

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Институт биологии южных морей имени А.О.Ковалевского РАН»

На правах рукописи

КУХАРЕВА ТАТЬЯНА АЛЕКСАНДРОВНА

**КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ КРОВИ И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ОРГАНОВ У
НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ДОННЫХ РЫБ
(СЕВАСТОПОЛЬСКАЯ БУХТА, ЧЕРНОЕ МОРЕ)**

Специальность

03.02.10 – гидробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологическх наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Солдатов Александр Александрович

Севастополь – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 ЭРИТРОГРАММА КРОВИ И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ОРГАНОВ РЫБ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ЦЕЛЯХ ЭКОДИАГНОСТИКИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	12
1.1 Донные виды рыб в экотоксикологических исследованиях.....	12
1.2 Локализация очагов гемопоза у костистых рыб	17
1.3 Характеристика циркулирующей крови костистых рыб (клетки эритроидного ряда)	20
1.4 Аномальные формы эритроцитов рыб	26
1.5 Среда и система красной крови рыб.....	32
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	41
2.1 Отлов, транспортировка и содержание материала	41
2.2 Экспериментальные схемы.....	42
2.3 Экспериментальный стенд	44
2.4 Отбор проб	46
2.5 Гематологические исследования	47
2.6 Определение морфометрических характеристик клеток.....	48
2.7 Статистический анализ результатов.....	51
ГЛАВА 3 КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ КРОВЕТВОРНЫХ ОРГАНОВ, СОЗРЕВАНИЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ФОРМ ЭРИТРОИДНОГО РЯДА	52
3.1 Клеточный состав головной почки и селезенки	52
3.2 Морфометрические характеристики эритроидных элементов в процессе созревания и дифференцировки.....	59
3.3 Обсуждение результатов исследований	62
ГЛАВА 4 ЭРИТРОЦИТЫ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ КРОВИ МОРСКОГО ЕРША (<i>SCORPAENA PORCUS</i> L. 1758) В УСЛОВИЯХ ОСТРОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ	71
4.1 Концентрация гемоглобина и число эритроцитов в крови морского ерша ...	71

4.2 Содержание незрелых и аномальных эритроидных форм в крови морского ерша.....	73
4.3 Обсуждение результатов исследования	74
ГЛАВА 5 ЭРИТРОГРАММА ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ КРОВИ <i>NEOGOBIOUS MELANOSTOMUS</i> (PALLAS, 1814) В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ.....	80
5.1 Незрелые эритроидные элементы.....	80
5.2 Аномальные эритроидные элементы.....	83
5.3 Содержание лактата в плазме крови.....	84
5.4 Обсуждение результатов исследований	86
ГЛАВА 6 АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ АНОМАЛЬНЫХ ЭРИТРОИДНЫХ ФОРМ В КРОВИ РЫБ В ЦЕЛЯХ ЭКОДИАГНОСТИКИ.....	90
6.1 Аномальные эритроциты в крови черноморских бычков.....	90
6.2 Эритроцитарные аномалии и темпы пролиферации в эритроидном ряду клеток.....	92
6.3 Сравнительная оценка гематологических характеристик и эритрограмм циркулирующей крови представителей семейства <i>Gobiidae</i> из акваторий юго-западного Крыма.....	100
6.4 Обсуждение результатов исследования	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	111
ВЫВОДЫ.....	115
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	117

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

КОЕ – колониеобразующие единицы;

Про – пронормобласты;

БН – базофильные нормобласты;

ПН – полихроматофильные нормобласты;

МСН – средноклеточное содержание гемоглобина;

МСНС – средноклеточная концентрация гемоглобина;

МСV – средноклеточный объем эритроцитов;

V_c – объем клетки;

V_n – объем ядра;

h – толщина клетки;

S_c – площадь поверхности клетки;

SS_c – удельная поверхность клетки;

NCR – ядерно-плазматическое отношение;

MS – показатель формы.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Прибрежные морские акватории населены преимущественно бентосными формами жизни, среди которых значительную роль играют представители донной ихтиофауны. Большинству из них не свойственно миграционное поведение. Это означает, что их организм на протяжении годового цикла вынужден адаптироваться к значительному градиенту условий абиотической среды, включая различные виды антропогенной нагрузки, что не свойственно пелагической группе рыб. Поэтому донные виды часто используются в качестве модельных объектов при изучении физиологических и биохимических основ адаптационного процесса.

Среди физиологических систем особое внимание уделяют красной крови, которая на уровне респираторных поверхностей фактически подвержена прямому действию факторов водной среды. В настоящей работе исследуется состояние эритронов у донных рыб, включающего пролиферативный, созревающий и функциональный пул клеток красной крови [22; 59]. Многие аспекты функционирования данной системы у костистых рыб до конца не исследованы. В частности, однозначно не определены места локализации очагов гемопоэза. Некоторые авторы считают, что эту роль выполняет головная почка [219; 292; 323], другие отдают приоритет селезенке [106; 135; 160; 170]. По анализу клеточного состава эритроидных элементов циркулирующей крови отмечена определенная моноцикличность в функционировании эритронов у морских рыб, которая приурочена к нерестовому периоду [62; 292]. При этом состояние эритроидного ростка гемопоэза на уровне кроветворной ткани не изучено.

Особое внимание следует обратить на влияние естественных абиотических факторов среды на состояние эритронов. Так, в условиях гипотермии у ряда теплолюбивых видов рыб отмечается развитие асфиксии, которая часто сопровождается гибелью особей. Это состояние наблюдается при температурах менее 7°C [51; 101]. При этом в тканях происходит усиление анаэробных процессов

на фоне снижения содержания аденилатов и энергетического заряда [5; 27]. Реакция в достаточной степени парадоксальна, так как развивается на фоне снижения кислородных потребностей рыб и повышения растворимости кислорода в воде и тканевых средах. Она требует специального изучения.

Действие гипоксии на эритроциты костистых рыб, напротив, хорошо изучено. Показано, что данный фактор индуцирует выработку эритропоэтинов в почках [223], что, в свою очередь, усиливает процессы пролиферации в эритроидном ростке гемопоэза и, в конечном итоге, приводит к росту циркулирующей эритроцитарной массы [247; 292]. Однако этот порядок событий реализуется спустя значительный отрезок времени. Процессы, которые предшествуют этому на самых ранних этапах адаптации к дефициту кислорода остаются не ясными.

Окружающая среда и, прежде всего, факторы антропогенной природы могут вызывать разнообразные цитоморфологические изменения на уровне циркулирующих эритроцитов, приводя к появлению различных аномалий. Это может проявляться в изменении формы, размеров клеток и их ядер, окраске цитоплазмы, случаях энуклиации, лизиса, появлении микроядерных включений и т.д. [64; 162; 203; 262; 324; 326]. Некоторые аномалии проявляются при действии конкретных токсических и биологических агентов: тяжелых металлов, вирусных инвазий, анемичных состояний [28; 29; 273; 305]. В настоящей работе предлагается использовать эти показатели для целей экодиагностики.

Степень разработанности темы исследования. Основные принципы структурно-функциональной организации системы красной крови рыб изложены в серии обзоров и руководств [29; 30; 35; 87; 293; 323]. Остается не ясными ряд аспектов, которым от части посвящена настоящая работа:

- локализация очагов эритропоэза (головная почка или селезенка);
- реакция эритроидного ростка гемопоэза на гипоксию на самых ранних этапах;
- способность гемопоэтической ткани сохранять чувствительность к управляющим сигналам в условиях крайне низких температур;

- можно ли использовать содержание аномальных эритроидных форм в крови рыб в качестве биомаркеров для целей экодиагностики и т.д.

Все выше рассмотренное определило цель настоящих исследований и перечень основных задач.

Цель работы – исследовать влияние естественных состояний (нерест) и абиотических факторов морской среды (температура, гипоксия) на систему красной крови некоторых видов донных рыб и определить возможность использования показателей эритрона для экодиагностики.

Задачи работы.

1. Изучить клеточный состав основных очагов гемопоэза (головная почка, селезенка) в организме ряда видов донных рыб.
2. Исследовать морфофункциональные характеристики эритроидных элементов крови донных рыб в процессе клеточной дифференцировки.
3. В условиях эксперимента оценить влияние краткосрочной острой гипоксии на клеточный состав и гематологические характеристики циркулирующей крови донных рыб.
4. Исследовать влияние экспериментальной гипотермии на эритрограмму циркулирующей крови донных рыб.
5. Изучить клеточный состав крови и гемомезотических органов донных рыб в нерестовый период.
6. Сравнить эритрограммы крови черноморских бычков, обладающих различной резистентностью к факторам водной среды.

Научная новизна. Впервые на основе анализа клеточного состава гемопоэтических тканей показано, что селезенка выполняет в основном функцию «резервного» очага эритропоэза, когда пролиферативная активность эритроидного ростка гемопоэза в головной почке достигает максимальных значений (нерестовый и постнерестовый период). При этом бластные эритроидные формы сохраняются только в головной почке. Впервые отмечено, что процесс дифференцировки эритроидных элементов на этапе: полихроматофильные нормобласты →

нормоциты, сопровождается существенным повышением диффузионной поверхности клеток (более чем на 40%).

Впервые показано, что краткосрочная (90 минут) гипоксия (15% насыщение воды O_2) не стимулирует, а подавляет эритроидный росток кроветворения, что приводит к снижению содержания незрелых эритроидных форм в циркулирующей крови. При этом гипотермия (1-2°C) оказывает противоположный эффект. В крови повышается содержание эритроидных элементов, способных к активной пролиферации (пронормобласты, базофильные нормобласты), что связано с развитием гипоксического состояния у рыб.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты исследований, представленные в настоящей работе, расширяют представления об особенностях течения процессов гемопоэза в организме костистых рыб. Они касаются мест локализации очагов кроветворения, динамики течения эритропоэтических процессов на протяжении годового цикла, характера дифференцировки клеток эритроидного ряда, а также влияния ключевых факторов водной среды (температуры, концентрации O_2) на эритрограмму циркулирующей крови.

В работе впервые предлагается использовать показатели эритрона некоторых видов донных рыб Черного моря для целей экодиагностики. Акцент делается на содержании аномальных клеток в крови донных рыб, которые позволяют давать не только интегральную оценку качества водной среды, но и определять присутствие в ней отдельных видов поллютантов.

Разработанные в ходе выполнения работы экспериментальные стенды могут быть рекомендованы к внедрению в практику научных исследований лабораторий, занимающихся изучением водных организмов.

Методы исследования. Общепринятые методы анализа ихтиологического материала (размерно-весовые характеристики рыб, пол и стадия зрелости гонад); спектрофотометрические методы при определении концентрации гемоглобина и лактата в крови рыб; метод центрифугирования при оценке гематокритной величины; гистологические методы фиксации и окраски мазков крови и гомогенатов кроветворных органов (головная почка, селезенка); светооптическая

микроскопия при подсчете числа эритроцитов в крови, а также изучении морфологических и морфометрических характеристик клеток эритроидного ряда; стандартные статистические методы обработки цифровых массивов, сравнения выборочных совокупностей, а также методы корреляционного и регрессионного анализа.

Защищаемые положения.

1. Гемопоэтические процессы у донных костистых рыб реализуются преимущественно в головной почке. Здесь сосредоточены бластные формы всех ростков гемопоэза. Селезенку следует рассматривать как орган эритропоэза, активность которого реализуется преимущественно в нерестовый и постнерестовый период.
2. В процессе созревания и дифференцировки эритроидных элементов в крови происходит значительный рост диффузионной поверхности клеток красной крови (более чем на 40%). Основные изменения происходят на этапе превращения полихроматофильных нормобластов в нормоциты.
3. Экстремальные формы гипотермии (1-2°C) вызывают развитие гипоксического состояния у донных рыб. Это усиливает процессы пролиферации и дифференцировки в эритроидном ряду клеток крови. В периферическом русле появляются малодифференцированные способные к делению пронормобласты и базофильные нормобласты, которые при нормоксии удерживаются стромой гемопоэтической ткани и не попадают в системный кровоток.

Соответствие паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 03.02.10 – гидробиология, в частности пункту 1: «Исследование влияния факторов водной среды на гидробионтов в природных и лабораторных условиях с целью установления пределов толерантности и оценки устойчивости водных организмов в условиях изменяющихся физико-химических свойств природных вод (в частности, при антропогенном воздействии)», а также пункту 7 паспорта «... Разработка методов экологического мониторинга водных экосистем».

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обеспечена применением адекватного набора методов исследований, оригинальными продуманными схемами постановки экспериментов с задействованием специально разработанных стендов, достаточными объемами контрольных и экспериментальных выборок, использованием необходимых методов и компьютерных программ статистической обработки цифровых массивов.

Апробация результатов работы.

Результаты работы докладывались на отечественных и международных научных конференциях: III Всеукраинская конференция молодых ученых, аспирантов, магистрантов и студентов «Биосфера XXI века» (г. Севастополь, 4-7 апреля 2011 г.); I Международная научно-техническая конференция «Современные проблемы физики, химии и биологии (ФизХимБио 2012)» (г. Севастополь, 28-30 ноября 2012 г.); XIII Международная научно-практическая экологическая конференция «Биоразнообразие и устойчивость живых систем» (г. Белгород, 6-11 октября 2014 г.); IX Всероссийская научно-практическая конференция молодых учёных (с международным участием) по проблемам водных экосистем «Pontus Euxinus 2015», посвященная 100-летию со дня рождения д.б.н., проф., чл.-кор. АН УССР В.Н. Грезе (г. Севастополь, 17-20 ноября 2015 г.); III Всероссийская конференция с международным участием к 100-летию со дня рождения академика В.И. Иванова «Современные проблемы эволюционной морфологии животных» (г. Санкт-Петербург, 26-28 сентября 2016 г.); XXI Международная Пущинской школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (г. Пущино, 17-21 апр. 2017 г.); X Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых по проблемам водных экосистем «Pontus Euxinus 2017» (г. Севастополь, 11-16 сентября 2017 г.); XXIII съезд Физиологического об-ва им. И.П. Павлова. (г. Воронеж, 18-22 сентября 2017 г.); V научно-практическая молодежная конференция «Экобиологические проблемы Азово-Черноморского региона и комплексное управление биологическими ресурсами (ЭКОБИО–2018)» (г. Севастополь, 8–11 октября 2018 г.).

Личный вклад автора. Автором осуществлен анализ имеющейся информации по проблематике представленной диссертации, и подготовлен обзор литературы. Им выполнены все виды экспериментальных работ, проведена статистическая обработка и графическое представление полученных результатов. Он принял непосредственное участие в анализе полученной информации, в подготовке рукописи диссертации и статей соответствующей тематики.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 21 печатная работа, из них 12 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 7 статей попадают в базу WoS (Scopus), 1 статья в сборнике и 8 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения, выводов и списка литературы. Она изложена на 150 страницах, содержит 5 таблиц и 30 рисунков. Список литературы включает 335 источников, из которых 232 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, доктору биологических наук, Солдатову Александру Александровичу, за помощь и поддержку на протяжении всех этапов работы, а также сотрудникам отдела физиологии животных и биохимии, к.б.н Андреевой А.Ю. и Кладченко Е.С., за плодотворное сотрудничество при проведении ряда исследований.

ГЛАВА 1 ЭРИТРОГРАММА КРОВИ И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ОРГАНОВ РЫБ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ЦЕЛЯХ ЭКОДИАГНОСТИКИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

В настоящей главе представлена информация о морфофункциональных характеристиках эритроидных элементах крови и кроветворных органах костистых рыб. Особое внимание уделяется аномальным клеткам красной крови, которые можно использовать в качестве маркеров качества морской среды.

1.1 Донные виды рыб в экотоксикологических исследованиях

В рамках современной морской экотоксикологии выделяют два основных подхода к оценке качества водной среды принципиально отличающихся по требованиям, предъявляемым к биологическим объектам:

- биотестирование;
- биоиндикация.

Для первого направления на первом месте стоит чувствительность биообъекта к факторам водной среды. В отношении второго подхода, к которому относится и настоящая работа, это требование не стоит на первом месте. Скорее наоборот, высокая экологическая пластичность (приспосабливаемость) к факторам водной среды (эврибионтность) позволяет ему иметь широкое распространение по побережью, что важно для проведения мониторинговых исследований.

Помимо эврибионтности важными требованиями к отбору организмов-биоиндикаторов (биомониторов) является следующий перечень критериев [98].

- широкая распространенность, что является следствием высокой толерантности морских организмов к факторам морской среды, как естественной, так и антропогенной природы;
- сбор организмов в полевых условиях не должен вызывать значительных сложностей;

- биология вида (видов) должна быть хорошо изучена;
- организмы должны вести малоподвижный, прикрепленный образ жизни; миграционная активность не должна быть выражена;
- организмы должны иметь высокоэффективные системы детоксикации, позволяющие нейтрализовать различные виды антропогенных нагрузок;
- ткани биообъекта должны накапливать наиболее широкий спектр поллютантов, при этом токсический и генотоксический эффекты фактически не должны быть выражены.

Оценка качества морской среды при этом проводится по кинетическим характеристикам накопления ксенобиотиков в теле (тканях) биологического объекта (организмы-мониторы). В последнее время все чаще для этих целей используется состояние антиоксидантного ферментного комплекса (содержание ТБК-активных продуктов, диеновых конъюгантов, активности каталазы, супероксиддисмутазы, состояние глутатионового комплекса и др.) [176; 231]. По степени его функционального напряжения судят о величине токсической нагрузки на водоем или акваторию.

Среди морских организмов удовлетворяющим всем требованиям, предъявляемым к объектам биоиндикации на первых позициях находятся двустворчатые моллюски-фильтраторы и макрофиты [123; 146; 252; 261]. Многие исследователи отдают предпочтение малоподвижным донным видам рыб, у которых миграционная активность практически не выражена [281; 314].

Донными рыбами принято считать виды, которые обитают в донных и придонных слоях воды [47]. Они могут встречаться как в шельфовых районах, так и в зонах континентального склона и занимать песчаные, илистые или гравийные грунты. Представители данной группы рыб, как правило, имеют уплощенное тело и хорошо развитую мускулатуру, образованную преимущественно белой мышечной тканью. Плавучесть низкая, многие утрачивают плавательный пузырь, что способствует удержанию в донных слоях без значительных энергетических

трат. У многих из них имеются специальные средства защиты (шипы, колючки, иглы).

По особенностям поведения донных рыб делят на четыре основные группы [68]:

- Подкарауливатели-преследователи – виды, для которых характерно выжидать, а затем нападать на свою добычу, совершая бросок. Они обладают стреловидным телом и развитыми плавниками.
- Подкарауливатели-засадники. Тело у таких рыб крупное, с маскирующей окраской, иногда на нем имеются специальные выросты, которые выполняют роль приманки.
- Донники-бентофаги, ведущие одиночный образ жизни. Тело может быть плоским (скаты, камбалы, химеры), или червеобразным (вьюны, угри).
- Стайные бентосоеды. Совершают миграции. Типичные представители – карповые.

Среди рыб Черного моря выделяют следующие донные или придонные виды: камбала, морской дракон, барабулька, мерланг, бычок, осетр, смарида, скат, султанка, морская мышь, морской ерш, песчанка, кефаль, морская корова, угорь [9; 16].

Широкое применение в черноморском регионе в биоиндикационных исследованиях получили донные виды рыб, принадлежащие семействам *Gobiidae* и *Scorpaena* [14; 42; 69; 70; 80; 314]. Они полностью удовлетворяют требованиям, предъявляемым к объектам биоиндикации и широко представлены по всему побережью Черного моря [66; 71]. Эти систематические группы рыб является основным объектом исследования и в настоящей работе.

1.1.1 Семейство *Gobiidae* (бычковые)

К семейству бычковых относят 212 родов и около 1875 видов рыб. Большинство из них обитают в прибрежных морских водах тропических и

умеренных широт, некоторые виды встречаются и в пресных водоемах. Часто используются как объект промысла.

Широкое распространение бычковые получили в Черном и Азовском морях, где насчитывают около 35-36 видов данного семейства [9; 79; 82]. Наиболее массовым представителем является бычок-кругляк.

Бычок-кругляк (*Neogobious melanostomus* Pallas, 1814) - рыба небольших размеров: около 13-16 см в длину. Туловище достаточно широкое, покрыто довольно крупной чешуей. Содержит 2 спинных плавника и 1 анальный. Грудные плавники широкие, хвостовой плавник имеет закругленную форму. Голова почти округлая, с выпуклым лбом. Рот небольшой (Рисунок 1.1).



Рисунок 1.1 – *Neogobious melanostomus* Pallas, 1814

Окраска у таких рыб имеет буровато-серые или желтовато-бурые оттенки. По бокам расположены 5 темно-бурых пятен. Отличительной особенностью данного вида является наличие большого темного пятна, расположенного в задней части первого спинного плавника.

Самцы крупнее самок (самцы – длина тела – 13-16 см, у самок – 11-15 см), в нерестовый период они приобретают насыщенную темную окраску.

Обитают бычки-кругляки на мелкокаменистых, песчаных или ракушечниковых грунтах, встречаясь на глубинах до 20 метров. Питаются моллюсками, ракообразными, личинками насекомых или многощетинковыми червями.

Половозрелыми особи становятся в возрасте 2-3 лет, нерест происходит с апреля по сентябрь. Как правило, самцы, охраняя кладку, гибнут после первого нереста. Самки живут около 4-5 лет.

1.1.2 *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758

Черноморская скорпена (*Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758) относится к семейству скорпеновых (*Scorpaenidae*), которое насчитывает до 40 видов. В длину достигает до 40 см, вес – до 0,5 кг. Голова у таких рыб крупная, имеет шипы и выросты. Рот широкий, в челюстях находятся зубы. Спинной, анальный и грудные плавники также содержат шипы и колючки (Рисунок 1.2). Плавательный пузырь отсутствует. Окраска пестрая: темные пятна и полосы располагаются на серо-желтом фоне, может меняться в зависимости от окружения, что способствует маскировке. Отличительной особенностью семейства скорпеновых является линька каждый месяц [9; 16].

Скорпены обитают на морском дне, большую часть времени сидят неподвижно, прячась в песке или камнях в ожидании добычи. При приближении мелких рыб или ракообразных скорпена совершает бросок и захватывает жертву.

Достигают половой зрелости приобретают на второй год жизни (самцы), а самки – на третий. Нерестятся данные рыбы с апреля по сентябрь.

Как уже отмечали, донные виды рыб часто используются в качестве объектов биоиндикации прибрежных акваторий, поскольку соответствуют всем необходимым для этого критериям. При этом в качестве физиологической системы наиболее целесообразен выбор циркулирующей крови, которая на уровне респираторных поверхностей (жабры) испытывает наиболее жесткое воздействие

внешней среды [23; 24; 61; 63]. При этом важно дифференцировать действие факторов естественной природы и влияние токсической нагрузки. Следует также обращать внимание на динамику естественных состояний организма, которые претерпевают закономерные изменения на протяжении годового цикла: нерест, нагул и др. [125; 126; 178]. В настоящей работе этим аспектам проблемы уделяется особое внимание. Принципиальный акцент делается на появлении в циркулирующей крови аномальных клеток, которые чаще всего являются следствием токсической нагрузки.



Рисунок 1.2 – *Scorpaena Porcus* Linnaeus, 1758

1.2 Локализация очагов гемопоэза у костистых рыб

Под гемопоэзом понимают процесс созревания форменных элементов крови, в ходе которого стволовые (полипотентные) клетки дают начало более дифференцированным делящимся клеткам-предшественникам, которые затем превращаются в зрелые клеточные элементы. Пул клеток-предшественников находится в тесном взаимодействии с пулом зрелых клеток, при этом разрушение и гибель последних уравновешивается постоянной продукцией и выходом в кровяное русло молодых элементов. К частным случаям гемопоэза относят эритропоэз – процесс созревания эритроцитов [208; 214; 217; 248].

Процесс кроветворения у рыб и млекопитающих во многом схож [165; 166; 187; 200]. Основное отличие заключается в том, что у рыб отсутствует красный костный мозг. Его роль выполняют ряд других органов и тканей. Форменные элементы, находящиеся на различных этапах дифференцировки, были обнаружены в эндотелии сердца и сосудов, жаберном аппарате, кишечнике, лимфоидном органе и тимусе. [35; 106; 171; 202; 310; 332]. При этом основными органами кроветворения у рыб являются почки и селезенка [160; 246; 277; 282; 292].

Почки у рыб представлены двумя тяжами расположенными по обе стороны позвоночника. Их делят на 2 составляющих: пронефрос (передняя, или головная почка) и мезонефрос (средняя, или туловищная почка). Пронефрос утрачивает экскреторную функцию еще на ранних этапах онтогенеза и становится исключительно кроветворным органом, а также одним из важнейших компонентов системы иммунитета. Мезонефрос, в свою очередь, сочетает эти функции на протяжении всей жизни [46; 55].

Пронефрос считается главным органом эритропоэза у костистых рыб [219; 292; 323]. Он наиболее сходен с красным костным мозгом высших позвоночных [274; 297; 335]. Пронефрос соответствует передней (головной) области почек и выглядит как образование, имеющее розовато-белую или серовато-розовую окраску и покрытое тонкой капсулой из соединительной ткани. Орган пронизан крупными и мелкими сосудами, выстланными однослойным эндотелием, а также содержит многочисленные синусы [1; 148; 155; 230; 242; 268; 275; 276; 284; 309]. Здесь происходит генерация и созревание всех типов форменных элементов крови, что подтверждено работами многих авторов [75; 78; 97; 129; 329]. В строме головной почки были найдены ретикулярные клетки, ретикулиновые волокна и меланомакрофагальные элементы, которые могут быть примитивными аналогами лимфатических узлов [105; 240; 241; 289; 304; 330; 335]. Однако эритроидный росток в пронефросе превалирует среди всех других ростков гемопоэза.

Туловищная почка (мезонефрос) также принимает участие в кроветворении [12; 43; 160;]. Благодаря врастанию лимфоидной ткани еще на этапе формирования туловищной почки, в этом органе происходит процесс лимфопоэза [229]. Помимо

этого, в межканальцевой ретикулярной ткани мезонефроса были найдены элементы эритроидного, гранулацитарного и агранулоцитарного рядов, находящиеся на различных этапах дифференцировки [57; 93; 331].

Селезенка у рыб располагается в передней полости тела, между петлями кишечника. Это плотное компактное тёмно-красное образование различной формы (шарообразной, лентовидной), но чаще вытянутой. По своей гистоструктуре напоминает селезенку высших позвоночных [249]. Интенсивность эритропоэза в селезенке у костистых рыб значительно ниже, чем в почках, некоторые авторы полагают, что здесь протекают лишь процессы лимфо-, тромбо- и гранулопоэза [249; 274]. Однако незрелые эритроидные элементы были обнаружены в селезенке некоторых морских и пресноводных видов рыб [106; 135; 160; 170; 290]. Показано, что малодифференцированные эритроциты появляются в этом органе в тот момент, когда размеры очагов эритропоэза в почках достигают критических пределов [192]. При этом у хрящевых рыб, в отличие от костистых, селезенка играет главную роль в процессе эритропоэза [142; 160]. Основной функцией селезенки является изоляция из кровотока старых эритроцитов с целью их последующей элиминации [1; 323]. Эти клеточные формы утрачивают эластичность и становятся неспособными проходить узкие просветы лакунарной системы органа. При гипоксических состояниях эритроцитарная масса селезенки может поступать обратно в кровяное русло и повышать кислородную емкость крови [4]. Вес органа при этом может уменьшаться в 2 раза [212; 320].

На ранних этапах онтогенеза рыб гемопоэтическая ткань присутствует также в жаберном аппарате, печени, кишечнике, лимфоидном органе, тимусе и в эндотелии сердца и кровеносных сосудов [35; 106; 171; 202; 310; 332].

Для рыб характерно интраваскулярное кроветворение [141; 161; 175]. Это означает, что созревание эритроидных элементов, находящихся на поздних этапах дифференцировки, происходит непосредственно внутри сосудов. Достигая стадии позднего базофильного нормобласта, клетки перестают удерживаться стромой кроветворных органов [106] и вымываются в кровоток, где завершают процесс дифференцировки, превращаясь в зрелые эритроциты [294]. Как правило, в

периферическую кровь попадают клетки, которые теряют способность к активной пролиферации (базофильные и полихроматофильные нормобласты). Однако в условиях активного эритропоэза допустимо появление в кровотоке менее дифференцированных эритроидных форм, таких как пронормобласты и ранние базофильные нормобласты, сохраняющих способность к пролиферации [159; 328]. Описаны также случаи амитоза среди зрелых эритроцитов, вызванные внешней гипоксией [250; 294].

Таким образом, основными кроветворными органами у рыб являются пронефрос, мезонефрос и селезенка. Однако на ранних этапах эмбрионального развития очаги гемопоэза присутствуют также в печени, кишечнике, жабрах, лимфоидном органе, тимусе и в эндотелии сердца и кровеносных сосудов.

1.3 Характеристика циркулирующей крови костистых рыб (клетки эритроидного ряда)

В настоящем разделе обзора рассматриваются общие гематологические характеристики (концентрация гемоглобина, число эритроцитов, гематокрит) и структурно-функциональные особенности клеток красной крови костистых рыб с акцентом на процессы их созревания и дифференцировки.

1.3.1 Гематологические характеристики

Эритроциты являются наиболее многочисленными (98-99%) форменными элементами в циркулирующей крови рыб [161]. Основная функция эритроцитов – респираторная: транспорт кислорода и углекислого газа. Помимо этого, они также переносят аминокислоты, участвуют в регуляции кислотно-щелочного баланса и в ряде ферментативных процессов, адсорбируют токсины и антитела [23].

Общий объем крови относительно массы организма составляет 1,4-2,4 % у пелагических видов и 0,9-1,9 % у донных малоподвижных. Больше всего крови, а, следовательно, и эритроцитов находится в жабрах, сердце и темной мускулатуре, меньше – в белой мускулатуре и кишечнике [4]. Часть эритроцитов депонирована в капиллярах печени и селезенки и при необходимости выбрасывается в общий кровоток [3].

Количественные показатели красной крови видоспецифичны, и, как правило, обусловлены двигательной активностью рыб, поведенческими реакциями и условиями обитания. Так, пелагические виды, совершающие большие кормовые и нерестовые миграции, в циркулирующей крови содержат в среднем 2-3 (10^6) клеток мкл^{-1} . Число эритроцитов в крови малоподвижных донных видов низкое и составляет около 0,15 (10^6) клеток мкл^{-1} 0,15 (10^6) клеток мкл^{-1} [30]. Некоторые виды антарктических рыб, существующих при низких температурах, не содержат эритроцитов, и транспорт кислорода осуществляется путем обычной диффузии [144; 269]. У пресноводных рыб число красных клеток крови ниже, чем у морских. У самцов выше, чем у самок. В целом же, среднее количество эритроцитов в крови рыб составляет 1,2-2,1 (10^6) клеток мкл^{-1} 1,2 – 2,1 10^6 кл. мкл^{-1} , что в 5-10 раз меньше, чем в крови млекопитающих.

Значения гематокрита у рыб также видоспецифично и коррелирует с уровнем естественной подвижности, достигая максимальных значений у пелагических видов. Гематокрит зависит от пола и возраста особей, сезона, фотопериода, питания и качества воды. В целом же, его величина варьирует от 20 до 45 %. [188; 197; 198; 225; 271; 313].

Содержание гемоглобина в крови рыб значительно меньше, чем у высших позвоночных [4]. Отмечено, что у активных пелагических рыб этот показатель выше (форель – 10 г %, скумбрия, кефаль 15 г %), чем у донных малоподвижных (сом – 7 г %) [17]. Количество гемоглобина изменяется под действием таких факторов, как: сезон, гидрохимический режим водоема (чем ниже рН водной среды, тем больше гемоглобина в крови), температура воды, условия питания и др.

[4]. В период зимовки отмечается снижение числа эритроцитов в крови большинства костистых рыб в среднем на 20 % [34].

1.3.2 Морфофункциональные и ультраструктурные особенности организации эритроцитов рыб

Поперечный диаметр эритроцитов осетровых в среднем составляет 9,8-14,0 мкм, продольный – 10,2-16,8 мкм, а у костистых – 5,3-11,1 и 9,9-18,3 соответственно [35]. Размер клеток красной крови обратно пропорционален их числу в циркулирующем русле. Так, эритроциты сельди имеют наиболее мелкие размеры [8×5 мкм], при относительно высоком содержании их кровотоке. Это позволяет существенно увеличить кислородную емкость крови.

По форме эритроциты бывают овальными (у костистых рыб) и округлыми (у осетровых) и, в отличие от высших позвоночных, содержат ядро. Ультраструктура клеток красной крови описана во многих работах [115; 298]. Как уже отмечалось, характерной особенностью эритроцитов рыб является присутствие ядра, которое обычно имеет неравномерную окраску. Гетерохроматин в ядре представлен в виде плотных скоплений – глыбок. Имеются и просветленные участки (эухроматин), которые свидетельствуют о функциональной активности данной структуры. Эндоплазматическая сеть развита крайне слабо. В цитоплазме находятся митохондрии, комплекс Гольджи, полисомы и другие структуры. Благодаря наличию полосы микротрубочек в экваториальной плоскости клетки, эритроциты приобретают способность поддерживать плоскую форму [122]. Клеточная мембрана представляет собой липидный бислой с вкрапленными в него белковыми глобулами [10; 92]. Основными мембранными белками являются: гликофорин [придает мембране отрицательный заряд и обеспечивает взаимодействие с межклеточной жидкостью [99], и спектрин (основной белок цитоскелета, обеспечивающий поддержание формы эритроцита и способности изменять ее при прохождении через капилляры [127]). В примембранном слое содержатся гранулы

гемоглобина, которые, помимо дыхательной функции, стабилизируют конфигурацию клетки [327].

