

УДК 547.42: 612.111

## РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ НЕКОТОРЫХ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ ПРИ ГИПООСМИИ И ВОЗДЕЙСТВИИ НЕИОННЫХ ДЕТЕРГЕНТОВ ТРИТОНА X-100 И ТВИНА-20

© 2021 г. Ю.А. Силкин, Е.Н. Силкина, М.Ю. Силкин

Карадагская научная станция им. Т. И. Вяземского — природный заповедник РАН,  
298188, Крым, Феодосия, п/о Курортное, ул. Науки, 24

E-mail: ysilkin@mail.ru

Поступила в редакцию 02.09.2020 г.

После доработки 24.02.2021 г.

Принята к публикации 20.09.2021 г.

У четырех видов черноморских рыб — ставриды (*Trachurus mediterraneus ponticus* Aleev), ласкиря (*Diplodus annularis* L.), скорпены (*Scorpaena porcus* L.) и морской лисицы (*Raja clavata* L.) — исследованы осмотическая резистентность эритроцитов и влияние на гемолитическую активность красных клеток крови при гипоосмии неионных детергентов тритона X-100 и твина-20. Показано, что в физиологических растворах при гипоосмии эритроциты морской лисицы и скорпены проявляли высокую резистентность к действию гипотонической среды. Определение концентрации физиологического раствора, в котором за время инкубации гемолизировалось 50% эритроцитов рыб ( $C_{50\%}$ ) позволило ранжировать эритроциты рыб по степени осмотической устойчивости в следующем порядке: скорпена > морская лисица > ласкирь > ставрида. Эритроциты исследованных костистых рыб демонстрировали по  $C_{50\%}$  четкую зависимость от подвижности, которая возрастала в ряду рыб с уменьшением их двигательной активности. Тритон X-100 не вызывал повышение резистентности или даже слабо стимулировал повышение гемолитической активности эритроцитов ласкиря и морской лисицы. В эритроцитах ставриды в присутствии тритона X-100 резистентность клеток возрастала в 4.7 раза в инкубационной среде с 50%-м разведением. Протекторные свойства тритона X-100 отмечены при инкубации эритроцитов скорпены в средах с 70%-м разведением. Твин-20 также увеличивал резистентность эритроцитов рыб к гемолизу. Результаты работы показали, что твин-20 и в некоторых случаях тритон X-100 могут быть использованы для поддержания стабильности суспензий эритроцитов рыб при проведении экспериментальных исследований.

*Ключевые слова:* резистентность, эритроциты, плазматическая мембрана, гипоосмия, детергенты, рыбы.

DOI: 10.31857/S0006302921060090

Одной из важнейших характеристик эритроцитов, которая обеспечивает их устойчивость к деформационным нагрузкам при движении в кровотоке и другим стрессовым воздействиям, является резистентность их плазматической мембраны. Резистентность мембраны — это интегральная характеристика, которая позволяет оценить способность эритроцита противостоять стрессовым воздействиям, возникающим в плазме крови в ответ на воздействия факторов среды. Эритроциты млекопитающих функционируют в кровяном русле с достаточно постоянными параметрами, такими как температура, уровень гликемии, ионов, pH и др. Эритроциты низших позвоночных и, в частности, рыб, функционируют в менее упорядоченных условиях, поэтому имеют большую автономность и должны быть наделены особой резистентностью к стрессовым флуктуа-

циям. Действительно, рыбы функционируют в стрессовых условиях, связанных с гипоксией, голоданием, перепадами температуры, интоксикациями, болезнями и так далее. Все это отражается на морфофункциональных свойствах плазматической мембраны эритроцитов, очень важной органелле этих клеток, без нормального функционирования которой невозможна полноценная газотранспортная функция. Одним из экспериментальных приемов, позволяющим изучать растяжение плазматической мембраны эритроцитов, является помещение их в гипоосмотические среды. Резистентность к подобному воздействию позволяет выявить такую важную характеристику, как наличие или отсутствие мембранного «резерва», или складчатости мембраны. Дело в том, что плазматическая мембрана эритроцитов крайне слабо приспособлена к растяжению на разрыв

