

УДК 599.745.3: 591.111.1

## ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ У БЕЛОМОРСКИХ МОРСКИХ ЗАЙЦЕВ *ERIGNATHUS BARBATUS BARBATUS* ERXLEBEN, 1777 (PHOCIDAE) РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА

© 2024 г. И. А. Ерохина\*<sup>@</sup>

\*Мурманский морской биологический институт РАН, ул. Владимирская, 17, Мурманск, 183010 Россия

<sup>@</sup>E-mail: irina.erohina58@mail.ru

Поступила в редакцию 04.04.2023 г.

После доработки 28.06.2023 г.

Принята к публикации 29.06.2023 г.

Проведено сравнительное исследование некоторых параметров эритроцитов морских зайцев различного возраста (3 года, 5 лет, 10 лет). Установлено, что с возрастом устойчивость эритроцитарных мембран к гемолизу повышается. В период полового созревания интенсивность гликолиза в эритроцитах морских зайцев повышается и затем снижается у взрослых животных. Показаны различия в содержании калия, кальция, магния в эритроцитах животных изученных возрастных групп.

*Ключевые слова:* морской заяц, *Erignathus barbatus*, кровь, эритроциты, метаболизм

DOI: 10.31857/S1026347024010154, EDN: LJVNTC

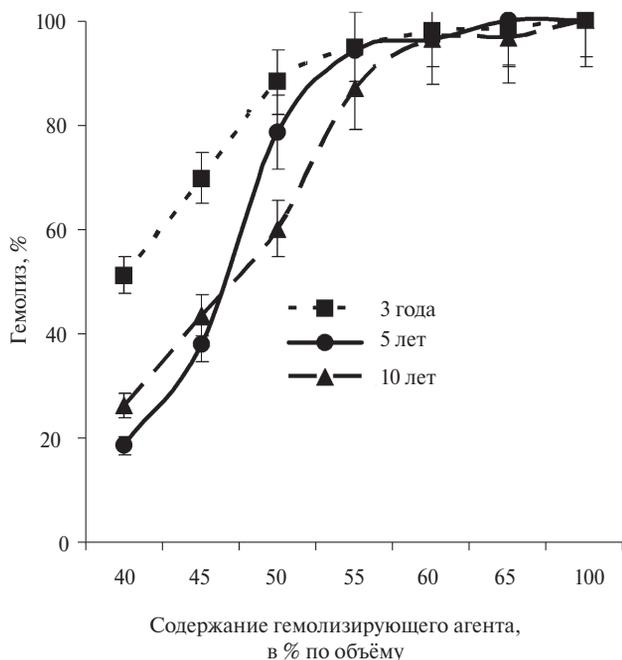
Морской заяц атлантического подвида (*Erignathus barbatus barbatus* Erxleben, 1777) является одним из наименее изученных морских млекопитающих Арктики, несмотря на его широкое распространение. Исследованиям этого вида уделяется меньше внимания, чем другим представителям лаастоногих. Отдельные работы посвящены изучению распределения, численности, репродуктивной биологии и некоторым аспектам физиологии дыхания (Andersen *et al.*, 1999; Charrier *et al.*, 2013; Светочева и др., 2017; Charmain *et al.*, 2018; Светочев, Кавцевич, 2019). В литературе практически отсутствуют сведения о метаболических характеристиках крови этих животных. В последние годы появились данные о составе крови морских зайцев Белого моря (Минзюк и др., 2015; Erokhina, Kavtsevich, 2019), Аляски (Goertz *et al.*, 2019) и Шпицбергена (Tryland *et al.*, 2021) в связи с оценкой физиологического состояния животных. Развитие такого рода исследований обусловлено интересом к вопросу использования морских млекопитающих, наряду с другими гидробионтами, в качестве видов – индикаторов состояния морских экосистем. Многочисленные публикации (Fair, Becker, 2000; Johannessen, Miles, 2011; Рожнов, 2015; Goertz *et al.*, 2019) называют поиск чувствительных индикаторов экологического неблагополучия одним из центральных вопросов в мониторинге природных популяций животных. Неотъемлемой составляющей подобных работ является исследование крови как один из доступных

и эффективных методов прижизненной оценки состояния животных в естественной среде обитания. Полученные физиолого-биохимические параметры принимаются в качестве референтных и в дальнейшем используются в системе оценки уровня нагрузки на животных различных природных и антропогенных факторов.