1.3.3 Особенности дифференцировки и созревания клеток эритроидного ряда рыб

Родоначальниками всех клеток крови являются стволовые клетки. Они способны трансформироваться в колониобразующие единицы (КОЕ), дающие начало форменным элементам всех ростков гемопоэза [39; 300]. На гистологических препаратах КОЕ выглядят как небольшие округлые образования (4-5 мкм) с темно-фиолетовым ядром плотной структуры, содержащим значительную долю гетерохроматина (Рисунок 1.3А). Цитоплазма располагается узким ободком вокруг ядра и имеет базофильную окраску.

Действие гормона эритропоэтина, вырабатываемого в почках, приводит к превращению стволовых клеток в коммитированные предшественники форменных элементов эритроидного ростка гемопоэза. В процессе дифференцировки они проходят через несколько последовательных стадий созревания, в ходе которых приобретают ряд морфологических характеристик, свойственные зрелым эритроцитам – нормоцитам.

Ниже представлены выделяемые морфотипы незрелых эритроцитов в порядке их созревания [234; 335].

1. Эритробласты – округлые клетки с крупным нежносетчатым ядром, бледной красновато-сиреневой окраски (Рисунок 1.3Б). Цитоплазма интенсивно-базофильного цвета окружает его узким ободком. Иногда имеется перинуклеарная зона. В ядре находятся 2-4 ядрышка [35].
2. Пронормобласты – важнейшим их отличием от эритробластов является ярко-выраженная перинуклеарная зона (Рисунок 1.3В). Клетки сохраняют округлую форму, слой базофильной цитоплазмы становится шире, структура ядра более грубая; отмечается увеличение содержания эухроматина.

3. Базофильные нормобласты – округлые клетки с первыми признаками эллипсоидности (Рисунок 1.3Г). Ядро становится мельче, более уплотнено и имеет красно-фиолетовую окраску. Объем клетки растет, что приводит к снижению значения ядерно-плазматического отношения. Цитоплазма сохраняет насыщенный базофильный оттенок, что определяется присутствием в ней значительного количества нуклеиновых кислот, в частности, РНК. На стадии позднего базофильного нормобласта клетки утрачивают способность к митотическому делению [106]. В дальнейшем эти форменные элементы перестают удерживаться стромой кроветворных органов и завершают процесс дифференцировки непосредственно в кровяном русле.
4. Полихроматофильные нормобласты – для данного этапа характерно уменьшение в ядре доли эухроматина, что свидетельствует о низкой функциональной активности данной структуры (Рисунок 1Д). Клетка содержит меньшее число митохондрий, и рибосом [298]. В цитоплазме появляются кислые (ацидофильные) компоненты (гемоглобин), что придает ей смешанную полихроматофильную окраску [147; 170; 234; 235; 280]. Встраиваясь в структуру клеточной мембраны, молекулы гемоглобина видоизменяют форму эритроцита с округлой на эллипсоидную, а также способствуют росту общего объема клетки.
5. Ортохромные эритроциты – это зрелые клетки. Имеют эллипсоидную форму, прозрачную серовато-розовую цитоплазму и вытянутое темно фиолетовое плотное ядро (Рисунок 1.3Е) [30].

Длительность созревания эритроцитов рыб в среднем занимает от 17 до 23 дней [29], однако при определенных состояниях может сокращаться [184]. Следует отметить, что данный процесс характеризуется однонаправленностью и необратимостью.

Продолжительность жизни эритроцитов обычно составляет чуть меньше года [33]. Однако согласно некоторым исследованиям, она может варьировать в пределах от 80 до 500 дней для разных видов [29].

Регулярное обновление эритроцитарной массы происходит одновременно с процессами лизиса, которые предполагают распад эритроцитов, сопровождающийся высвобождением гемоглобина.

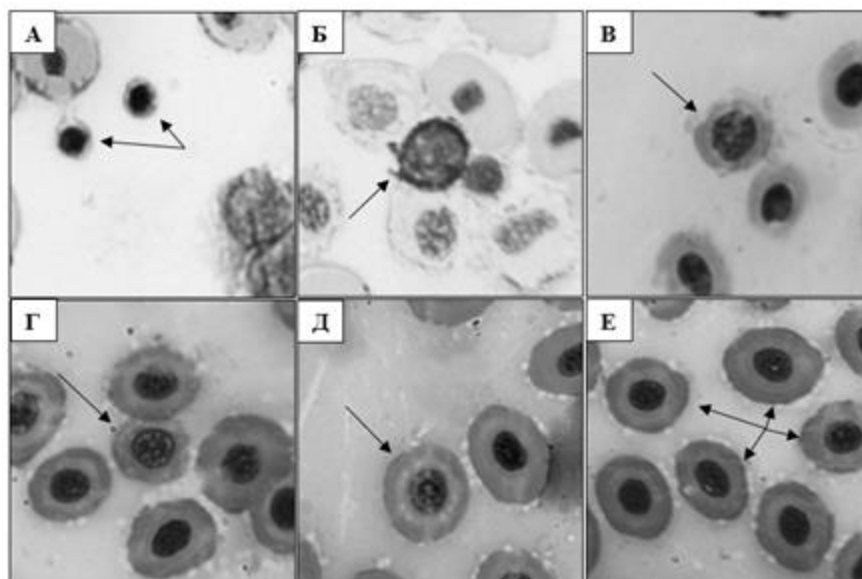


Рисунок 1.3 – Малодифференцированные эритроидные элементы в пронефресе и циркулирующей крови *Scorpaena porcus L.* (А – колониеобразующие единицы, Б – эритробласты, В – пронормобласты, Г – базофильные нормобласты, Д – полихроматофильные нормобласты, Е – зрелые эритроциты) [85; 112]

Основная масса эритроцитов разрушается в селезенке. Происходит это путем эритрофагоцитоза, при котором старые клетки поглощаются макрофагами, а выделившийся при этом гемоглобин распадается до гемовой группы и железа [170; 224]. Гемовая группа, в свою очередь, разрушается до билирубина и выводится с желчью на уровне тонкого кишечника. Железо поступает в кроветворные органы, где используется для синтеза гемоглобина.

Таким образом, эритроциты выполняют ряд жизненно важных функций в организме, основная из которых – респираторная. Гематологические показатели (количество эритроцитов, концентрация гемоглобина, гематокрит) зависят от факторов среды и физиологических состояний организма, а также имеют выраженную видовую специфику. Процесс созревания эритроидных элементов

крови у рыб предполагает ряд последовательных морфологических и ультраструктурных преобразований клеток:

- увеличение размера клетки и приобретение ею эллипсоидной формы;
- сокращение в цитоплазме числа митохондрий и рибосом;
- уменьшение размеров ядра и увеличение в нем доли гетерохроматина;
- постепенное снижение содержания в цитоплазме клетки РНК (базофильный компонент окраски) и накопление в ней гемоглобина (ацидофильный компонент окраски).

1.4 Аномальные формы эритроцитов рыб

К аномальным формам эритроцитов относят клетки с нарушенными формой и размерами, повреждениями мембран, измененной окраской и другими патологиями [162; 179; 203; 262; 324; 326]. При этом патологические изменения могут затрагивать не только морфологические характеристики клеток, но и их ядер, что выражается в появлении ядерных деформаций и микроядерных включений [201; 259; 319]. Подобные нарушения могут определяться как внутренними причинами, так и наблюдаться в условиях экзогенной гипоксии и токсического действия поллютантов. Количественный учет данных аномалий также позволяет судить о нарушении процессов созревания эритроидных элементов в гемопоэтической ткани.

1.4.1 Изменения размеров и формы эритроцитов рыб

В циркулирующей крови можно обнаружить эритроидные элементы, для которых характерно нарушение нормальной формы и размеров: пойкилоцитоз и анизоцитоз, соответственно.

Анизоцитоз предполагает явное различие в величине отдельных эритроцитов и сопровождается присутствием *микроцитов (микроцитоз)* и *макроцитов (макроцитоз)* среди циркулирующей эритроидной массы. Это дегенеративное явление свидетельствует о функциональной недостаточности кроветворной ткани. Отклонение от нормальных размеров наблюдается под влиянием токсических агентов, при изменении осмотического давления крови, а также по мере старения клетки. Анизоцитоз рассматривается как первый признак анемии [28; 30]. Стоит отметить, что микроциты бывает двух видов: обыкновенные (клетки с размерами меньше обычного) и *микросфероциты*. Последние считаются важнейшим признаком гемолитических анемий, в ходе которых эритроцит, стремясь уменьшить площадь своей поверхности в качестве защитной реакции, принимает сферическую форму. Как следствие – уменьшаются линейные размеры клетки [29].

Пойкилоцитоз предполагает изменения формы эритроцитов, и как следствие, нарушение их функций, и потому часто сопровождается развитием анемии. При *пойкилоцитозе* в кровяном русле встречаются клетки с изогнутыми, вытянутыми неправильными формами, которые могут иметь выпуклости и отростки различной длины. Это явление можно наблюдать при изменении условий внешней среды (гипоксия, химические вещества, вирусы и др.), либо нарушений внутренней среды организма, когда клеточная мембрана утрачивает свою эластичность. Тем не менее, иногда изменение формы несет компенсаторную функцию и приводит к увеличению удельной площади поверхности эритроцита, что позволяет более эффективно осуществлять газотранспортные процессы [29]. К частным случаям *пойкилоцитоза* относят: *дакриоциты*, *шистоциты*, *эхиноциты*, *акантоциты* и *дегмациты*:

Дакриоциты – это клетки каплевидной формы с характерным выростом – так называемой *спикулой* (Рисунок 1.4А). Количество данных аномалий возрастает в условиях гипоксии и под воздействием токсикантов [28; 102]. Присутствие *дакриоцитов* может свидетельствовать о таких патологических состояниях, как: анемии, лейкозы, лимфомы, эритролейкемии и др. [118; 119; 149; 210; 273; 305]. Несмотря на то, что подсчет числа *дакриоцитов* является широко

распространенной практикой при проведении общего анализа крови рыб, механизмы формирования данных аномалий до конца не ясны [305]. Считается, что причиной образования дакриоцитов может быть как механическая деформация мембраны и цитоскелета эритроцитов в процессе созревания, так и производство изначально деформированных эритроцитов из поврежденных стволовых клеток [163; 181]. Отмеченные изменения происходят на уровне кроветворной ткани (пронефрос и мезонефрос). Селезенка также является местом образования данных патологий. В условиях спленэктомии наблюдалось значительное снижение числа дакриоцитов в периферическом русле [132; 151].

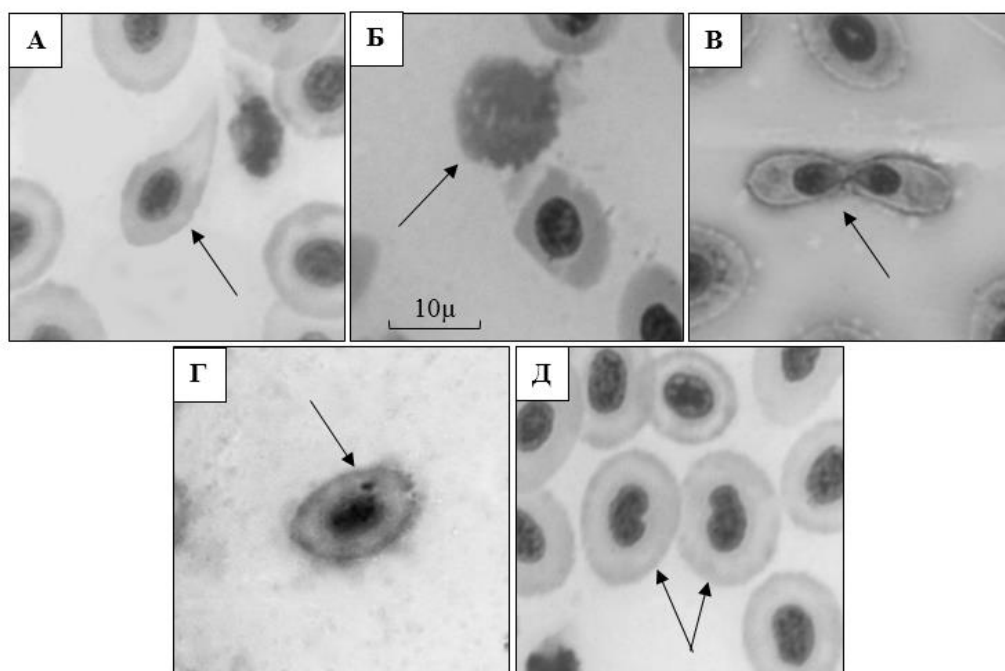


Рисунок 1.4 – Аномальные эритроциты в циркулирующей крови *Neogobius melanostomus P.* (А – дакриоцит; Б – эритроцитарная тень; В – амитоз; Г – микроядерные включения; Д – ядерные инвагинации) [85]

Шистоциты – это обломки эритроцитов, разрушенных непосредственно в кровотоке. В норме их количество крайне мало.

Эхиноциты – это клетки, с различными шипами и выростами по всей поверхности.

Акантоциты – по внешнему виду близки к эхиноцитам и имеют зубчатую поверхность.

Дегмациты – клетки с «надкусанными» краями [30; 102; 141; 262].

1.4.2 Изменения окраски эритроцитов рыб

Явление, при котором на мазке крови можно обнаружить эритроциты с различной интенсивностью окраски, называют *анизохромией*. Как правило, анизохромия регистрируется либо при изменении толщины эритроцита, либо при изменении содержания в нем гемоглобина [28; 45]. Нормально окрашенные эритроциты называют *нормохромными*. Уменьшение интенсивности окраски – *гипохромия* – свидетельствует о низком насыщении клетки гемоглобином и встречается при железодефицитных анемиях и других анемиях, вызванных нарушением синтеза гемоглобина. При значительном дефиците железа в организме цитоплазма эритроцитов окрашиваются лишь по краям. Такие клетки называют *анулоцитами*. *Гиперхромия* – слишком яркая окраска эритроцитов – может быть связана как с увеличением толщины клеток, так и с повышенным содержанием гемоглобина в них, а также определяться присутствием большого числа макроцитов и микросфероцитов в крови [28].

1.4.3 Другие виды аномалий эритроцитов рыб

К ним относятся: безъядерных клетки, эритроцитарные тени, случаи агглютинации и амитоза.

Безъядерные эритроциты, как правило, возникает при гипоксии и образуются путем выталкивания ядра из клетки (энуклеация), либо путем цитокинеза с образованием микроцита и безъядерной клетки. Биологический смысл данного явления состоит в том, что при отсутствии ядра уменьшается

потребление кислорода самой клеткой в процессе его переноса. В эволюционном аспекте это нашло отражение у высших позвоночных, у рыб же наблюдается только в условиях гипоксии, функциональной недостаточности гемопоэтической ткани и т.д. [11; 59;190; 265;].

Эритроцитарные тени появляются в результате лизиса преимущественно зрелых эритроидных форм в системе циркуляции. Они представляют собой остатки клеточных ядер, которые образуются при разрушении клеток крови. На мазках выглядят как розовые пятна (Рисунок 1.4Б). Количество эритроцитарных теней возрастает при токсикозах, под влиянием гемолитических ядов, некоторых химических агентов, холода и т.д., что может способствовать развитию анемии [52].

Агглютинация – явление, при котором эритроциты слипаются, образуя так называемые «монетные столбики». Она бывает обратимой (клетки способны разделяться без повреждений) и необратимой (сопровождается разрушением клеток). Агглютинация может быть вызвана действием ядов, вирусов и токсических веществ [190].

Амитоз – это прямое деление клеток, при котором цитокинез реализуется без предварительного кариокинеза, поэтому содержимое ядра между дочерними клетками распределяется хаотично (Рисунок 1.4В). Амитоз характерен для узкоспециализированных клеток с ограниченным сроком жизни, ядро которых функционально подавлено и содержит большую долю гетерохроматина. Прямое деление клеток наблюдается при гипоксии, анемии и способствует росту кислородной емкости крови, что связано с увеличением общего числа эритроцитов [53].

1.4.4 Аномалии ядер

Отдельное внимание следует уделить аномалиям клеточных ядер. Они предполагают: гиперсегментацию ядра; хроманолиз (распад хроматина, при

котором ядро становится светлым, сохраняя контуры); кариолиз (части ядра растворяются, размывая его контуры); пикноз (уплотнение хроматина ядра, последнее становится тёмным, бесструктурным); кариорексис (распад ядра на части), ацентричность ядра (смещение ядра в периферическую область клетки); вакуолизация; изменение зернистости [30; 35; 133]. Подобные нарушения возникают вследствие влияния цитотоксических, генотоксических, мутагенных и канцерогенных агентов. Показано, что изменения формы ядра обусловлены нарушением взаимодействия хроматина и кариолеммы. Частота ядерных аномалий, таких как нарушение формы, вакуолизация, присутствие микроядер, обычно наблюдается при различных токсических воздействиях [136; 154; 182], однако может определяться также интенсивностью функционирования гемопоэтической ткани [302].

К наиболее часто встречаемым ядерным нарушениям относят микроядерные включения и инвагинации ядерной оболочки.

Микроядерные включения – это фрагменты клеточного ядра, образуемые в период кариокинеза из участков хромосом, не вошедших ни в одно из новообразуемых ядер [38] (Рисунок 1.4Г). Представляют собой патологическое образование [317]. Подобные нарушения, как правило, необратимы и продолжают проявляться в последующих поколениях. В дальнейшем могут приводить к хромосомным перестройкам и анеуплоидии [259]. Микроядра возникают под влиянием многих факторов, таких как: гипоксия, воздействие тяжелых металлов, вирусные инфекции и прочее [107; 136]. На подсчете клеток с микроядрами основан микроядерный тест, широко применяемый во всем мире при оценке генотоксичности водной среды [38; 116; 162; 222; 263]. Метод чувствителен к малым концентрациям токсических соединений и позволяет обнаружить их влияние на ранних этапах [259]. Часто в качестве объектов исследования применяются ядерные эритроциты костистых рыб [28; 37; 107; 167; 190; 194; 243]. Это позволяет многократно отбирать пробы крови, не нанося существенных повреждений, и позволяет избежать гибели рыбы, что является неоспоримым преимуществом при диагностике состояния популяции.

Инвагинации ядер. Для данных аномалий характерна утрата округлой формы ядра в связи с появлением так называемого впячивания ядерной мембраны [28] (Рисунок 1.4Д). По числу клеток с ядерными инвагинациями часто судят о величине токсической нагрузки [154; 301]. В некоторых работах [110; 302] отмечено, что число микроядер и ядерных инвагинаций коррелируют между собой. При этом показано, что ядерные деформации могут быть первичным ответом организма, то есть предшествовать образованию микроядер [117; 213].

Таким образом, зрелые эритроциты морских рыб могут подвергаться разнообразным морфологическим изменениям, которые затрагивают как сами клетки, так и их ядра. Эти изменения связаны как с функциональным состоянием организма, так и с условиями среды, в которых он находится. Последнее позволяет проводить оценку токсического и генотоксического действия водной среды, основанную на количественном учете различных аномальных форм.

1.5 Среда и система красной крови рыб

В оценке влияния водной среды на организм рыб важно уметь дифференцировать факторы естественной и антропогенной природы. Среди естественных факторов решающее значение имеют температура, содержание кислорода в воде, соленость, прозрачность [47]. К факторам антропогенной природы относятся различные виды химических загрязнений, оказывающие определенные токсические эффекты на организм рыб. Немаловажное значение имеет учет естественных состояний, которые закономерно изменяются на протяжении годового цикла (нагул, нерест, миграции и ряд других). В настоящей работе особое внимание уделяется влиянию температуры, внешней гипоксии и суммарным токсическим эффектам, что и определило структуру данного раздела обзора литературы.

1.5.1 Влияние температуры

Как правило, у пойкилотермных организмов наблюдается прямая связь между температурой воды и кислородной емкостью крови. При увеличении температуры в естественных и экспериментальных условиях происходит рост концентрации гемоглобина и количества эритроцитов в циркулирующей крови. При понижении температуры наблюдается обратная картина [227; 280; 286]. Однако выход за пределы температурной устойчивости вида вызывает противоположную реакцию [233]. В ряде работ зафиксировано повышенное содержание эритроцитов и концентрация гемоглобина в крови рыб в зимний период [20; 233; 236]. Подобный эффект может быть достигнут несколькими путями [292]:

- выбросом эритроцитов в кровяное русло из кровяных депо (селезенка);
- усилением активности эритропоэтического ростка кроветворения, сопровождающееся смещением эритроцитарного равновесия в пользу продукционных процессов;
- частичной дегидратацией плазмы крови, приводящей к росту значений гематокрита и как следствие к увеличению числа эритроцитов и концентрации гемоглобина в крови.

Усиление темпов пролиферации среди незрелых эритроидных форм, в свою очередь, способно индуцировать появление в циркулирующей крови аномальных клеток красной крови [279]. Это необходимо учитывать при оценке токсических эффектов на организм рыб, так как данный факт может привести к ложным заключениям и выводам.

1.5.2 Влияние внешней гипоксии

Внешний дефицит кислорода сказывается, прежде всего, на состоянии систем кислородного обеспечения организма: респираторной, циркуляционной и

крови. Последняя принимает непосредственное участие в адаптации к данному фактору и изменения, происходящие на уровне данной физиологической системы, следует уметь дифференцировать от токсической нагрузки на организм.

При гипоксии происходит усиленная выработка эритропоэтина в почках, что способствует поступлению молодых генераций эритроцитов в циркулирующую кровь [220; 223; 247; 292; 334]. Однако это достаточно инерционный процесс и в условиях срочной адаптации к дефициту кислорода более лабильным и эффективным является выброс эритроцитов в кровотоки из кровяных депо [320]. У рыб эту функцию выполняет селезенка [160; 192]. В ряде случаев, наблюдается частичная дегидратация плазмы крови, что сопровождается относительным ростом содержания в крови эритроцитов и концентрации гемоглобина [84]. Не исключено также наложение выше перечисленных процессов друг на друга.

Случаи роста концентрации гемоглобина, числа эритроцитов и гематокрита при гипоксии отмечены у многих видов морских и пресноводных рыб [143; 285; 287]. Высокая пролиферативная активность кроветворной ткани (эритропоэз), которая наблюдается при гипоксии, обычно приводит к повышению содержания в крови ряда незрелых эритроидных форм (базофильных и полихроматофильных нормобластов) [72; 291; 312]. При этом в крови могут появляться аномальные клеточные формы: ядерные деформации, микроядерные включения [134; 136]. Часто отмечаются случаи эритроцитарного пойкилоцитоза [28; 102].

Гипоксия также может вызывать набухание (свеллинг) клеток красной крови [72; 120; 137; 253; 312], перестройку гемоглобиновой системы [177; 288] и ряд других эффектов.

1.5.3 Система красной крови в условиях токсической нагрузки

Широкое распространение в мировой практике получили методы, направленные на исследование гематологических характеристик рыб в целях экодиагностики. Они позволяют сравнительно быстро дать интегральную

характеристику функционального состояния организма, подверженного различным видам токсической нагрузки [23; 24; 61; 63].

Известно, что организм рыб, не смотря на сравнительно широкую норму реакции [23], обладает высокой чувствительностью к содержанию ксенобиотиков в воде, что в значительной степени сопровождается морфофункциональными трансформациями клеток красной и белой крови даже при концентрациях, не превышающих ПДК [24; 31; 36]. Быстрый отклик системы крови в ответ на токсическое воздействие связан с тем, что кровь на уровне респираторных поверхностей испытывает наиболее жесткое действие токсических соединений [28]. При этом часто наблюдается сочетанное действие нескольких поллютантов, которое может усиливать токсический эффект (аддитивный и синергический эффект) [65].

При анализе реакции крови на действие токсикантов предпочтение отдается морфологическим характеристикам клеток красной крови [318; 322; 333] в виду их массовости: до 97 % всех форменных элементов крови рыб [245]. Следует также отметить, что при анализе эритрограммы достаточно всего нескольких капель крови, что позволяет использовать щадящие методы взятия образцов (пункция хвостовой или жаберной артерий) без значительных кровопотерь [173; 189; 325]. Поэтому эритроциты циркулирующей крови рыб могут быть использованы в качестве индикатора качества водной среды [18; 50; 91; 162].

Существуют общие закономерности трансформации системы крови под действием ксенобиотиков [60].

- Стадия контакта с токсикантами. На этой стадии система крови начинает проявлять защитную функцию посредством увеличения количества лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов.
- Стадия мобилизации резервных функций: происходит выброс в кровоток молодых и резервных форменных элементов, вследствие чего, возрастает общая концентрация гемоглобина и число лейкоцитов.

- Стадия дестабилизации системы кроветворения. Отмечаются нарушения в системе гемопоза: клетки крови подвергаются деструкции, при этом организм, стремясь компенсировать потери, продуцирует новые элементы, однако они часто имеют патологические формы. Защитные функции находятся на грани истощения.
- Стадия деградации: деструкция клеток приобретает массовый характер, что в конечном итоге приводит к гибели организма. Наблюдается большое число патологических форм, падает концентрация гемоглобина и число лейкоцитов.

Выявление данных состояний в системе крови позволяет оценить величину токсической нагрузки на водоем или акваторию [2; 13; 60; 81; 94].

Динамика токсического отравления рыб хорошо рассмотрена и в работах других авторов [7; 30; 48; 49; 96]. На первых этапах отмечается возрастание концентрации гемоглобина с последующим постепенным развитием анемии. Затем, по мере истощения защитных механизмов, происходят необратимые деструктивные изменения, ведущие к гибели. Период её достижения зависит от индивидуальной устойчивости рыб, а также от интенсивности и продолжительности действия ксенобиотиков [76]. Более детально этот порядок событий выглядит следующим образом.

- Нарушение функций гемоглобина. Некоторые токсические вещества взаимодействуют с гемоглобином, что приводит к нарушению кислородтранспортной функции крови, а в дальнейшем и к развитию гипоксии. Помимо этого, существуют токсиканты, способные окислять железо, входящее в структуру гемоглобина, что приводит к развитию метгемоглобинемии – состояния, характеризующегося наличием более 1% метгемоглобина в крови.
- Изменение числа форменных элементов. Нарушение клеточного состава крови также может сигнализировать об интоксикации некоторыми веществами. При этом наблюдаются гемолитические и апластические анемии, лейкопении, лейкомии, тромбоцитопении.

- Снижение эффективности гемопоэза, которое сопровождается нарушением пролиферации и дифференцировки клеток с последующим появлением патологических (аномальных) клеточных форм в крови.
- Действие ксенобиотиков может способствовать развитию апластических процессов в кроветворных органах, что приводит к сокращению производства всех форменных элементов (так называемый панцитопенический синдром). Подавление производства исключительно одного вида клеточных элементов встречается крайне редко.

Не следует исключать из внимания и влияние естественных факторов среды и функциональных состояний на циркулирующую кровь рыб [58]. Известно, что кровь рыб претерпевает закономерные изменения на протяжении годового цикла: естественная динамика физико-химических факторов водной среды (температура, фотопериод) и сопряженных с этим состояний организма (нерест, нагул и т.д.) [125; 126; 178]. Определенные различия существуют у рыб разного пола, возраста. Имеется видовая специфика. Следует также учитывать состояние манипуляционного стресса, которое возникает у рыб в момент отлова, гипоксии, определяемой внешними и внутренними причинами. Важно уметь дифференцировать естественные состояния от токсической нагрузки, что и входит в задачу настоящего исследования.

1.5.4 Система красной крови в условиях токсической нагрузки (частные аспекты)

Кровь рыб реагирует на различные виды токсической нагрузки. При этом имеются как общие, так и специфические виды изменений затрагивающие, прежде всего, морфологические характеристики циркулирующих клеток красной крови [52].

Тяжелые металлы. При сочетанном действии тяжелых металлов на кровь рыб, когда доля каждого из них не контролировалась, наиболее часто

встречаемыми аномалиями являются различные виды ядерных деформаций, включая появление микроядерных включений. Это было отмечено у тилапий и кефалей Нила [319], а также у карпов в условиях лабораторного эксперимента [326]. В последнем случае наряду со случаями деформации ядер отмечали конденсацию ядерного хроматина и набухание эритроцитов.

В случае дифференцированного воздействия тяжелых металлов на кровь рыб отмечено, что наибольшее число эритроцитарных аномалий наблюдалось при действии свинца и цинка, в меньшей степени – кадмия и меди.

Большинство работ посвящено токсическому действию солей кадмия. У карпа при воздействии сублетальных концентраций данного металла отмечено появление в циркулирующей крови эритроцитов с клеточными и ядерными деформациями [324; 326]. При исследовании змееголовов пятнистых, находившихся в водах с сублетальными концентрациями кадмия, обнаружено также повышение хрупкости мембран эритроцитов и их лизис [207]. У огненных барбусов кадмий вызывал одновременно конденсацию и рассеивание ядерного хроматина на фоне формирования хроматиновых глыбок в объеме ядра [173].

Под воздействием ртути у рыб наблюдалось значительное снижение интенсивности эритропоэза в кроветворной ткани. Количество незрелых эритроцитов снижалось до 0,2 % от общей клеточной массы [50]. При сочетанном действии ртути и меди на организм рыб отмечали понижение проницаемости мембран клеток красной крови, лизис эритроцитов и изменение вязкости плазмы крови [183].

При действии хрома у огненных барбусов наблюдали набухание эритроцитов (свеллинг), развитие пойкилоцитоза, вакуолизации цитоплазмы и увеличение случаев прямого деления клеток (амитоз) [173].

Радиация. Определенные закономерности отмечены в изменении морфологии клеток красной крови у рыб при радиационном воздействии на их организм. У карпов, содержащихся в водоемах охладителях АЭС, отмечен значительный рост содержания в крови клеток с микроядерными включениями [232]. У катли (семейство карповых) в крови также повышалось содержание

эритроцитов с микроядрами, но и увеличивались случаи образования эхиноцитов, повышалось число клеток с деформацией ядра и вакуолизацией цитоплазмы [110].

Нефть. Под влиянием нефтяного загрязнения у карпов и красноперок значительно повышалось число клеток с микроядерными включениями и двуядерных эритроцитов. Содержание гемоглобина при этом снижалось [1; 21]. В циркулирующей крови бычковых рыб, обитающих в местах расположения нефтяных скважин, регистрировали большое число дакриоцитов, эритроцитов с ядерными деформациями и эритроцитарных теней [54].

Другие виды токсической нагрузки. В виду ограниченной информации все остальные виды химической интоксикации и особенности их действие на морфологические характеристики циркулирующих эритроцитов рыб объединены в рамках настоящего подраздела.

При отравлении фторидом натрия у пресноводного сома (*Clarias batrachus*) отмечали случаи анизоцитоза и пойкилоцитоза среди клеток красной крови [179]. У змееголовов в крови были обнаружены также эхиноциты, сфероциты и клетки с поврежденными мембранами [262]. Случаи эхиноцитоза отмечались и у черных-сомов кошек при действии анионного детергента [333].

Хлорированные сточные воды вызывали множественные изменения морфологии зрелых эритроцитов в крови кижуча: развивался пойкилоцитоз, полихромазия, появлялись тельца Гейнца, происходило изменение краевой зоны клеток, наблюдались случаи лизиса эритроцитов в кровотоке [131]. Множественные морфологические изменения клеток красной крови наблюдались и при вирусной интоксикации (erythrocyte necrosis virus) рыб. В частности, наблюдали появление неровной краевой зоны у клеток, конденсацию и рассеивание хроматина ядра, вакуолизацию цитоплазмы эритроцитов, смещение положения ядра (ацентричность) [153; 157].

Фенольные соединения вызывали лизис эритроцитов у морского волка на фоне понижения содержания АТФ в клетках [124]. В случае нитратных отравлений наблюдали развитие гемической гипоксии, что объяснялось переходом гемоглобина в мет-форму, при которой железо становится трехвалентным и не

было способно связывать кислород. При отравлении сульфаниламидами гемоглобин переходит в сульф-форму и также теряет способность к транспорту кислорода [311].

* * *

Из представленной выше информации следует, что донные виды рыб удовлетворяют всем требованиям, предъявляемым к объектам биоиндикации. При этом эритрограмма циркулирующей крови этой группы рыб весьма чувствительна к различным видам токсических нагрузок и может быть использована в качестве инструмента в современной экодиагностике. Вместе с тем, непонятен вклад естественных факторов и состояний организма в появление в крови аномальных эритроидных форм, в процессы созревания и дифференцировки клеток эритроидного ряда. Это может стать причиной ложных суждений и заключений о качестве водной (морской) среды. В настоящей работе предпринята попытка дифференцирования этих состояний, что определило ее цель и основную группу задач, рассмотренных выше.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящей главе диссертационной работы дается общая характеристика используемого материала, описывается процедуры его отлова, транспортировки и содержания. Представлена информация о моделировании гипоксических и температурных условий. Описывается методика отбора образцов крови, методы лабораторного анализа опытных проб и пути статистической обработки цифровых массивов.

2.1 Отлов, транспортировка и содержание материала

Работа выполнена в течение 2010-2019 г.г. в отделе физиологии животных и биохимии ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О.Ковалевского РАН».

Объектами исследования являлись взрослые особи скорпены (*Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758) и четырех видов черноморских бычков: кругляк (*Neogobius melanostomus* Pallas, 1814), мартовик (*Mesogobius batrachocephalus* Pallas, 1814), кругляш (*Gobius cobitis* Pallas, 1814) и травяник (*Zosterisessor ophiocephalus* Pallas, 1814). В работе использовали особей, находящихся в состоянии относительного физиологического покоя (стадия зрелости гонад – II-III), а также активно нерестящихся особей (стадия зрелости гонад – IV-V). Число использованных особей и их размерно-весовые характеристики представлены в Таблице 2.1.