[1]. Ее способность противостоять гипоосмотическому набуханию обусловлена прежде всего наличием складок в ее структуре. Известно, что у низших позвоночных эритроциты обладают большей складчатостью по сравнению с эритроцитами млекопитающих. По этой причине эритроциты низших животных обладают меньшей осмотической хрупкостью в гипоосмотических средах [2]. Осмотическая хрупкость эритроцитов определяется не только свойствами мембраны эритроцитов, но также модифицирующим влиянием некоторых веществ, способных встраиваться в мембранный бислой и изменять соотношение площади поверхности клетки к ее объему. К таким веществам относятся детергенты и мембранотропные вещества [3].

В настоящем исследовании проводили сравнение резистентности эритроцитов рыб разной экологии в различных гипотоничных средах и влияние слабых неионных детергентов Тритон X-100 и Твин-20 на устойчивость эритроцитов рыб в этих средах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили эритроциты хрящевой рыбы — ската, морской лисицы (*Raja clavata* L.) и костистых рыб — ставриды (*Trachurus mediterraneus ponticus* Aleev), ласкиря (*Diplodus annularis* L.), скорпены (*Scorpaena porcus* L.).

Костистые рыбы, осмотическая резистентность эритроцитов которых исследована в настоящей работе, различались по уровню естественной подвижности. Ставрида — быстроплавающий вид, осуществляющий значительные миграции. Ласкирь — оседлый, прибрежный вид, характеризуется умеренной подвижностью с хорошими маневренными свойствами. Скорпена — оседлый вид, донная, малоподвижная, рыба — хищник-засадчик. Исследуемый скат — морская лисица — холодолюбивый вид, не отличается значительной активностью движения, однако для него характерны довольно длительные миграции с небольшой скоростью [4].

Кровь получали пункцией хвостовой артерии стеклянной пипеткой у костистых рыб и пункцией желудочка сердца шприцем — у хрящевых. У ската на опыт хватало крови от одной особи, а у костистых рыб — от пяти-семи особей. Полученную кровь помещали (в соотношении 1:20) в соответствующий физиологический раствор следующего состава: для костистых рыб — 0.18 М NaCl + 0.01 М трис-HCl, pH 7.4; для хрящевых рыб — 0.22 М NaCl + 0.3 М мочевины + 0.05 М трис-HCl, pH 7.4. Для предотвращения сворачиваемости крови использовали 5%-й раствор гепарина, которым прополаскивали пипетку, иглу и внутреннюю часть шприца, применяемых для

пункции сердца и сосудов рыб. Гепарин также добавляли в отмывающий физиологический раствор рыб из расчета 1 мл на 10 мл омывающей среды. Полученную кровь помещали в физиологический раствор в соотношении 1 : 10, центрифугировали на рефрижераторной центрифуге К-23 (MLW, Германия) и осуществляли осаждение форменных элементов крови центрифугированием в течение 5 мин при 1000–1500 об/мин. После центрифугирования эритроциты отделяли от лейкоцитов и плазмы (процедуру проводили дважды). Полученные эритроциты разводили до определенного гематокрита ( $Ht = 25\%$ ) и использовали клетки для определения их устойчивости в различных гипоосмотических условиях. Для этого в стеклянные центрифужные пробирки помещали по 2 мл гипоосмотического раствора 30, 50 и 70%-го разведения, а также дистиллированную воду. Затем в гипоосмотическую среду добавляли по 20 мкл суспензии эритроцитов, перемешивали, через 5 мин проводили центрифугирование (5 мин, 1000–1500 об/мин). Надосадочную жидкость отбирали и определяли ее оптическую плотность на спектрофотометре с использованием светофильтра с длиной волны в 550 нм. Для изучения влияния детергентов на осмотическую хрупкость эритроцитов использовали тритон X-100 и твин-20, которые добавляли в пробы в количестве 20 мкл до конечной концентрации в инкубационной среде, равной 0.01%.

