



УДК 577.352.33:597.4/.5:597.8

СЕЗОННЫЕ КОЛЕБАНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ МИКРОВАЗКОСТИ, ПОЛЯРНОСТИ И СОРБЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН *CYPRINUS CARPIO* И *RANA RIDIBUNDA*

**С.Д. Чернявских,
С.В. Недопёкина**

Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет, Россия, 308015,
г. Белгород, ул. Победы, 85

E-mail: nedopekina_sv@mail.ru

Изучены сезонные колебания относительной микровязкости, полярности и сорбционной способности эритроцитарных мембран *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda*. В липидном бислое мембран эритроцитов сазана самые высокие значения показателей относительной микровязкости и полярности регистрируются весной, самые низкие – летом, в зоне белок-липидных контактов – летом и зимой соответственно. У лягушки самые высокие значения микровязкости и полярности как липидной фазы, так и зоны аннулярных липидов эритроцитарных мембран отмечаются летом, самые низкие – зимой. Показатели сорбционной способности красных клеток крови в весенний и, особенно, в летний периоды у сазана повышаются, у лягушек – снижаются по сравнению с осенним и зимним сезонами.

Ключевые слова: относительная микровязкость, полярность, сорбционная способность, эритроцитарные мембраны, сазан, лягушка.

Введение

Биологические мембраны играют важную роль в нормальном строении и функционировании клеток [1]. Ограничивая клетку снаружи, они первыми реагируют на изменяющиеся условия внешней среды [2]. Динамические свойства цитоплазматических мембран обусловлены текучестью липидного бислоя [3, 4]. В научной литературе наиболее детально изучены структурно-функциональные особенности мембраны эритроцитов млекопитающих животных и человека [5], в частности, достаточно подробно рассмотрен процесс исследования микровязкости клеточных мембран методом диффузии гидрофобного зонда пирена [6, 7, 8], показано влияние разных факторов на текучесть клеток крови [9, 10]. Описаны особенности сорбционной способности гемоцитов млекопитающих [11, 12], показано воздействие различных факторов на данный показатель [13, 14]. Исследования морфофункциональных характеристик ядерных эритроцитов, в частности гемоцитов пойкилотермных животных, в научной литературе ограничены. В хронобиологических исследованиях практически отсутствуют сведения о сезонных изменениях структурно-функциональных показателей красных клеток крови у представителей классов Костные рыбы и Земноводные. Исходя из вышеизложенного, изучение сезонных колебаний показателей микровязкости, полярности и сорбционной способности эритроцитарных мембран у *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda* является актуальным.

Объекты и методы исследования

Исследования были проведены на сазанах (*Cyprinus carpio*) (30 особей) и лягушках (*Rana ridibunda*) (30 особей). В работе использовали периферическую кровь, взятую у наркотизированных эфиром животных. Объектами исследования служили ядерные эритроциты. У сазана кровь брали из хвостовой вены, у лягушки – из сердца. В качестве антикоагулянта использовали гепарин в количестве 10 ед./мл. Полученную кровь центрифугировали 4 мин. при 400 g, отбирали суспензию эритроцитов.

Оценку относительной микровязкости мембран красных клеток крови осуществляли методом латеральной диффузии гидрофобного зонда пирена (C₁₆H₁₀) [15]. Суспензию эритроцитов разводили физиологическим раствором до оптической плотности 0.700 ед. (в 0.5 см кювете при длине волны поглощения 650 нм). Инкубацию суспензии клеток с пиреном (Koh Light) (3 мкМ на 1 мл суспензии) проводили при комнатной температуре в течение 1 мин. при постоянном встряхивании. Коэффициент эксимеризации пирена (F₀/F_M) рассчитывали по отношению интенсивности флуоресценции эксимеров (длина волны испускания 470 нм) и мономеров (длина волны испускания 395 нм). Данный коэффициент находится в обратной зависимости от относительной микровязкости [16]. Микровязкость липидного бислоя эритроци-



тарных мембран оценивали при длине волны возбуждения 334 нм, микровязкость зон белок-липидных контактов – при 286 нм. Полярность липидного бислоя и зон белок-липидных контактов мембран эритроцитов оценивали по соотношению интенсивности флуоресценции двух мономерных форм F_{372}/F_{393} в тонкой структуре пирена при длинах возбуждения 334 и 286 нм соответственно. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофотометре СФ-56 (Ломо Спектр, г. Санкт-Петербург).