Рыбу отлавливали в Севастопольской бухте в весенне-осенний период при помощи ставного невода и доставляли в лабораторию в пластиковых баках объемом 60 л с принудительной аэрацией. Транспортировка длилась не более 3-х часов.

После отлова особей рассаживали в аквариумы объемом 50 л. Плотность посадки составляла 17-25 л на одну особь. В аквариумах поддерживался

естественный проток. Температура воды – 14-16 °С. Фотопериод: 12 часов день – 12 часов ночь. В данных условиях рыбу выдерживали в течение одной недели с целью снятия стресса, вызванного отловом и транспортировкой. В течение этого времени особей кормили фаршем из малоценных видов рыб. Суточный пищевой рацион составлял 6-7 % от массы тела. В работе использовали подвижных активно питающихся рыб.

Таблица 2.1 – Размерно-весовые характеристики использованного материала

Вид	n	Вес, г	Длина, см
<i>Scorpaena porcus</i>	40	84-134	11-17
<i>Neogobius melanostomus</i>	38	30-45	14-17
<i>Mesogobius batrachocephalus</i>	10	60-75	17-19
<i>Gobius cobitis</i>	10	80-95	22-24
<i>Zosterisessor ophiocephalus</i>	10	25-30	13-14

Примечание: n – число особей; длина – до основания хвостового стебля

2.2 Экспериментальные схемы

Влияние температуры. Работа выполнена на особях бычка-кругляка. Контрольная группа рыб содержалась при температуре 19-20°С. Экспериментальные группы – при 1-2°С и 15-16°С. Изменение температуры воды в аквариумах осуществляли со скоростью 1-2°С ч⁻¹. По достижению новых температурных условий особи выдерживались в течение 5-ти суток. Фотопериод: 12 часов день – 12 часов ночь.

Влияние гипоксии. Объектом исследования являлись особи скорпены. Контрольная группа рыб содержалась при концентрации кислорода в воде 8,5–8,7 мг л⁻¹ (100% насыщения, контроль). Температура воды в рабочей камере поддерживалась на уровне 14-16°С. После адаптации к этим условиям (один день) содержание кислорода в воде снижали в течение 2,5–3,0 часов с 8,5–8,7 мг л⁻¹ (100% насыщения, контроль) до 2,6 мг л⁻¹ (30% насыщения, опыт), а затем до 1,3 мг л⁻¹ (15% насыщения, опыт) прокачиванием азота. Экспозиция составляла 1,5 часа.

Контроль за содержанием кислорода в воде осуществляли потенциометрически. В работе применяли оксиметр ELWRO PRL T N 5221 (Poland).

В обеих экспериментальных сериях перед изъятием рыб из аквариума применяли уретановую анестезию [293].

Сравнительная оценка устойчивости рыб к токсической нагрузке. Рыбу отлавливали в Карантинной бухте, которая находится в окрестностях Севастополя и является одной из наиболее загрязненных. В бухту поступают бытовые стоки, воды ливневой канализации, здесь базируются военные катера и яхты. Содержание токсикантов в Карантинной бухте представлены в таблице 2.2 [56; 67]. Эта бухта взята намеренно, для того, чтобы определить реакцию системы крови ряда видов черноморских бычков на сходную фоновую токсическую нагрузку.

Таблица 2.2 – Содержание некоторых токсических соединений в Карантинной бухте

Показатели	Содержание, мг л ⁻¹
СПАВ	0,003
Взвешенное вещество	2,4
NH ₄	0,02
NO ₃	0,003
Углеводороды нефти	0,07-0,05
Тяжелые металлы	
Fe	0,03
Pb	0,02
Zn	0,17
As	0,018
Cd	-
Hg	0,0038
Cu	0,006

2.3 Экспериментальный стенд

Экспериментальные разделы работы (главы 4, 5) выполнены при помощи специально разработанного экспериментального стенда, который позволяет удерживать требуемую концентрацию кислорода в воде и температуру в течение необходимого отрезка времени.

Стенд состоит из 6 блоков: рабочей камеры, камеры насыщения кислородом, кислородомера, ультратермостата, насоса и регистрирующего устройства (Рисунок 2.1).

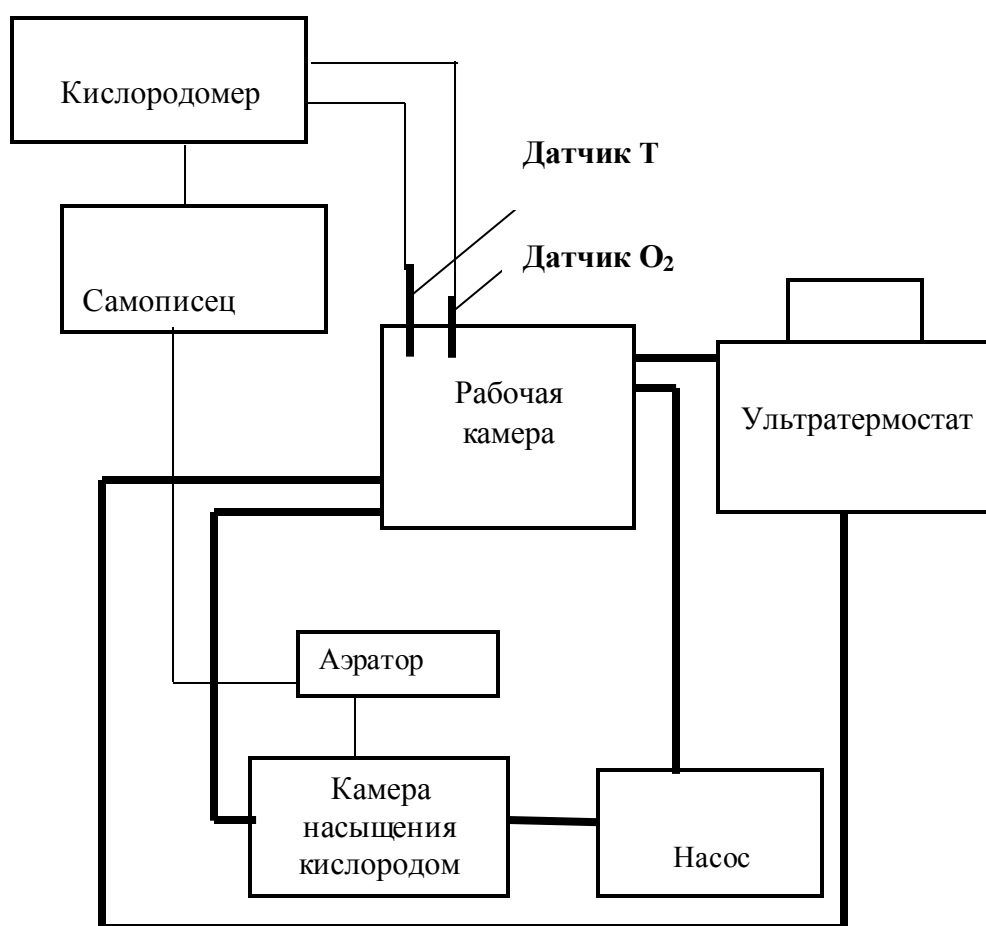


Рисунок 2.1 – Принципиальная схема экспериментального стенда

Рабочая камера является основным рабочим элементом стенда. Здесь размещаются биообъекты (рыбы, моллюски, ракообразные). Выполнена из

винипласта. Внешние размеры: 280×340×390 мм. Камера имеет двойные стенки (Рисунок 2.2). Внутренняя камера – рабочий отсек, вместимостью 15 литров имеет входной и выходной патрубки, которые соединены посредством силиконовых шлангов с насосом. Последний обеспечивает циркуляцию морской воды во внутренней камере для: обеспечения нормальной работы кислородного датчика и поддержания постоянного кислородного режима в рабочей камере.

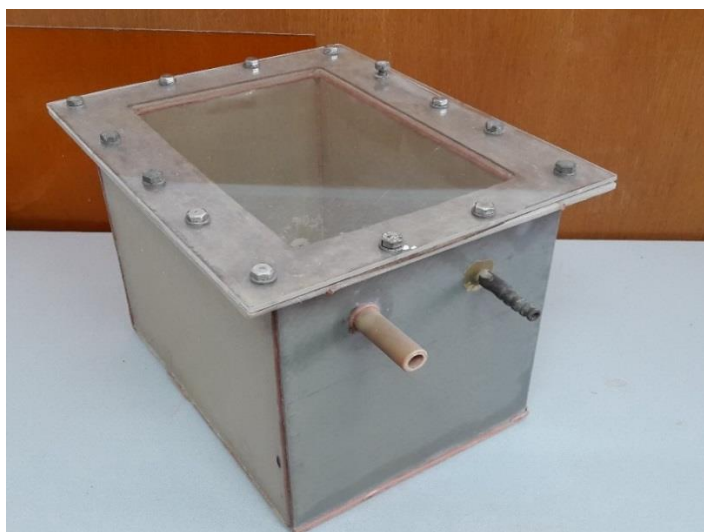


Рисунок 2.2 – Внешний вид рабочей камеры

Внешняя камера имеет два самостоятельных патрубка. Они соединены с ультратермостатом. Последний обеспечивает поддержание заданного температурного режима в «рубашке» рабочей камеры за счет циркуляции в ней дистиллированной воды.

Крышка рабочей камеры изготовлена из оргстекла и посредством резиновой прокладки герметично крепится к корпусу камеры болтами. В крышке имеются отверстия для размещения датчиков температуры и кислорода. Они соединены с кислородомером и блоком автоматической регистрации (самописец КСП-4).

Камера насыщения кислородом. Представляет собой камеру, выполненную из винипласта в которой размещен распылитель аэратора. Габаритные размеры 200×200× 450 мм. Блок имеет входные и выходные патрубки и отверстие для подключения аэратора. Камера блока аэрации разделена специальной

перегородкой, которая позволяет проводить обогащение воды кислородом и не допускает попадание пузырьков воздуха в рабочую камеру.

Кислородомер. В работе использовали кислородомер марки ELWRO [Польша]. Он позволял, при помощи соответствующих датчиков, регистрировать концентрацию кислорода и температуру в рабочей камере. Кислородомер был соединен с потенциометром КСП-4, который осуществлял регистрацию и поддерживал заданную концентрацию кислорода и температуру в рабочей камере за счет замыкающего/размыкающего устройства.

В качестве *азратора* использовали компрессор типа EP 8500 фирмы «Рембо» [Германия]. Его подключали при помощи насадки к камере насыщения кислородом через специальное отверстие. Он осуществлял подачу воздуха. Включение и выключение его осуществлялось через КСП-4.

Насос. Изготовлен из винипласта. Габаритные размеры 200x200x450 мм. Мотор, находящийся в изолированном отсеке, перекачивает воду во внутреннем отсеке рабочей камеры.

Ультратермостат. Использован ультратермостат марки UTU-4 (Польша). Он имеет систему контроля температуры воды. Нагрев воды происходит за счет термопары ультратермостата. Автоматически с термопарой включается насос, который и перекачивает воду в рубашке рабочей камеры.

Блок автоматической регистрации представлен потенциометром марки КСП-4. Он предназначен, с одной стороны, для непрерывной регистрации температуры и концентрация кислорода в воде, а с другой стороны, для автоматического пуска блока аэрации при снижении кислорода ниже заданного уровня.

2.4 Отбор проб

Кровь получали пункцией хвостовой артерии. В качестве антикоагулянта применяли гепарин («Рихтер», Венгрия). Образцы крови помещались в

пластиковую пробирку объемом 2 мл и затем подвергали лабораторной обработке: изготовление мазков и проведение количественных гематологических исследований.

Образцы кроветворных органов: головной почки (про- и мезонефрос) и селезенки, подвергались механическому измельчению в среде, содержащей: 128 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 1,5 мМ CaCl₂, 1,5 мМ MgCl₂, 15 мМ HEPES, 2,2 мМ D-глюкозы (pH 7,8) [306]. Крупные фрагменты тканей удаляли. Для этого клеточную массу трижды отмывали в 1,5 мл указанной среды в течение 5 минут при скорости 1500 об·мин⁻¹, используя центрифугу Elmi CM-50. Из осадка изготавливались мазки для последующей обработки.

2.5 Гематологические исследования

Концентрацию гемоглобина в крови контролировали при помощи гемиглобинцианидного метода. Применяли стандартный набор реактивов ООО «Агат-мед» (Россия). Число эритроцитов в крови подсчитывали в камере Горяева [32]. Гематокрит определяли путем центрифугирования образцов крови в гепаринизированных капиллярах (750 g; 15 минут). Центрифугирование проводили в специальном гематокритном роторе (центрифуга MPW-310, Польша). На основании полученных значений рассчитывали эритроцитарные индексы: среднеклеточный объем (MCV), среднеклеточное содержание (MCH) и среднеклеточную концентрацию гемоглобина (MCHC) [32]. Расчеты выполняли по следующим формулам [2.1; 2.2; 2.3]:

$$MCH = \frac{Hb}{Er}, \quad [2.1]$$

$$MCHC = \frac{Hb}{Ht} \cdot 10, \quad [2.2]$$

$$MCV = \frac{Ht}{Er} \cdot 10, \quad [2.3]$$

где

Hb – концентрация гемоглобина в крови (г л⁻¹);

Er – число эритроцитов в крови (млн мкл⁻¹);

Ht – гематокрит (%).

Содержание лактата в плазме крови определяли ферментативным методом по количеству образовавшегося НАД·Н₂ в результате дегидрирования молекул молочной кислоты с участием лактатдегидрогеназы в присутствии НАД [41]. Величину экстинкции определяли при длине волны 365 нм на однолучевом спектрофотометре СФ-26.

Осмотическую резистентность клеток красной крови оценивали по микроскопическому методу Яновского [32].

Морфологические исследования выполнены на мазках крови. Их окрашивали по комбинированному методу Паппенгейма (Май-Грюнвальд + Романовский-Гимза) [32]. На мазках подсчитывали процентное содержание аномальных клеток и незрелых эритроидных форм. Объем выборки составил 10000 клеток на мазок. В работе применяли светооптический микроскоп «Биомед-5 ПР ЛЮМ2».

2.6 Определение морфометрических характеристик клеток

Линейные размеры клеток крови определяли по фотографиям в компьютерной программе ImageJ 1.44р [174]. Измеряли большую и малую оси клетки (C_1 и C_2) и их ядер (N_1 и N_2) (Рисунок 2.3). Объем выборочной совокупности – 100 клеток на мазок.

На основании определенных значений рассчитывали ряд метрических характеристик. Объем клетки (V_c) оценивали с учетом объема ядра (V_n) [90] и ее толщины (h) [100] по уравнению (2.4) [195]:

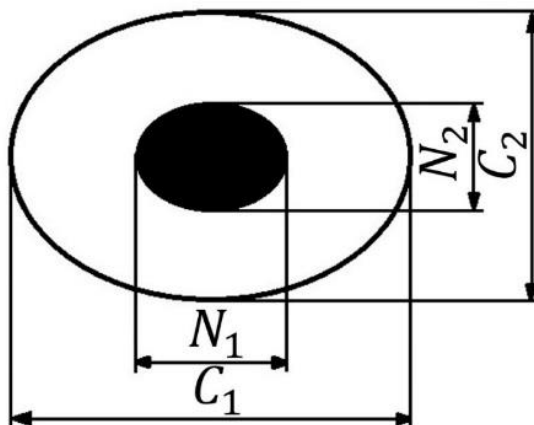


Рисунок 2.3 – Линейные размеры ядерных эритроцитов, контролируемые в работе (C_1 – большая ось клетки; C_2 – малая ось клетки; N_1 – большая ось ядра; N_2 – малая ось ядра)

$$V_c = 0.7012 \cdot \left(\frac{C_1 + C_2}{2}\right)^2 \cdot h + V_n, \quad (2.4)$$

где

V_n – объем ядра (2.5);

$$V_n = \frac{\pi \cdot N_1 \cdot N_2^2}{6}, \quad (2.5)$$

h – толщина клетки (2.6);

$$h = 1.8 + 0.0915 \cdot (C_1 - 7.5), \quad (2.6)$$

C_1 - длина большой оси клетки.

Одновременно рассчитывали площадь поверхности клетки (S_c) (2.7) [90; 195].

$$S_c = 2\pi a^2 b + \frac{2\pi a b \sin(h^{-1}e)}{e}, \quad (2.7)$$

где

a, b, e – коэффициенты, рассчитываемые по формулам (2.8; 2.9; 2.10):

$$a = \frac{C_1 + C_2}{4}, \quad (2.8)$$

$$b = 0,67h, \quad (2.9)$$

$$e = \frac{\sqrt{a^2 + b^2}}{a} \quad (2.10)$$

На основании значений V_c и V_n определяли величину ядерно-плазматического отношения (NCR) (2.11):

$$NCR = \frac{V_c}{V_n} \quad (2.11)$$

Значения S_c и V_c позволяли также рассчитать удельную поверхность эритроцитов (SS_c) (2.12):

$$SS_c = \frac{S_c}{V_c}, \quad (2.12)$$

2.7 Статистический анализ результатов

Нормальность распределения цифровых массивов проверяли, используя критерий Пирсона. Достоверность отличий оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. Корреляционный анализ проб проводился путем расчета коэффициента детерминации R^2 . Объем выборочных совокупностей представлен по тексту. Статистическая обработка цифровых массивов и графическое представление результатов исследований выполнено в программе Grapher 7.0.

ГЛАВА 3 КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ КРОВЕТВОРНЫХ ОРГАНОВ, СОЗРЕВАНИЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ФОРМ ЭРИТРОИДНОГО РЯДА

В настоящей главе представлены результаты светооптических исследований клеточного состава гемопоэтических органов морского ерша (головная почка, селезенка). Особое внимание уделено процессам созревания и дифференцировки эритроидных элементов (на примере бычка-кругляка) с акцентом на их морфометрические характеристики.

3.1 Клеточный состав головной почки и селезенки

Анализ клеточного состава головной почки морского ерша при помощи методов световой микроскопии позволил обнаружить в этом органе форменные элементы всех ростков гемопоэза, находящиеся на различных этапах дифференцировки. Для удобства эти элементы были поделены на 3 размерных кластера: кластер мелких клеток (диаметр 4-7 мкм), кластер средних клеток (диаметр 8-9 мкм) и кластер крупных клеток (диаметр более 10 мкм) (Рисунок 3.1).

3.1.1 Кластер мелких клеток

Данная размерная группа была образована клетками преимущественно округлой формы, диаметр которых составлял 4-7 мкм. Внутри нее выделялось две размерных кластера. Более мелкие клетки диаметром $4,5 \pm 0,2$ мкм имели темно-фиолетовое ядро с плотной структурой и значительной долей гетерохроматина, а также узким ободком цитоплазмы светло-базофильных оттенков. Подобные морфологические признаки характерны для ряда форменных элементов, различить которые методом световой микроскопии не представляется возможным. В сосудах периферического русла описанные структуры идентифицируются как тромбоциты

и малые лимфоциты. Однако, имея дело с кроветворными органами, необходимо учитывать, что схожие морфологические характеристики имеют и колониеобразующие единицы (КОЕ) – родоначальные клетки всех ростков гемопоэза [299]. По-видимому, в данном случае часть подобных форменных элементов принадлежала именно к классу КОЕ. Лимфоциты и тромбоциты, в свою очередь, могли попасть в суспензию клеток непосредственно из сосудов периферического русла.

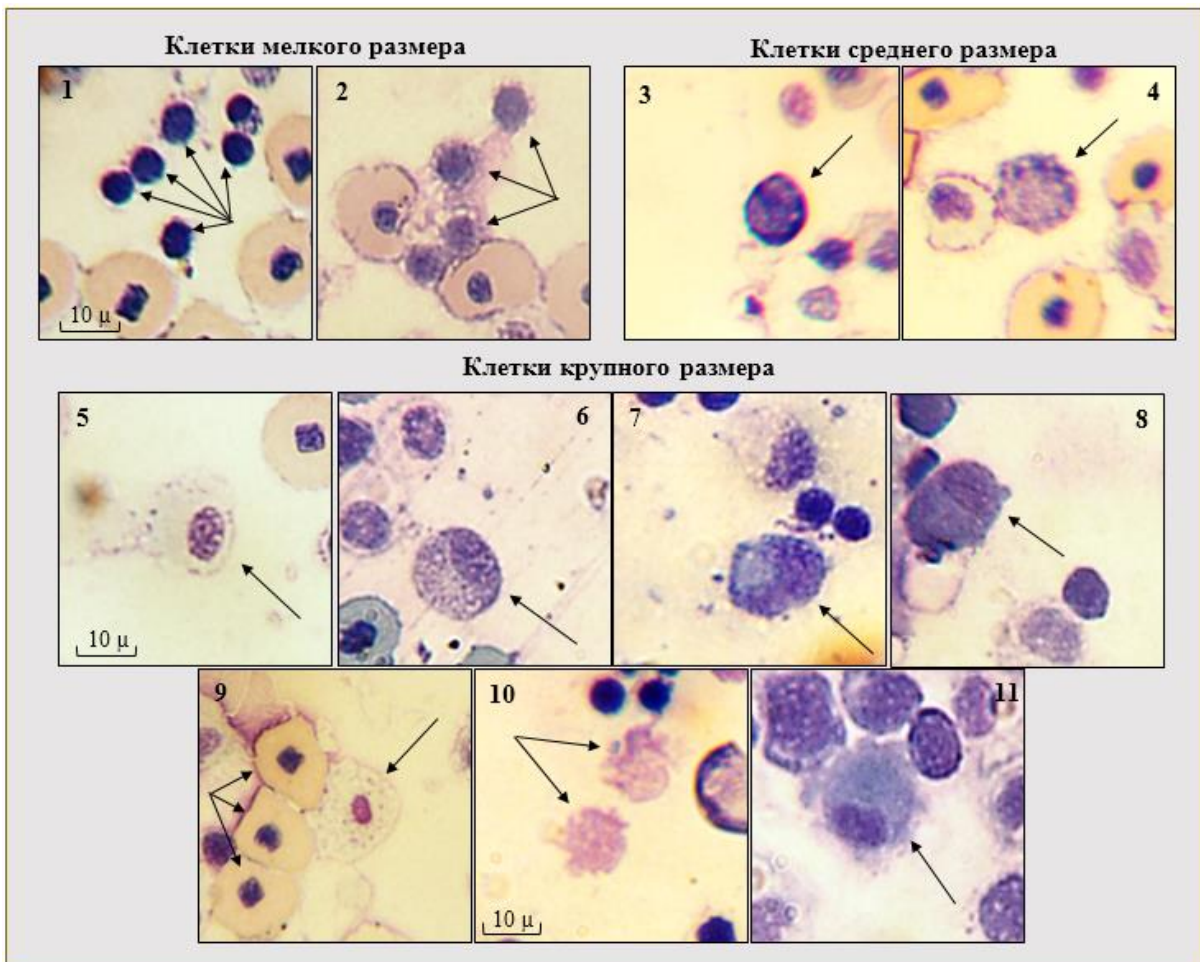


Рисунок 3.1 – Клеточный состав головной почки и селезенки морского ерша

1 – КОЕ (или малые лимфоциты и тромбоциты); 2 – большие лимфоциты; 3 – эритробласт; 4 – миелобласт; 5 – незрелый нейтрофил; 6 – незрелый эозинофил; 7 – незрелый базофил; 8 – незрелый моноцит; 9 – зрелые эритроциты (слева) и макрофаг (справа); 10 – эритроцитарные тени; 11 – плазматическая клетка

Среди кластера мелких клеток, по всей видимости, также присутствовали предшественники лимфоцитов и тромбоцитов: пролимфоциты и протромбоциты. Однако, идентифицировать данные клеточные структуры методом световой микроскопии также весьма затруднительно.

Более крупные клетки из данной размерной группы имели средний диаметр $6,5 \pm 0,1$ мкм и представляли собой большие лимфоциты.

3.1.2 Кластер средних клеток

Данная группа была образована бластными клетками крови всех ростков гемопоэза. Клетки имели диаметр $8,4 \pm 0,2$ мкм, характеризовались крупным ядром, занимающим почти весь объем клетки, цвет которого варьировал от ярко-красного до темно-фиолетового. В цитоплазме, расположенной узким ободком вокруг ядра, часто наблюдалась выраженная перинуклеарная зона. Повышенное содержание эухроматина свидетельствует о высокой функциональной активности ядерных структур.

Ввиду схожести морфологических признаков у всех бластных форм при использовании методов световой микроскопии, нами было выделено 2 типа клеток:

- Эритробласты, цитоплазма которых имела выраженную базофильную окраску.
- Бластные формы клеток белой крови, которые отличались цитоплазмой светлых оттенков. Они включали в себя миелобласты, монобласты, лимфобласты и мегакариобласты.

3.1.3 Кластер крупных клеток

В кластер наиболее крупных клеток входили элементы, диаметром более 10 мкм. Среди них были выделены все типы гранулоцитов, зрелые эритроциты, моноциты, макрофаги, и плазматические клетки, находящихся на различных этапах дифференцировки.

Нейтрофилы, базофилы и эозинофилы представляли собой клетки округлой формы диаметром $10,4 \pm 0,1$ мкм с достаточно крупными, ацентрично расположенными овальными ядрами, размер которых уменьшался по мере созревания. Хроматин в ядрах был несконденсирован. В цитоплазме обнаруживались мелкие гранулы различной окраски, соответствующей типу клетки.

Зрелые эритроциты морского ерша, обнаруженные в головной почке, имели эллипсоидную форму со средними размерами большой и малой оси $12,7 \pm 0,2$ мкм и $9,7 \pm 0,2$ мкм соответственно. Небольшое ядро имело плотную структуру с преобладанием гетерохроматина. Ацидофильная окраска цитоплазмы свидетельствовала о присутствии в ней молекул гемоглобина.

На гистологических препаратах пронефроса были найдены также предшественники моноцитов, находящиеся на различных этапах дифференцировки. Это клетки округлой формы, со средним диаметром $11,4 \pm 0,3$ мкм. Цитоплазма светлая, слегка базофильная. Бобовидное или округлое ядро красно-фиолетовой окраски располагалось ацентрично и занимало большую часть клетки.

Макрофаги составляли группу наиболее крупных элементов среди всей рассмотренной клеточной популяции. Являясь производными моноцитов, они имели непостоянную форму с разнообразными очертаниями. Средний диаметр большой оси составил $18,2 \pm 1,1$ мкм, малой – $13,4 \pm 0,9$ мкм. Ядро округлое или эллипсоидное, небольших размеров. Светло-базофильная цитоплазма содержала несколько крупных и множество мелких включений - фагосом.

Плазматические клетки имели округлую форму со средним диаметром $14,2 \pm 0,5$ мкм. Бобовидное ядро содержало глыбки гетерохроматина и располагалось ацентрично в светло-базофильной цитоплазме.

Следует отметить, что на микрофотографиях регистрировались отдельные случаи кариорексиса клеток.

3.1.4 Селезенка

В селезенке морского ерша были выделены две размерные группы клеток, соответствующие мелкому и крупному кластеру в суспензии пронефроса. Клеточный состав группы мелких клеток соответствовал суспензии головной почки.

Крупный кластер клеток селезенки был образован преимущественно зрелыми эритроцитами. Эритроциты, найденные в селезенке, обладали более выраженной эллипсоидностью (большая ось – $12,15 \pm 0,23$ мкм, малая – $7,91 \pm 0,22$ мкм) и часто имели некоторые нарушения формы (пойкилоцитоз), что характерно для стареющих эритроидных элементов. Среди данных клеток наблюдались случаи свеллинга, диаметр таких эритроцитов составил $18,17 \pm 0,56$ и $14,97 \pm 0,34$ мкм для большой и малой оси соответственно.

Другие форменные элементы в селезенке были малочисленны (менее 2%) и представляли собой эритробласты и клетки белой крови.

3.1.5 Клеточный состав кроветворных органов в период нереста

У всех особей, находившихся в нерестовом состоянии, был отмечен рост числа бластных форм в головной почке (Таблица 3.1). В сравнении с преднерестовым периодом, количество бластных форм белых клеток крови увеличилось в полтора раза и составило $9,3 \pm 2,1\%$. Содержание эритробластов увеличилось более чем – в 2,5 раза – и достигло значений $11,5 \pm 2,3\%$. Одновременно регистрировалось относительное снижение числа клеток наименьшей размерной группы у нерестящихся особей. Их доля среди клеток головной почки составляла $23,3 \pm 7,5\%$, что на 30% меньше, чем у особей в преднерестовом состоянии. Количество больших лимфоцитов снизилось на треть и составило $14,2 \pm 3,3\%$.

Основную часть форменных элементов крупного кластера у всех исследуемых особей составили гранулоциты, находящиеся на различных этапах дифференцировки. Наиболее массовыми представителями этой группы были

малодифференцированные нейтрофилы. У особей, находящихся в преднерестовом состоянии, на их долю приходилось более 24% всей клеточной популяции головной почки, у нерестящихся – более 37 %. Число эозинофилов существенно не изменялось и находилось на уровне 2-3 %. Базофилы у рыб встречаются крайне редко [35], в нашем случае их было обнаружено менее 0,3%.

Таблица 3.1 – Относительное содержание форменных элементов в головной почке особей морского ерша, находящихся в преднерестовом состоянии и состоянии нереста, n – число особей

Форменные элементы	Преднерестовое состояние (n=10)	Состояние нереста (n=10)
Бластные формы клеток белой крови, %	6,09±1,5	9,3±2,1
Эритробласты, %	4,70±1,78	11,5±2,3
Мелкий кластер (малые лимфоциты, тромбоциты и КОЕ), %	32,54±5,47	23,3±7,5
Большие лимфоциты, %	21,28±4,35	14,2±3,3
Предшественники нейтрофилов, %	24,05±4,75	37,07±7,48
Предшественники эозинофилов, %	2,17±1,46	2,03±0,98
Предшественники базофилов, %	0,26±0,14	0,09±0,17
Промоноциты, %	5,63±1,87	1,9±0,3
Макрофаги, %	1,3±0,43	0,2±0,13
Плазматические клетки, %	0,6±0,35	0,31±0,09
Зрелые эритроциты, %	1,38±0,75	0,1±0,08

Относительное содержание пролиферирующих моноцитов, напротив, понижалось. У нерестящихся особей их содержание регистрировалось на уровне $1,9 \pm 0,3 \%$, тогда как в преднерестовом состоянии их число было в 3 раза большим.

Относительно содержания макрофагов, плазматических клеток и зрелых эритроцитов достоверных различий обнаружено не было, их количество не превышало 3 % от всех форменных элементов пронефроса.

Среди эритроидных элементов головной почки встречались единичные случаи кариорексиса и лизиса эритроцитов (эритроцитарные тени).

Клеточные популяции селезенки были представлены зрелыми эритроцитами, а также клетками мелкого кластера (тромбоцитами, колониеобразующими единицами, большими и малыми лимфоцитами) (Таблица 3.2). Кроме того, на мазках отмечены эритроцитарные тени. Количество других форменных элементов не превышало 2%, среди них наиболее массовыми представителями в нерестовый период были эритробласты (0,86%).

Таблица 3.2 – Содержание форменных элементов в селезенке особей морского ерша, находящихся в преднерестовом состоянии и состоянии нереста, n – число особей

Форменные элементы	Преднерестовое состояние (n=10)	Состояние нереста (n=10)
Зрелые эритроциты, %	$22,08 \pm 4,67$	$24,44 \pm 5,81$
Мелкий кластер (лимфоциты, тромбоциты и КОЕ), %	$58,73 \pm 5,72$	$56,73 \pm 6,48$
Эритроцитарные тени, %	$18,79 \pm 3,46$	$16,64 \pm 3,12$
Эритробласты, %	$0,23 \pm 0,18$	$0,86 \pm 0,23$
Другие форменные элементы	около 1%	около 1%

3.2 Морфометрические характеристики эритроидных элементов в процессе созревания и дифференцировки

Напомним, что процесс созревания и дифференцировки эритроидных элементов крови у рыб включает следующие последовательные этапы: базофильные нормобласты (БН) → полихроматофильные нормобласты (ПН) → нормоциты.

3.2.1 Геометрические характеристики клеток

В процессе дифференцировки происходили однозначные изменения формы клетки. БН имели округлую форму (Рисунок 3.2). Различия между большой и малой осями (C_1 и C_2 соответственно) не превышали 10% ($C_1 - 7,78 \pm 0,18$ мкм; $C_2 - 7,07 \pm 0,13$). Между линейными характеристиками существовала выраженная связь ($R^2 0,514$) (Рисунок 3.3). Показатель формы (MS) имел самые низкие значения – $1,10 \pm 0,01$. Толщина (h) и объем клетки (V_c) были минимальны и составляли $1,83 \pm 0,02$ мкм и $104,5 \pm 6,8$ мкм³ соответственно.

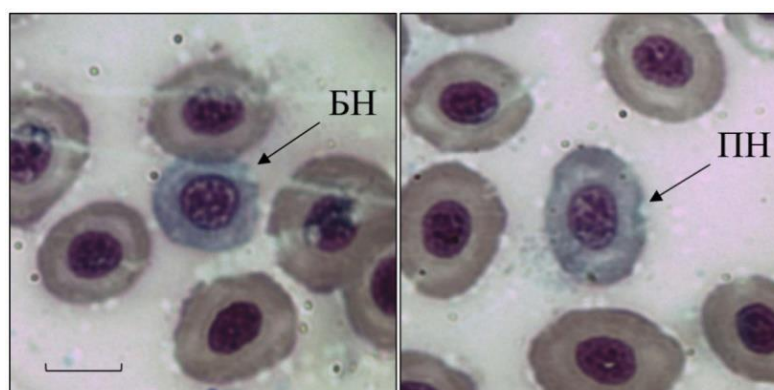


Рисунок 3.2 – Незрелые эритроидные элементы в крови бычка-кругляка (БН – базофильные нормобласты; ПН – полихроматофильные нормобласты)

Начиная с ПН, связь между C_1 и C_2 утрачивалась ($R^2 0,032$) (Рисунок 3.3). Явно превалировал рост C_1 . Увеличение составило 19% ($p < 0,05$; $9,22 \pm 0,25$ мкм).