Ранее нами были получены данные о биохимическом составе плазмы крови у морских зайцев, обитающих в Белом море (Erokhina, Kavtsevich, 2019). Цель данной работы – характеристика показателей метаболизма эритроцитов этих животных.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кровь морских зайцев была получена во время экспедиций в Онежский залив Белого моря в июле 2014–2015 гг. у животных следующих возрастных групп: 3 года (молодые, n = 4), 5 лет (половозрелые, n = 4), 10 лет (взрослые, n = 3). С животными обращались в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (1986). Тюлени были пойманы на линии морского побережья вручную с помощью облучной сетки, без предварительной иммобилизации. Все животные были в адекватном состоянии здоровья (без внешних признаков болезни). Возраст тюленей оценивался по размеру тела и состоянию когтей на передних лапах. Образцы крови брали из



**Рис. 1.** Осмотическая стойкость эритроцитов морских зайцев различного возраста.

экстрадуральной внутривerteбральной вены с помощью спинальной иглы (1,2 × 90 мм), а затем сразу же помещали в пробирки для сбора крови, используя гепарин в качестве антикоагулянта. Эритроциты получали через 2–4 часа после взятия крови. Плазму отделяли центрифугированием в течение десяти минут со скоростью 1500 об/мин. Эритроциты трехкратно отмывали охлажденным изотоническим раствором хлористого натрия. Для этого к осадку эритроцитов добавляли двукратный объем физиологического раствора. Пробы центрифугировали и отбирали надосадочную жидкость. Осмотическую стойкость эритроцитов определяли в день отбора проб. В этот же день получали гемолизаты эритроцитов и замораживали их. Определение метаболитов в гемолизатах после размораживания проводили в стационарных лабораторных условиях через 2–3 недели.

Осмотическую стойкость эритроцитов оценивали методом, основанным на определении степени гемолита в среде с разным объемным содержанием изотонических растворов хлористого натрия и мочевины (Камышников, 2000). Гемолизаты эритроцитов получали по методу Драбкина (Drabkin, 1949). Биохимические показатели в гемолизатах эритроцитов определяли на анализаторе ROKI (Беларусь), используя наборы реагентов для биохимических исследований производства НПФ «Абрис+» (Россия). Содержание глюкозы и молочной кислоты определяли энзиматическими колориметрическими методами, кальция – по реакции

с хромогеном Арсенazo III, фосфора – реакцией с молибдатом аммония, магния – реакцией с ксиллиловым синим, натрия – реакцией с уранилацетатом, калия – турбидиметрическим методом реакцией с тетрафенилборатом (Энциклопедия..., 1997).

Статистическую обработку цифрового материала проводили методами вариационной статистики с использованием программ Microsoft Excel Windows XP и Statistica 6.0. О нормальности распределения судили по показателям асимметрии и эксцесса. Достоверность различий между средними величинами оценивали при помощи критерия Стьюдента, различия при  $p < 0.05$  рассматривались как статистически значимые.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