Результаты выражали в процентах, за 100% брали самый высокий показатель распада клеток, когда гемоглобин выходил из эритроцита и окрашивал раствор в красный цвет. По отношению к нему рассчитывали процентную долю распада клеток в других гипотоничных средах по формуле:

$$\% \text{ Hem} = (E_0/E_{\max}) \times 100,$$

где  $E_0$  — экстинкция пробы,  $E_{\max}$  — экстинкция, соответствующая 100%-му гемолизу.

Для количественной оценки осмотической резистентности эритроцитов использовали величину осмотичности инкубационной среды (физиологического раствора), соответствующую 50%-му гемолизу клеток ( $C_{50\%}$ ), — центр распределения эритроцитов по осмотической резистентности [5].

Все результаты подвергали статистической обработке. Результаты были получены при проведении пяти-двенадцати независимых экспериментов. Данные подвергали статистической обработке и представляли как среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение, достоверность различий оценивали при помощи критерия Стьюдента.

Влияние гипоосмотической среды и неионных детергентов на количество распавшихся эритроцитов рыб разной экологии

Вид рыб	Изо- тонич- ная среда (физ. рас- твор, кон- троль № 1)	Степень гипотоничности среды (% разведения физ. раствора)				$C_{50\%}$	Изо- тонич- ная среда (физ. рас- твор + 0.01% три- тона Х-100, кон- троль № 2)	Степень гипотоничности среды (% разведения физ. раствора + 0,01% тритона Х-100)			Изо- тоничная среда (физ. раствор + 0,01% твин-20, кон- троль № 3)	Степень гипотонично- сти среды (% разведе- ния физ. раствора + 0.01% твин-20)		
		30%	50%	70%	0% (дист. H <sub>2</sub> O)			30%	50%	70%		30%	50%	70%
Став- рида	4.5 ± 0.3 n = 7	7.2 ± 0.5 n = 9	75.5 ± 7.2* n = 5	100.0 ± 0.0* n = 10	85.0 ± 7.0* n = 12	45.0 ± 2.0 n = 5	6.5 ± 0.1 n = 5	8.9 ± 0.5 n = 7	16.2 ± 1.2*(**) n = 5	100.0 ± 0.0* n = 10	—	—	—	—
Ласкирь	3.5 ± 0.4 n = 4	3.8 ± 0.4 n = 4	5.6 ± 0.7 n = 4	100.0 ± 0.0* n = 4	95.0 ± 3.0* n = 4	60.0 ± 3.5 n = 5	5.0 ± 0.5 n = 4	6.0 ± 0.3 n = 4	10.0 ± 0.5 n = 4	100.0 ± 0.0* n = 4	—	—	—	—
Скор- пена	1.7 ± 0.1 n = 9	2.4 ± 0.2 n = 9	3.2 ± 0.3 n = 9	84.3 ± 3.9* n = 8	100.0 ± 0.0* n = 12	64.0 ± 2.8 n = 5	2.4 ± 0.2 n = 9	3.6 ± 0.1 n = 9	4.5 ± 0.4 n = 9	72.6 ± 2.9*(**) n = 8	0.5 ± 0.1** n = 9	1.6 ± 0.2 n = 9	2.4 ± 0.6 n = 9	73.0 ± 1.1* n = 9
Морская лисица	2.3 ± 0.3 N = 6	3.3 ± 0.4 n = 6	10.7 ± 1.7 n = 6	75.2 ± 0.5* n = 6	100.0 ± 0.0* n = 6	62.5 ± 4.4 n = 5	2.0 ± 0.2 n = 4	3.5 ± 0.3 n = 4	8.6 ± 0.8 n = 4	72.9 ± 1.5* n = 4	2.0 ± 0.3 n = 5	2.8 ± 0.1 n = 5	8.9 ± 0.4 n = 5	70.6 ± 0.4* n = 5