Изменение C_2 статистически не было выражено (Рисунок 3.3). В результате клетки приобретали эллипсоидную форму (Рисунок 3.2). Значения MS увеличивались на 17% ($p < 0,01$) и достигали $1,29 \pm 0,03$. Это происходило на фоне незначительного увеличения h на 7% ($p < 0,05$; $1,96 \pm 0,02$ мкм) и повышения V_c на 20% ($p < 0,01$; $125,7 \pm 5,2$ мкм³).

Отмеченная направленность изменений сохранялась и на этапе: ПН → нормоцит. Наблюдали дальнейший рост C_1 . Относительно ПН увеличение составило 9% ($p < 0,05$; $10,1 \pm 0,2$ мкм). При этом значения C_2 , напротив, понижались (Рисунок 3.3). Эритроциты приобретали еще более выраженную форму эллипса (Рисунок 3.2). Показатель формы достигал максимальных значений – $1,46 \pm 0,06$. Толщина клетки (h) увеличивалась еще на 10% ($p < 0,05$; $2,03 \pm 0,02$ мкм). При этом объем клетки (V_c) не изменялся. Значения сохранялись на уровне, отмеченном для ПН ($124,6 \pm 3,9$ мкм³).

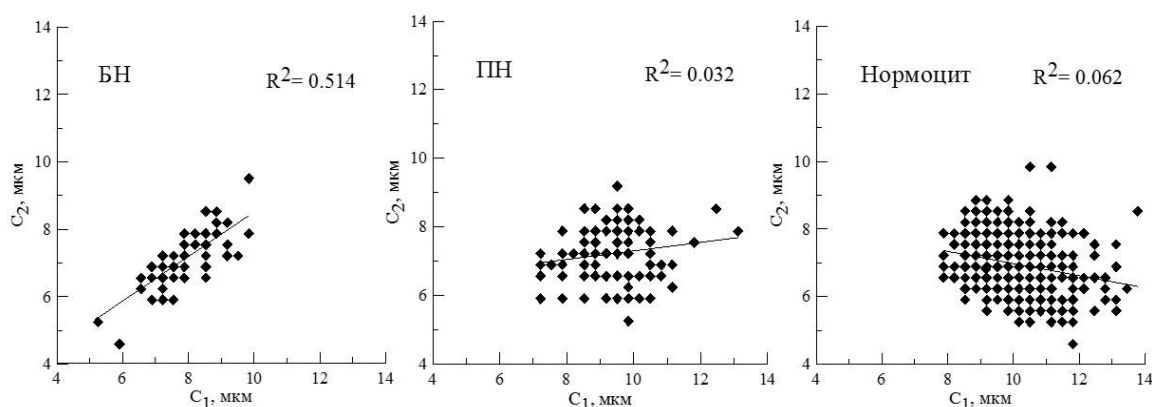


Рисунок 3.3 – Зависимости между продольными (C_1) и поперечными (C_2) осями эритроидных элементов крови бычка-кругляка в процессе созревания

3.2.2 Геометрические характеристики ядер клеток

Максимальный объем ядра (V_n) отмечали у БН – $32,7 \pm 4,1$ мкм³. На его приходилось 31% от объема клетки. В сравнении с другими эритроидными формами (ПН, нормоцит) доля эухроматина была максимальна (Рисунок 3.2). На данном этапе клеточной дифференцировки отмечали выраженную корреляцию

между V_c и V_n (R^2 0,654) (Рисунок 3.4). Ядерно-плазматическое отношение (NCR) имело минимальные значения – $3,40 \pm 0,26$.

У ПН объем ядра сохранялся на уровне значений, отмеченных для БН – $31,8 \pm 3,3$ мкм³. Однако доля эухроматина явно понижалась (Рисунок 3.2). Утрачивалась связь между V_c и V_n (R^2 0,272) (Рисунок 3.4). Значения NCR повышались на 26% ($p < 0,05$) и составляли $4,28 \pm 0,34$, что было связано с увеличением объема клетки.

На стадии нормоцита относительно ПН объем ядра уменьшался на 36% ($p < 0,05$) ($20,4 \pm 1,2$ мкм³). На него приходилось около 16% объема клетки. Зоны эухроматина практически не были выражены (Рисунок 3.2). Связь между V_c и V_n была крайне слабой (R^2 0,179) (Рисунок 3.4). Величина NCR достигала максимальных значений – $6,47 \pm 0,35$. Это определялось уменьшением V_n , так как значения V_c оставались на уровне, отмеченном для ПН.

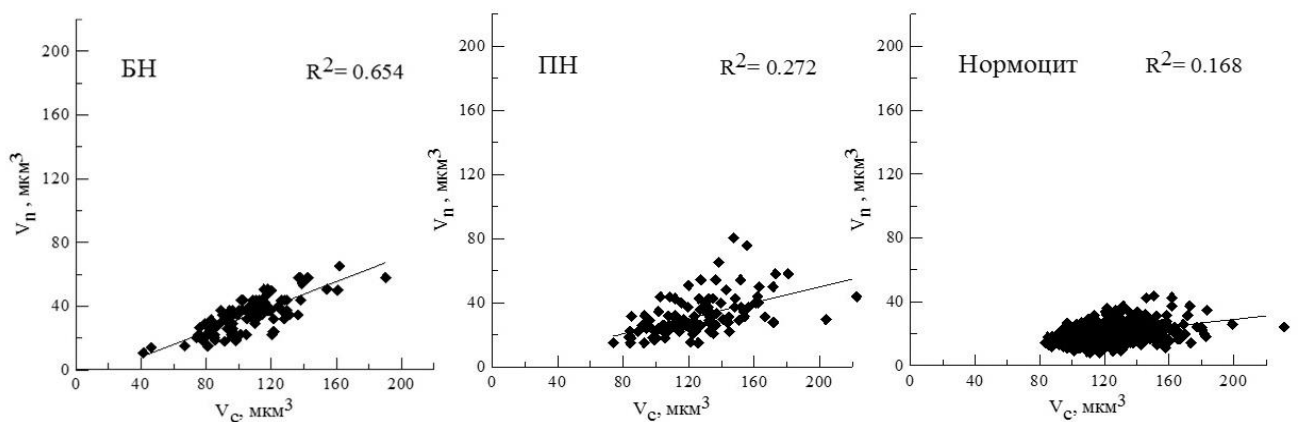


Рисунок 3.4 – Зависимости между объемом ядра (V_n) и объемом клетки (V_c) у эритроидных элементов крови бычка-кругляка в процессе созревания

3.2.3 Морфофункциональные характеристики клеток

При оценке респираторных характеристик эритроцитов важно учитывать диффузионную поверхность клетки (S_c), ее удельную поверхность (SS_c) и толщину диффузионного слоя (h) (Рисунок 3.5).

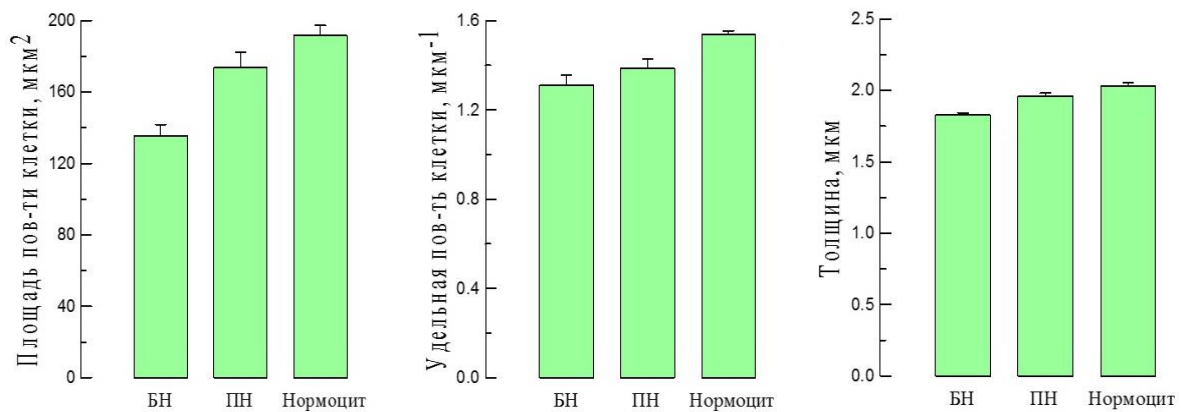


Рисунок 3.5 – Площадь поверхности (S_c), удельная поверхность (SS_c) и толщина (h) эритроидных элементов бычка-кругляка в процессе созревания (БН – базофильные нормобласты; ПН – полихроматофильные нормобласты; по осям ординат: S_c , SS_c , h ; по осям абсцисс: стадии созревания эритроидных элементов)

Минимальная площадь поверхности была отмечена у БН – $135,5 \pm 6,3 \mu\text{m}^2$. Процесс созревания и дифференцировки в ряду: БН→ПН→нормоцит, сопровождался увеличением значений данного показателя более чем на 40% ($p < 0,001$). У зрелого эритроцита S_c составляла $191,6 \pm 5,8 \mu\text{m}^2$. Одновременно равномерно повышалась удельная поверхность клеток. Различия между БН и нормоцитом составляли более 17% ($p < 0,001$). Сходным образом изменялась толщина диффузионного слоя. В сравнении с БН рост h составил 11% ($p < 0,001$).

3.3 Обсуждение результатов исследований

Как уже отмечали, гемопоэз костистых рыб характеризуется значительным сходством с высшими позвоночными [165; 166]. Клеточный состав крови рыб близок к млекопитающим: 98-99% гематокрита составляют эритроциты, а остальная часть клеток сформирована лейкоцитами и тромбоцитами [257]. Среди клеток белой крови выделяют субпопуляции лимфоцитов, моноцитов, макрофагов, гранулоцитов и неспецифических цитотоксических клеток [211]. Вместе с тем,

образование форменных элементов крови проходит в специфических органах: в головной почке (пронефрос) и селезенке. При этом в специализации органов кроветворения обнаруживается видовая специфичность. У большинства видов костистых рыб селезенка осуществляет функцию депонирования и утилизации старых эритроцитов [1; 323], а основную гемопоэтическую функцию берет на себя головная почка, которая морфологически сходна с красным костным мозгом высших позвоночных [1; 135; 274; 335;]. С другой стороны, известны виды, у которых в селезенке отмечено образование эритроцитов и лимфоцитов [1; 323]. В головной почке при этом может отсутствовать эритроидный росток кроветворения [160] и орган специализируется только на формировании клеток белой крови.

Известно, что клеточный состав и гематологические показатели крови костистых рыб непостоянны в течение года и зависят от множества факторов. Показано, что эти параметры существенно зависят от изменений температуры воды, концентрации в ней кислорода, длины светового дня [218]. Так, сезонное увеличение температуры вызывало возрастание числа эритроцитов, концентрации гемоглобина и гематокрита у радужной форели [209]. Снижение температуры воды индуцировало уменьшение значений этих показателей и числа лейкоцитов крови у *Tinca tinca* [145] и sea beam (*Sparus aurata*) [283]. Показано, что подобные колебания состава крови обусловлены снижением активности гемопоэза в кроветворных органах [140] и ингибированием экспрессии генов, ответственных за активацию кроветворения [221]. Следует учитывать также, что интенсивность пролиферации клеток кроветворной ткани рыб зависит и от нерестового периода [238; 292]. Отмечено, что в период нереста наблюдалось снижение числа эритроцитов, гемоглобина и гематокрита, а также увеличение числа лейкоцитов крови у *winter flounder*, *Channa punctatus*, *tinca tinca* [130; 150]. Аналогичные результаты были получены на других видах рыб.

Кроме того, межвидовые различия обнаруживаются и в морфологических характеристиках клеток крови [323]. Особую сложность представляет дифференциация клеток по стадиям зрелости, а также идентификация бластных форм в кроветворной ткани. Это отчасти объясняется тем, что традиционные

методы изучения крови млекопитающих не дают адекватных результатов при использовании на рыбах. Все эти факторы усложняют изучение процесса гемопоэза рыб. Поэтому перед проведением исследований по влиянию температуры, гипоксии и антропогенных факторов среды нами были выполнены работы, которые нашли отражение в настоящей главе диссертационной работы.

3.3.1 Клеточный состав гемопоэтических органов

На мазках головной почки морского ерша (раздел 3.1) были идентифицированы клетки всех линий крови рыб: эритроидного, миелоидного и лимфоидного ростков кроветворения. Это позволяет рассматривать головную почку в качестве ключевого органа кроветворения у морского ерша. Основную массу клеток данного органа составляли незрелые элементы, находящиеся на разных этапах дифференцировки. Зрелые форменные элементы были относительно немногочисленны. Эритроциты, встречаемые нами на мазках, по-видимому, попали в суспензию из сосудов периферического русла в момент отбора образцов ткани. Очевидно, что при таком соотношении зрелых/незрелых клеток пронефрос является местом образования клеток крови, а не их резервирования.

Отдельного внимания заслуживают макрофаги, плазматические клетки, а также моноциты, находящиеся на различных стадиях дифференцировки, обнаруживаемые нами на мазках головной почки. Их наличие свидетельствует о том, что головная почка морского ерша является также и центром неспецифического клеточного иммунитета [308]. Подобная специализация головной почки характерна для костистых рыб [135; 142]. Макрофаги и моноциты были обнаружены в почках различных видов рыб [204; 278]. Происхождение и структура плазматических клеток в пронефросе остается неясной. Как правило, они отсутствуют, либо присутствуют в незначительных количествах в циркулирующей крови, но могут находиться в гемопоэтической ткани [242]. Общее количество макрофагов, моноцитов и плазматических клеток в головной почке скорпены

составило около 3%. Несмотря на то, что иммунная система рыб высокочувствительна к уровню половых гормонов [185], мы не обнаружили существенных различий в содержании макрофагов, моноцитов и плазматических клеток в головной почке. Нерестовый период, по-видимому, повлиял лишь на качественные характеристики иммунных клеток (например, фагоцитарную активность), но не на их количество.

Иная ситуация наблюдалась в селезенке. В преднерестовый период на мазках селезенки обнаруживались преимущественно эритроциты. При этом они имели более вытянутую форму, которая присуща стареющим клеткам. Кроме того, на микрофотографиях селезенки часто встречались макроциты (эритроциты с диаметром большой оси $16,9 \pm 0,4$ мкм, малой – $11,5 \pm 0,3$ мкм). Подобное набухание эритроцитов обычно предшествует их лизису [77]. Вышеуказанные особенности морфологии эритроцитов, а также наличие большого числа эритроцитарных теней позволяют заключить, что селезенка морского ерша выполняет в первую очередь функцию депонирования и утилизации стареющих красных клеток крови. Эта гипотеза соответствует предположению о том, что селезенка у костистых рыб утратила свою роль в образовании крови, в отличие от хрящевых рыб [160].

В преднерестовый период в селезенке не обнаруживалось признаков пролиферации клеток. У нерестящихся особей, напротив, на мазках отмечались эритробласты. У рыб, как известно, синтез новых эритроцитов осуществляется преимущественно в период нереста. В период функционального покоя активность эритропоэтической ткани, как правило, подавлена [292; 323]. Этот факт позволяет рассматривать селезенку как орган вторичного эритропоэза, активация которого происходит периодически. Селезенка скорпены содержала большое количество тромбоцитов и лимфоцитов. Тромбопоэз у костистых изучен слабо в сравнении с другими гематопоэтическими ростками. Известно, что образование тромбоцитов в селезенке характерно для акулообразных [155]. Среди костистых тромбопоэтическая активность селезенки была продемонстрирована у нескольких видов [270]. Аналогичным образом, в недавних исследованиях сообщалось о возникновении лимфопоэза в селезенке [278]. Однако мы не наблюдали никаких

других типов бластных клеток, кроме эритроидных на мазках селезенки. По-видимому, селезенка скорпены выполняет исключительно функцию депонирования лимфоцитов и тромбоцитов.

Из результатов исследования, представленных в разделе 3.1, следует, что нерест морского ерша был связан с активизацией деятельности кроветворных органов. Наиболее существенные изменения происходили в селезенке, на мазках которой отмечено появление эритробластов. В головной почке также регистрировалось увеличение числа эритробластов, а также других бластных клеток. Однако количество эритробластов превалировало над числом других бластных форм. По-видимому, период нереста оказывает наибольшее влияние именно на эритропоэз. В нескольких работах было показано, что состав клеток крови различных видов значительно изменяется во время (или после) размножения [209]. В настоящей работе мы также продемонстрировали сезонный характер эритропоэза у морского ерша. Интересно, что период зимовки сопровождался полным торможением гемопоэтической функции в селезенке, но в почках наблюдалось небольшое количество эритробластов. Этот факт следует дополнительно исследовать. В нашей работе мы не наблюдали значительного увеличения числа бластных форм белых клеток крови у нерестящихся особей. Однако в почках число созревающих нейтрофилов было увеличено, а число моноцитов уменьшено по сравнению с таковыми во время зимовки. Подобные изменения в кроветворной ткани могут влиять на количество эритроцитов и лейкоцитов в циркулирующей крови. К сожалению, мы не контролировали эти показатели в нашей работе. Однако в исследованиях, выполненных на других видах костистых рыб, эта закономерность была отмечена [239]. Ряд авторов регистрировали лимфоцитопению у костистых в течение нерестовых месяцев [180; 266]. Однако неясно, связаны ли эти последствия с гемопоэтическими изменениями или просто вызваны увеличением количества эритроцитов в циркулирующей крови.

3.3.2 Морфометрические характеристики эритроидных элементов крови в процессе созревания и дифференцировки

В целях более детального изучения процессов созревания и дифференцировки эритроидных элементов в крови рыб, было проведено исследование морфометрических характеристик незрелых эритроидных элементов циркулирующей крови бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus* P.): позднего базофильного нормобласта (БН), полихроматофильного нормобласта (ПН), нормоцита (зрелый эритроцит).

Известно, что эритроидный росток гемопоэза у костистых рыб представлен стволовыми формами → эритробласти → проэритробласти → базофильными нормобласти → полихроматофильными нормобласти → ацидофильными нормобласти → ретикулоцитами → нормоцитами (зрелыми эритроцитами) [234; 87]. В ранних работах вместо термина «стволовые клетки» использовался термин «гемоцитобласты» [35]. В настоящее время он практически не употребляется. Стадию эритробласти также выделяют не во всех работах, что связано с определенными трудностями ее морфологической идентификации. Поэтому обычно эритроидный ряд начинают с проэритробласти [87; 156]. Его же рассматривают как морфологический аналог стволовых клеток крови. В связи с неопределенностью морфологических признаков также достаточно редко выделяют и стадию ретикулоцита.

Пролиферирующий пул эритроидных клеток локализован в основном в про- и мезонефросе, частично имеет место в селезенке [138; 199]. Способность к митотическому делению утрачивается на стадии позднего базофильного нормобласти [106]. Эти клетки перестают адсорбироваться стромой почек (селезенки) [106] и вымываются в кровоток [294], где завершают процесс дифференцировки, превращаясь в зрелый эритроцит (нормоцит). При этом происходит ряд последовательных морфологических изменений [87; 234; 280]: уменьшение размеров ядра и повышение в нём доли гетерохроматина; понижение содержания РНК в цитоплазме и накопление в ней гемоглобина (смена

базофильной окраски цитоплазмы на ацидофильную). Одновременно округлая клетка постепенно приобретает форму эллипса. Всё это можно наблюдать в ряду: базофильный нормобласт → полихроматофильный нормобласт → нормоцит (зрелый эритроцит).

Несмотря на относительную ясность наблюдаемых изменений, информация о морфометрических характеристиках клеток, определяющих их респираторные свойства (удельная поверхность, толщина диффузионного слоя и др.) фактически отсутствует. В то же время, на финальных этапах дифференцировки эритроцит приобретает оптимальную форму, обеспечивающую его участие в газотранспортных процессах. Количественная оценка этих преобразований впервые приводится в настоящей работе.

Из результатов, представленных выше, следует обратить внимание на следующие моменты.

- Изменение формы клетки начиналось на стадии ПН. Прогрессивно увеличивалась продольная ось (C_1) при сохранении значений (C_2). Эритроидный элемент приобретал форму эллипса. Одновременно повышалась общая и удельная поверхность клетки (S_c, SS_c), росли ее объем (V_c) и толщина (h).
- Аналогичная направленность процессов сохранялась на этапе: ПН → нормоцит, но изменение объема клетки, при этом не было выражено.
- Снижение объема ядра (V_n) происходило только при трансформации ПН в нормоцит.

Изменение формы на стадии ПН совпадало с повышением содержания гемоглобина в цитоплазме. Об этом свидетельствовало изменение ее цвета от базофильной до светло-серой окраски (накопление ацидофильного компонента) (Рисунок 3.2). Этот процесс, по-видимому, и определяет рост объема ПН (V_c). Ранее обнаружена прямая связь между содержанием гемоглобина и уровнем спектрина в клетке ($r > 0,5$) [26]. Это позволяет предположить согласованность синтеза данных соединений. Известно, что спектрин относится к группе интегральных мембранных

белков и составляет основу цитоскелета эритроцита (полоса 1 и 2 по Фейрбанксу) [127], а гемоглобин является одним из основных белков примембранного слоя, стабилизирующего конфигурацию клетки [327]. Следует обратить внимание и на наличие положительной связи между содержанием гемоглобина и уровнем тропомиозина (полоса 7 по Фейрбанксу) (r около 0,6) [26]. Тропомиозин организует структуру полимерного актина, что обеспечивает его взаимодействие со спектрином цитоплазматической мембраны [315]. Все выше перечисленное позволяет предположить, что появление гемоглобина в цитоплазме ПН индуцирует процессы формирования цитоскелета и изменение формы эритроцита.

В отличие от спектрина и тропомиозина, содержание других компонентов цитоскелета: анкерина (синдеина), белков полос 3-6 и 8-9 (по Фейрбанксу), фактически не зависит от концентрации гемоглобина в клетке (r 0,06-0,43) [26]. По всей видимости, они появляются на этапе поздних ПН, когда концентрация гемоглобина достигает предельных значений и объем клеток перестает увеличиваться. Эта группа белков завершает формирование цитоскелета и формы клетки, то есть определяет переход ПН в нормоцит.

Из результатов, представленных в настоящей работе, следует, что процессы созревания и дифференцировки клеток эритроидного ряда у бычка-кругляка на этапах: поздний БН \rightarrow ПН \rightarrow нормоцит, направлены не только на повышение содержания гемоглобина в цитоплазме клетки, но и на совершенствование ее формы. Диффузионная поверхность эритроцита существенно повышается, что способствует росту его респираторных характеристик (S_c увеличивалась более чем на 40%; SS_c – более чем на 17%). Ядро сохраняется в клетке, но его объем существенно понижается, а доля эухроматина крайне незначительна, что позволяет констатировать значительное понижение обменных процессов в клетке.

Единственным негативным изменением следует считать рост толщины диффузионного слоя (h). Это, по-видимому, явилось следствием увеличения краевого утолщения клетки. Однако, если принять во внимание то, что гемоглобин в эритроците в основном сосредоточен в примембранном слое [327], то вести речь об увеличении диффузионного расстояния не приходится. Дистанция между

поверхностью эритроцита и примембранным белковым слоем остается постоянным.

Таким образом, процесс созревания и дифференцировки эритроидных элементов (поздние БН → ПН → нормоциты) в циркулирующей крови *Neogobius melanostomus* P. предполагает совершенствование респираторных характеристик клеток. Основные изменения происходят на этапе: ПН → нормоциты. Они включают: накопление гемоглобина в цитоплазме, подавление функциональной активности ядра и значительный рост диффузионной поверхности. При этом клетки приобретают форму эллипса.

* * *

Представленные в настоящей главе результаты исследований и их анализ позволяют сделать ряд обобщений.

- Организация гемопоэза у морского ерша в целом соответствует общим принципам формирования клеток крови у других костистых. Головная почка является основным гемопоэтическим органом, содержащим бластные клетки всех гемопоэтических рядов. Селезенка функционирует как эритропоэтический орган только в период нереста, являясь «резервным» местом формирования эритроцитов у взрослых особей морского ерша. Гемопоэтическая активность обоих органов усиливается в нерестовый период, и это усиление преимущественно вызвано активацией эритроидного ростка кроветворения.
- Процесс созревания и дифференцировки эритроидных элементов (поздние БН → ПН → нормоциты) в циркулирующей крови *Neogobius melanostomus* P. предполагает совершенствование респираторных характеристик клеток. Основные изменения происходят на этапе: ПН → нормоциты. Они включают: накопление гемоглобина в цитоплазме, подавление функциональной активности ядра и значительный рост диффузионной поверхности. При этом клетки приобретают форму эллипса.

ГЛАВА 4 ЭРИТРОЦИТЫ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ КРОВИ МОРСКОГО ЕРША (*SCORPAENA PORCUS* L. 1758) В УСЛОВИЯХ ОСТРОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

Диффузия кислорода в водной среде протекает почти в 10000 раз менее эффективно, чем в воздушной среде. В связи с этим любое ограничение водообмена в акватории приводит к сравнительно быстрому понижению содержания кислорода и формированию устойчивых во времени гипоксических зон [152; 205]. Последние широко представлены в водах Мирового океана и Черного моря [172; 228; 244]. На сегодняшний момент дефицит кислорода является одним из ведущих факторов водной среды и оказывает существенное влияние на функциональное состояние морских организмов, их популяций и экосистем.

В настоящей главе диссертационной работы приводятся результаты экспериментального изучения влияния ранжированной гипоксии на эритроциты циркулирующей крови устойчивого к гипоксии морского ерша, для которого установлены низкие значения критических и пороговых концентраций кислорода [44]. Экспериментальная схема подробно рассмотрена ранее (см. главу 2).

4.1 Концентрация гемоглобина и число эритроцитов в крови морского ерша

Концентрация гемоглобина и число эритроцитов в крови контрольной группы рыб составляли $43,7 \pm 2,8$ г л⁻¹ и $0,86 \pm 0,07$ (10^6) кл-к мкл⁻¹. Снижение содержания кислорода в воде до уровня 30% насыщения не оказывало значимого влияния на данные показатели (Рисунок 4.1). При более глубокой гипоксии (15% насыщения) концентрация гемоглобина и число эритроцитов в крови ерша понижались соответственно на 17,6% и 12,8% ($p \leq 0,05$).

При данных условиях наблюдали также увеличение объема циркулирующих эритроцитов. При 15% насыщении он составил $270,4 \pm 1,7$ мкм³, что на 4,1% ($p \leq 0,01$) выше контрольных значений ($259,7 \pm 1,3$ мкм³). При 30% насыщении воды

кислородом эритроциты, напротив, уменьшались в объеме на 4,0% ($p < 0,01$) ($249,1 \pm 1,5$ мкм³). Отмеченные выше изменения происходили на фоне роста осмотической стойкости эритроцитов при 15% насыщении воды кислородом, что допускает лизис части клеток (Таблица 4.1). Максимальная (полный лизис) и минимальная (начало лизиса) резистентность эритроцитов повышалась на 17-18 % ($p \leq 0,01$), то есть разрушение клеток происходило при более низких концентрациях NaCl в инкубационной среде.

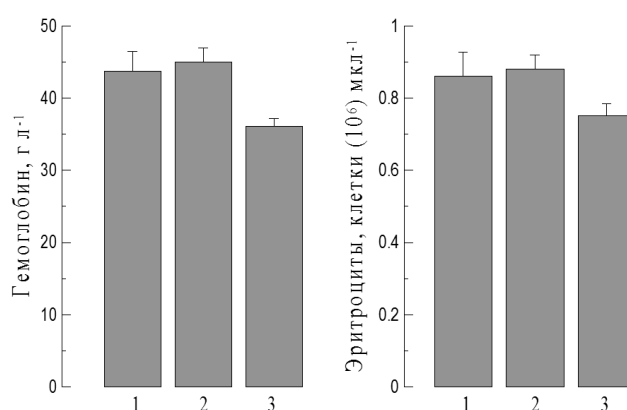


Рисунок 4.1 – Концентрация гемоглобина и число эритроцитов в крови морского ерша при различном насыщении воды кислородом (1 – нормоксия; 2 – 30% насыщение; 3 – 15% насыщение)

Таблица 4.1 – Показатели осмотической стойкости циркулирующих эритроцитов морского ерша в условиях экспериментальной гипоксии

Условия эксперимента	n	Осмотическая резистентность, % NaCl	
		Минимальная	Максимальная
Нормоксия	7	0,484±0,013	0,311±0,013
Насыщение 30%	5	0,429±0,029	0,293±0,025
Насыщение 15%	6	0,400±0,020	0,225±0,014

Примечание: n – число особей

4.2 Содержание незрелых и аномальных эритроидных форм в крови морского ерша

Анализ содержания незрелых эритроидных форм (базофильных и полихроматофильных нормобластов) в крови ерша показал, что при 15% насыщении воды кислородом их содержание относительно контрольных значений уменьшалось на 2,2% ($p \leq 0,05$) (Рисунок 4.2). Это в большей степени затрагивало мало дифференцированные эритроидные формы: базофильные нормобласты (БН), чем полихроматофильные нормобласты (ПН). Индекс БН/ПН уменьшался на 26%. При более высоком насыщении воды кислородом (30%) этого не наблюдали.

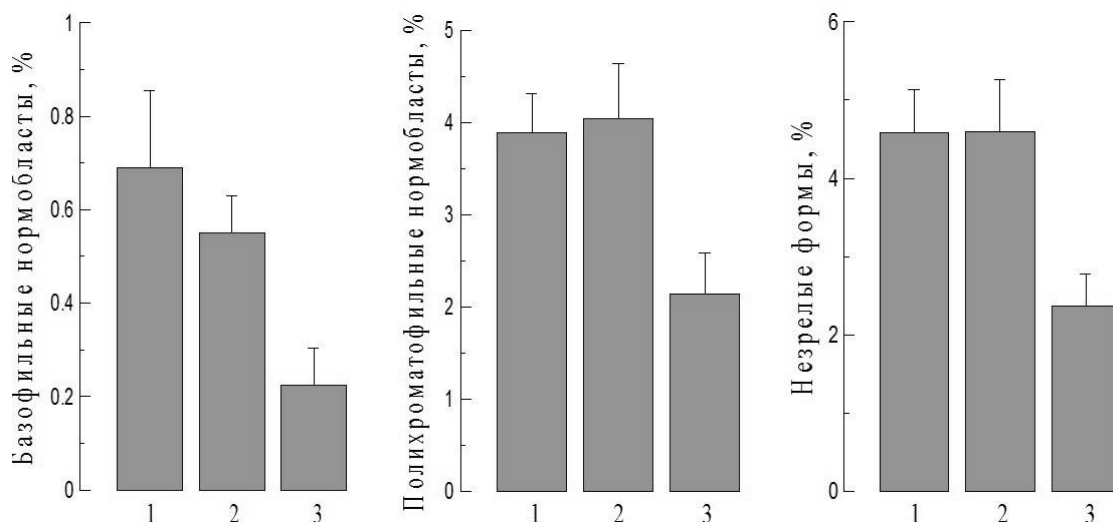


Рисунок 4.2 – Содержание незрелых эритроидных форм в крови морского ерша при различном насыщении воды кислородом (1 – нормоксия; 2 – 30% насыщение; 3 – 15% насыщение)

Одновременно наблюдали понижение числа эритроцитарных аномалий в крови относительно контрольной группы рыб: дакриоцитов – на 0,4% ($p \leq 0,05$), клеток с микроядерными включениями – на 0,05% ($p \leq 0,001$) и эритроцитарных теней – на 0,26% ($p \leq 0,001$). Это происходило только при 15% насыщении кислородом воды (Рисунок 4.3). Единственной аномалией, содержание которой сохранялось в крови на уровне контрольных значений, являлись клетки со

случаями инвагинации ядра. При 30% насыщении воды кислородом в сравнении с контрольной группой рыб различия не были выражены.

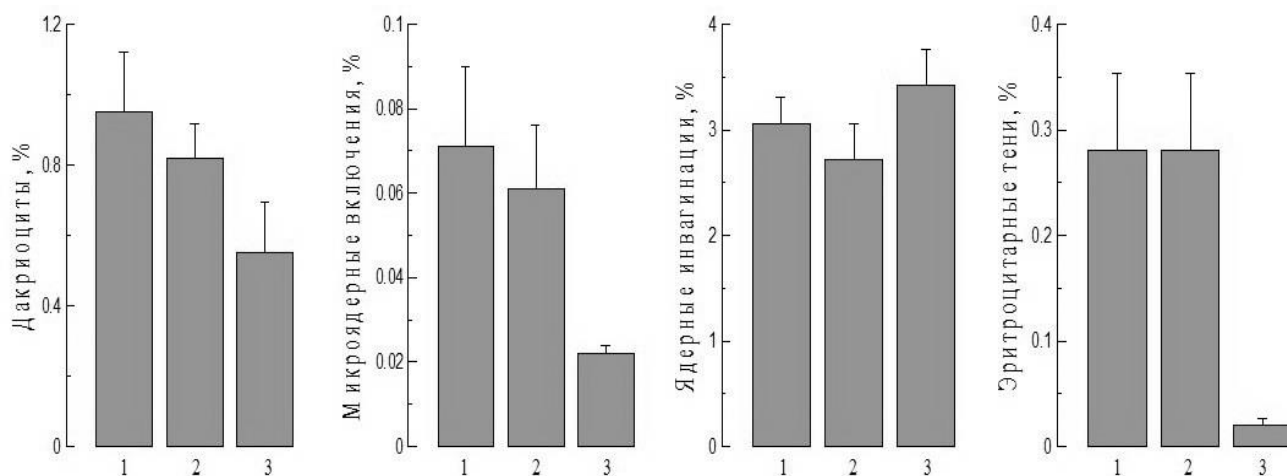


Рисунок 4.3 – Содержание аномальных эритроидных форм в крови морского ерша при различном насыщении воды кислородом (1 – нормоксия; 2 – 30% насыщение; 3 – 15% насыщение)

Морфологические особенности аномальных и незрелых клеток эритроидного ряда показаны на Рисунке 4.4. Они подробно описаны в предыдущей главе.