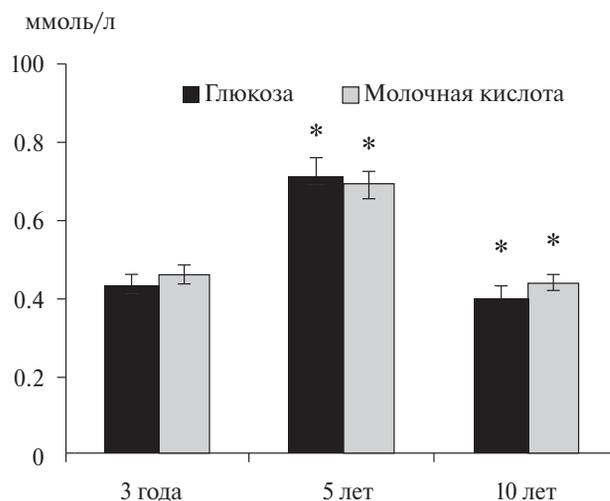
Осмотическая стойкость эритроцитов (ОСЭ) является интегральным тестом, характеризующим изменение антиоксидантного статуса организма, и претерпевает сдвиги в сторону снижения при многих физиологических и патологических состояниях, сопровождающихся активацией свободно-радикального окисления липидов. Полученные показатели осмотической стойкости эритроцитов морских зайцев представлены в виде кривых гемолита, характеризующих зависимость степени гемолита (%) от концентрации гемолизирующего агента (рис. 1).

Эритроциты морских зайцев так же, как и у других видов морских млекопитающих (Ерохина, Кавцевич, 2007), более чувствительны к гемолизирующим воздействиям по сравнению с наземными животными и человеком, что выражается в сдвиге кривой гемолита влево. Количество гемолизованных эритроцитов достигает от 18 до 50% в разных возрастных группах даже при минимальном содержании гемолизирующего агента, тогда как для эритроцитов человека этот показатель в норме не более 3% (Камышников, 2000). При этом ОСЭ изменяется в процессе развития животных, повышаясь с возрастом (рис. 1). В наибольшей степени возрастные различия в чувствительности эритроцитарных мембран к гемолизу проявляются при низких концентрациях гемолизирующего агента (40–50% по объему). Повышение с возрастом устойчивости эритроцитов к гемолизу вполне объяснимо известным фактом совершенствования процессов регуляции, направленных на контролирование метаболизма с целью быстрой приспособляемости его к условиям окружающей среды.

Особенности реагирования эритроцитарных мембран морских млекопитающих на гемолизирующие воздействия объясняют химическим составом, в частности высоким содержанием лецитина, что способствует повышенной проницаемости

клеток и более активному обмену эритроцитов с окружающей средой (Гелетюк и др., 1972). Кроме того, в процессе гемолиза определенное значение может иметь содержание гемоглобина в эритроцитах и его способность связывать кислород (Куликов и др., 1988). Представляется, что появляющиеся в крови супероксидные анионы взаимодействуют с оксигемоглобином, в результате чего происходит образование метгемоглобина и перекиси водорода. Образующийся комплекс обладает свойствами сильного окислителя и отвечает за гемолиз эритроцитов. Повышенное по сравнению с наземными животными содержание гемоглобина в эритроцитах морских млекопитающих (особенно ластоногих) в свете вышеупомянутых предостережений может частично объяснять низкую осмотическую стойкость эритроцитов последних.

Состояние мембран зависит и от внутриэритроцитарного метаболизма. Глюкоза является основным субстратом, а молочная кислота — конечным продуктом гликолиза, единственного пути получения энергии в этих клетках. Содержание глюкозы в эритроцитах морских зайцев находится в пределах 0.40–0.71 ммоль/л, что существенно ниже, чем у дельфинов-афалин соответствующего возраста, в эритроцитах которых уровень глюкозы достигает  $5.06 \pm 0.08$  ммоль/л (Каганова и др., 2002), и у наземных млекопитающих ( $4.42 \pm 0.55$  ммоль/л у крыс) (Скверчинская и др., 2013). Не исключено, что такое низкое содержание связано с выходом глюкозы из эритроцитов для поддержания ее нормального уровня в плазме крови. Однако сведений об этом в литературе не найдено. К тому же известно о роли адсорбционно-транспортной функции эритроцитов в поддержании уровня метаболитов плазмы, когда избыточная часть отдельных соединений адсорбируется на мембране эритроцита и по мере необходимости может транспортироваться обратно в плазму. Наши исследования смывов с эритроцитарных мембран у морских зайцев показали присутствие глюкозы в пределах 0.2–0.4 ммоль/л (неопубликованные данные), что сопоставимо с данными у других видов млекопитающих. Маловероятно, что для предотвращения критического снижения уровня глюкозы в плазме происходит транспорт ее из внутриэритроцитарного пула. К тому же острой необходимости в этом нет, судя по содержанию глюкозы в плазме исследованных животных (1.9–5.2 ммоль/л) (Erokhina, Kavtsevich, 2019), сопоставимому с данными (Tryland *et al.*, 2021) для взрослых морских зайцев (2.89–10.71 ммоль/л). Очевидно, этот вопрос требует дальнейшего изучения. При этом возрастные изменения данного показателя имеют однонаправленный характер — как и у представителя китообразных, у представителя ластоногих морского зайца в старшем