Сорбционную способность эритроцитарных мембран (ССЭ) определяли по степени поглощения красителя (метиленовый синий) эритроцитарной массой [17]. К 1 мл суспензии эритроцитов добавляли 3 мл 0.025%-ного раствора метиленового синего, инкубировали 3 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 400 g в течение 4 мин. С помощью ФЭК при длине волны 630 нм определяли оптическую плотность исходного раствора и надосаточной жидкости в единицах экстинкции по отношению к изотоническому раствору NaCl [18]. Сорбционную способность эритроцитов рассчитывали по формуле:

$$ССЭ = 100 - \frac{C_x \cdot 100}{B},$$

где B – оптическая плотность красителя до инкубации с эритроцитами, C_x – оптическая плотность надосаточной жидкости.

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики. С помощью компьютерных программ Excel 7.0 и Statistica 6.0 вычисляли значение средней арифметической выборочной совокупности (M) и стандартной ошибки среднего значения (m). С использованием непарного (двухвыборочного) t -критерия Стьюдента определяли достоверность различий между значениями признаков сравниваемых групп. За уровень статистически значимых принимали изменения при $p < 0.05$ [19].

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования относительной микровязкости и полярности мембран эритроцитов *Syrpinus carpio* в разные сезоны года приведены в табл. 1.

Таблица 1

Коэффициенты, характеризующие относительную микровязкость и полярность мембран эритроцитов *Syrpinus carpio* в разные сезоны года

Коэффициенты эксимеризации пирена, ед. изм.	Сезон года			
	Осень	Зима	Весна	Лето
$F_9/F_{M(334)}$, усл. ед. $\times 10^{-3}$	3.6 \pm 0.4	3.3 \pm 0.3	2.5 \pm 0.1 * \textcircled{R}	7.1 \pm 0.1 * $\textcircled{R}\#$
$F_9/F_{M(286)}$, усл. ед. $\times 10^{-3}$	4.2 \pm 0.1	6.0 \pm 0.5 *	4.2 \pm 0.1 \textcircled{R}	3.7 \pm 0.1 * $\textcircled{R}\#$
$F_{372}/F_{393(334)}$, усл. ед. $\times 10^{-4}$	0.8 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1 * $\textcircled{R}\#$
$F_{372}/F_{393(286)}$, усл. ед. $\times 10^{-4}$	1.5 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1 * \textcircled{R}	1.1 \pm 0.1 * \textcircled{R}

Примечание (здесь и в табл. 2–3). Достоверность различий: * – по сравнению с осенним периодом, \textcircled{R} – по сравнению с зимним периодом, # – по сравнению с весенним периодом по t -критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

Как видно из таблицы, коэффициент эксимеризации пирена $F_9/F_{M(334)}$, характеризующий текучесть липидного бислоя мембраны эритроцитов сазана, в зимний период практически не изменяется по сравнению с осенним сезоном. Весной наблюдается уменьшение данного показателя на 31% по сравнению с осенью, летом – увеличение в 2 раза по сравнению с осенью и зимой и практически в 3 раза по сравнению с весной.

Коэффициент эксимеризации пирена в зоне белок-липидных контактов $F_9/F_{M(286)}$ в зимний период по сравнению с осенним повышается на 43%. Весной наблюдается снижение текучести мембраны эритроцитов сазана в зоне белок-липидных контактов на 30% по сравнению с зимним сезоном. Данный показатель уменьшается летом на 22% по сравнению с осенью и весной и на 38% по сравнению с зимой.