Примечание.  $C_{50\%}$  — степень разведения физиологического раствора (в %), при котором происходит гемолиз 50% инкубированных эритроцитов рыб;  $n$  — число повторных опытов; \* — достоверные различия по сравнению с распадом клеток в контрольных средах собственных серий опытов с  $p < 0.05$ ; \*\* — достоверные различия по сравнению с распадом клеток в средах без добавления детергента с  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные результаты по влиянию гипоосмотических растворов разной концентрации и действия неионных детергентов на устойчивость эритроцитов рыб представлены в таблице.

Как видно из таблицы, часть эритроцитов в изотонических для рыб растворах подвергалась распаду. В ряду костистых рыб самыми стойкими были эритроциты скорпены, которые имели самый низкий показатель гемолиза, равный 1.7%. Затем следовали эритроциты ласкиря — 3.5%, эритроциты ставриды были самыми хрупкими — их показатель гемолиза равнялся 4.5%. Эритроциты морской лисицы по устойчивости немного уступали клеткам скорпены, их показатель гемолиза составлял 2.3%. В слабо гипотоничных средах, в которых физиологический раствор был разбавлен дистиллированной водой на 30%, разрушение клеток у рыб увеличивалось незначи-

тельно: у скорпены — до 2.4%, у ласкиря — до 3.8%, у морской лисицы — до 3.3% и у ставриды — до 7.2%. В 50%-й гипотоничной среде клетки скорпены сохраняли определенную устойчивость (до 3.2%), тогда как у других рыб гемолиз клеток был более выражен и составлял у ласкиря 5.6%, у морской лисицы — 10.7%. Эритроциты ставриды в этих условиях демонстрировали самую высокую гемолитическую способность (75.5%). При повышении гипотоничности среды до 70% от исходной практически все клетки ставриды и ласкиря гемолизировались, тогда как часть клеток морской лисицы и скорпены (25 и 15% соответственно) сохраняли свою устойчивость в этих средах (см. таблицу). В дистиллированной воде эритроциты рыб должны были бы демонстрировать 100%-й гемолиз, но у ставриды и ласкиря показатели экстинкции растворенного гемоглобина были меньше, чем в гипоосмотической среде с

70%-м разведением (на 15 и 5% соответственно, см. таблицу).

Устойчивость эритроцитов к гипоосмии хорошо демонстрировала величина  $C_{50\%}$ . Эти данные свидетельствовали о том, что самыми устойчивыми из исследованных рыб были эритроциты скорпены и морской лисицы, а самыми хрупкими — эритроциты ласкиря и ставриды. Кроме того, эритроциты исследованных костистых рыб демонстрировали по  $C_{50\%}$  четкую зависимость от подвижности, которая возрастала в ряду рыб с уменьшением их двигательной активности (см. таблицу).

Внесение в физиологический раствор 0.01% Тритона X-100 приводило к стимуляции гемолиза эритроцитов костистых рыб и не вызывало изменений гемолитической активности эритроцитов морской лисицы (таблица, контроли № 1 и № 2). При гипоосмии действие тритона X-100 на гемолиз эритроцитов рыб был индивидуален для каждого исследованного вида. У ставриды при 30% разведении тритон X-100 не изменял гемолитической активности эритроцитов, в то время как при 50% гипоосмии тритон X-100 в 4.7 раза тормозил гемолиз и тем самым выполнял стабилизирующую роль для плазматической мембраны эритроцитов ставриды. Стабилизация мембраны эритроцитов (на 16%) в присутствии тритона X-100 отмечена и у скорпены, но при 70%-м разведении среды. У ласкиря и морской лисицы эффекта стабилизации плазматической мембраны эритроцитов тритоном-X100 не была отмечена. У этих видов рыб при гипоосмии тритон X-100 умеренно стимулировал гемолиз, его действие соответствовало природе этого неионного детергента. Такая же тенденция воздействия тритона X-100 в эритроцитах этих рыб сохранялась при сравнении влияния гипоосмии в присутствии детергента с их собственным контролем (контроль № 2).