4.3 Обсуждение результатов исследования

Участие системы красной крови костистых рыб в адаптации к среде с низкой концентрацией кислорода наиболее активно исследуется последние 30 лет. Показано, что гипоксия и анемия усиливают продукцию эритропоэтина в почках рыб [220; 223]. Это соединение впервые было идентифицировано у данной систематической группы с использованием методов иммунохимического анализа [321], а в настоящее время у *Fugu rubripes* подробно описана структура его гена [139]. Эритропоэтин повышает темпы пролиферации и дифференцировки в эритроидном ростке гемопоэза, что с течением времени смещает эритроцитарный

баланс в пользу продукционных процессов и сопровождается ростом кислородной емкости крови [247; 292]. Однако этот процесс сравнительно инерционен и развивается в течение достаточно продолжительного периода времени (дни) [292].

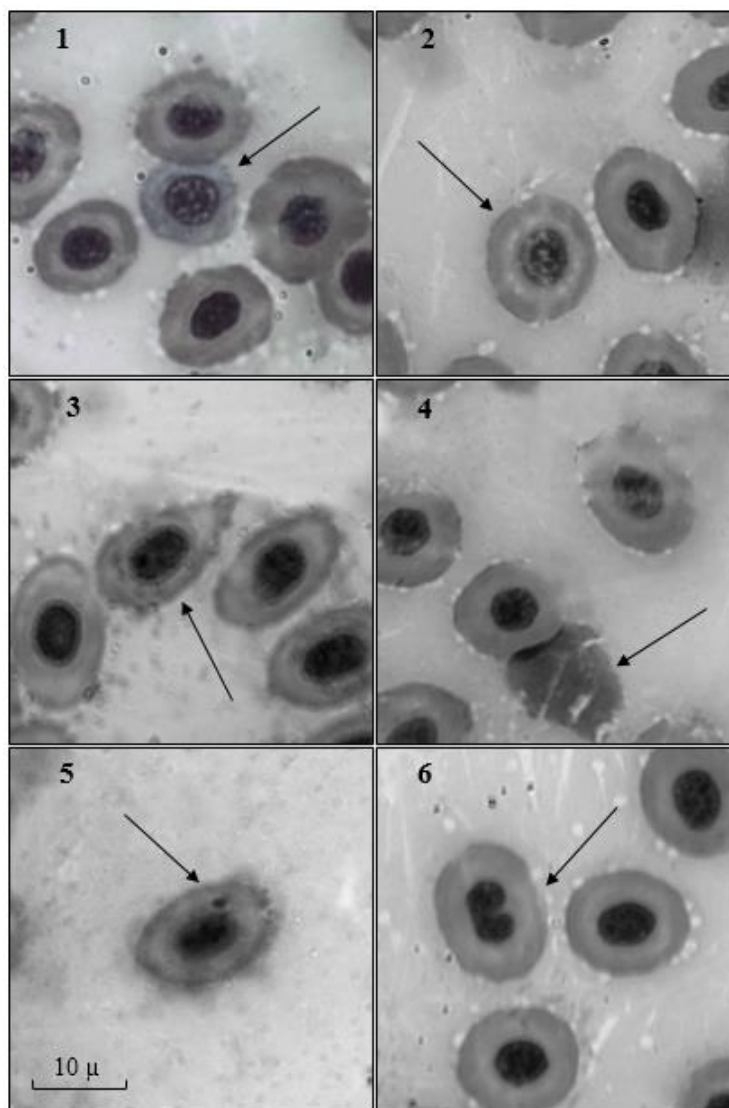


Рисунок 4.4 – Морфологические особенности незрелых и аномальных эритроидных форм крови морского ерша (1 – базофильные нормобласты; 2 – полихроматофильные нормобласты; 3 – дакриоциты; 4 – эритроцитарные тени; 5 – клетки с микроядерными включениями; 6 – клетки со случаями инвагинации ядер)

Другой более лабильной компенсационной реакцией на гипоксию следует считать опорожнение кровяных депо [320]. Она позволяет повысить кислородную емкость крови в относительно короткий промежуток времени. У рыб эту функцию

связывают с селезенкой [160; 192]. При этом в крови появляются старые эритроциты, имеющие ограниченный срок циркуляции в периферическом русле [192]. Однако, учитывая высокую продолжительность жизни клеток красной крови у рыб [около года] [33], эта компенсационная реакция может быть эффективна на значительном временном отрезке. Сравнительная оценка резервов депо крови у пелагических и донных рыб показала, что у первых она была почти в 5 раз выше [83].

Рост кислородной емкости крови в условиях гипоксии может быть обусловлен и частичной дегидратацией плазмы. Это сопровождается увеличением вязкости и негативно сказывается на работе сердца. Поэтому этот процесс эффективен только на начальных этапах адаптации к дефициту кислорода. Он был отмечен ранее в эксперименте у особей скорпены [84].

Существенным дополнением к изменениям, происходящим на системном уровне, является также коррекция положения кривых диссоциации оксигемоглобина. В условиях гипоксии отмечаются количественные и качественные перестройки в гетерогенной системе данного белка [237]. Появляются компоненты, обладающие обратным эффектом Бора [158; 164], не чувствительные к рН [264; 303], сочетающие высокое сродство с выраженным эффектом Бора [86] и др.

В настоящей работе особое внимание уделяется процессам, происходящим в системе красной крови толерантных к гипоксии рыб на начальных этапах адаптации к дефициту кислорода, которые затем определяют многие из выше перечисленных адаптивных изменений.

Из представленных выше результатов исследования необходимо обратить внимание на то, что основные эффекты были выявлены только при акклимации рыб к условиям 15% насыщения воды кислородом. Они сводились к следующему:

- понижению концентрации гемоглобина и числа эритроцитов в крови;
- росту осмотической стойкости клеток красной крови;

- уменьшению относительного содержания в крови аномальных и незрелых эритроидных форм.

Уменьшение концентрации гемоглобина и числа эритроцитов в крови в условиях краткосрочной адаптации к условиям гипоксии отмечено и у высших позвоночных [73; 74]. В основе наблюдаемых изменений может лежать несколько процессов:

- смещение эритроцитарного баланса в пользу деструктивных процессов;
- депонирование части циркулирующей эритроцитарной массы;
- гидратация плазмы крови;
- лизис части старых и аномальных эритроцитов.

Последние два могут дополнять друг друга.

Изменение баланса между продукцией и деструкцией эритроидных клеток в системе красной крови является весьма инерционным процессом, эффект от которого можно наблюдать только спустя несколько суток. В течение 90 минут это сделать не удастся. К тому же гипоксия обычно индуцирует продукцию эритроцитов в кроветворной ткани на значительном отрезке времени, а не оказывает противоположное действие [247]. Поэтому данный процесс можно исключить из рассмотрения.

Резервирование части циркулирующей эритроцитарной массы в кровяных депо – реакция, которая может протекать в относительно короткий промежуток времени. Эту роль у рыб, как и других организмов, в основном выполняет селезенка [160; 192]. Отмечено, что мембраны старых эритроцитов имеют измененный антигенный комплекс [121]. Это позволяет строме селезенки избирательно аттрагировать эти клетки на своей поверхности, выводя их из системы циркуляции. Вместе с тем, за 90 минут экспериментальной гипоксии вряд ли число этих клеток может существенно возрасти. К тому же, как уже отмечалось, функция депо крови у донных видов рыб, к которым относится и морской ерш, развита значительно хуже, чем у пелагических рыб [83]. Однако этот процесс не следует исключать из рассмотрения.

Частичная гидратация плазмы крови в условиях гипоксии, также является исключительно теоретическим предположением. Ранее показано, что у ерша при гипоксии, напротив, кровь подвергается незначительной дегидратации [84]. Это должно приводит к относительному росту числа эритроцитов в крови, а не понижению.

Избирательный лизис старых и аномальных эритроцитов более вероятный процесс, определяющий снижение их числа в крови ерша. Содержание большинства аномальных эритроидных форм в крови ерша в условиях гипоксии [15% насыщение] действительно понижалось.

Причиной лизиса клеток красной крови в условиях экстремальной гипоксии может стать также их набухание (свеллинг), отмеченное во многих работах. Впервые о данной реакции заговорили после работ финских исследователей [254]. Она была отмечена у радужной форели, а потом у многих других видов рыб [254; 255]. В основе ее лежит трансмембранный Na^+/H^+ обмен [256]. Наличие этого процесса было показано и для морского ерша, как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* [113; 295].

Продукты лизиса эритроцитов должны индуцировать выработку эритропоэтинов в почках [220], а те, в свою очередь, повышать темпы пролиферации в эритроидном ростке гемопоэза [247]. Однако, по-видимому, это происходит не сразу. В нашем случае содержание незрелых эритроидных форм в крови, напротив, существенно понижалось. Это в большей степени затрагивало мало дифференцированные формы: больше БН, чем ПН. Индекс БН/ПН относительно контрольных значений уменьшался на 26%. Сходные результаты были получены и для высших позвоночных [73; 74]. Все это свидетельствует об определенной степени инерционности процессов эритропоэза, активизация которых при гипоксии опосредуется через выработку эритропоэтинов в почках.

Краткосрочная гипоксическая нагрузка (90 минут): 15% насыщение воды кислородом ($1,3 \text{ мг л}^{-1}$), вызывает ряд однонаправленных изменений в системе красной крови рыб. Угнетаются эритропоэтические процессы в гемопоэтической ткани, что находит отражение в преимущественном снижении содержания в крови, прежде всего, малодифференцированных эритроидных форм (базофильных нормобластов). Одновременно отмечается набухание циркулирующих эритроцитов и лизис осмотически низкостойких и аномальных клеток. Это приводит к снижению концентрации гемоглобина, числа эритроцитов в крови и росту осмотической резистентности циркулирующей эритроцитарной массы. При 30% насыщении воды кислородом показатели сохранялись на уровне контрольных значений.

ГЛАВА 5 ЭРИТРОГРАММА ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ КРОВИ *NEOGOBIUS MELANOSTOMUS* (PALLAS, 1814) В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ

Для первичноводных организмов температура среды является одним из ключевых факторов, влияющих на процессы тканевого метаболизма. Несмотря на высокую теплоемкость воды, температура ее может претерпевать существенные изменения в течение годового цикла, а мелководные участки подвержены значительным суточным колебаниям. Особый интерес представляют адаптации морских организмов к экстремально низким температурам близких к 0°C (условия гипотермии).

В настоящей главе диссертационной работы в условиях эксперимента исследуется состав эритрона циркулирующей крови у теплолюбивого бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus*, Pallas, 1814). Схема постановки эксперимента подробно была рассмотрена ранее (см. главу 2).

5.1 Незрелые эритроидные элементы

Пул незрелых эритроидных элементов в крови бычка-кругляка был представлен пронормобластами, базофильными и полихроматофильными нормобластами. Морфологические характеристики этих клеток были близки к рассмотренным ранее в отношении морского ерша (глава 4). Пронормобласты (Про) являются наименее зрелой клеткой. Для нее характерно округлая форма, наличие крупного с высокой долей эухроматина ядра с хорошо выраженной перинуклеарной зоной и узкого участка базофильной цитоплазмы (Рисунок 5.1). Базофильный нормобласт (БН) – клетка преимущественно округлой формы. Размеры ядра и доля эухроматина, в сравнении с пронормобластом, снижены. Выражена перинуклеарная зона. Цитоплазма занимает значительный объем клетки и имеет голубую (базофильную) окраску. Полихроматофильный

нормобласт (ПН) – клетка эллипсоидной формы. Размеры ядра явно выше, чем у зрелых эритроцитов. Перинуклеарная зона практически не выражена. Цитоплазма имеет признаки ацидофилии, что связано с накоплением в ней гемоглобина.

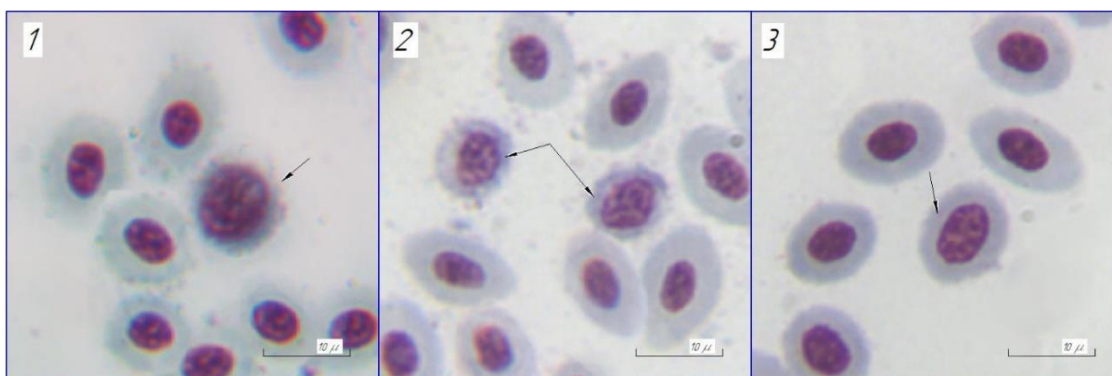


Рисунок 5.1 – Незрелые эритроидные элементы в крови бычка-кругляка (1 – Про; 2 – БН; 3 – ПН)

Из результатов, представленных на рисунке 5.2, видно, что по мере снижения температуры доля незрелых эритроидных форм в крови особей бычка-кругляка пропорционально растет. При 19-20°C на них приходилось около 2 % клеточной массы, тогда как при 15-16°C уже более 3 %, а при 1-2°C более 4 %. Фактически доля незрелых форм увеличивалась более чем в 2 раза ($p < 0,001$). Содержание Про в крови бычка-кругляка не превышало 0,12 %. Минимальные значения были зарегистрированы у особей, содержащихся при 15-16°C. Они составляли менее 0,02 %. Максимум был отмечен при 1-2°C – более 0,07 %. Зависимость содержания БН и ПН от температуры фактически отражает отмеченную ранее в отношении суммарного уровня незрелых эритроидных форм. Максимум наблюдали при 1-2°C, а минимум – при 19-20°C. Различия между этими значениями в случае с БН достигали около 3 раз ($p < 0,001$), а ПН почти 2 раз ($p < 0,01$).

Показательными являются значения индексов Про/БН и БН/ПН (Рисунок 5.3). Значения индекса БН/ПН относительно контроля равномерно повышались и при 1-2°C достигали 7,7 единиц, что на 32 % выше ($p < 0,05$). Индекс Про/БН, напротив, вначале (15-16°C) понижался более чем в 4 раза ($p < 0,001$). Однако при 1-

2°C опять повышался почти в 3 раза ($p < 0,01$). Все это отражало оживление эритроидного ростка гемопоэза в условиях гипотермии.

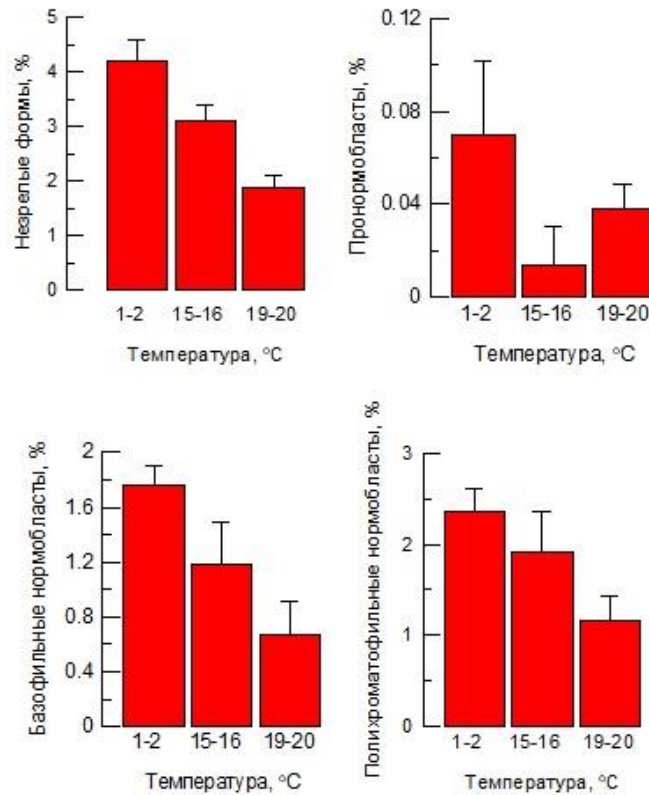


Рисунок 5.2 – Содержание незрелых эритроидных элементов в крови бычка-кругляка при адаптации к различным температурам (при 1-2 °C $n=5$, при 15-16 °C $n=5$, при 19-20 °C $n=8$, где n - число особей)

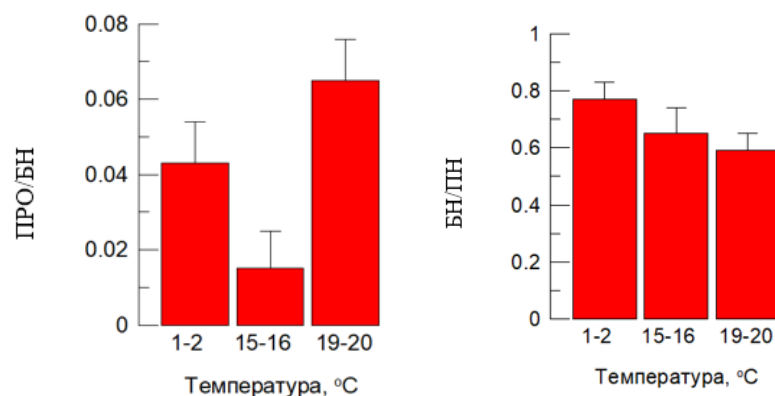


Рисунок 5.3 – Значение индексов Про/БН и БН/ПН у бычка-кругляка при адаптации к различным температурам

5.2 Аномальные эритроидные элементы

Анализ препаратов крови бычка-кругляка позволил выявить в целом такие же виды эритроцитарных аномалий, как и у морского ерша: случаи прямого (амитотического) деления клеток, дакриоциты, случаи инвагинации ядер, эритроцитарные тени, присутствие микроядер в цитоплазме. Случаи прямого деления клеток представляют собой процесс цитокинеза, которому не предшествует редупликация ДНК и ядерный материал распределяется между дочерними клетками случайным образом (Рисунок 5.4).

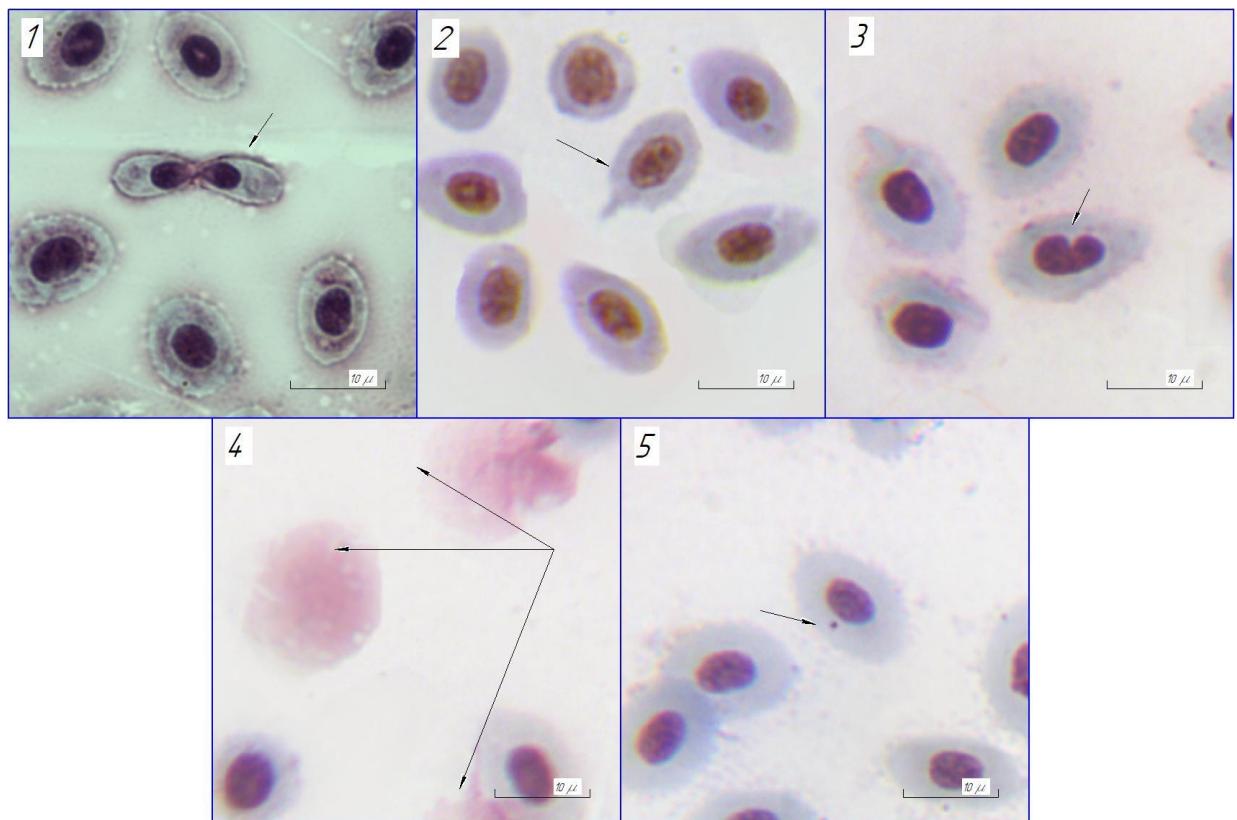


Рисунок 5.4 – Аномальные эритроидные элементы в крови бычка-кругляка (1 – случай прямого деления зрелых эритроцитов; 2 – дакриоцит; 3 – эритроцит с инвагинацией ядерной оболочки; 4 – эритроцитарные тени; 5 – клетка с микроядерным включением)

Дакриоциты являются вариантом пойкилоцитоза. Это клетки каплевидной формы, содержащие одну большую спикуну (вырост) (Рисунок 5.4). Инвагинация клеточного ядра предполагает утрату им округлой формы. Появляется характерное впячивание, что отражает нарушение структуры ядерной мембраны клетки. Эритроцитарные тени фактически отражают случаи лизиса зрелых эритроцитов в процессе их циркуляции. Тень является остатками оболочки (стромы) клетки, сохраняющими пигментацию ввиду присутствия мембраносвязанного гемоглобина. Микроядра – это небольшие фрагменты клеточного ядра, которые образуются в период кариокинеза из участков хромосом, лишенных центромер.

Содержание эритроцитарных аномалий при 15-16°C было минимально и не превышало 0,3% (Рисунок 5.5). При 1-2°C и 19-20°C оно было несколько выше – 0,4-0,8 %. При этом необходимо отметить значительную индивидуальную вариабельность контролируемых величин. Это не позволило получить достоверных отличий между сравниваемыми группами рыб, что допускает отсутствие каких-либо изменений. То же можно сказать и относительно содержания в крови дакриоцитов (основная доля аномалий), клеток с признаками прямого деления и эритроцитарных теней. В отношении содержания клеток с признаками инвагинации ядер и микроядерными включениями можно констатировать существенный рост этих аномалий по мере понижения температуры воды.

5.3 Содержание лактата в плазме крови

В качестве критерия развития гипоксического состояния у особей бычка-кругляка использовали содержание лактата в циркулирующей крови. У контрольной группы рыб (19-20°C) уровень этого соединения составил $110,4 \pm 6,8(8)$ мг л⁻¹ крови (в скобках указано число особей). Снижение температуры воды до 15-16°C не вызывало заметного изменения значений данного показателя – $105,9 \pm 7,6(5)$ мг л⁻¹ крови. Различия не были статистически выражены. При адаптации особей к

низким температурам, напротив, наблюдали существенный рост уровня лактата в крови рыб. Он достигал $216,3 \pm 14,7(5)$ мг л⁻¹ крови. В сравнении с контролем различия составили более 2 раз ($p < 0,001$).

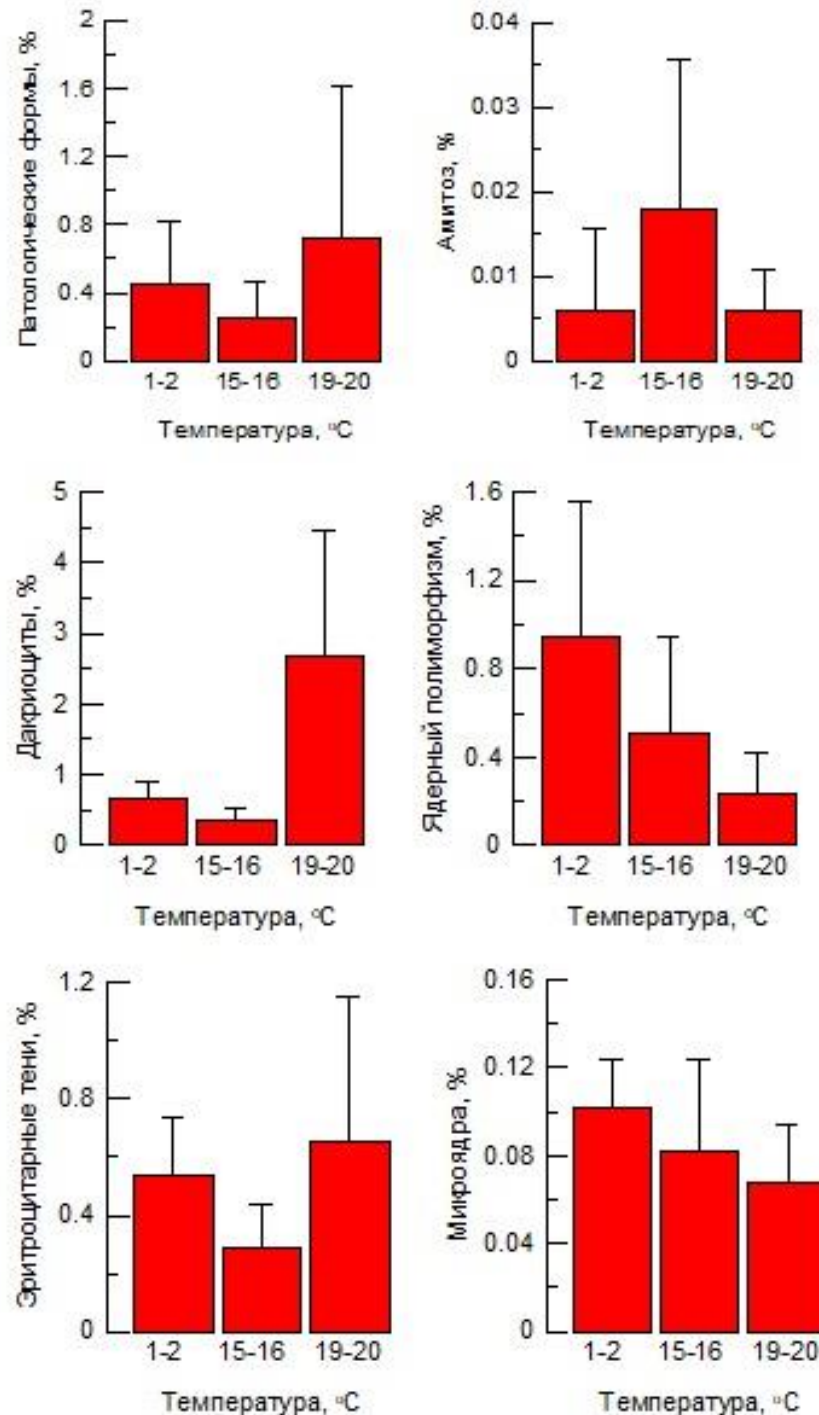


Рисунок 5.5 – Содержание аномальных эритроидных элементов в крови бычка-кругляка при адаптации к различным температурам

5.4 Обсуждение результатов исследований

В условиях гипотермии у многих теплолюбивых видов рыб отмечается развитие асфиксии, которая часто сопровождается гибелью посадочного материала. Эта реакция наблюдается при температурах менее 7°C [51; 101]. В тканях происходит усиление анаэробных процессов на фоне снижения содержания аденилатов и энергетического заряда [5; 27].

Особый интерес в этой связи представляет состояние систем кислородного обеспечения организма рыб и в частности красной крови. Характер ее реакции определяется границами температурной толерантности вида. В рамках диапазона устойчивости между температурой и кислородной емкостью крови существует прямая связь. Рост концентрации гемоглобина и числа эритроцитов в крови совпадает с общей интенсификацией обменных процессов в организме [227; 253; 280; 286]. Положительная корреляция между температурой среды и кислородной емкостью крови нарушается за пределами границ температурной устойчивости вида. В области высоких температур происходит снижение концентрации гемоглобина и числа эритроцитов в крови, а в области низких температур – рост [20; 233; 236].

Считается, что низкие температуры подавляют метаболические процессы у эктотермных организмов и угнетают функциональную активность многих физиологических систем. В настоящей работе данное положение подвергается экспериментальной проверке. Известно, что асфиксия всегда сопровождается развитием гипоксических состояний. Они стимулируют выработку эритропоэтинов в почках [139; 247; 292; 321] и повышают продукцию HIF-1 (hypoxia-inducible factor) в клетках тканей рыб [128; 206]. Эритропоэтины усиливают процессы пролиферации в эритроидном ростке гемопоэза, что приводит к появлению малодифференцированных эритроидных форм в кровяном русле (пронормобластов, ранних базофильных нормобластов). Сохраняется ли этот порядок событий в условиях экстремально низких температур не ясно.

Из представленной выше информации следует, что гипотермия (1-2°C) вызывает в крови бычка-кругляка ряд однозначных изменений:

- существенный рост содержания в крови незрелых эритроидных форм (Про, БН, ПН);
- повышение в плазме крови содержания лактата;
- увеличение ряда эритроцитарных аномалий по мере понижения температуры воды (микроядерных включений и случаев ядерного полиморфизма).

Следует отметить, что Про и ранние БН относятся к пролиферативному пулу клеток [57; 193; 251]. Увеличение их содержания в периферическом русле при 1-2°C почти в 2 раза свидетельствует о наличии определенного напряжения в эритроидном ростке гемопоэза. При этом рост БН (3 раза, $p < 0,001$) превышал величину прироста ПН (2 раза, $p < 0,01$), что отражает усиление продукции эритроцитов кроветворной тканью в целом. Основным гемопоэтическим органом у костистых рыб принято считать головную почку (пронефрос) [1]. В норме строма этого органа активно абсорбирует пролиферирующие формы [297] и способна контролировать направление дифференцировки стволовых клеток [148]. Периферическая кровь обычно содержит клетки не способные к активной пролиферации: поздние БН и ПН [106]. Они не включают ^3H -тимидин [57]. Однако в условиях активного эритропоэза в циркулирующей крови могут появляться менее дифференцированные эритроидные формы: Про и ранние БН, способные к делению [57; 159; 328], что и имело место в нашем случае.

Основным фактором, повышающим продукцию эритроцитов гемопоэтической тканью, является состояние гипоксии [221; 223]. В нашем случае оно действительно имело место. Содержание лактата в плазме крови повышалось более чем в 2 раза ($p < 0,001$). Аналогичные данные были получены ранее в опытах на карпе [5; 27]. Следует отметить, что действие гипоксии опосредуется через выработку эритропоэтинов почками. Это соединение впервые было идентифицировано у костистых рыб с использованием методов иммунохимического анализа [321], а в настоящее время у *Fugu rubripes* подробно

описана структура его гена [139]. Эритропоэтин повышает темпы пролиферации и дифференцировки в эритроидном ростке гемопоэза, что с течением времени смещает эритроцитарный баланс в пользу продукционных процессов и сопровождается ростом кислородной емкости крови [87; 247].

Увеличение в условиях гипотермии в крови рыб ряда аномальных эритроидных форм, прежде всего клеток с микроядерными включениями, следует рассматривать как результат активной клеточной пролиферации, при которой возможно увеличение числа ошибок в распределение хромосомного материала между дочерними клетками. Такая закономерность была отмечена нами ранее у бычка-кругляка в условиях активного и пассивного эритропоэза [294].

Как уже отмечалось, возникновение гипоксических состояний у рыб в условиях гипотермии в определенной степени парадоксально. Оно возникает при пониженных кислородных потребностях организма и повышенной растворимости кислорода в воде, тканевых и циркуляционных средах. Вместе с тем, факт остается фактом, в условиях гипотермии у многих рыб развивается реакция асфиксии [51; 101], растет содержание лактата в крови и понижается энергетический статус тканей [5; 27]. Особый интерес представляет также индукция образования HIF-1 (hypoxia inducible factor) в условиях низких температур [186]. Сравнительно недавно этот фактор был идентифицирован в плазме крови форелей [296]. Известно, что HIF-1, наряду с другими локусами генома, экспрессируется гипоксией [128; 206]. Это означает, что гипотермия должна перестраивать метаболизм тканей с аэробного на анаэробный, что было подтверждено и в настоящей работе: рост содержания лактата в плазме крови при 1-2°C.