Полярность липидного бислоя мембран эритроцитов *Syrpinus carpio* в зимний и весенний периоды по сравнению с осенью достоверно не изменяется. Летом параметр $F_{372}/F_{393(334)}$ возрастает практически в 3 раза по сравнению с другими периодами, полярность липидного бислоя соответственно снижается.



Показатель полярности зоны аннулярных липидов в зимний период также достоверно не изменяется по сравнению с осенью. Весной и летом параметр $F_{372}/F_{393(286)}$ на 27% ниже, чем осенью и зимой, что свидетельствует об увеличении полярности в зоне аннулярных липидов.

Таким образом, относительная микровязкость и полярность липидного бислоя эритроцитарных мембран у сазана изменяются по сезонам: самые низкие значения показателей отмечаются летом, самые высокие – весной. В зоне белок-липидных контактов значения выше-названных показателей в летний период, напротив, самые высокие, в зимний – самые низкие.

Результаты исследования относительной микровязкости и полярности мембран эритроцитов лягушки в различные сезоны года приведены в таблице 2.

Таблица 2

Коэффициенты, характеризующие относительную микровязкость и полярность мембран эритроцитов *Rana ridibunda* в разные сезоны года

Коэффициенты эксимеризации пирена, ед. изм.	Сезон года			
	Осень	Зима	Весна	Лето
$F_a/F_{M(334)}$, усл. ед. $\times 10^{-3}$	25.4±0.9	38.7±1.2 *	10.9±1.0 *®	11.2±1.7 *®
$F_a/F_{M(286)}$, усл. ед. $\times 10^{-3}$	53.7±2.3	58.6±1.8	38.8±5.5 *®	33.0±7.4 *®
$F_{372}/F_{393(334)}$, усл. ед. $\times 10^{-4}$	2.8±0.2	3.8±0.1 *	3.0±0.3 ®	2.6±0.3 ®
$F_{372}/F_{393(286)}$, усл. ед. $\times 10^{-4}$	26.3±0.1	27.9±0.2 *	10.7±1.5 ®	7.7±1.5 *®

Как видно из таблицы, показатель текучести липидного бислоя мембраны эритроцитов лягушки в зимний период увеличивается на 52%, в весенний и летний периоды снижается на 57 и 56% по сравнению с осенним сезоном. В весенний и летний периоды данный показатель ниже, чем в зимний сезон на 72 и 71%, соответственно.

Текучесть мембраны эритроцитов *Rana ridibunda* в зоне белок-липидных контактов весной и летом уменьшается на 28 и 39% по сравнению с осенью и на 34 и 44% – по сравнению с зимой.

Значение параметра $F_{372}/F_{393(334)}$ в зимний период по сравнению с осенью повышается на 36%, что свидетельствует о снижении полярности в зоне белок-липидных контактов эритроцитарной мембраны лягушек. В весенний и летний периоды наблюдается уменьшение значения данного показателя на 21 и 32% по сравнению с зимним сезоном.

Параметр полярности зоны аннулярных липидов у красных клеток крови *Rana ridibunda* в зимний период увеличивается на 6%, в весенний и летний сезоны – снижается на 59 и 71% соответственно по сравнению с осенним периодом. Весной и летом показатель $F_{372}/F_{393(286)}$ на 62 и 72% ниже, чем зимой, полярность в зоне аннулярных липидов соответственно выше.

Таким образом, микровязкость и полярность липидного бислоя и зоны белок-липидных контактов мембран *Rana ridibunda* также, как и у *Cyprinus carpio*, изменяются по сезонам: самые высокие значения отмечаются летом, самые низкие – зимой. Низкие значения показателей микровязкости мембраны эритроцитов в зимний период свидетельствуют о высокой функциональной активности клеток изучаемого пула у лягушки озерной в этот сезон года [20].