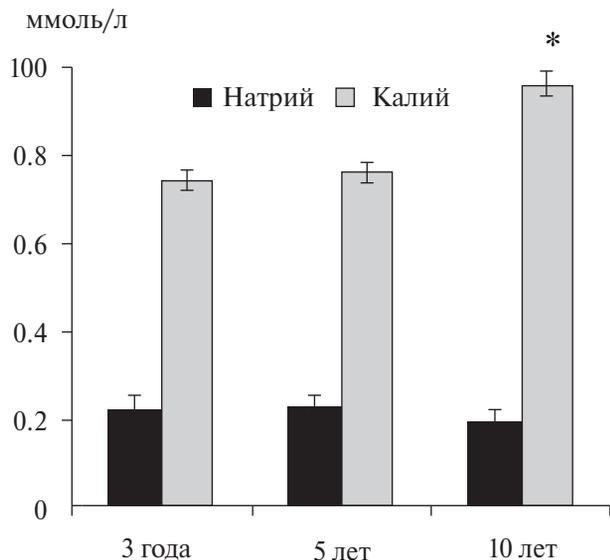
**Рис. 2.** Содержание метаболитов гликолиза в гемолизатах эритроцитов морских зайцев различного возраста. Здесь и далее знаком “\*” отмечены статистически значимые различия по сравнению с предыдущим периодом развития.

возрасте концентрация глюкозы в эритроцитах снижается ( $p < 0.001$ ) (рис. 2). Отметим заметное (более чем в полтора раза) повышение ( $p < 0.001$ ) уровня глюкозы к 5-летнему возрасту, очевидно, связанное с общей интенсификацией метаболизма в период полового созревания, и в дальнейшем уменьшение ( $p < 0.001$ ) значения этого показателя к 10-летнему возрасту. Такие же изменения наблюдаются и в содержании в эритроцитах морских зайцев конечного продукта гликолиза — молочной кислоты (рис. 2).

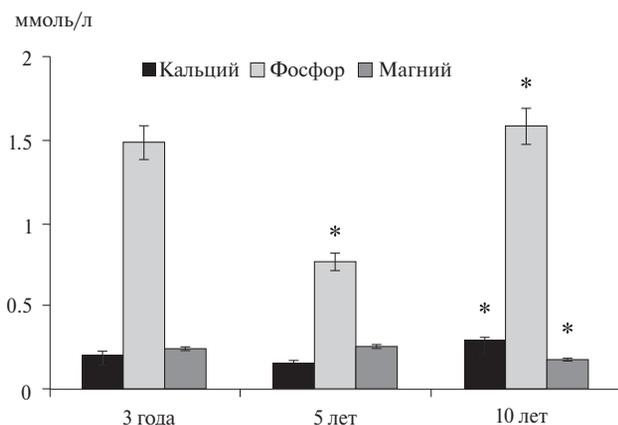
Таким образом, судя по этим двум показателям, интенсивность гликолитических реакций в эритроцитах морских зайцев с возрастом снижается, как и у других млекопитающих и человека (Коркушко и др., 2009).