Механизмы, определяющие развитие гипоксических состояний у рыб в условиях гипотермии, пока однозначно определить сложно. Можно с определенной долей вероятности допустить развитие нескольких процессов.

- Подавление активности нейронов респираторного центра продолговатого мозга и одновременно сердечной деятельности в соответствии с явлением дыхательного синхронизма, известного для костистых рыб [34; 109]. Это

должно сопровождаться развитием артериальной гипоксемии и ограничением доставки кислорода к тканевым структурам. Выработка HIF-1, эритропоэтинов и переключение тканевого метаболизма на анаэробный режим функционирования в этом случае будет закономерным следствием.

- Повышенная чувствительность гемоглобинов теплолюбивых рыб к гипотермии [88]. При температурах менее 10°C у ряда из них отмечается чрезмерный рост сродства к кислороду, что ограничивает его диффузию в ткани и так же должно приводить к развитию гипоксических состояний.

Скорее всего, это не полный перечень процессов, ограничивающих доставку кислорода к тканевым структурам, и приводящих к развитию гипоксических состояний у рыб в условиях гипотермии.

Из представленных результатов следует также обратить внимание на то, что низкие температуры полностью не подавляют метаболические процессы в организме рыб. На примере кроветворной ткани можно видеть, что она сохраняет чувствительность к управляющим сигналам (гипоксия) и может существенно повысить свою пролиферативную активность в условиях внешней гипотермии.

* * *

Таким образом, в условиях экспериментальной гипотермии (1-2°C) у особей бычка-кругляка в циркулирующей крови повышается содержание незрелых эритроидных элементов (Про, БН, ПН) и особенно клеток пролиферативного пула Про и, по-видимому, ранних БН. Содержание аномальных эритроцитов в целом не изменяется, за исключением клеток, содержащих микроядерные включения. Отмеченные изменения происходят на фоне роста содержания в крови лактата, что допускает развитие гипоксического состояния.

ГЛАВА 6 АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ АНОМАЛЬНЫХ ЭРИТРОИДНЫХ ФОРМ В КРОВИ РЫБ В ЦЕЛЯХ ЭКОДИАГНОСТИКИ

В настоящее время широкое применение получили тесты оценки качества водной среды по гематологическим характеристикам циркулирующей крови [50; 162]. Это связано с тем, что кровь на уровне респираторных поверхностей испытывает прямое действие различных ксенобиотиков и реагирует в ответ на это воздействие изменением своих качественных и количественных характеристик [28]. Среди них, в основном, преобладают методы микроядерного тестирования, позволяющие судить о генотоксичности водной среды. В то время как учет других эритроцитарных аномалий (дакриоциты, ядерные инвагинации и эритроцитарные тени и т.д.) обычно выпадает из внимания исследователей. Вместе с тем, количественный учет этих эритроидных форм косвенно позволяет судить об уровне токсической нагрузки, которую испытывают морские организмы.

В настоящей главе диссертационной работы приводятся морфологические описания эритроцитарных аномалий, встречаемых в крови черноморских бычков, а также исследуется роль естественных состояний и факторов среды, ответственных за их развитие.

6.1 Аномальные эритроциты в крови черноморских бычков

Светооптический анализ образцов циркулирующей крови (мазков крови) у четырех видов бычковых: *Neogobius melanostomus*, *Mesogobius batrachocephalus*, *Gobius cobitis*, *Zosterisessor ophiocephalus*, позволил обнаружить следующие виды эритроцитарных аномалий: микроядерные включения, дакриоциты, случаи ядерных инвагинаций и эритроцитарные тени. Ниже приводятся их микрофотографии и краткое описание.

Микроядра. Представляют собой мелкое избыточное ядро, образуемое отдельными хромосомами или их фрагментами, которые в митозе (или мейозе)

отделились от остальных и остались лежать в цитоплазме (Рисунок 6.1А). Появление микроядер свидетельствует о снижении жизнеспособности клеток, что является маркером нестабильности их функционирования, активизации процессов воспаления [40] и апоптоза [317]. Такие нарушения могут быть связаны с широким спектром факторов, начиная от воздействия тяжелых металлов и заканчивая вирусными инфекциями.

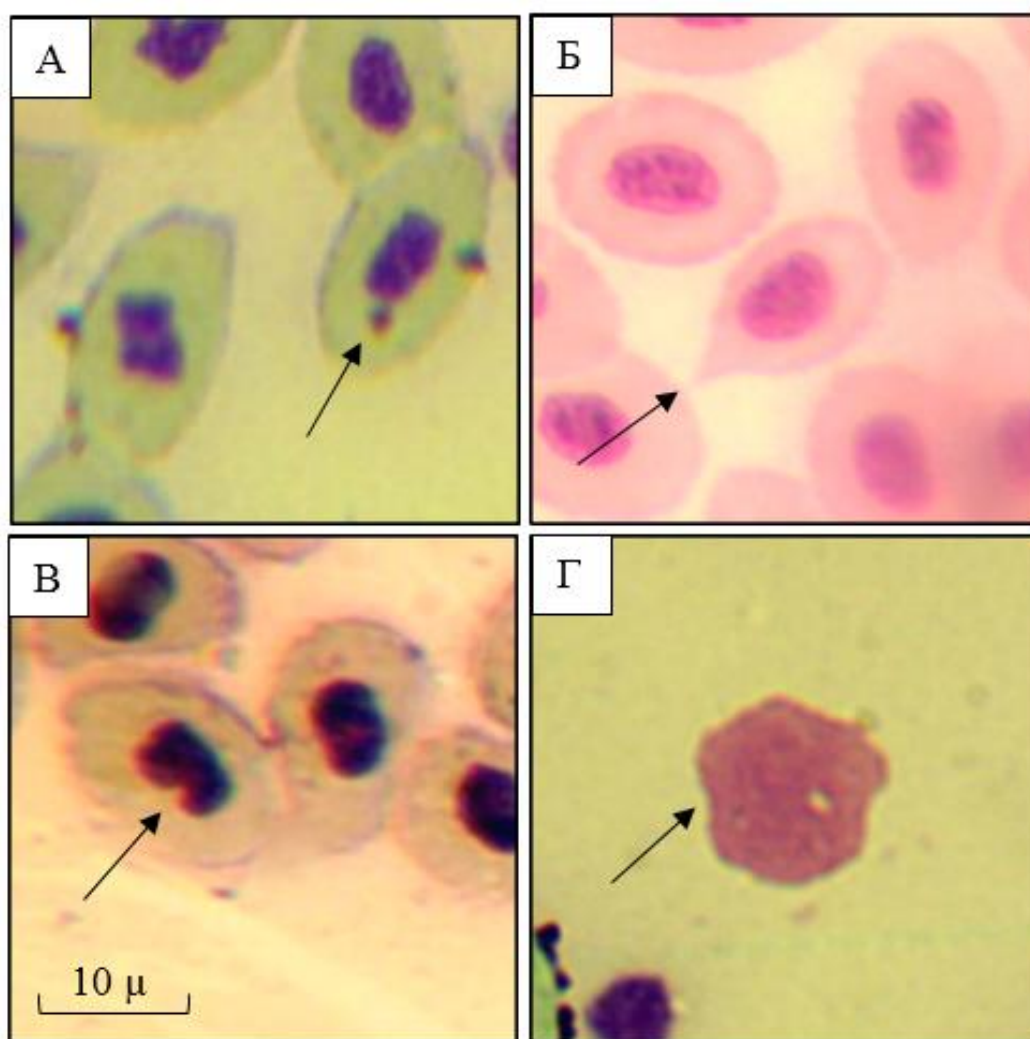


Рисунок 6.1 – Аномальные эритроциты в циркулирующей крови *Neogobius melanostomus* P.: А – микроядерные включения, Б – дакрициты, В – ядерные инвагинации, Г – эритроцитарные тени

Дакрициты. Клетки, по форме напоминающие каплю, имеют одну большую спикуну (Рисунок 6.1Б). Такие нарушения эритроцитарной мембраны возникают

при контакте с токсическими веществами, миелофиброзе, различных формах анемии.

Ядерный полиморфизм. Представляет собой деструктивное изменение эритроцитов, которое характеризуется наличием деформированных ядер. При этом происходит инвагинация ядерной оболочки (Рисунок 6.1В). Ядерный полиморфизм отражает условия существования организма и возникает при анемиях и токсических заболеваниях.

Эритроцитарные тени. Представляют собой оболочку эритроцитов, которая остается в результате процессов гемолиза, то есть разрушения клеток крови (Рисунок 6.1Г). В норме гемолиз завершает жизненный цикл эритроцитов и происходит в организме непрерывно. Патологическая форма гемолиза, при которой наблюдается увеличение темпов разрушения эритроцитов, возникает при гемолитических анемиях, токсикозах, под влиянием гемолитических ядов, при воздействии некоторых химических агентов, холода и т.д.

6.2 Эритроцитарные аномалии и темпы пролиферации в эритроидном ряду клеток

В настоящем разделе работы представлены результаты исследования зависимости содержания в циркулирующей крови бычка-кругляка аномальных эритроцитов от функциональной активности кроветворной ткани. Это необходимо для выделения чистого токсического эффекта, не связанного с функциональным состоянием биообъекта. Как уже отмечали (см. раздел 3), наиболее высокие темпы пролиферативной активности в эритроидном ряду клеток наблюдались у рыб в нерестовый и постнерестовый периоды. Это состояние и было предложено использовать в сравнительном аспекте. Целесообразность выбора бычка-кругляка в качестве объекта исследований обусловлена повсеместным использованием представителей данного вида в качестве организмов-биоиндикаторов для оценки состояния водной среды, поскольку они ведут донный малоподвижный образ

жизни и обладают высокой чувствительностью к различного рода экотоксикантам [14; 42; 66; 71; 314]. Помимо этого, бычок-кругляк является порционнонерестящимся видом, что позволяет при отлове одновременно получать особей с различной степенью зрелости гонад, а, следовательно, и с различной пролиферативной активностью кроветворной ткани.

Работа проводилась на бычках, находящихся в преднерестовом (III-IV стадия зрелости гонад), нерестовом (V стадия зрелости гонад) и постнерестовом состояниях (VI-II стадия зрелости гонад). Следует отметить, что все особи были получены одновременно и из одной точки, то есть условия среды, а значит и токсическая нагрузка, совпадали для всех исследуемых групп рыб.

6.2.1 Содержание аномальных эритроцитов в крови бычка-кругляка

Оценка процентного содержания микроядерных включений, дакриоцитов, ядерных инвагинаций и эритроцитарных теней в циркулирующей крови особей с различной степенью зрелости гонад позволила получить следующие результаты.

На мазках крови регистрировались *эритроциты с микроядерными включениями*, количество которых составило в среднем 1-2 единицы на клетку (Рисунок 6.2А). Было показано, что процентное содержание данных аномалий зависело от стадии зрелости гонад. Наименьшее число этих структур (около 0,5%) наблюдалось у особей, находившихся в преднерестовом состоянии (III-IV стадия зрелости гонад). По мере созревания гонад доля микроядер возрастала в 4,5 раза ($p < 0,01$) и составила около 2% у нерестящихся рыб (V стадия зрелости гонад). Максимальные значения данного показателя были отмечены у отнерестившихся особей (VI-II стадия зрелости гонад), когда количество клеток с микроядрами превысило 5% от общей эритроидной массы и стало в 12,9 раз больше исходных величин ($p < 0,01$).

Содержание *дакриоцитов*, напротив, снижалось по мере приближения бычка-кругляка к стадии нереста. (Рисунок 6.2Б). У рыб, находившихся в преднерестовом состоянии, количество этих аномальных клеток регистрировалось

на уровне 0,5 % от всей эритроцитарной массы. Затем оно снизилось до 0,218 % у нерестящихся особей. У отнерестившихся рыб доля дакриоцитов сократилась в 4 раза ($p < 0,05$) и составила лишь 0,123 %.

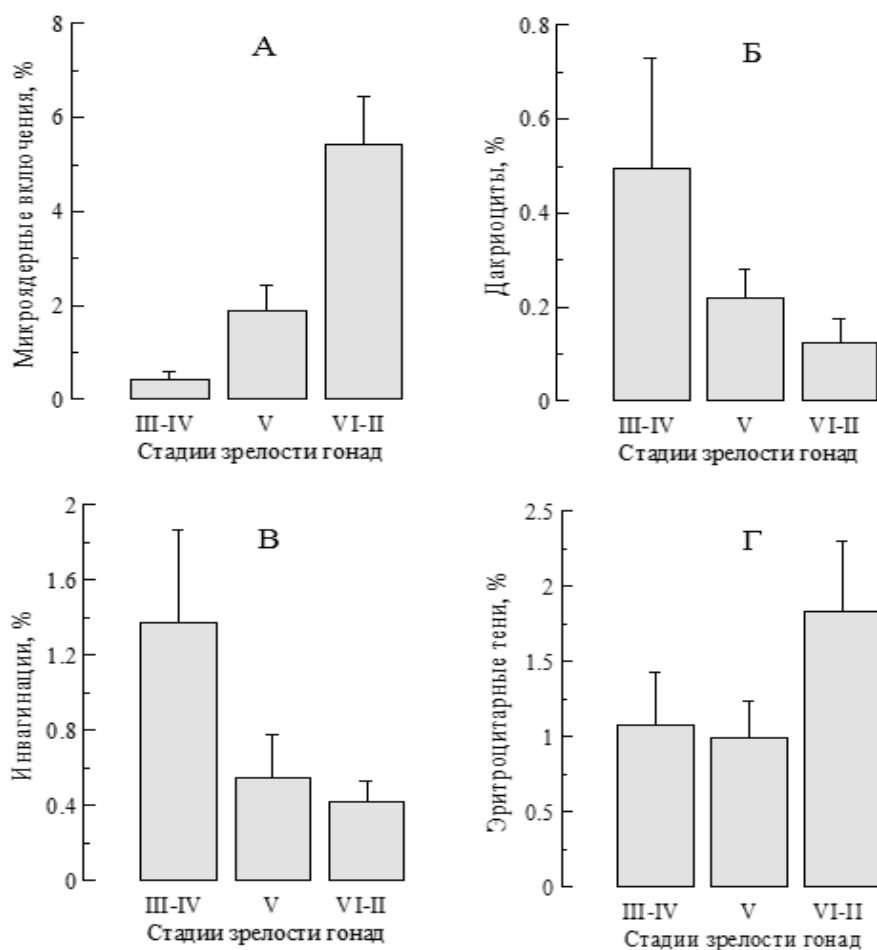


Рисунок 6.2 – Содержание аномальных эритроцитов в циркулирующей крови *Neogobius melanostomus* Pallas, 1814, в зависимости от стадии зрелости гонад: А – микроядерные включения; Б – дакриоциты, В – ядерные инвагинации, Г – эритроцитарные тени

Клетки с ядерными инвагинациями чаще встречались у бычков с III-IV стадией зрелости гонад (преднерестовый период), при этом их содержание составляло 1,4 % от общей эритроидной массы. Затем оно снижалось до 0,5 % у текущих особей и до 0,424% у отнерестившихся, что в 3,2 раза меньше исходных значений ($p < 0,05$) (Рисунок 6.2В).

Рост числа *эритроцитарных теней* в циркулирующей крови был отмечен у бычков, находящихся в постнерестовом состоянии (Рисунок 6.2Г). В этот период количество данных аномалий составило 1,7%, что в 1,8 раз превышает значения, зарегистрированные на момент преднерестового периода ($p < 0,05$).

Таким образом, у бычка-кругляка выявлена достоверная зависимость между содержанием аномальных эритроцитов и степенью зрелости гонад. По мере приближения особей к постнерестовому периоду, на мазках крови регистрировалось все больше эритроцитарных теней и клеток с микроядрами. Количество дакриоцитов и ядерных инвагинаций, напротив, снижалось.

6.2.2 Содержание незрелых эритроидных форм в крови бычка-кругляка

При просмотре мазков крови также проводился учет числа незрелых эритроидных элементов, таких как: пронормобласты (Про), базофильные (БН) и полихроматофильные нормобласты (ПН), что позволило оценить пролиферативную активность в эритроидном ряду клеток у рыб, находящихся на различных этапах нерестового цикла. Морфологические особенности этих клеточных форм описаны ранее (см. раздел 5).

Число *пронормобластов* составляло не более 0,2 % от всей массы эритроцитов бычка-кругляка (Рисунок 6.3А). Сравнительная оценка относительного содержания данного эритроидного элемента в циркулирующей крови не позволила обнаружить какой-либо зависимости от стадии нереста. Различия не были статистически выражены.

Уровень *базофильных нормобластов* равномерно повышался к концу нереста (Рисунок 6.3Б). При начальных значениях 2,5 % от общего числа эритроцитов в преднерестовый период, в постнерестовый период этот показатель увеличился в 1,5 раза ($p < 0,05$) и достиг 3,5 %.

Как и в случае с БН, содержание *полихроматофильных нормобластов* в крови повышалось на момент окончания нереста (Рисунок 6.3В). Различия в

количестве ПН у особей бычка-кругляка, находившихся в нерестовом и постнерестовом состояниях, составляли около 12 %. Однако рост значений данного показателя носил характер тенденции и не был статистически выражен.

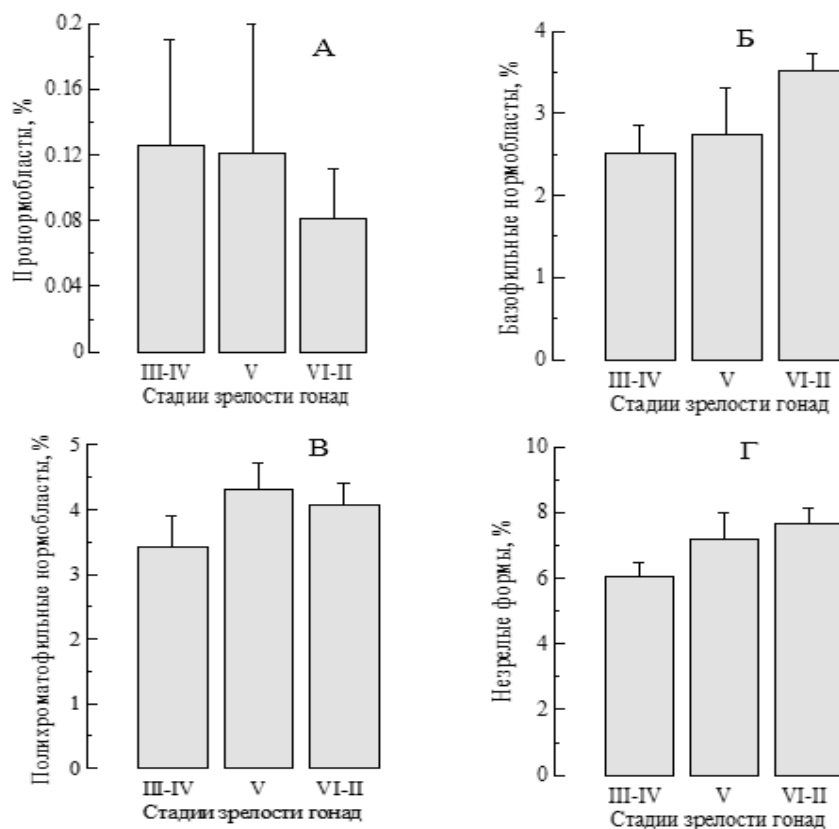


Рисунок 6.3 – Содержание незрелых эритроидных элементов в циркулирующей крови *Neogobius melanostomus* Pallas, 1814, в зависимости от стадии зрелости гонад: А – пронормобласты; Б – базофильные нормобласты, В – полихроматофильные нормобласты, Г – незрелые формы

Как следует из представленных выше результатов, к концу нереста в циркулирующей крови бычка-кругляка повышалось содержание малодифференцированных эритроидных форм – БН и ПН. При объединении этих значений в общую совокупность под названием «Незрелые формы» было обнаружено, что число малодифференцированных эритроцитов возрастает на 26% ($p < 0.05$) и на момент постнерестового периода составляет 7.66 ± 0.49 % от

циркулирующей эритроцитарной массы (Рисунок 6.3Г). Следовательно, можно констатировать, что по мере созревания гонад у бычка-кругляка явно активизируется кроветворная функция.

Оценить интенсивность процессов пролиферации и дифференцировки среди эритроидных элементов позволяет отношение относительного содержания базофильных и полихроматофильных нормобластов в циркулирующей крови (БН/ПН). Высокие значения индекса свидетельствуют об усилении пролиферативной активности кроветворной ткани. Низкие значения, напротив, означают, что в эритроидной массе преобладают процессы дифференцировки. Сравнительные исследования показали, что величина значений индекса БН/ПН существенно не изменяется по мере созревания гонад (Рисунок 6.4). Это означает, что процессы пролиферации и дифференцировки эритроидных элементов в кроветворных органах были сбалансированы и равномерны.

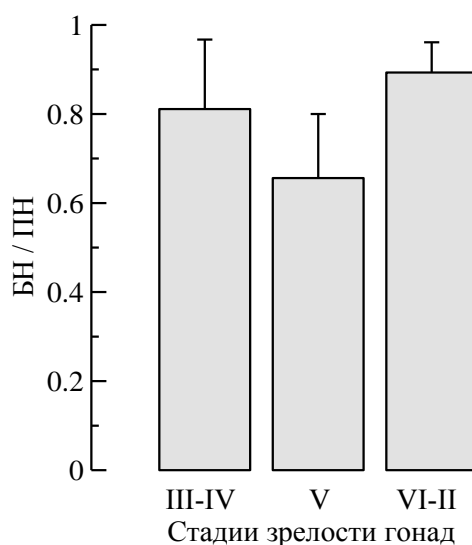


Рисунок 6.4 – Значения индекса БН/ПН в циркулирующей крови бычка-кругляка в зависимости от стадии зрелости гонад

Таким образом, проведенные исследования показывают, что созревание гонад у бычка-кругляка сопровождается активизацией эритроидного ростка кроветворения в гемopoэтической ткани. Об этом свидетельствует рост содержания незрелых эритроидных форм (базофильных и полихроматофильных нормобластов)

в циркулирующей крови. Процессы пролиферации и дифференцировки при этом сбалансированы, что подтверждается постоянством значений индекса БН/ПН на протяжении всего периода.

6.2.3 Корреляционные связи между содержанием аномальных и незрелых эритроидных форм в крови бычка-кругляка

Рассмотренные выше результаты позволяют констатировать, что содержание аномальных и незрелых эритроцитов в крови особей бычка-кругляка тесно коррелирует со стадией зрелости гонад исследуемых особей. Это позволяет предположить, что активизация процессов эритропоэза в кроветворной ткани сопровождается не только поступлением в кровоток эритроидных форм на ранних стадиях дифференцировки, но и приводит к росту числа аномальных клеток. Для проверки данного предположения была проведена оценка корреляционных связей между содержанием малодифференцированных эритроидных форм и эритроцитарных аномалий в периферической крови бычка-кругляка.

Между содержанием микроядер и уровнем незрелых эритроцитов была обнаружена прямая линейная зависимость, коэффициент детерминации достигал значений 0,995 (Рисунок 6.5А). Установлена также обратная зависимость между содержанием дакриоцитов и уровнем незрелых форм при высоком значении коэффициента детерминации (0,95) (Рисунок 6.5Б). Обратная зависимость сохранялась и в случае ядерных инвагинаций с незрелыми эритроцитами (Рисунок 6.5В). Коэффициент детерминации сохранял высокие значения (0,95). При этом не удалось обнаружить какой-либо зависимости между содержанием эритроцитарных теней и незрелых эритроцитов. Однако в целом можно констатировать факт роста числа данных аномалий при интенсивной пролиферативной активности кроветворной ткани бычка-кругляка (Рисунок 6.5Г).

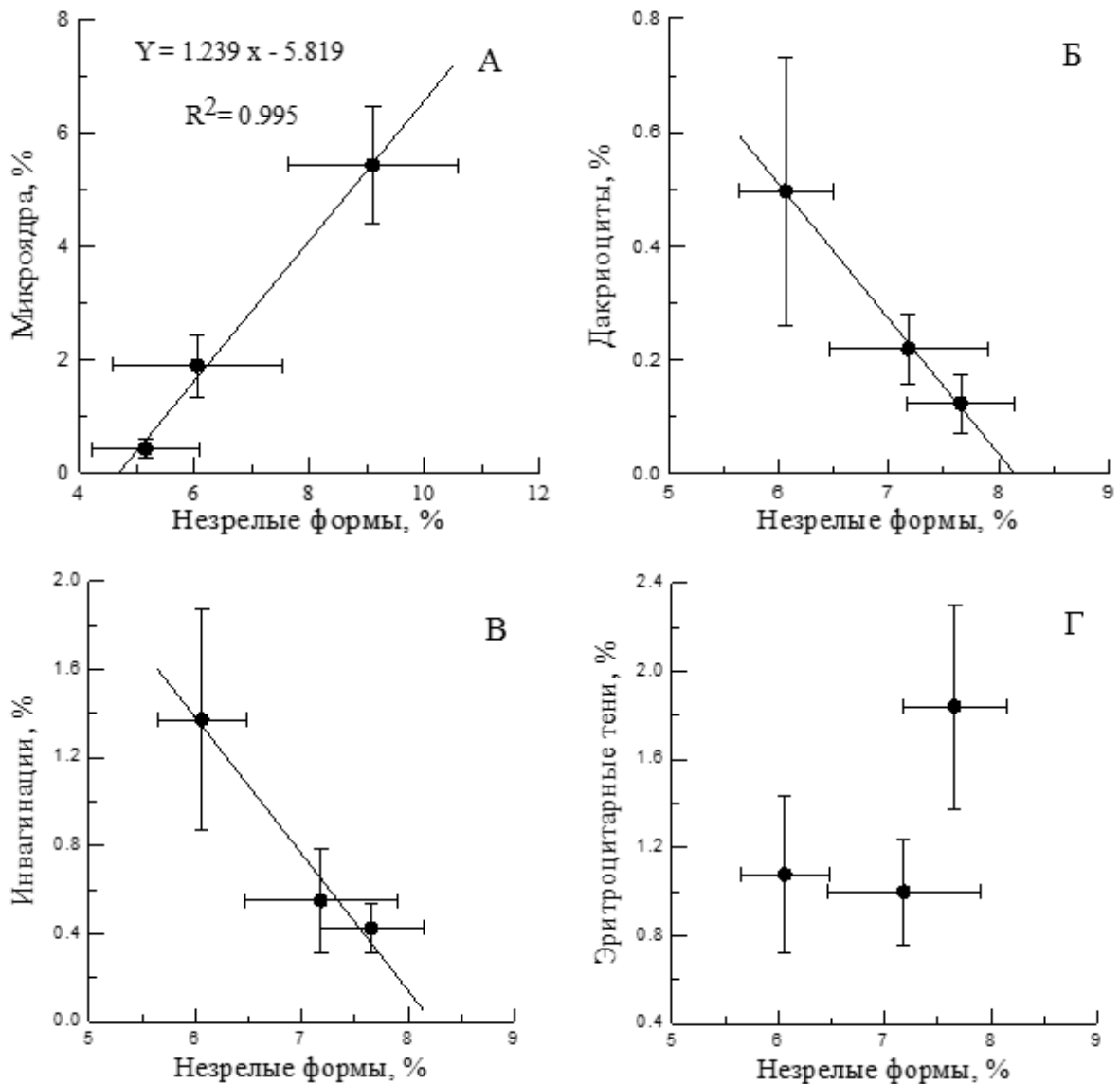


Рисунок 6.5 – Корреляционные отношения: А – «содержание незрелых эритроцитов ↔ содержание микроядерных включений»; Б – «содержание незрелых эритроцитов ↔ содержание дакриоцитов»; В – «содержание незрелых эритроцитов ↔ содержание клеток с ядерными инвагинациями»; Г – «содержание незрелых эритроцитов ↔ содержание эритроцитарных теней»

6.3 Сравнительная оценка гематологических характеристик и эритрограмм циркулирующей крови представителей семейства Gobiidae из акваторий юго-западного Крыма

В настоящем разделе работы проводится сравнение гематологических характеристик, эритроцитарных индексов и эритрограмм циркулирующей крови у трёх видов черноморских бычков: двух массовых – мартовик *Mesogobius batrachocephalus* и кругляш *Gobius cobitis*, и одного редкого – травяник *Zosterisessor ophiocephalus*. Основная задача – определить группу показателей, которую можно использовать в экодиагностических целях. Рыбу отлавливали в одной из наиболее загрязненных бухт – Карантинная бухта. Детали описаны ранее в главе 2.

Отлов проводился при помощи ставного невода, затем рыбу доставляли в лабораторию в пластиковых баках объёмом 50 л с принудительной аэрацией; транспортировка длилась 30–40 минут. С целью снятия стресса, вызванного отловом и транспортировкой, в течение недели рыб содержали в проточных аквариумах объёмом 50 л (по 2–3 экз.) при температуре 14–16°C и фотопериоде 12 ч день: 12 ч ночь. В этот период рыб кормили фаршем из малоценных видов рыб; суточный пищевой рацион составлял 6–7% массы тела. В работе использовали взрослых особей в состоянии относительного функционального покоя (II–III стадия зрелости гонад).

6.3.1 Гематологические характеристики и эритроцитарные индексы

В качестве гематологических показателей рассматривали концентрацию гемоглобина и число эритроцитов в крови рыб, а также гематокритную величину. Результаты исследований представлены на Рисунке 6.6. Как видно, концентрация гемоглобина в крови рыб совпадала у всех исследуемых видов и находилась на уровне 39–40 г·л⁻¹. Различия не были статистически выражены. Аналогичные

данные получены и в отношении гематокрита (24-25 %). Незначительные расхождения между видами отмечены в отношении числа эритроцитов в крови. Минимальные значения зарегистрированы для бычка-кругляша – $0,80 \pm 0,14$ клеток (10^6) мкл^{-1} , а максимальные для бычка-мартовика – $0,93 \pm 0,06$ клеток (10^6) мкл^{-1} при этом различия не были статистически значимы ($p > 0,05$).

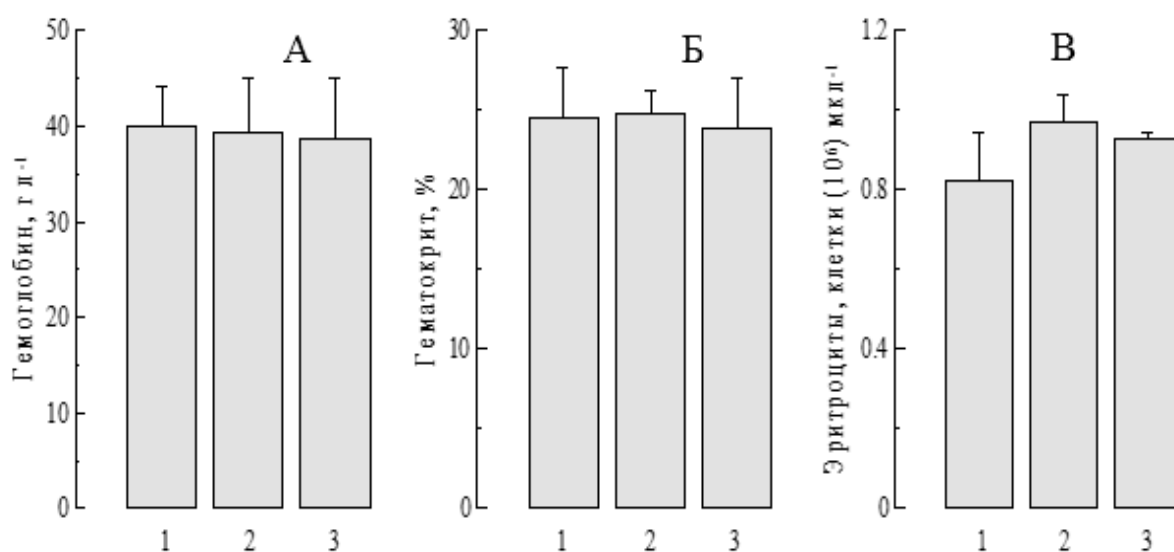


Рисунок 6.6 – Гематологические характеристики крови бычков крови (А – концентрация гемоглобина; Б – гематокрит; В – число эритроцитов; 1 – бычок-кругляш; 2 – бычок-мартовик; 3 – бычок-травяник)

На основании значений выше рассмотренных величин были рассчитаны эритроцитарные индексы: среднеклеточное содержание гемоглобина (МСН), среднеклеточная концентрация гемоглобина (МСНС), среднеклеточный объем эритроцитов (МСV) (см. главу 2). Результаты расчетов представлены на Рисунке 6.7. Из рисунка видно, что все рассчитанные величины у исследуемых видов бычков были близкими. Имеющиеся различия не были статистически значимы ($p > 0,05$).

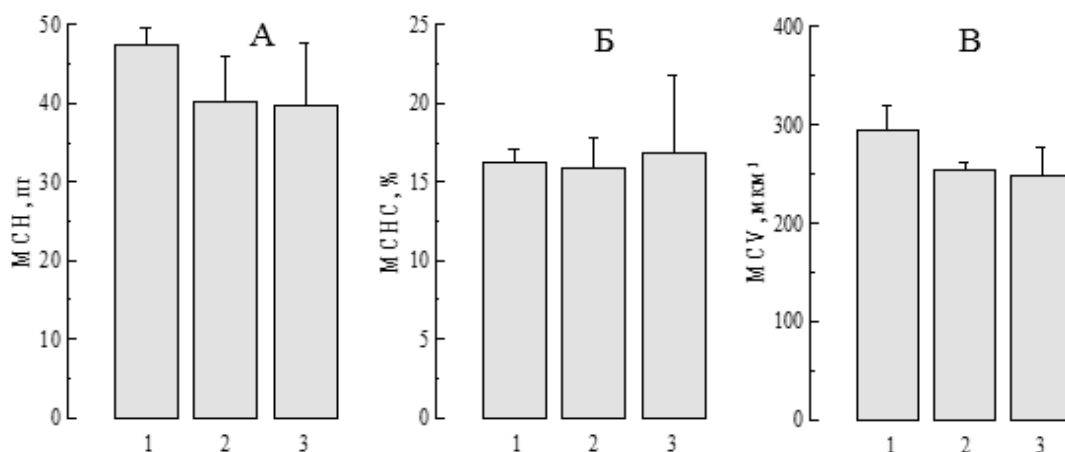


Рисунок 6.7 – Эритроцитарные индексы бычков (А – МСН; Б – МСНС; В – МСV; 1 – бычок-кругляш; 2 – бычок-мартовик; 3 – бычок-травяник)

6.3.2 Аномальные эритроидные формы

Особенности морфологии аномальных клеток эритроидного ряда у бычков рассмотрены ранее (Рисунок 6.1).

