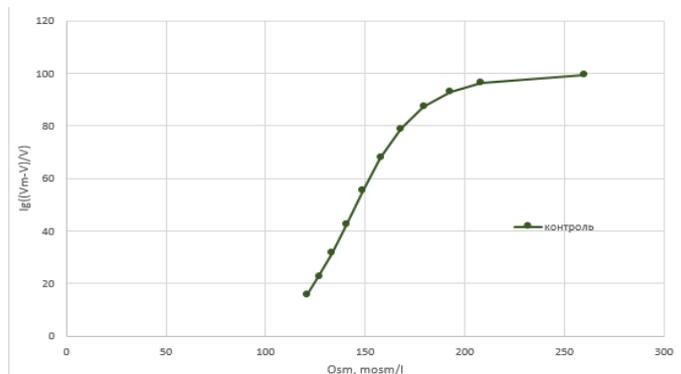


Рисунок 10. Кривая, визуализирующая осмотическую стойкость эритроцитов в отсутствии окислительного стресса

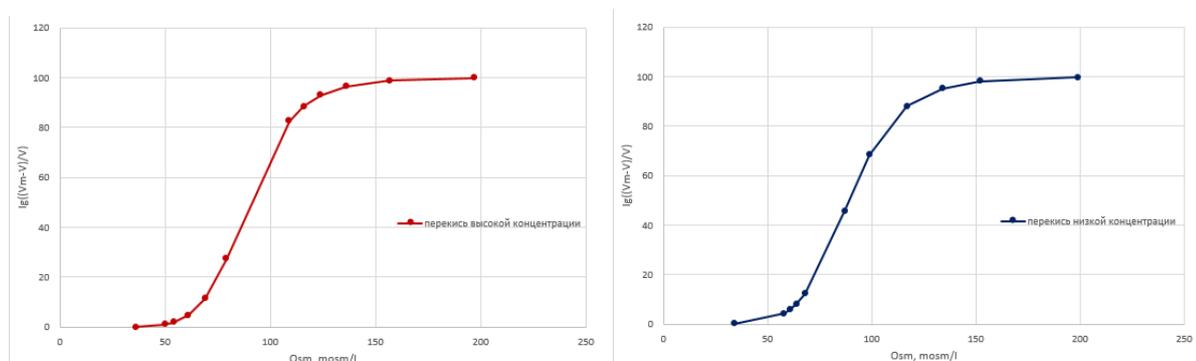


Рисунок 11. Кривые, визуализирующие осмотическую стойкость эритроцитов при взаимодействии с высокой (левая кривая) и низкой (правая кривая) концентрацией пероксида водорода

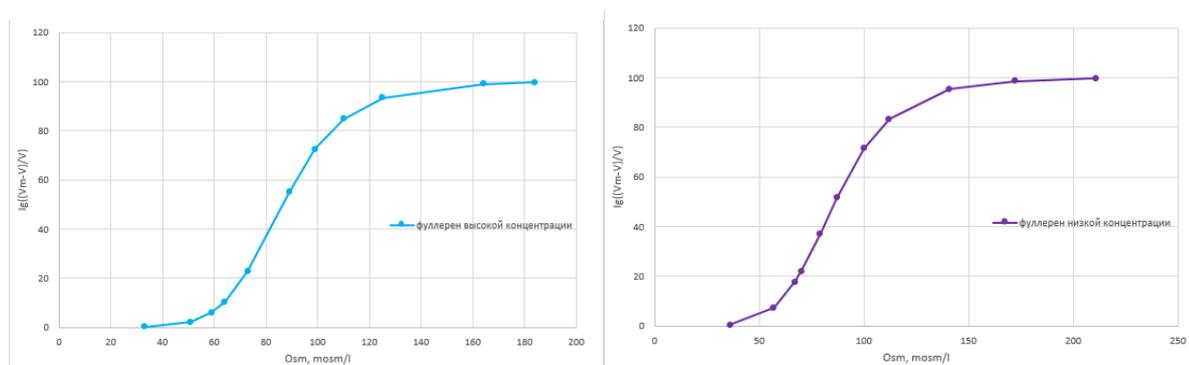


Рисунок 12. Кривые, визуализирующие осмотическую стойкость эритроцитов при взаимодействии с высокой (левая кривая) и низкой (правая кривая) концентрацией фуллерена C_{60}

По полученным экспериментальным данным были определены значения H_{50} – осмолярность, при которой лизирует 50 % от первоначального количества клеток (табл. 1).

Таблица 1. Значения осмолярности, при которых лизирует 50% клеток

№ пробирки	H_{50}
1	149
2.2	124
3.1	154
3.2	152
4.1	147

На рисунке 13 представлен результирующий график зависимости процента целых клеток от осмолярности среды, из которого видно, что кривые контроля и смеси фуллерена C_{60} с пероксидом водорода практически совпадают, из чего можно сделать вывод, что фуллерен C_{60} повлиял на окислительный стресс, частично компенсируя его воздействие. Также, из графика видно, что фуллерен C_{60} в любых концентрациях практически не повлиял на эритроциты, из чего можно сделать вывод, что он не действует губительно на клетки крови.

Из таблицы и графика видно, что значение H_{50} для клеток, обработанных перекисью, существенно меньше, чем у других образцов, т.е. в этом случае мембраны таких клеток становятся более жесткими. Повышение жесткости мембран может привести к ухудшению сосудистого кровотока, особенно при прохождении по капиллярам эритроциты будут не способны менять свой объём, что приведет к ухудшению газообмена в клетках.