Кроме метаболитов гликолиза определяли уровень катионов, играющих важную регуляторную роль в эритроцитах. Содержание натрия в эритроцитах изученных морских зайцев находится в пределах 19.58–22.37 ммоль/л, калия — 74.41–96.57 ммоль/л (рис. 3).

Для сравнения, в эритроцитах человека концентрация натрия в норме 13–22 ммоль/л, калия — 79.8–99.3 ммоль/л (Лифшиц, Сидельникова, 2006), в эритроцитах ряда пресноводных рыб концентрация натрия 18.2–65.6 ммоль/л, калия — 65.7–111.0 ммоль/л (Запруднова, 2017). Соотношение ионов натрия и калия в клетке оказывает, наряду с другими факторами, существенное влияние на активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы. Этому ферменту принадлежит ведущая роль в поддержании



**Рис. 3.** Содержание натрия и калия в гемолизатах эритроцитов морских зайцев различного возраста.



**Рис. 4.** Содержание кальция, фосфора и магния в гемолизатах эритроцитов морских зайцев различного возраста.

объема и формы эритроцитов как важного условия их функциональной активности. Показано, что основную регуляторную роль в активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы играют ионы калия, а ионы натрия оказывают незначительное влияние (Мосягин и др., 2010). У изученных морских зайцев содержание натрия в эритроцитах не изменяется с возрастом, тогда как концентрация калия статистически значимо ( $p < 0.001$ ) увеличивается у взрослых животных. Мы не располагаем сведениями об ионном составе эритроцитов у других видов морских млекопитающих, поэтому можем сравнивать полученные результаты лишь с данными для эритроцитов

человека. Так, у человека с возрастом концентрация внутриэритроцитарного натрия увеличивается, а калия — уменьшается вследствие торможения гликолиза и уменьшения концентрации АТФ. При этом снижается активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы, что приводит к выходу  $\text{K}^+$  и входу  $\text{Na}^+$  в клетку (Коркушко и др., 2009). Возможно, что наблюдаемое у морских зайцев повышение с возрастом уровня внутриэритроцитарного калия обеспечивает, наряду с другими механизмами, устойчивость к гипоксии, как это описано для рыб (Запруднова, 2017).

Уровень кальция в эритроцитах морских зайцев статистически значимо увеличивается к 10-летнему возрасту (рис. 4), косвенно указывая на интенсификацию работы калий-натриевого насоса в клетках (Engelman, Duhm, 1987). Содержание фосфора в эритроцитах взрослых животных не отличается от такового в возрасте 3 года, при этом статистически значимо снижается вдвое в период полового созревания (5 лет). Концентрация магния в эритроцитах снижается к 10-летнему возрасту. Как известно (Мисюра, Богданова, 1997), с ионами магния связана часть фосфатных соединений эритроцитов. Магний снижает сродство фосфатов к гемоглобину, тем самым повышая сродство последнего к кислороду. Можно предположить, что кислородсвязывающая способность гемоглобина в эритроцитах молодых животных регулируется магнием, влияние которого снижается к тому моменту, когда эта способность поддерживается за счет высокой концентрации гемоглобина.

Таким образом, исследование ряда показателей метаболизма эритроцитов у морских зайцев различного возраста показало, что устойчивость мембран эритроцитов к гемолизирующим воздействиям повышается к периоду полового созревания и в дальнейшем сохраняется на том же уровне. Установлено, что в эритроцитах морских зайцев в период полового созревания интенсивность гликолиза повышается и затем снижается у взрослых животных. С возрастом изменяется концентрация некоторых катионов — повышается уровень внутриэритроцитарного калия, но снижается содержание магния. Предполагается, что эти изменения отражают роль регуляторных катионов в устойчивости к гипоксии и кислородсвязывающей способности гемоглобина в эритроцитах.

Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории морских млекопитающих ММБИ РАН Н. Н. Кавцевичу, В. Н. Светочеву, О. Н. Светочевой за отбор и первичную обработку проб крови животных во время экспедиций.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках темы госзадания ММБИ РАН “Экология и физиология морских млекопитающих арктических морей” (№ гос. регистрации 121091600101-6).

## ЭТИЧЕСКОЕ ОДОБРЕНИЕ

Исследование одобрено комиссией по биоэтике Мурманского морского биологического института РАН (Заключение № 2 о соответствии исследования действующим международным нормам, рекомендациям, законам и иным нормативным актам Российской Федерации, нормам этического проведения исследований) с использованием животных от 27 декабря 2023 г.).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор данной работы заявляет, что у него нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гелетюк В.В., Маминов М.К., Анбиндер Е.М.* Некоторые показатели крови выдры, двух видов настоящих тюленей и наземных хищных // Тез. докл. V Всес. совещ. по изучению морских млекопитающих / Махачкала, сентябрь 1972 г. Махачкала, 1972. Ч. 2. С. 59–62.
- Ерохина И.А., Кавцевич Н.Н.* Чувствительность эритроцитов морских млекопитающих к осмотическому лизису // Вет. практика. 2007. № 3 (38). С. 60–63.
- Запруднова Р.А.* Эритроцитарные катионы в адаптационных процессах у окуня *Perca fluviatilis* L. (Percidae) // Тр. Карельского НЦ РАН. 2017. № 12. С. 57–62.  
<https://doi.org/10.17075/eb590>
- Каганова Н.В., Коношенко С.В., Ларина М.В.* Состояние внутриэритроцитарного метаболизма у дельфинов-афалин при адаптации к условиям океанариума // Морские биотехнические системы. Вып. 2. Севастополь, 2002. С. 173–181.
- Камышников В.С.* Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2т. Т. 2. Минск: Беларусь. 2000. С. 209–210.
- Коркушко О.В., Иванов Л.А., Писарук А.В., Чеботарев Р.Д.* Дыхательная функция крови в пожилом и старческом возрасте и факторы, ее определяющие // Физиол. чел. 2009. Т. 35, № 2. С. 40–46.
- Куликов В.Ю., Семенюк А.В., Колесникова Л.И.* Перекисное окисление липидов и холодовой фактор. Новосибирск: Наука, 1988. 192 с.
- Лифшиц В.М., Сидельникова В.И.* Биохимические анализы в клинике. Справочник. М.: «Триада-Х», 2006. 216 с.
- Минзюк Т.В., Кавцевич Н.Н., Светочев В.Н.* Новые данные о клеточном составе крови морского зайца // Докл. Академии наук. 2015. Т. 462, № 6. С. 727–729.  
<https://doi.org/10.7868/S0869565215180255>
- Мисюра А.Г., Богданова Л.Н.* Система крови черноморской афалины // Черноморская афалина *Tursiops truncatus ponticus*: морфология, физиология, акустика, гидродинамика. М.: Наука, 1997. С. 186–213.
- Мосягин В.В., Максимов В.И., Фурман Ю.В.* Активность АТФаз эритроцитов свиней // Докл. Росс. Акад. сельскохоз. наук. 2010. № 5. С. 38–39.
- Рожнов В.В.* Крупные млекопитающие как виды-индикаторы состояния экосистем в Российской Арктике // Научно-технические проблемы освоения Арктики. М.: Наука, 2015. С. 286–297.
- Светочев В.Н., Кавцевич Н.Н.* Результаты мечения морского зайца (*Erignathus barbatus*) датчиками спутниковой телеметрии в Мезенском заливе Белого моря в июле 2017 г. // Евраз. Науч. Объед. 2019. № 1–3 (47). С. 126–129.  
<https://doi.org/10.5281/zenodo.2560091>
- Светочева О.Н., Светочев В.Н., Кавцевич Н.Н.* Суточная активность и бюджет энергии морского зайца (*Erignathus barbatus*) в Белом море // Евраз. науч. объед. 2017. Т. 1. № 3 (28). С. 53–56.
- Скверчинская Е.А., Тавровская Т.В., Новожилов А.В.* Активность Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы эритроцитов крыс при продолжительном алиментарном голодании // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2013. Т. 49, № 2. С. 144–152.
- Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Под ред Н. Тица. М.: Лабинформ, 1997. 960 с.
- Andersen M., Hjelset A.M., Gjertz J., Lydersen C., Gulliksen B.* Growth, age and sexual maturity and condition in bearded seals (*Erignathus barbatus*) from Svalbard, Norway // Polar Biol. 1999. V. 21. P. 179–185.
- Charmain D.H., Kovacs K.M., Lydersen C.* Individual variability in diving, movement and activity patterns of adult bearded seals in Svalbard, Norway // Scient. Rep. 2018. № 8. 16988.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-35306-6>
- Charrier J., Mathevon N., Aubin T.* Bearded seal males perceive geographic variation in their trills // Behav. Ecol. and Sociobiol. 2013. V. 67. P. 1679–1689.  
<https://doi.org/10.1007/s00265-013-1578-6>
- Drabkin D.* A simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and haemoglobin in the crystalline // Arch. Biochem. 1949. V. 21. P. 224–226.
- Engelman B., Duhm J.* Intracellular calcium content of human erythrocytes: relation to sodium transport systems // J. Membrane Biol. 1987. V. 98. P. 79–87.
- Erokhina I.A., Kavtsevich N.N.* Blood plasma chemistry in White Sea bearded seals across different age groups // Arctic Envir. Res. 2019. V. 19. № 4. P. 159–165.  
<https://doi.org/10.3897/issn2541-8416.2019.19.4.159>
- Fair P.A., Becker P.R.* Review of stress in marine mammals // J. Aquat. Ecosyst. Stress and Recovery. 2000. V. 7 (4). P. 335–354.  
<https://doi.org/10.1023/A:1009968113079>
- Goertz C.E.C., Reichmuth C., Thometz N.M., Ziel H., Boveng P.* Comparative health assessments of Alaskan ice seals // Front. Vet. Sci. 2019. V. 6. Article 4.  
<https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00004>