В циркулирующей крови исследованных бычков обнаружены зрелые *эритроциты с микроядрами*, в среднем 1–2 единицы на клетку. Как видно на Рисунке 6.8, максимальное число клеток с подобного рода аномалиями отмечено в крови травяника ($4,69 \pm 0,59$ %); повышенное значение этого показателя наблюдалось и у кругляша ($3,62 \pm 1,08$ %). По сравнению с этими видами у мартовика содержание эритроцитов с микроядерными включениями было существенно ниже – $1,40 \pm 0,70$ % ($p \leq 0,05$).

На мазках крови *эритроцитарные тени* были представлены розоватыми пятнами – разрушенные ядра клеток. Максимальный уровень этих аномалий обнаружен у травяника – $1,70 \pm 0,10$ % (Рисунок 6.8). У кругляша и мартовика значения этого показателя существенно ниже ($p < 0,05$) – соответственно $0,80 \pm 0,30$ и $0,85 \pm 0,11$ %.

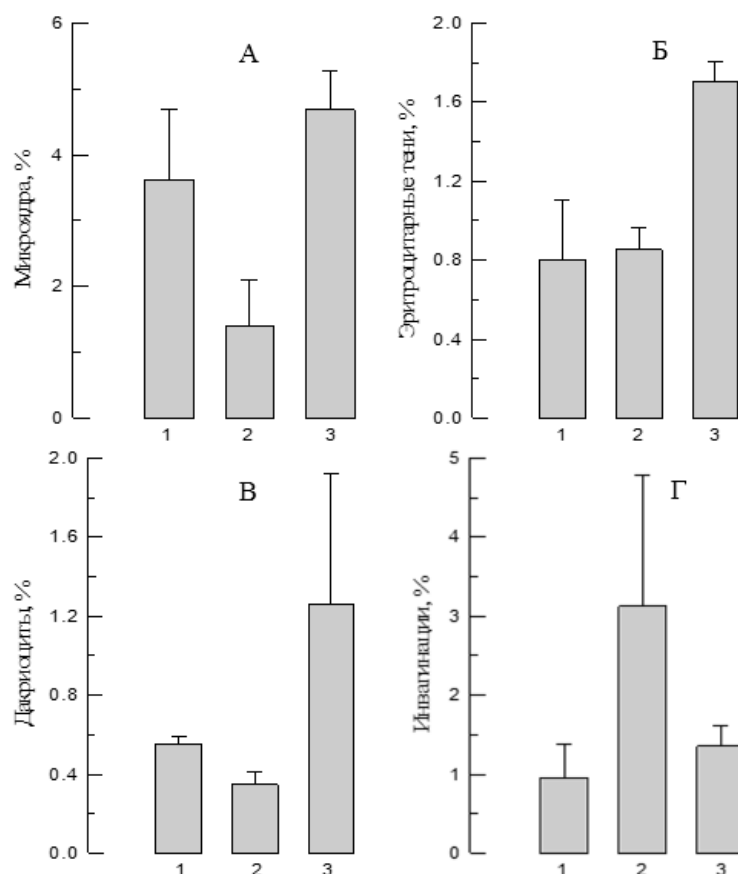


Рисунок 6.8 – Содержание аномальных эритроидных форм в крови бычков (А – клетки с микроядерными включениями; Б – эритроцитарные тени; В – дакриоциты; Г – клетки с ядерными инвагинациями; 1 – бычок-кругляш; 2 – бычок-мартовик; 3 – бычок-травяник)

Пойкилоцитоз предполагает присутствие в циркулирующей крови эритроцитов различной формы. Среди них особо выделяют *дакриоциты*, то есть клетки каплевидной формы, содержащие одну большую спикуну (вырост). Высокий уровень этих клеток был отмечен в крови травяника: $1,26 \pm 0,66$ % (Рисунок 6.8). Это в 2-3 раза выше ($p < 0,05$), чем у мартовика ($0,35 \pm 0,06$ %) и кругляша ($0,55 \pm 0,06$ %).

Ядерные инвагинации предполагают утрату округлой формы ядра. Появляется характерное впячивание. Максимальное число данных аномалий было отмечено в крови мартовика – $3,120 \pm 1,65$ %; у кругляша и травяника доля

эритроцитов со случаями инвагинации составляла соответственно $0,95 \pm 0,42$ и $1,35 \pm 0,25$ % (Рисунок 6.8). Однако ввиду значительной вариабельности значений, полученных для мартовика, различия были не достоверны.

6.3.3 Незрелые эритроидные формы

Анализ мазков крови исследованных бычков показал, что на долю незрелых эритроидных элементов приходится 6,5–8,5 % циркулирующей эритроцитарной массы (Рисунок 6.9). При этом содержание пронормобластов составляло 0,18–0,26 %, базофильных нормобластов – 2,6–3,0 % и полихроматофильных нормобластов – 3,7–5,1 %. Полученные значения были близки у трёх видов бычков ($p > 0,05$).

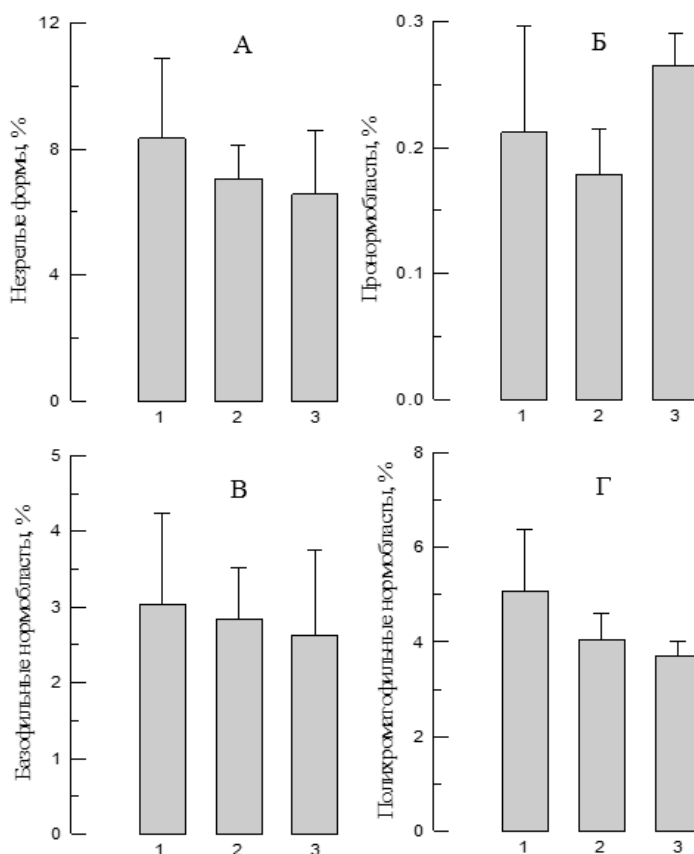


Рисунок 6.9 – Содержание незрелых эритроидных форм в крови бычков (А – все виды незрелых форм; Б – пронормобласты; В – базофильные нормобласты; Г – полихроматофильные нормобласты; 1 – бычок-кругляш; 2 – бычок-мартовик; 3 – бычок-травяник)

6.4 Обсуждение результатов исследования

Из представленной выше информации следует обратить внимание на следующие моменты:

- содержание отдельных аномальных эритроидных форм коррелирует с уровнем незрелых эритроцитов в крови рыб;
- по содержанию аномальных эритроцитов в крови можно судить об адаптационной пластичности отдельных видов морских рыб и качестве морской среды.

6.4.1 Диагностическое значение аномальных эритроцитов

Эти аспекты были затронуты ранее (см. главу 1, раздел 6.1). В настоящей работе в крови рыб, как отмечалось выше, чаще всего регистрировали четыре вида аномалий: микроядерные включения, эритроцитарные тени, дакриоциты и ядерные инвагинации.

Микроядра являются фрагментом клеточного ядра. Они не содержат полный геном; образуются в период кариокинеза из участков хромосом лишённых центромер [38]. Представляют собой патологическое образование [317]. Такие нарушения могут быть связаны с действием широкого спектра факторов, начиная от воздействия тяжёлых металлов и заканчивая вирусными инфекциями. Учёт числа клеток с микроядрами лежит в основе микроядерного теста. Он используется в цитогенетических исследованиях при оценке генотоксичности водной среды [38; 116] и способствует раннему обнаружению токсического воздействия [259]. Ядерные эритроциты костистых рыб в этом отношении являются наиболее популярным объектом исследований [28; 37]. Однако показано, что процент повреждений ДНК существенно выше в тканях с интенсивной пролиферативной активностью (эффект нестабильности генома) [19]. Это означает, что показания микроядерного теста могут быть не всегда адекватны условиям среды, а отражать динамику естественных состояний организма.

Эритроцитарные тени фактически отражают случаи лизиса зрелых эритроцитов в процессе их циркуляции. В норме этот процесс происходит непрерывно. Однако воздействие различных ксенобиотиков может вызвать усиление темпов гемолиза, что в свою очередь приводит к развитию анемии [52]. На мазке крови эритроцитарные тени представлены розоватыми пятнами – разрушенные ядра клеток.

Пойкилоцитоз предполагает присутствие в циркулирующей крови эритроцитов различной формы. Среди них особо выделяют *дакрициты*, то есть клетки каплевидной формы, содержащие одну большую спикуну (вырост). Отмечено, что число таких клеток существенно повышается в условиях внешней гипоксии, при различных формах анемии и токсических воздействиях [28; 102].

Инвагинация ядра предполагает утрату округлой формы ядра. Появляется характерное впячивание, что отражает нарушение структуры ядерной мембраны клетки [28]. Инвагинации возникают под воздействием различных факторов и отражают функциональную напряжённость обменных процессов в клетке. Подобные образования часто рассматриваются как индикаторы токсичности окружающей среды [154; 301].

Следует отметить, что появление выше рассмотренных аномалий может быть обусловлено не только условиями внешней среды, но и определяться функциональной активностью кроветворной ткани (эффект нестабильности генома). Ранее показано, что в условиях интенсивного эритропоэза в циркулирующей крови рыб может повышаться число зрелых эритроцитов с микроядерными включениями [89]. Для оценки значимости данного фактора мы проанализировали содержание незрелых и аномальных эритроидных форм в крови бычка-кругляка.

6.4.2 Эритропоэз и содержание в крови аномальных эритроцитов

При оценке фоновой токсической нагрузки на прибрежные морские акватории часто используют представителей семейства *Gobiidae* [14; 42; 314]. Они

удовлетворяют всем требованиям, предъявляемым к объектам биоиндикации [66; 71]. О величине токсического эффекта обычно судят по состоянию циркулирующей крови, которая на уровне респираторных поверхностей испытывает прямое действие различных ксенобиотиков [28]. Последние могут вызывать появление разнообразных эритроцитарных аномалий [28; 116; 154].

Однако присутствие в крови рыб аномальных эритроидных форм может быть связано и с высокой пролиферативной активностью кроветворной ткани (про- и мезонефроса, селезенки) [89]. Известно, что эритропоэтические процессы у рыб протекают нерегулярно. Активная продукция эритроцитов наблюдается преимущественно в постнерестовый период в течение 3-4 месяцев [62; 87]. В остальное время кроветворная ткань исключена из активного функционирования. Это позволяет предположить, что рост числа эритроцитарных аномалий в кровяном русле рыб не всегда отражает условия морской среды, а является следствием изменения функционального состояния организма. Так, у *Sparus aurata* отмечено закономерное изменение числа эритроцитов с аномалиями ядра на протяжении годового цикла [302].

Для проверки данного предположения целесообразен выбор порционно нерестящихся видов рыб. К ним относится бычок-кругляк (*Neogobius melanostomus* Pallas, 1811). В этом случае, одномоментно можно получать особей в преднерестовом, нерестовом и постнерестовом состояниях, которым свойственны различные темпы пролиферативной активности очагов эритропоэза.

Рост эритропоэтической активности кроветворной ткани бычка в нерестовый период может определяться анемичностью преднерестового состояния, которое было отмечено для ряда костистых видов рыб, как в естественных, так и экспериментальных условиях (инъекции гормональных препаратов) [87; 260, 272]. Анемия является самым мощным фактором выработки эритропоэтинов. О возможности продукции данных соединений в организме рыб свидетельствуют работы, выполненные на радужной форели [321]. Иммунохимически они были идентифицированы у данного вида в почках, селезенке, печени и плазме крови. Местом их образования, по всей видимости, являются почки. Здесь была

обнаружена самая высокая концентрация эритропоэтинов. Отмечено также, что продукция эритропоэтинов в организме рыб положительно коррелирует с содержанием половых гормонов в крови, в частности тестостерона [267]. Из этого следует, что нерест и продукция эритроцитов кроветворной тканью являются, в достаточной степени, сопряженными процессами. Состояние нереста фактически индуцирует процессы пролиферации и дифференцировки в эритроидном ростке гемопоэза, что прослеживается на протяжении 3-4 месяцев в постнерестовый период [87; 238].

Как следует из результатов настоящего исследования содержание в крови бычка-кругляка аномальных и незрелых эритроидных форм на протяжении нереста претерпевало однозначные изменения. О связи между этими характеристиками можно судить по результатам корреляционного анализа. Зависимость числа дакриоцитов и клеток с инвагинациями ядра от уровня незрелых эритроидных элементов в крови носила обратно пропорциональный характер при высоких значениях коэффициента детерминации (R^2 более 0,95). В отношении содержания эритроцитарных теней какой-либо связи обнаружить не удалось. Функциональный смысл установленной зависимости состоит в том, что в момент активного эритропоэза в кровотоке поступает значительное количество относительно молодых эритроцитов, которые еще не были подвержены токсическому влиянию. Снижение относительного содержания аномальных клеток в кровяном русле отражает этот процесс. С другой стороны, незрелые эритроидные формы отличаются пониженной осмотической и механической стойкостью [87], что, по-видимому, и определяет рост числа эритроцитарных теней в циркулирующей крови.

В отношении содержания клеток с микроядерными включениями, напротив, получена прямая зависимость, которая хорошо описывалась уравнением линейной регрессии при высоких значениях коэффициента детерминации. Это позволяет говорить о том, что чем интенсивнее пролиферативная активность тканей, тем выше вероятность нарушений в геноме клетки (эффект нестабильности генома), то есть, применение микроядерного теста в оценке генотоксичности окружающей среды не всегда адекватно и требует учета функционального состояния организма.

6.4.3 Эритроцитарные аномалии в оценке качества среды и адаптационной пластичности отдельных видов рыб

Представители семейства Gobiidae являются важнейшей составляющей ихтиокомплекса прибрежных акваторий Чёрного и Азовского морей. Gobiidae характеризуются значительным видовым разнообразием [6; 82]. Согласно последней сводке на шельфе обоих морей встречаются 35–36 видов бычков [9]. В настоящее время запасы бычковых активно восстанавливаются. На данный момент это основной промысловый ресурс Азовского моря [9].

Обитая в прибрежных водах, представители этого семейства испытывают существенную антропогенную нагрузку, которая, по всей видимости, дифференцирована в отношении отдельных видов и влияет на характер их распределения и частоту встречаемости. Севастопольский регион отличается тем, что здесь обитают как массовые, так и редкие виды Gobiidae [9]. Это позволяет провести сравнительную оценку влияния фоновой токсической нагрузки на их организм на основе учета присутствия в крови эритроцитарных аномалий.

Из рассмотренных результатов следует, что максимальное число эритроцитарных аномалий (микроядерные включения, дакриоциты, эритроцитарные тени) при сходных условиях существования наблюдается в циркулирующей крови травяника. На них приходилось более 9% циркулирующей эритроцитарной массы. У кругляша и мартовика этот показатель был более чем в 1,5 раза ниже (соответственно 5,9 и 5,7%). Как уже отмечалось, различия могут быть обусловлены не только условиями внешней среды, но и определяться функциональной активностью кроветворной ткани. Анализ мазков крови исследованных бычков показал, что на долю незрелых эритроидных элементов приходится 6,5–8,5% циркулирующей эритроцитарной массы. Полученные значения близки у трёх видов бычков ($p > 0,05$). Это означает, что содержание аномальных эритроидных форм в крови рыб, отмеченное выше, не определяется функциональной активностью кроветворной ткани, а связано с условиями среды.

Учитывая, что рыб отлавливали одновременно из одной и той же точки, можно заключить, что толерантность к фоновой токсической нагрузке у исследованных видов бычков не одинакова. Травяник оказался наименее стойким.

Это хорошо согласуется с данными по биологии изучаемых видов. Так, мартовик и кругляш являются массовыми представителями семейства *Gobiidae*, которые широко представлены по побережью Чёрного и Азовского морей [82]. Травяник, напротив, имеет ограниченное распространение (южный берег Крыма, северо-восток Сиваша), а с 1996 г. занесён в Красный список МСОП [6]. Это означает, что распространение, частота встречаемости и связанное с ними видовое разнообразие семейства *Gobiidae* может определяться устойчивостью отдельных видов бычков к фоновой токсической нагрузке, которую испытывают прибрежные акватории черноморского региона.

* * *

Активная продукция эритроцитов кроветворной тканью у бычка-кругляка приходится на нерестовый период. Об этом свидетельствует относительный рост содержания в крови рыб малодифференцированных эритроидных форм (БН, ПН). Данный процесс влияет на содержание числа аномальных эритроидных клеток в крови. В ряде случаев, между этими показателями установлена выраженная корреляционная связь (R^2 выше 0,95). Это означает, что подсчет числа аномальных эритроцитов в крови рыб при оценке уровня токсичности морской среды необходимо проводить с учетом активности кроветворной ткани, которая существенно изменяется в нерестовый период.

Среди бычков, обитающих в юго-западных акваториях Крыма, наименее стойким к фоновой токсической нагрузке оказался краснокнижный бычок-травяник (*Zosterisessor ophiocephalus* Pallas, 1814). В его циркулирующей крови обнаружено максимальное содержание аномальных эритроидных форм при сходных условиях среды и близком уровне незрелых эритроцитов в крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученной в настоящей работе информации выполнен нами ранее в рамках каждой отдельно взятой главы (см. разделы «Обсуждение»). В заключении же проводится лишь обобщение полученных результатов с акцентом на выявленные в работе эффекты.

Локализация очагов гемопоэза. Принято считать, что основные очаги гемопоэза у взрослых особей костистых рыб локализованы в головной почке (про-, мезонефрос) и селезенке [160; 246; 277; 282; 292]. Анализ клеточного состава головной почки у особей морского ерша позволил констатировать присутствие здесь практически всех ростков гемопоэза: лимфо-миелоидного, эритроидного и монобластического. В отличие от ранее выполненных исследований в настоящей работе изготавливались не отпечатки кроветворных органов, а анализировались их гомогенаты. Это позволило впервые описать для низших позвоночных мелкий кластер клеток по морфологическим признакам близкий к колониеобразующим единицам (КОЕ). По данным проточной цитометрии он обладал крайне низкой пролиферативной активностью (не более 2 % клеток) [114], что характерно именно для КОЕ [299].

Селезенку костистых рыб принято считать местом, где активно протекают процессы эритродиереза: задержка старой эритроцитарной массы, с последующей ее элиминацией [104; 323]. Некоторые авторы считают, что здесь сосредоточены лимфоидный и мегакариобластический ростки гемопоэза [249; 274]. В нашем случае пролиферирующие формы эритроидного и лимфоидного рядов кроветворения в селезенке морского ерша не превышали 2 %. В основном преобладала старая эритроцитарная масса, что позволяет рассматривать данный орган с позиций процессов эритродиереза. Вместе с тем, в нем были выявлены в достаточно большом количестве клетки мелкого кластера, которые ранее рассматривались как КОЕ. Отмечено, что в момент активной пролиферации в эритроидном ряду клеток в головной почке эта функция частично передавалась и селезенке. Это позволило нам высказать предположение о том, что селезенка может

выполнять функцию органа вторичного гемопоэза в случае, если функциональные возможности головной почки оказываются недостаточными. Эта позиция нам кажется достаточно обоснованной и высказывается впервые.

Процессы созревания эритроидных клеток. Созревающий пул клеток эритроидного ряда у костистых рыб представлен поздними базофильными нормобластами, а также полихроматофильными и ацидофильными нормобластами [87; 234; 280]. Эта группа клеток не способна к пролиферации и созревая претерпевает характерные морфологические изменения. Нами впервые предложено использовать ряд алгоритмов для оценки морфометрических изменений клеток красной крови в процессе их созревания. Это позволило показать, что приобретение клетками эллипсоидной формы на стадии: полихроматофильные нормобласты → нормоциты, увеличивает их удельную диффузионную поверхность почти на 20 % и обеспечивает рост общей поверхности почти на 40 %, что важно в последующем для выполнения газотранспортной функции.

Гемопоэз и функциональное состояние организма рыб. Наиболее радикальные изменения в организме костистых рыб происходят в период нереста, что связано с перераспределением пластических ресурсов в масштабах всего организма [103]. Это состояние затрагивает практически все физиологические системы, включая и систему крови. Поэтому ему было уделено особое внимание. Ранее установлено, что в циркулирующей крови рыб в нерестовый и постнерестовый период повышается доля не только созревающих эритроидных форм, но и клеток пролиферативного пула (пронормобластов, ранних базофильных нормобластов) [62; 87]. В настоящей работе эта закономерность была показана, прежде всего, на уровне гемопоэтической ткани, что ранее сделано не было [115]. В головной почке повышалось содержание бластных форм, особенно эритробластов, пул которых увеличивался более чем в 2 раза. Число аномальных эритроцитов в крови при этом понижалось (дакриоциты, случаи инвагинации ядра), за исключением числа эритроцитарных теней и клеток с микроядерными

включениями. Последнее важно при оценке генотоксических эффектов внешней среды, так как может приводить к ложным заключениям.

Гемопоз и абиотическое окружение: гипоксия. Гипоксические зоны (менее $0,5 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) широко представлены в водах Мирового океана [172; 228; 244]. Основная причина – низкая скорость диффузии газа в сочетании с ограничением водообмена [152; 205]. В большей степени этому фактору подвержены донные сообщества организмов, где перемещение водных масс крайне ограничено. Существование в этих условиях требует адекватной реакции со стороны систем кислородного обеспечения организма и красной крови, в частности. Известно, что гипоксия индуцирует выработку эритропоэтина у рыб [223; 247], что усиливает процессы пролиферации эритроидного ростка гемопоза и приводит к росту кислородной емкости крови [220; 292; 334]. Однако весь этот порядок событий реализуется спустя определенный отрезок времени. Процессы, которые предшествуют этому на самых ранних этапах адаптации к дефициту кислорода, до конца не ясны. Именно этим аспектам проблемы и посвящена соответствующая глава диссертации.

В настоящей работе показано, что в течение первых 90 минут действия острой гипоксии эритропоэтические процессы, напротив, угнетаются. Происходит свеллинг циркулирующей эритроцитарной массы, что сопровождается разрушением низкостойких к осмотическому фактору клеток, представленных в основном старыми и аномальными формами. Именно этот процесс, по нашему мнению, должен индуцировать выработку эритропоэтина в почках и определять выше рассмотренную последовательность событий. Эта информация получена впервые и расширяет представление о путях адаптации костистых рыб к дефициту кислорода.

Гемопоз и абиотическое окружение: гипотермия. Температура является одним из ведущих факторов водной среды, который определяет многие процессы жизнедеятельности гидробионтов [47]. У каждого вида существует зона температурной толерантности, в рамках которой физиологические процессы протекают на относительно устойчивом уровне. В настоящей работе в условиях

эксперимента мы намеренно вышли за эти пределы, чтобы зарегистрировать группу процессов адаптивного порядка, реализуемых на уровне системы крови. Впервые удалось показать, что гипотермия оказывает гипоксический эффект на организм рыб, индуцируя продукцию бластных эритроидных форм в гемопозитической ткани, которые появляются даже в системе периферического кровообращения.

Аномальные эритроидные формы и экодиагностика. Как уже отмечалось, циркулирующая кровь на уровне респираторных поверхностей испытывает фактически прямое действие факторов внешней среды, включая влияние экотоксикантов. Появление в системе циркуляции аномальных эритроидных форм в значительной степени может определяться характером и величиной токсической нагрузки на организм. Сравнительные исследования, выполненные в настоящей работе на трех видах черноморских бычков, показали, что присутствие аномальных эритроидных форм в крови донных рыб может быть использовано в качестве перспективного биомаркера в целях диагностики состояния водной среды.

ВЫВОДЫ

1. Головная почка скорпены (пронефрос) является основным гемопоэтическим органом, содержащим бластные клетки всех ростков кроветворения. Селезенка функционирует в основном как эритропоэтический орган только в период нереста, являясь «резервным» очагом формирования эритроцитов. Гемопоэтическая активность обоих органов усиливается в нерестовый период, что связано преимущественно с активацией эритроидного ростка кроветворения.
2. Процесс созревания и дифференцировки эритроидных элементов (базофильные нормобласты → полихроматофильные нормобласты → нормоциты) в крови бычка-кругляка совпадает с совершенствованием респираторных характеристик клеток. Основные изменения происходят на этапе: полихроматофильные нормобласты → нормоциты. Они включают: накопление гемоглобина в цитоплазме, подавление функциональной активности ядра и значительный рост диффузионной поверхности.
3. В условиях краткосрочной гипоксической нагрузки (15% насыщение воды O_2) угнетаются эритропоэтические процессы в гемопоэтической ткани скорпены, что находит отражение в преимущественном снижении содержания в крови базофильных нормобластов. Одновременно происходит набухание циркулирующих эритроцитов и лизис осмотически низкостойких и аномальных клеток. Это приводит к снижению концентрации гемоглобина, числа эритроцитов в крови и росту осмотической резистентности циркулирующей эритроцитарной массы. При 30% насыщении воды O_2 отмеченные выше показатели не изменяются.
4. В условиях экспериментальной гипотермии (1-2°C) у особей бычка-кругляка в крови повышается содержание незрелых эритроидных элементов: пронормобластов, базофильных и полихроматофильных нормобластов. Содержание аномальных эритроцитов не изменяется, за исключением клеток,

содержащих микроядерные включения. Отмеченные изменения происходят на фоне роста содержания в крови лактата, что отражает развитие гипоксического состояния.

5. Активная продукция эритроцитов кроветворной тканью у бычка-кругляка приходится на нерестовый период. Об этом свидетельствует относительный рост содержания в крови рыб базофильных и полихроматофильных нормобластов. Данный процесс влияет на содержание числа аномальных эритроидных клеток в крови.
6. Подсчет числа аномальных эритроцитов в крови рыб при оценке уровня токсичности морской среды необходимо проводить с учетом активности кроветворной ткани, которая существенно изменяется в нерестовый период.
7. Среди бычков, обитающих в юго-западных акваториях Крыма, наименее стойким к фоновой токсической нагрузке оказался бычок-травяник (*Zosterisessor ophiocephalus* Pallas, 1814). В его циркулирующей крови обнаружено максимальное содержание аномальных эритроидных форм при сходных условиях среды и близком уровне незрелых эритроцитов в крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллаева Н.М. Цитогематомологические исследования красноперки (*Scarginius erythrophthalmus* L., 1758) при воздействии нитрита натрия и сырой нефти / Н.М. Абдуллаева, А.Р. Исуев, М.М. Габипов // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия Естественные науки. – 2009. – № 1. – С. 59-62.
2. Алабастер Дж. Критерии качества воды для пресноводных рыб / Дж. Алабастер, Р.М. Ллойд. – Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 344 с.
3. Аминева В.А. Физиология рыб: Учебник для вузов по специальности 1013 "Ихтиология и рыбоводство" / В.А. Аминева, А.А. Яржомбек. – Москва: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 200 с.
4. Анисимова И.М. Ихтиология. Учебное пособие для с.-х. вузов под редакцией Орловой А.С. / И.М. Анисимова, В.В. Лавровский. – М.: Высшая школа, 1983. – 255 с., ил.
5. Арсан О.М. Роль температуры водной среды в регуляции процессов гликолиза и трикарбонового цикла в организме рыб // Гидробиологический журнал – 1986. – Т. 22. – С. 57–62.
6. Атлас пресноводных рыб России: В двух томах. // Под ред. Ю.С. Решетникова. – М.: Наука, 2002. – Т.2. – 251 с.
7. Бичарева О.Н. Динамика гематологических показателей и микроэлементного состава прудовых рыб / О.Н. Бичарева, М.А. Мусаев, Э.И. Мелякина // Социально-экономические и природоохранные аспекты развития сельских муниципальных образований. – М.: Изд-во «Вестник Рос. акад. с.-х. наук». – 2010. – С. 231-235.
8. Болтачев А.Р. Морские рыбы Крымского полуострова / А.Р. Болтачев, Е.П. Карпова. – Симферополь: Бизнес-информ, 2012. – 224 с.
9. Болтачев А.Р. Морские рыбы Крымского полуострова. 2-е изд. / А.Р. Болтачев, Е.П. Карпова. – Симферополь: Бизнес-Информ, 2017. – 376 с., ил.

10. Боровская М.К. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза / М.К. Боровская, Э.Э. Кузнецова, В.Г. Горохова, Л.Б. Корякина, Т.Е. Курильская, Ю.И. Пивоваров // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 3(73). – С. 334-354.
11. Ботязова О.А. Физиология системы крови: сравнительные, экологические и эволюционные аспекты: Учебное пособие / О.А. Ботязова. – Ярославль, 2000. – 60 с.
12. Бочаров Ю.С. Эволюционная эмбриология позвоночных / Ю.С. Бочаров. – М.: Издательство московского университета, 1988. – 232 с.
13. Брагинский Л.П. Теоретические аспекты проблемы «нормы и патологии» в водной экотоксикологии // Теоретические аспекты водной токсикологии. – 1981. – С. 29–40.
14. Булгаков Н.Г. Индикация состояния природных экосистем и нормирование факторов окружающей среды. Обзор существующих подходов // Успехи соврем. биол. – 2002. – Т. 122, № 2. – С. 115–135.
15. Бурдин К.С. Основы биологического мониторинга / К.С. Бурдин. – М.: Изд-во МГУ, 1985. – 158 с.
16. Васильева Е.Д. Рыбы Черного моря. Определитель морских, солоноватых, эвригалинных и проходных видов с цветными иллюстрациями, собранными С.В. Богородским / Е.Д. Васильева. – М.: Изд-во ВНИРО, 2007. – 238 с.
17. Васильков Г.В. Справочник по болезням рыб / Г.В. Васильков, Л.И. Грищенко, В.Г. Енгашев, А.И. Канаев, З.И. Ларькова, В.С. Осетров. – М.: Колос. – 1978. – 351 с.
18. Вернидуб М.Ф. Влияние сточных вод газосланцевого производства на физиологические процессы и на развитие личинок молоди лосося / Материалы совещания по вопросам рыбоводства. – М.: Наука. – 1959. – С. 103-112.
19. Войтович А.М. Микроядра в периферической крови бурых лягушек как тест на хронические мутагенные воздействия / А.М. Войтович, К.Г. Елисеева // Объемные методы генотоксической оценки и побочных эффектов биологически активных веществ: тезисы докладов Всесоюзного симпозиума. — Л. 1989. – С. 180-183.

20. Волынкин Ю.Л. Динамика показателей красной крови годовиков карпа в период зимовки / Ю.Л. Волынкин, В.А. Аминова // Вопр. экол., физиол. рыб, ихтиопат. – 1990. – Калининград. – С.63-73.
21. Габибов М.М. Влияние загрязнения водной среды ионами Pb²⁺, Cd²⁺ и сырой нефтью на накопление генетически индуцированных повреждений в эритроцитах рыб / М.М. Габибов, Н.М. Абдуллаева, Л.М. Ортабаева и др. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13, № 1 (5). – С. 1068-1070.
22. Гематология. Новейший справочник / Под ред. Абдулкадырова К.М. – Москва, 2004. – 928 с.
23. Головина Н.А. Морфофункциональная характеристика крови рыб - объектов аквакультуры: автореферат дис. ... доктора биологических наук: 03.00.10 / ВНИИ прудового рыбного хоз-ва. – Москва, 1996. – 53 с.: ил. РГБ ОД, 9 96-3/1025-6.
24. Гольдин В.М. Некоторые гематологические показатели рыб Камского водохранилища в связи с загрязнением промышленными стоками // Учёные записки Пермского университета. – 1975. – Вып. 338. – С. 123-131.
25. Гольдин В.М. О влиянии промышленного загрязнения на рыб верхней части Камского водохранилища // Основы рационального использования рыбных ресурсов камских водохранилищ. – Пермь: Издательство Пермского университета, 1978. – С.13-30.
26. Гончарова Е.И. Белки цитоскелета эритроцитов / Гончарова Е.И., Г.П. Пинаев // Цитология. – 1988. – Т. 30, № 1. – С.5-18.
27. Гулевский А.К. Роль гликолиза при холодовой адаптации карася серебряного *Carassius auratus gibelio* / А.К. Гулевский, Л.И. Релина, Е.Г. Жегунова // Проблемы криобиологии – 2007. – Т. 17. – С. 64–70.
28. Давыдов О.Н. Патология крови рыб / Давыдов О.Н., Темниханов Ю.Д., Куровская Л.Я. – Фирма «ИНКОС», 2006. – 206 с.
29. Житенева Л.Д. Основы ихтеогематологии (в сравнительном аспекте) / Л.Д. Житенева, Э.В. Макаров, О.А. Рудницкая. – Федер. гос. унитар. предприятие "Азов. науч.-исслед. ин-т рыб. хоз-ва", 2004. – Ростов н/Д: Эверест. – 311 с.