Таким образом, в ходе эксперимента было показано, что пероксид водорода, моделируя окислительный стресс, влияет на мембраны эритроцитов, что приводит к увеличению их жесткости. Фуллерен C_{60} же, в свою очередь, компенсирует влияние пероксида водорода на мембраны эритроцитов.

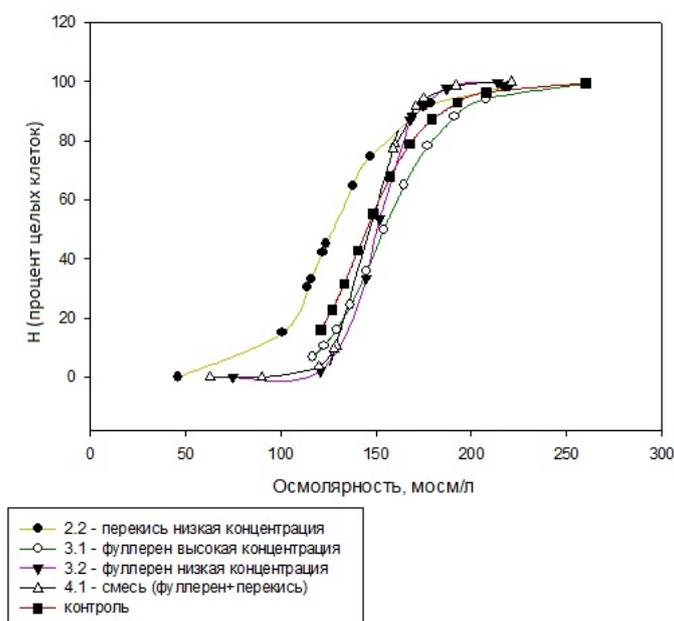


Рисунок 13. Результирующий график зависимости процента целых клеток от осмолярности среды

Список литературы / References:

1. Солдатов А.А. Функциональные аспекты существования морских организмов в зонах острой гипоксии. *Труды ИБВВ РАН*, 2019, вып. 88, № 91. [Soldatov A.A. Functional aspects of the existence of marine organisms in areas of acute hypoxia. *Proceedings of IBVV RAS*, 2019, vol. 88, no. 91. (In Russ.)]
2. Шахристова Е.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Носарева О.Л. Индукция пероксидом водорода окислительного стресса *in vitro* в эпителиальных клетках молочной железы для изучения апоптоза опухолевых клеток линии MCF-7. *Сибирский научный медицинский журнал*, 2015, т. 35, № 2. [Shakhristova E.V., Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A., Nosareva O.L. Induction of oxidative stress by hydrogen peroxide *in vitro* in mammary epithelial cells to study the apoptosis of MCF-7 tumor cells. *Siberian Scientific Medical Journal*, 2015, vol. 35, no. 2. (In Russ.)]
3. Орлова М.А., Трофимова Т.П., Орлов А.П., Шаталов О.А., Свистунов А.А., Наполов Ю.К., Чехонин В.П., Фуллерены и оксидативный стресс. *Онкогематология*, 2012, вып. 4, с. 11-15. [Orlova M.A., Trofimova T.P., Orlov A.P., Shatalov O.A., Svistunov A.A., Napolov Yu.K., Chekhonin V.P. Fullerenes and oxidative stress. *Oncohematology*, 2012, iss. 4, pp. 11-15. (In Russ.)]
4. Федорова В.Н., Фаустов Е.В. *Медицинская и биологическая физика*. Курс лекций с задачами: учеб. Пособие, 2008, 592 с. [Fedorova V.N., Faustov E.V. *Medical and biological physics*. Course of lectures with tasks: textbook. Manual, 2008, 592 p. (In Russ.)]

INFLUENCE OF NANOPARTICLES ON THE MECHANICAL PROPERTIES OF SCORPENA PORCUS ERYTHROCYTE MEMBRANES**Kalpa V.A.^{1,2}, Gadzhi A.V.², Lantushenko A.O.²**¹ Marine Hydrophysical Institute of RAS

st. Kapitan, 2, 299011, Sevastopol, Russia; e-mail: vel.kalpa@gmail.com

² Sevastopol State University

st. Universitetskaya, 33, 299053, Sevastopol, Russia

Abstract. In the process of vital activity, aquatic organisms are constantly under the influence of biotic and abiotic factors. Bottom organisms and inhabitants of intertidal zones may experience a lack of oxygen (hypoxia). In addition, hypoxic conditions can occur when phytoplankton and algae overgrow (bloom), actively absorbing oxygen dissolved in water. Aquatic organisms in intertidal zones at low tide also experience hypoxia. At the cellular level, hypoxia can induce autooxidation of respiratory pigments, inhibits metabolism, and also reduces the immune functions of hemocytes in the hemolymph. In this work, the modeling of hypoxic conditions in *in vitro* experiments was implemented by exposing erythrocytes and hemocytes to a solution of hydrogen peroxide. The effect of fullerene on the induction of oxidative stress was also investigated. It was also shown that the addition of phthalates at a concentration of 0.4 mg / L led to the death of most mollusks within 24 hours, and at a concentration of 10 times more, all mollusks participating in the experiment died.

Key words: hydrobionts, hemolymph, oxidative stress, fullerene C₆₀.