Johannessen O.M., Miles M.W. Critical vulnerabilities of marine and sea ice-based ecosystems in the high Arctic // Reg. Envir. Change. 2011. V. 11 (Suppl. 1). P. S239–S248.  
<https://doi.org/10.1007/s10113-010-0186-5>

Tryland M., Lydersen C., Kovacs K., Rafter E., Thoresen S. Serum biochemistry and haematology in wild and captive bearded seals (*Erignathus barbatus*) from Svalbard, Norway // Acta Vet. Scand. 2021. V. 63. № 1. P. 33–39.  
<https://doi.org/10.1186/s13028-021-00598-8>

## Physiological and Biochemical Parameters of Erythrocytes in White Sea Bearded Seals *Erignathus barbatus barbatus* Erxleben, 1777 (Phocidae) across Different Age Groups

I. A. Erokhina<sup>1, #</sup>

Murmansk Marine Biological Institute of the Russian Academy of Sciences, Vladimirskaia st., 17, Murmansk, 183010 Russia

<sup>#</sup>e-mail: [irina.erohina58@mail.ru](mailto:irina.erohina58@mail.ru)

A comparative study of some parameters of erythrocytes of bearded seals of different ages (3 years, 5 years, 10 years) was carried out. It has been established that with age, the resistance of erythrocyte membranes to hemolysis increases. During puberty, the intensity of glycolysis in the bearded seals erythrocytes increases and then decreases in adult animals. Differences in the content of potassium, calcium, magnesium in the erythrocytes of animals of the studied age groups are shown.

*Keywords:* bearded seal, *Erignathus barbatus*, blood, erythrocytes, metabolism