Добавление в инкубационную среду другого неионного детергента — твин-20 — вызывало повышение резистентной способности эритроцитов скорпены. Как видно из данных таблицы, в изотоничных средах (контроли № 1 и № 3) гемолиз эритроцитов скорпены в присутствии твин-20 уменьшался в три раза. В гипотоничных средах с твин-20 гемолитическая активность клеток скорпены относительно гипоосмии без детергента, снижалась с меньшей интенсивностью — от 13 до 34%. При сравнении действия твин-20 при гипоосмии с собственным контролем (контроль № 3) видно, что детергент закономерно стимулировал гемолиз эритроцитов с уменьшением осмотичности среды. У морской лисицы в изотонических средах твин-20 не вызывал изменений в гемолитической активности эритроцитов, а в гипотонических средах действовал, как и у скорпены, аналогичным образом — тормозил гемолиз в клетках этого вида на 7–20%, а относительно

собственного контроля вызывал рост гемолиза по мере увеличения разведения инкубационной среды.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные исследования показали, что эритроциты разных черноморских рыб имели существенные различия по осмотической резистентности. Факт различной резистентности эритроцитов рыб к действию гипотоничных растворов известен достаточно давно [6], в настоящее время основные исследования направлены на выяснение причин такой гетерогенности. Мы исследовали резистентность эритроцитов у трех видов костистых рыб (ставрида, ласкирь, скорпена), различающихся по двигательной активности, и одного хрящевого вида — морской лисицы. Принципиальным отличием между хрящевыми и костистыми рыбами является наличие в плазме скатов высокой концентрации мочевины (300 ммоль), обеспечивающей высокое осмотическое давление крови. Высокое осмотическое давление крови, по мнению ряда авторов [6, 7], существенным образом снижает осмотическую резистентность эритроцитов у сельхий (*Selachimorpha*). Наши данные не подтверждают эту закономерность. Эритроциты морской лисицы обладали существенно большей резистентностью к гипоосмии по сравнению с эритроцитами ставриды и ласкиря. Более того, эритроциты ската совсем немного уступали по этому показателю эритроцитам скорпены, показавшей самый высокий уровень гипоосмотической устойчивости среди исследованных рыб (см. таблицу). В отношении морских костистых рыб одни авторы считают, что их эритроциты имеют меньшую гипоосмотическую резистентность, чем у проходных и пресноводных видов. Более того, резистентность эритроцитов у молоди кеты (*Oncorhynchus keta*) может значительно ухудшаться в процессе смолтификации мальков, как бы подтверждая факт большей устойчивости эритроцитов у рыб, находящихся в пресноводной среде [7]. Напротив, другие авторы [8] показали, что эритроциты морских рыб имели более высокую резистентность, чем пресноводные рыбы. Известно, что снижение солености водной среды в целом коррелировало со снижением устойчивости эритроцитов рыб к гемолизу.

У исследованных нами рыб можно отметить более высокую резистентность эритроцитов у менее активных (скорпена) и холодоустойчивых (морская лисица) видов. Кроме того, в ряду костистых рыб прослеживается четкая зависимость резистентности эритроцитов рыб от их подвижности, которая закономерно возрастает с уменьшением двигательной активности. Причины этой закономерности неизвестны. Возможно, высокая