Результаты исследования ССЭ *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda* в разные периоды года приведены в таблице 3.

Таблица 3

Сорбционная способность мембран эритроцитов *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda* в разные сезоны года

Вид животного	Сезон года			
	Осень	Зима	Весна	Лето
<i>Cyprinus carpio</i>	78.01±1.31	90.82±0.27 *	95.27±1.13 *®	99.14±0.13 *®#
<i>Rana ridibunda</i>	93.20±1.21	93.18±0.99	83.75±0.79 *®	81.51±0.2 *®#

У сазана в зимний, весенний и летний периоды сорбционная способность эритроцитарной мембраны повышается на 16, 22 и 27% по сравнению с осенью. Весной и летом значение данного показателя на 5 и 9% выше, чем зимой. Летом сорбционная способность мембраны эритроцитов *Cyprinus carpio* увеличивается на 4% по сравнению с весной.

Показатели сорбционной способности мембран эритроцитов *Rana ridibunda* одинаково высокие в осенний и зимний сезоны. Весной ССЭ лягушки ниже на 10 и 10% по сравнению с осенью и зимой. В летний период показатель сорбционной способности эритроцитов лягушки уменьшается на 12% по сравнению с осенью и зимой и на 3% по сравнению с весной.

Таким образом, значения показателя сорбционной способности красных клеток крови в весенний и, особенно, в летний периоды у сазана повышаются, у лягушек – снижаются по



сравнению с осенним и зимним сезонами [21]. Соответственно, у *Cyprinus carpio* в весенний и летний сезоны, у *Rana ridibunda* – в осенний и зимний периоды более высокие значения данного показателя могут способствовать улучшению адсорбции и удалению токсинов, продуктов метаболизма, а также иммунных комплексов [17].

Выводы

1. Относительная микровязкость, полярность и сорбционная способность эритроцитарных мембран у *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda* изменяются по сезонам.

2. У сазана самые высокие значения показателей микровязкости и полярности в липидном бислое мембран эритроцитов регистрируются весной, самые низкие – летом, в зоне белок-липидных контактов – летом и зимой соответственно. У лягушки самые высокие значения микровязкости и полярности как липидной фазы, так и зоны аннулярных липидов эритроцитарных мембран отмечаются летом, самые низкие – зимой.

3. Сорбционная способность красных клеток крови в весенний и, особенно, в летний периоды у сазана повышается, у лягушки – снижается по сравнению с осенним и зимним сезонами.