резистентность клеток обусловлена особенностями фосфолипидного состава плазматических мембран эритроцитов скорпены и морской лисицы. Липидный состав играет центральную роль в функции клеточных мембран и определяет ее физические свойства, такие как проницаемость, текучесть, резистентность к внешним и внутренним факторам среды. Важным фактором стабильности плазматической мембраны являются особенности структурной упаковки ее фосфолипидного состава мембран эритроцитов морских рыб нами ранее было показано [10], что плазматические мембраны морской лисицы и скорпены имели самые высокие индексы насыщенности жирных кислот, входящих в состав их фосфолипидов. Этот факт является подтверждением более упорядоченной упаковки плазматических мембран у этих видов в сравнении с другими рыбами, что может играть решающую роль в их высокой гипоосмотической резистентности. Хорошим дополнением к установленным закономерностям явилось определение концентрации физиологического раствора, при котором происходит 50%-й гемолиз инкубированных эритроцитов рыб ( $C_{50\%}$ ). В соответствии с определенными нами величинами  $C_{50\%}$  осмотическая устойчивость эритроцитов исследованных рыб распределялась следующим образом: самыми устойчивыми были эритроциты скорпены, затем следовали эритроциты морской лисицы, ласкиря и самыми осмотически хрупкими оказались эритроциты ставриды.

При глубокой гипоосмии, когда разведение физиологического раствора достигало 70%, эритроциты рыб гемолизировались либо на 100% (ставрида, ласкирь), либо в подавляющей своей массе: у скорпены – на 85%, а у морской лисицы – на 75%. Можно было бы ожидать, что в чистой дистиллированной воде все эритроциты должны показать 100%-й гемолиз. Однако у некоторых видов рыб (ставрида, ласкирь) оптическая плотность растворов была меньше 100%. Как мы полагаем, возможны две причины этой «аномальной» оптической плотности. Первая причина состоит в том, что часть эритроцитов остается негемолизированной в дистиллированной воде и, таким образом, не происходит выделение части гемоглобина в надосадочную жидкость. Вторая причина, возможно, связана с тем, что полный гемолиз эритроцитов осуществляется, но в дистиллированной воде часть высвобожденной клетками гемоглобина, связанного с водой, как бы образует пересыщенный раствор и осаждается в процессе центрифугирования вместе с другими фрагментами разрушенных клеток или же часть гемоглобина сорбируется этими фрагментами. Для проверки второй причины в пробирки добавляли

немного физиологического раствора до концентрации 1–2‰ и проверяли оптическую плотность супернатантов. Результаты показали, что в присутствии низкоосмотического солевого раствора оптическая плотность супернатанта возрастала до 90–95%, что указывало на переход части агрегированного гемоглобина в раствор. Таким образом, отсутствие 100%-го гемолиза эритроцитов у ставриды и ласкиря в дистилляте является артефактом, вызванным либо осаждением макромолекулярного гемоглобина, либо частичной адсорбцией гемоглобина нерастворимым в воде клеточным материалом.

Детергенты по своим свойствам относятся к амфифильным молекулам и, следовательно, благодаря этому могут встраиваться в мембрану, вызывая перегруппировку ее компонентов и в конечном итоге экстрагировать липиды и белки в мицеллярные структуры. По этой причине детергенты играют важную роль в изучении состава и свойств мембран [11]. Уже достаточно давно было установлено, что неионные детергенты (третон X-100, твин-20-40-80) в малых концентрациях способны стабилизировать мембрану эритроцитов от гипотонического гемолиза, тогда как в больших концентрациях они вызывали солилизацию мембран и гемолиз эритроцитов [12, 13]. Установлено, что для эритроцитов протекторные свойства третона X-100 и твин-20 максимальны при их концентрации, равной 0.01% [14]. В наших исследованиях мы использовали такие же концентрации детергентов для выяснения их воздействия на мембраны эритроцитов рыб. Как видно из таблицы, третон X-100 не защищал мембраны эритроцитов ласкиря и морской лисицы от гипоосмотического воздействия среды. При этом у ласкиря присутствие третона X-100 стимулировало гемолиз, а в эритроцитах морской лисицы этот эффект не проявлялся. Действие третона X-100 на эритроциты скорпены при низких разведениях среды (на 30–50%) не изменяло гемолитической активности клеток, тогда как при более высоких разведениях отмечался слабый протекторный эффект детергента. Наибольшие протекторные свойства третона X-100 были отмечены для эритроцитов ставриды в гипоосмотических средах с 50%-м разведением. В этих условиях в присутствии детергента торможение гемолиза было значительным и в 4.7 раза увеличивало резистентность клеток в сравнении с контролем. Причины столь различного отношения клеток к действию третона X-100 скорее всего обусловлены структурной организацией плазматической мембраны эритроцитов этих рыб. Мы уже указывали на то, что плазматические мембраны скорпены и морской лисицы имели самые высокие индексы насыщенности жирных кислот, т.е. имели самые жесткие ацильные цепи их фосфолипидов. Авторы работы [9] с помощью ЭПР-спектроскопии

показали, что устойчивость к детергентам у мембран выше, когда ацильные цепи более насыщены. При этом наблюдается более плотная упаковка бислоя, что и является определяющим фактором устойчивости таких мембран к действию тритона X-100 и других детергентов.

Протекторные свойства к гипоосмотическому воздействию среды на эритроциты рыб кроме тритона X-100 демонстрировал и твин-20 (см. таблицу). Это выразалось в уменьшении гемолитической активности эритроцитов рыб как в контроле (физиологический раствор), так и при гипоосмотической нагрузке. В основе такого протекторного действия твина-20 и тритона X-100 лежит способность неионных детергентов в малых концентрациях интеркалировать (встраиваться) в мембрану и увеличивать ее площадь.

Считается, что наиболее важным параметром эритроцита является отношение площади поверхности клетки к ее объему. В нормальном эритроците человека это соотношение равно 1.9. Это означает, что эритроциты человека могут почти в два раза увеличить свой объем без изменения площади мембраны. Плазматическая мембрана эритроцитов сопротивляется трем видам деформации: растяжению – сжатию, сопровождающемуся изменением площади мембраны; деформации сдвига, без изменения площади; деформации изгиба [15]. Увеличение площади поверхности мембраны эритроцита за счет растяжения на 3% приводит к ее разрыву [16]. Твин-20 и тритон X-100 благодаря тому, что они могут встраиваться в мембрану и увеличивать площадь ее поверхности, тем самым уменьшают отношение площади поверхности к объему в эритроцитах некоторых рыб. Поэтому чтобы осуществить разрыв мембраны при гипоосмотической нагрузке клетки нужно помещать в более разбавленный солевой раствор, чем до воздействия детергентов. Таким образом, исследованные неионные детергенты по-разному воздействовали на устойчивость мембран эритроцитов рыб. Тритон X-100 почти не оказывал протекторных свойств и вызывал усиление гемолиза в эритроцитах ласкиря и морской лисицы, нократно (в 4.7 раза) понижал осмотическую хрупкость эритроцитов ставриды в инкубационных средах с 50%-м разведением инкубационной среды, а в эритроцитах скорпены – на 16% даже в 70%-х гипоосмотических средах. Твин-20 характеризовался выраженным протекторным эффектом в эритроцитах всех исследуемых рыб в изо- и гипотонических средах. Поэтому твин-20 может быть использован для поддержания стабильности суспензий эритроцитов рыб при проведении экспериментальных исследований.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы Государственного задания № АААА-А19-119012490045-0 «Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов».