Список литературы

1. Болдырев А.А. Введение в биомембранологию. – М.: Изд-во Московского университета, 1990. – 208 с.
2. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
3. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Динамическая структура липидного бислоя. – М.: Наука, 1981. – 296 с.
4. Molecular Biology Of The Cell / В. Alberts, А. Johnson, J. Lewis et al. – 5th ed. – New York: Garland Science, 2007. – 364 p.
5. Мэдди Э. Биохимическое исследование мембран. – М.: Мир, 1979. – 460 с.
6. Изменение микровязкости мембран лимфоцитов и эритроцитов крови у онкологических больных / И.А. Горошинская, Л.Ю. Глотина, Е.И. Горло и др. // Вопр. мед. химии. – 1999. – Т. 45. – № 1. – С. 53–57.
7. Влияние плеторического введения перфторана на параметры структурно-функционального состояния мембран эритроцитов / Н.Б. Кармен, Н.П. Милюткина, А.А. Орлов и др. // Росс. биомед. журн. – 2004. – Т. 5. – С. 128–129.
8. Изучение структурных свойств мембраны эритроцитов методом флуоресцентного зондирования в динамике нитритной метгемоглобинемии / О.Н. Филиппова, И.А. Шперлинг, В.В. Новицкий и др. // Фундамент. исследования. – 2005. – № 4. – С. 90–91.
9. Лупенко М.Т., Андриевская И.А., Ипугина Н.А. Изменение микровязкости мембран эритроцитов периферической крови при обострении герпес-вирусной инфекции у беременных // Инф. и сист. управления. – 2010. – № 2 (24). – С. 98–100.
10. Изменения физико-химических свойств биологических мембран при развитии толерантности к этанолу / С.А. Сторожок, Л.Ф. Панченко, Ю.Д. Филиппович, В.С. Глушков // Вопр. мед. химии. – 2001. – Т. 47. – № 2 – С. 198–208.
11. Изменения структурно-функционального состояния мембран эритроцитов у онкологических больных / Л.М. Гунина, А.П. Кабан, В.М. Войницкий, Л.Е. Шевченко // II съезд биофизиков России. Тезисы. Раздел 9. Мед. биофизика. – М., 1999. – С. 665–666.
12. Гунина Л.М., Кабан А.П., Коробко В.Б. Роль изменений структурно-функционального состояния мембраны эритроцита в развитии анемии у больных раком желудка // Онкология. – 2000. – Т. 2. – № 4. – С. 247–249.
13. Добротина Н.А., Копыткова Т.В., Щелчкова Н.А. Характеристика функционального состояния мембран эритроцитов при эндогенной интоксикации у больных хроническими распространенными дерматозами // Успехи совр. естествознания. – 2010. – № 2. – С. 39–43.
14. Сравнительная характеристика функциональных параметров эритроцитов крови больных хроническим пиелонефритом и гломерулонефритом / Л.Е. Муравлёва, В.Б. Мологов-Лучанский, Д.А. Клюев и др. // Совр. пробл. науки и образования. – 2011. – № 2. – С. 74–77.
15. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. – М.: Наука, 1980. – 320 с.
16. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. – М.: Наука, 1989. – 227 с.
17. Додхоев Д.С. Особенности проницаемости эритроцитарных мембран и сорбционная способность эритроцитов у здоровых доношенных новорожденных детей и их матерей // Физиол. человека. – 1998. – Т. 24. – № 2. – С. 135–137.
18. Сим Э. Биохимия мембран: Пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – 110 с.
19. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.
20. Камкин А.Г., Киселева И.С. Физиология и молекулярная биология мембран клеток. – М.: Изд. центр «Академия», 2008. – 592 с.



21. Недопёкина С.В., Нгуен Тхи Тьук, То Тхи Бик Тхуи Структурно-функциональные особенности мембран ядерных эритроцитов // Сборник научн. Трудов 16 междунар. Пуцинской школы-конференции «Биология наука XXI века». – Пушино, 2012. – С. 432–433.

SEASONAL FLUCTUATIONS OF THE RELATIVE MICROVISCOSITY, POLARITY AND SORPTION CAPABILITY OF *CYPRINUS CARPIO* AND *RANA RIDIBUNDA*'S ERYTHROCYTE MEMBRANES

**S.D. Chernyavskikh,
S.V. Nedopekina**

*Belgorod State National Research
University, 85, Pobedy St., Belgorod,
308015, Russia*

E-mail: nedopekina_sv@mail.ru

Seasonal fluctuations of the relative microviscosity, polarity and sorption capability of *Cyprinus carpio* and *Rana ridibunda*'s erythrocyte membranes have been studied. The highest values of relative microviscosity and polarity of carp's erythrocyte membranes have been recorded in the lipid bilayer in the spring, the lowest - in the summer; respectively, in summer and winter in the area of protein-lipid contact. The frog had the highest values of microviscosity and polarity of both lipid phase and annular lipid area of erythrocyte membrane in summer, the lowest - in winter. Sorption capability parameters of red blood cells of carp rose in spring and, in summer especially; of frogs - reduced compared to fall and winter.

Keywords: relative microviscosity, polarity, sorption capability, erythrocyte membrane, carp, frog.