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах соблюдали принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского Сообщества (2010/63 EU) и положении ИВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Я. Потапенко, А. А. Кягова и А. М. Тихомиров, *Осмотическая устойчивость эритроцитов*. Учебное пособие (ГОУ ВПО ГРМУ, 2006).
2. С. И. Головкин, Автореф. дисс. ... канд. биол. наук (Ярославль, 2010).
3. A. M. Seddon, P. Curnow, and P. J. Booth, *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 105 (2004).
4. А. Н. Световидов, *Рыбы Черного моря*. (Наука, М., 1964).
5. М. А. М. Аль-Раби, Ш. И. Чалабов, М. Д. Астаева и Н. К. Кличханов, *Современные проблемы науки и образования* **2015** (3), 17364 (2015). URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=17364>.
6. Г. Н. Калашников, *Уч. записки МГУ* **33**, 65 (1939).
7. Е. Е. Изергина и И. Л. Изергин, *Исследование водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана* **23**, 18 (2011).
8. А. М. Андреева, И. П. Рябцева, И. И. Руднева и др., *Вестн. СПбГУ* **3** (4), 3 (2013).
9. P. V. Rodi, V. M. Trucco, and A. M. Gennaro, *Biophys. Chem.* **135** (1–3), 14 (2008).
10. Yu. A. Silkin, E. N. Silkina, and S. A. Zabelenskii, *J. Evol. Biochim. and Physiol.* **48** (1), 43 (2012).
11. D. Linke, *Methods Enzymol.* **463**, 603 (2009).
12. P. Seeman, *Biochem. Pharmacol.* **15**, 1753 (1966).
13. H. Hägerstrand and B. Isomaa, *Chem. Biol. Interact.* **79** (3), 335 (1991).
14. K. A. Riske, C. C. Domingues, B. R. Casadei, et al., *Biophys. Rev.* **9**, 649 (2017).
15. М. К. Боровская, Э. Э. Кузнецова, В. Г. Горохова и др., *Бюл. ВСНЦ СО РАН* **3** (73), 334 (2010).
16. Э. С. Бабаев, *Гематология и трансфузиология* **43** (1), 34 (2001).

## Resistance of Erythrocytes in Some Black Sea Hyposmic Fishes Exposed to Non-Ionic Detergents Triton-X100 and Tween-20

Yu.A. Silkin, E.N. Silkina, and M.Yu. Silkin

*Karadag Scientific Station named after T.I. Vyazemsky – nature reserve of the Russian Academy of Sciences, ul. Nauki 24, Kurortnoe, Feodosia, Crimea, 298188 Russia*

The osmotic resistance of erythrocytes and the hemolytic effect of non-ionic detergents, Triton X-100 and Tween-20, on red blood cells were analyzed using 4 hyposmic Black Sea fish species such as horse mackerel (*Trachurus mediterraneus ponticus* Aleev), gilthead (*Diplodus annularis* L.), black scorpionfish (*Scorpaena porcus* L.) and thornback ray (*Raja clavata* L.). It was shown that in physiological solutions, red blood cells from hyposmic thornback ray and black scorpionfish were highly resistant to hypotonic environment. Determination of the concentration of physiological solution, in which, during incubation, 50% of fish erythrocytes ( $C_{50\%}$ ) were hemolyzed, it was possible to rank fish erythrocytes according to the degree of osmotic resistance in the following order: black scorpionfish > thornback ray > gilthead > horse mackerel. The erythrocytes of the investigated teleost fishes exhibited a clear dependence on the mobility by  $C_{50\%}$ , which increased in some fishes with a decrease in their motor activity. Triton X-100 did not induce an increase in resistance or even weakly stimulated an increase in the hemolytic activity of erythrocytes in gilthead and thornback ray. In the presence of Triton X-100 in horse mackerel erythrocytes, cell resistance increased by a factor of 4.7 in an incubation medium with 50% dilution. Protective properties of Triton X-100 were seen during incubation of black scorpionfish erythrocytes in media with 70% dilution. Tween-20 also increased the resistance of fish erythrocytes to hemolysis. The results of this study showed that Tween-20 and, in some cases, Triton X-100 are useful in maintaining stability of fish erythrocyte suspensions during experimental studies.

*Keywords: resistance, erythrocytes, plasma membrane, hyposmia, detergents, fish*