30. Житенева Л.Д. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб / Л.Д. Житенева, Т.Г. Полтавцева, О.А. Рудницкая. –Ростов-на-Дону: Кн. изд-во, 1989. – 112 с.
31. Житенёва Л.Д. Эколого-гематологические характеристики некоторых видов рыб. Справочник. / Л.Д. Житенёва, О.А. Рудницкая, Т.И. Калюжная //Ростов н/Д: АзНИИРХ, 1997. – 149 с.
32. Золотницкая Р.П. Методы гистологических исследований// Лабораторные методы исследований в клинике (Справочник) / Р.П. Золотницкая – М.: Медицина. – 1987. – С. 106-148.
33. Золотова Т.Е. Экспериментальное исследование кроветворения у рыб. -Автореф. диссерт. на соиск. учен. степ, канд наук. М., МГУ. - 1989.
34. Иванов А.А. Физиология рыб / А.А. Иванов. – Мир, 2003. – 284 с. ил. –(Учебники и учеб, пособия для студентов высших учебных заведений).
35. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб (сравнительная морфология и классификация форменных элементов крови рыб) / Н.Т. Иванова. – М.: Легкая и пищевая пром-ть, 1983. – 184 с.
36. Иванова Н.Т. Метод морфологического анализа крови в ихтиопатологических исследованиях // Изв. ГосНИОРХ. – 1977. – № 5. –С. 114-117.
37. Изюмов Ю.Г. Количество микроядер в эритроцитах периферической крови плотвы *Rutilus rutilus* и леща *Abramis brama* Рыбинского и Горьковского водохранилищ / Ю.Г. Изюмов, М.Г. Таликина, Ю.В. Чеботарева // Биол. внутр. вод. – 2003. – № 1. – С. 98-101.
38. Ильинских Н. Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность / Н.Н. Ильинских, И.Н. Ильинских, В.В. Новицкий, Н.Н. Ванчугова // Томск: Изд-во Томского ун-та. – 1992. – 272 с.
39. Истаманова Т.С. Функциональная гематология / Т.С. Истаманова, В.А. Алмазов, С.В. Канаев // Л.: Медицина. – 1973. – 310 с.
40. Калаев В.Н. Частота встречаемости клеток с микроядрами в плоском эпителии, полученном из соскобов с шейки матки женщин детородного возраста при различных физиологических состояниях, в норме и при воспалении / В.Н.

- Калаев, А.К. Буторина, О.Л. Кудрявцева // Естествознание и гуманизм – 2006. – Т. 3, № 2. – С. 22-23.
41. Камышников В.С. Справочник по клинико- биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ. – 2004. – С.499-501.
42. Карапетьян О.Ш. Молекулярные биомаркеры антропогенного загрязнения в печени бычка-кругляка *Neogobius melanosotomus* из Таганрогского залива/О.Ш. Карапетьян, Н.И. Цема, С.И. Дудкин // Вопр. рыболовства. – 2011. – Т. 12, № 4 (48). – С. 747-759.
43. Кауфман, З.С. Эмбриология рыб / З.С. Кауфман. – М: ВО Агропромиздат, 1990. – 272 с.
44. Кляшторин Л.Б. Водное дыхание и кислородные потребности рыб. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1982. – 168 с.
45. Козловская Л.В. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования / Л.В. Козловская, А.Ю. Николаев // Москва, Медицина. – под ред. Е. М. Тареева. - 2-е изд. перераб. и доп. – Москва : Медицина, 1985. – 288 с. : ил.; 22 см.
46. Кондратьева И.А. Современные представления об иммунной системе рыб / И.А. Кондратьева, А.А. Киташова, М.А. Ланге // Вестник Московского университета. – 2001. – сер.16. – № 4. – С.11-20.
47. Константинов А.С. Общая гидробиология / А.С. Константинов. – М.: Высш. шк., 1986. – 472 с.
48. Крылов О.Н. Патоморфологические изменения крови рыб Камского водохранилища и р. Камы при отравлении сточными водами // Сб. «Влияние пестицидов на диких животных». – Москва, 1972. – С. 46-64.
49. Крылов О.Н. Пособие по профилактике и диагностике отравлений рыб вредными веществами / О.Н. Крылов. – М.: ЦНИИТЭИРХ, 1980. – 116 с.
50. Крылов О.Н. Методические указания по гематологическому обследованию рыб в водной токсикологии / О.Н. Крылов. – Л.: ГосНИОРХ. – 1974. – 39 с.

51. Куликова Н.И. Об отношении молодежи черноморских кефалей к низкой температуре / Н.И. Куликова, П.В. Шекк, В.И. Руденко // Вопросы ихтиологии – 1986. – Т. 26. – С. 119-128.
52. Куценко С.А. Основы токсикологии / С.А. Куценко. – М.: Фолиант. – 2004. – 570 с.
53. Кузина Т.В. Цитофизиологические особенности крови промысловых рыб Волго-Каспийского канала: автореф. дис. кандид. биологических наук: 03.03.04 / Кузина Татьяна Вячеславовна – Астрахань, 2011. – 26 с.
54. Кузина Т.В. Частота встречаемости цитопатологических нарушений в периферической крови бычковых рыб северного Каспия / Т.В. Кузина. // Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность. – 2018. – С. 668-672.
55. Купер Э. Сравнительная иммунология / Э. Купер. – М.: Мир, 1980. – 422 с.
56. Куфтаркова Е.А. Гидрохимическая характеристика отдельных бухт севастопольского взморья / Е.А. Куфтаркова, Н.Ю. Родионова, В.И. Губанов, Н.И. Бобко // Труды Южного научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии. – 2008. – Т. 46. – С. 110–117.
57. Ланге М.А. Морфологическое и автордиографическое исследование кроветворных органов личинок ручьевой миноги (*Lampetra planeri*) разного возраста / М.А. Ланге, Н.В. Потапина, Н.Г. Хрущев // Журнал общей биологии. – 1990. – Т. 51, № 6. – С. 796-818.
58. Леонова Е.В. Патология системы крови: учебное пособие. Электронные текстовые данные / Е.В. Леонова, А.В. Чантурия, Ф.И. Висмонт. – Минск: Высшая школа, 2013. – 144 с.
59. Липунова Е.А. Система красной крови: Сравнительная физиология. Монография / Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2004. – 216 с.
60. Лукьяненко В.И. Токсикология рыб / В.И. Лукьяненко. – М.: Легкая и пищевая пром-ть, 1984. – 270 с.

61. Лукьяненко В.И. Белковый состав сыворотки крови двух аллопатрических популяций Сибирского осетра / В.И. Лукьяненко, А.В. Попов // Докл. АН СССР. – 1969. – Вып. 186, № 1. – С. 233-235.
62. Маслова М.Н. Динамика сезонных изменений в системе красной крови низших позвоночных: сезонная динамика эритропоэза у форели *Salmo gairdneri* / М.Н. Маслова, Т.В. Тавровская // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 1991. – Т. 27. – С. 796-798.
63. Микряков В.Р. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление воды / В.Р. Микряков, Л.В. Балабанова, Е.А. Заботкина. – М.: Наука, 2001. – 126 с.
64. Минеев А.К. Морфологический анализ и патологические изменения структуры клеток крови у рыб Саратовского водохранилища // Вопросы ихтиологии. – 2007. – Т. 47, № 1. – С. 93-100.
65. Минеев А.К. Некоторые гематологические параметры бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus Pallas, 1814*) Саратовского водохранилища // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2013. – Т. 15, № 3. – С. 180–186.
66. Мисейко Г.Н. Биологический анализ качества пресных вод / Г.Н. Мисейко, Д.М. Безматерных, Г.И. Тушкова. – Барнаул: АлтГУ, 2001. – 201 с.
67. Миронов О.Г. Санитарно-бактериологическая характеристика Карантинной бухты (Севастополь, Черное море) / О.Г. Миронов, Л.В. Енина, Р.В. Сосновская // Экология моря. – 2002. – Вып. 59. – С. 70–73.
68. Наумов Н.П. Часть 1. Низшие хордовые, безчелюстные, рыбы, земноводные. Зоология позвоночных. / Н.П. Наумов, Н.Н. Карташев. – М.: Высшая школа, 1979. – С. 117-118.
69. Овен Л.С. Ихтиофауна черноморских бухт в условиях антропогенного воздействия / Л. С. Овен, А. Д. Гордина, О. Г. Миронов // Акад. наук Украины. Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского. – Киев : Наукова думка. – 1993. – 143 с.

70. Овен Л.С. Ответные реакции черноморского ерша *Scorpaena porcus* на антропогенное воздействие / Л.С. Овен, И.И. Руднева, Н.Ф. Шевченко // Вопросы ихтиологии. – 2000. – Т. 40. № 1. – С. 75–78.
71. Опекунова М.Г. Биоиндикация загрязнений / М.Г. Опекунова – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2004. – 354 с.
72. Парфенова И.А. Функциональная морфология циркулирующих эритроцитов бычка-кругляка в условиях экспериментальной гипоксии / И.А. Парфенова, А.А. Солдатов // Морской экологический журнал. – № 2. – 2011. – С. 59-67.
73. Пахрова О.А. Динамика клеточных показателей эритроцитарной системы при адаптации к острой экспериментальной гипоксии головного мозга в зависимости от уровня стрессоустойчивости / О.А. Пахрова, В.В. Криштоп, О.С. Ленчер, М.Г. Курчанинова, Т.А. Румянцева // Успехи современной науки. – 2016. – Т. 9, № 12. – С. 99-104.
74. Пахрова О.А. Реакция эритроидного ростка кроветворных органов белых крыс при моделировании острой тотальной гипоксии головного мозга / О.А. Пахрова, О.С. Ефремочкина, Е.О. Смолина, В.В. Криштоп // Актуальные вопросы научных исследований: сборник научных трудов: материалы III Межд. научно-практ. конф. (Иваново, 15 июня 2016): Иваново: ИП Цветков А.А. – 2016. – С. 73-77.
75. Пегель В.А. Физиология пищеварения рыб / В.А. Пегель. – Труды Томского университета, серия Биология, 1950. – Т. 108. – 199 с.
76. Петров Р.В. Контроль и регуляция иммунного ответа / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов, В.М. Манько, А.А. Михайлова. – Л.: Медицина, 1981. – 311 с.
77. Потапенко А.Я. Осмотическая устойчивость эритроцитов Учебное пособие / А.Я. Потапенко, А.А. Кягова, А.М. Тихомиров. – ГОУ ВПО ГРМУ, 2006. – 16 с.
78. Пучков Н.В. Физиология рыб / Н.В. Пучков. – М. Пищепромиздат, 1954. – 300 с.
79. Решетников Ю.С. Атлас пресноводных рыб России / Ю.С. Решетников. – М.: Наука, 2002. – Т. 2 – 251 с.
80. Руднева И.И. Ответные реакции морских животных на антропогенное загрязнение Черного моря: Автореф. дис. . д-ра биол. наук: 03.00.29 / МГУ. М., 2000. - 55 с.

81. Савваитова К.А. Аномалии в строении рыб как показатели состояния природной среды / К.А. Савваитова, Ю.В. Чеботарева, М.Ю. Пичугин, С.В. Максимов // Вопросы ихтиологии. –1995. – Т. 35, № 2. – С. 182-188.
82. Световидов А.Н. Рыбы Черного моря. – М.: Наука, 1964. – 551 с.
83. Солдатов А.А. Формирование резервов депо крови в онтогенезе морских рыб // Экология моря. 1992. – Вып. 42. – С.46-55.
84. Солдатов А.А. Влияние гипоксии на биохимические показатели эритроцитов скорпены А.А. Солдатов, О.С. Русинова, В.В. Трусевич, Т.Ф. Звезда // Украинский биохимический журнал –1994. – Т.66, № 5. – С.115-118.
85. Солдатов А.А. Эритроциты циркулирующей крови морского ерша *Scorpaena porcus* L. 1758 в условиях острой экспериментальной гипоксии / А.А. Солдатов, Т.А. Кухарева, А.Ю. Андреева, И.А. Парфенова // Морской биологический журнал. – 2018. – Т. 3, № 4. – С. 92-100.
86. Солдатов А.А. Гемоглобиновая система черноморского бычка-кругляка в условиях экспериментальной гипоксии / А.А. Солдатов, И.А. Парфенова, С.В. Коношенко // Украинский биохимический журнал – 2004. – Т. 76, № 3. – С. 85-90.
87. Солдатов А.А. Особенности организации и функционирования системы красной крови рыб (обзор) // Журнал эволюционной биохимии и физиологии – 2005. – Т. 41, № 3. – С. 217-223.
88. Солдатов А.А. Связывание кислорода кровью морских рыб в условиях экспериментальной гипотермии / А.А. Солдатов, И.А. Парфенова // Украинский биохимический журнал. – 2011. – Т.83, № 1. – С.77-82.
89. Солдатов А.А. Микроядерные включения в эритроцитах бычка-кругляка при различной интенсивности эритропоэтических процессов / А.А. Солдатов, Е.В. Пашкова, Т.А. Кухарева // Гидробиологический журнал. – 2012. – Т. 48, № 4. – С. 75-80.
90. Ташкэ К. Введение в количественную цитологическую морфологию / К. Ташкэ. – Бухарест: Изд-во Академии Респ. Румынии, 1980. – 291 с.

91. Терсков Г.В. Метод химических (кислотных) эритрограмм / Г.В. Терсков, И.И. Гительзон // Биофизика. – 1957. – Т. 11. №. 2. М. – С. 259 – 266.
92. Трошкина Н.А. Эритроцит: строение и функции его мембраны / Н.А. Трошкина, В.И. Циркин, С.А. Дворянский // Вятский медицинский вестник. 2007. – № 2-3. – С. 32-40.
93. Федорова Н.Н. Мезонефрос как орган кроветворения у половозрелых рыб / Н.Н. Федорова, М.П. Грушко, О.П. Ложниченко, О.В. Боброва // Фундаментальные исследования. – 2002. – № 4 – С. 89-91.
94. Филенко О.Ф. Водная токсикология / О.Ф. Филенко. – МГУ, Черноголовка, 1988. – 175 с.
95. Филенко О.Ф. Водная экотоксикология в России: от прошлого к настоящему / О.Ф. Филенко, Г.М. Чуйко // Труды Института биологии внутренних вод РАН. – 2017. – № 77. – С. 124-142.
96. Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. – Л.: Наука, 1989. – 138 с.
97. Флерова Е.А. Клеточная организация почек костистых рыб (на примере отрядов Cypriniformes и Perciformes): монография / Е.А. Флёрова. – Ярославль: Изд-во ФГБОУ ВПО «Ярославская ГСХА», 2012. – 140 с.
98. Христофорова Н. К. Биоиндикация и мониторинг загрязнения морских вод тяжелыми металлами. – Л.: Наука, 1989. – 192 с.
99. Чеснокова Н.П. Особенности структуры и функций эритроцитарной мембраны / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Успехи современного естествознания. – 2015. – №1. – С. 328-331.
100. Чижевский А.Л. Структурный анализ движущейся крови. – М.: Изд-во АН СССР, 1959. – 474 с.
101. Шекк П.В. Возрастные изменения реакции черноморского сингиля *Liza aurata* на низкую температуру / П.В. Шекк, Н.И. Куликова, В.И. Руденко // Вопросы ихтиологии. – 1990. – Т. 30. – С. 94-106.
102. Шиффман Ф. Дж. Патофизиология крови. – С.-Петербург: БИНОМ, 2000. – 365 с.

103. Шульман Г.Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1972. – 368 с.
104. Abdel-Aziz E.-SH. Haemopoiesis in the head kidney of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae): a morphological (optical and ultrastructural) study / E.-SH. Abdel-Aziz, S.B.S. Abdu, TE-S Ali, H.F. Fouad // Fish Physiol. Biochem. – 2010. – No. 36. – P. 323–336.
105. Agius C. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology / C. Agius, R. J. Roberts // Jurnal of fish diseases. – 2003. – Vol. 26, Iss. 9. – P. 499-509.
106. Alford P.B. Erythropoiesis and maturation of erythrocytes in peripheral circulation in channel catfish / P.B. Alford, J.R. Tomasso, A.B. Bodine // Copeia. – 1993. – N 3. – P. 889–890.
107. Al-Sabti K. Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of industrial waste products in the Baltic Sea, Sweden / K. Al-Sabti, J. Hardig // Comperative Biochemistry and Physiology. – 1990. – No. 97 (1). – P. 179–182.
108. Álvarez F. Seasonal intrathymic erythropoietic activity in trout / F. Álvarez, E. Flaño, A.J. Villena, A. Zapata, B.E. Razquin // Dev Comp Immunol. – 1994. – No. 18. – P. 409-420.
109. Amend J.F. Primitive origins of the respiratory-heart rate relationship: respiratory heart relationship in an elasmobranch / J.F. Amend, H.E. Hoff, N.K. Amend // Cardiovasc. Res. Cent. Bull. – 1970. – Vol. 8, No 3. – P. 93-101.
110. Anbumani S. Gamma radiation induced micronuclei and erythrocyte cellular abnormalities in the fish *Catla catla* / S. Anbumani, Mary N. Mohankumar // Aquatic Toxicology. – 2012. – Vol. 122–123. – P. 125–132.
111. Andreyeva A.Y. Method of intravital morphometry of the nucleated erythrocytes of fishes / A.Y. Andreyeva, V.S. Mukhanov // Hydrobiological J. – 2012. – No. 48: – P. 107-112.
112. Andreyeva A.Y. Black scorpionfish (*Scorpaena porcus* L.) hemopoiesis. Analysis by flow cytometry and light microscopy / A.Y. Andreyeva, A.A. Soldatov, T.A. Kukhareva // The Anatomical Record. – 2017. – No. 300. – P. 1993–1999.

113. Andreeva A.Y. The influence of acute hypoxia on the functional and morphological state of the black scorpionfish red blood cells / A.Y. Andreeva, A.A. Soldatov, V.S. Mukhanov // *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. – 2017. – Vol. 53, Iss. 4. – P. 312-319.
114. Andreyeva A.Y. Cellular composition and proliferation levels in the hematopoietic tissue of Black Scorpionfish (*Scorpaena porcus* L.) head kidney and spleen during the spawning and wintering periods / A.Y. Andreyeva, T.A. Kukhareva, A.A. Soldatov // *The Anatomical Record*. – 2019. – Vol. 302, iss. 7. – P. 1136-1142.
115. Andrew W. Comparative hematology / New York and London, 1965. – P. 171.
116. Auletta A. E. Mutagenicity test schemes and guidelines: US EPA Office of Pollution Prevention and Toxics and Office of Pesticide Programs / A.E. Auletta, K.L. Dearfield, M.C. Cimino // *Environmental and Molecular Mutagenesis*. – 1993. – Vol. 21. – P. 38–45.
117. Ayllon F. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test / F. Ayllon, Garcia- E. Vazquez // *Mutation Research*. – 2000. – V. 467, No. 2. – P. 177–186.
118. Bain B.J. Morphology of blood cells // *Blood cells. A practical guide*, 4th ed. Blackwell Publishing. – 2006. – P. –76-79.
119. Bain B.J. Diagnosis from the blood smear // *N Engl J Med*. – 2005. – No. 353. – P. 498–507.
120. Baldisserotto B. Ion fluxes and haematological parameters of two teleosts from the Rio Negro, Amazon exposed to hypoxia / B. Baldisserotto, A.R. Chippari-Games, N.P. Lopes, J.E.P.W. Bicudo, Paula- M.N. Silva, V.M.F. Almida, A.L. Val // *Brazil. J. Biol.* – 2008. – Vol. 68. – P. 336-345.
121. Bartosz G. Erythrocyte Aging: Physical and Chemical Membrane Changes. *Gerontology*. – 1991. – Vol. 37. – P. 33-67.
122. Beams H.W. Fine structure of the red blood cells and thrombocytes of the young trout (*Salmo gairdneri*) / H. W. Beams, S. S. Sekhon // *J. Cell Biol.* – 1966. – No. 31. – 11A.

123. Bihari N. Flow cytometric detection of DNA cell cycle alterations in hemocytes of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) off the Adriatic coast, Croatia / N. Bihari, M. Mičić, R. Batel, R. K. Zahn // *Aquatic Toxicology*. – 2003. – No. 64. – №. 2. – P. 121-129.
124. Boge G. Cytotoxicity of phenolic compounds on *Dicentrarchus labrax* erythrocytes / G. Boge, H. Roche // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* – 1996. – No. 57. – P. 171.
125. Bolognesi C. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions / C. Bolognesi, E. Perrone, P. Roggieri, D. Pampanin and A. Sciutto // *Aquat Toxicol.* – 2006. – № 78. – P. 93-98.
126. Bolognesi C. Micronucleus assay in aquatic animals / C. Bolognesi, M. Hayashi // *Mutagenesis*. – 2011. – № 26. – P. 205-213.
127. Bogusławska D.M. Spectrin and phospholipids - the current picture of their fascinating interplay / D.M. Bogusławska, B. Machnicka, A. Hryniewicz-Jankowska, A. Czogalla // *Cell Mol. Biol. Lett.* – 2014. – Vol. 19, No 1. – P. 158-179.
128. Bosworth C.A. Protein expression patterns in zebrafish skeletal muscle: initial characterization and the effects of hypoxic exposure / C.A. Bosworth, C.W. Chou, R.B. Cole, B.B. Rees // *Proteomics*. – 2005. – Vol. 5, No 5. – P. 1362-1371.
129. Botham J.W., Manning M.J. The histogenesis of the lymphoid organs of the carp *Cyprinus carpio* L. and the ontogenetic development of allograft reactivity // *Fish. Biol.* – 1981. – P. 403-414.
130. Bridges D.W. Seasonal hematological changes in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* / D.W. Bridges, Jr.J.J. Cech, D.N. Pedro // *Transactions Am Fisheries Soc.* – 1976. – No. 105. – P. 596-600.
131. Buckley J.A. Heinz body hemolytic anemia in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to chlorinated wastewater // *J. Fish Res. Bd. Can.* – 1976. – No. 34. – P. 224.
132. Bunyaratvej A. Quantitative changes of red blood cell shapes in relation to clinical features in beta-thalassemia HbE disease / A. Bunyaratvej, S. Sahaphong, N. Bhamarapavati, P. Wasi // *Am J. Clin Pathol.* – 1985. – 83. – P. 555–559.
133. Carrasco D. Multiple hemopoietic defects and lymphoid hyperplasia in mice lacking the transcriptional activation domain of the c-Rel protein / D. Carrasco, J. Cheng, A.

- Lewin, G. Warr, H. Yang, C. Rizzo, F. Rosas, C. Snapper, R. Bravo // *J Exp Med.* – 1998. – V. 187, I. 7. – P. 973-984.
134. Carrola J. Frequency of micronuclei and of other nuclear abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro and Ave estuaries—Portugal / J. Carrola, N. Santos, M.J. Rocha, A. Fontainhas-Fernandes, M.A. Pardal, R.A.F. Monteiro // *Environmental Science and Pollution Research.* – 2014. – V.21, I. 9. – P. 6057–6068.
135. Catton W.T. Blood cell formation in certain teleost fishes // *Blood.* 1951. – V. 6, №1. – P. 39–60.
136. Cavas T. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes chronically exposed to cadmium chloride and copper sulphonate / T. Cavas, N.N. Garanko, V.V. Arkhipchuk // *Chemosphere.* – 2002. – P. 47-49.
137. Chapman C.A. Hematological responses of the grey carpet shark (*Chiloscyllium punctatum*) and the epaulette shark (*Hemiscyllium ocellatum*) to anoxia and re-oxygenation / C.A. Chapman, G.M. Renshaw // *J.Exp.Zool. Part A.* – 2009. – Part A., Vol. 311. – P. 422-438.
138. Chen Y.H. Zinc transferrin stimulates red blood cell formation in the head kidney of common carp (*Cyprinus carpio*) / Y.H. Chen, S.W. Fang, S.S. Jeng // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* – 2013. – Vol. 166, No 1. – P. 1-7.
139. Chou C-F. Erythropoietin gene from a teleost fish, *Fugu rubripes* / C-F. Chou, S. Tohari, S. Brenner, B. Venkatesh // *Blood.* – 2004. – Vol. 104, No 5. – P. 1498-1503.
140. Chudzik J. Temperature and erythropoiesis in goldfish / J. Chudzik, A.H. Houston // *Can J Zool.* – 1983. – No. 61. – P. 1322-1325.
141. Clauss T.M. Hematologic Disorders of Fish / T.M. Clauss, D.M.D. Alistair, J.E. Arnold // *Hematology and Related Disorders* – 2008. – V.11, I. 3. – P. 445-462.
142. Claver J.A. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates / J.A. Claver, A.I.E. Quaglia // *J Exotic Pet Med.* – 2009. – Vol. 18, № 2. – P. 87–97.
143. Claireaux G. Adaptive respiratory responses of trout to hypoxia. II. Blood oxygen carrying properties during hypoxia / G. Claireaux, S. Thomas, B. Fievet, R. Motais // *Respiration Physiology.* – 1988. – No. 74. – P. 91-98.

144. Cocca E. Genomic Remnants of A-Globin Genes in the Hemoglobinless Antarctic Icefishes / M. Ratnayake-Lecamwasam, S.K. Parker, L. Camardella, M. Ciaramella, G. di Prisco, and H.W. Dietrich // Proceedings of National Academy of Sciences USA. – 1995. – No. 92. – P. 1817–1821.
145. Collazos M.E. Seasonal variation in haematological parameters in male and female *Tinca tinca* / M.E. Collazos, E. Ortega, C. Barriga, A.B. Rodríguez // Mol Cell Biochem. – 1998. – No. 183. – P.165-168.
146. Cossu C. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments / C. Cossu, A. Doyotte, M. Babut, A. Exinger, P. Vasseur // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2000. – Vol. 45, iss. 2. – P. 106–121.
147. Cvitanic A. Morphological characteristics of blood cells in species of cartilaginous fish from the Adriatic Sea // Acta Adriat. – 1999. – V.40. – P. 23-36.
148. Diago M.L. In vitro haemopoiesis induced in rainbow trout pronephric stromal cell line TPS / M.L. Diago, P. López-Fierro, B. Razquin, A. Villena // Fish Shellfish Immunol. – 1988. – No. 8. – P. 101–119.
149. Dani S.U. Osteoresorptive arsenic intoxication. – Bone 2013. – No. 53. – P. 541–555.
150. De Pedro N. Daily and seasonal variations in haematological and blood biochemical parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758 / N. De Pedro, A.I. Guijarro, M.A. López-Patiño, R. Martínez-Álvarez, M.J. Delgado // Aquaculture Res. – 2005. – No. 36. – P. 1185-1196.
151. DiBella N.J. Effect of splenectomy on teardrop-shaped erythrocytes in agnogenic myeloid metaplasia / N.J. DiBella, M.N. Silverstein, H.C. Hoagland // Arch Int Med. – 1977. – No. 137. – P. 380–391.
152. Duncombe-Rae C.M. Low oxygen expression and the poleward undercurrent on the Angola-Namibia shelf, July 1999 / C.M. Duncombe-Rae, G.W. Bailey, T. Neumann, A. Plas, D. Mouton, V. Filipe, I. Schuffenhauer, F. Franz, G. Nelson // 10th SAMSS, 2000: Wilderness (South Africa), 22-26 Nov 1999. – Abstracts, 2000. – P. 1.

153. Eiras J.C. Suspected viral erythrocytic necrosis (VEN) in the intertidal fish *Mauligobius maderensis* from Madeira / J.C. Eiras, G. Costa, M. Biscoito, A.J. Davies // Portugal J. mar. boil. Ass. U. K. – 1996. – No. 76. – P 545-554.
154. Ergene S. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution / S. Ergene, T. Cavas, A. Celik, N. Koleli, F. Kaya, A. Karahan // Ecotoxicologi. – 2007. – No. 16. – P. 385-394.
155. Esteban M.A. Erythropoiesis and thrombopoiesis in the head-kidney of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural study / M.A. Esteban, J. Meseguer, A. Garcia Ayala, B. Agulleiro // Arch Histol Cytol. – 1989. – No. 52. – P. 407–419.
156. Esteban M. Blood cells of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Flow cytometric and microscopic studies / M. Esteban, J. Muñoz, J. Meseguer // Anatom Rec. – 2000. – No. 258. – P. 80-89.
157. Evelyn T.P.T. Viral erythrocytic necrosis: natural occurrence in Pacific salmon and experimental transmission / T.P.T. Evelyn, G.S. Traxler // J. Fish. Res. Bd. Can. – 1978. – No. 35. – P. 903-912.
158. Fago A. The cathodic hemoglobin of *Anguilla anguilla*. Amino acid sequence and oxygen affinity and phosphate sensitivity / A. Fago, V. Carratore, Di Prisco, R.J. Feuerlein, L. Sottrup-Jensen, R.E. Weber // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol. 270. – P. 18897-18902.
159. Fan Z. The cell cycles and DNA contents of the erythrocytes in peripheral blood of four species of fish / Z. Fan, H. Yin, S. Song, F. Pan., D. Xia // Acta Zool. Sin. 1995. – V. 41. – P. 370-374.
160. Fange R. The fish spleen: structure and function / R. Fange, S. Nilsson // Experientia. – 1985. – V.41. – P. 152-158.
161. Fange R. Fish blood cells // Fish physiology. – 1992. – San Diego (CA): Academic Press Inc. – Vol. 12B. – P. 1–54.
162. Farag M.G., Alagawany M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity // Chemico-Biological Interactions. – 2018. - № 279. – P. 73-83.

163. Farolino D.L. Teardrop-shaped red cells in autoimmune hemolytic anemia / D.L. Farolino, P.K. Rustagi, M.S. Currie, T.D. Doebelin, G.L. Logue // *Am J Hematol.* – 1986. – No. 21. – P.415–428.
164. Feuerlein R.J. Oxygen equilibria of cathodic eel hemoglobin analysed in terms of the NWC model and Adiar's successive oxygenation theory / R.J. Feuerlein, R.E. Weber // *J. Comp. Physiol.* – 1996. – Vol. 165B. – P. 597-606.
165. Fijan N. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish // *J Fish Biol* – 2002a. – No. 60. – P. 999–1014.
166. Fijan N. Composition of main haematopoietic compartments in normal and bled channel catfish // *J Fish Biol.* – 2002b. – No. 60. – P. 1142–1154.
167. Flora S. De. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water / S. De Flora, L. Viganó, F. D'Agostini, A. Camoirano, M. Bagnasco, C. Bennicelli, F. Melodia, A. Arillo // *Mutat. Res.* – 1993. – No. 319. – P. 167–177.
168. Ford J. Red blood cell morphology // *Int J Lab Hematol.* – 2013. – No. 35. –P. 351-357.
169. Galindez E.J. The spleen of *Mustelus schmitti* (*Chondrichthyes, Triakidae*): a light and electron microscopic study / E.J. Galindez., M.C. Aggio // *Ichthyol. Res.* – 1998. – V. 45. J. A. P. 179–186.
170. Galindez E.J. Haematology and blood cell morphology of *Mustelus schmitti* / E.J. Galindez, M.C. Aggio // *An. Mus. Hist. Nat.Valparaiso.* – 1995. – V. 23. –P. 33-40.
171. Garavini C. Hematopoiesis in *Ameiurus nebulosus* in condizioni normali esperimental // *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* – 1972. – V. 48. – P. 457–461.
172. Gewin V. Dead in the water // *Nature.* – 2010. – Vol. 466, No. 7308. – P. 812–814.
173. Gill T.S. Erythrocytic and leukocytic responses to cadmium poisoning in a freshwater fish, *Puntius conchoni* ham / T.S. Gill, J.C. Pant // *Environ. Res.* – 1985. – No. 36. – P. 327-336.
174. Girish V. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ / V. Girish, A. Vijayalakshmi // *Indian J. Cancer.* – 2004. – V. 41, No 1. – P. 41-47.

175. Glomski C.A. The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. III. Fish, the lower vertebrate experience / C.A. Glomski, J. Tamburlin, M. Chainani // *Histol. Histopathol.* – 1992. – No.7. – P. 501–528.
176. Gorinstein S. Antioxidants in the black mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as an indicator of Black Sea coastal pollution / S. Gorinstein, S. Moncheva, E. Katrich, F. Toledo, P. Arancibia, I. Goshev, S. Trakhtenberg // *Marine Pollution Bulletin.* – 2003. – Vol. 46, iss. 10. – P. 1317–1325.
177. Greaney G.S. Allosteric modifiers of fish hemoglobins: In vitro and in vivo studies of the effect of ambient oxygen and pH on erythrocyte ATP concentrations / G.S. Greaney, D.A. Powers // *Journal of experimental zoology comparative physiology and biochemistry.* –1978. – V. 203, I. 3. – P. 339-349.
178. Grisolia C.K. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in eutrophic tropical lake / C.K. Grisolia, C.L.G. Rivero, F.L.R.M. Starling, I.C.R. Silva, A.C. Barbosa, J.G. Dorea // *Genet Mol Biol.* – 2009. – No. 32. – P. 138-143.
179. Gubta S. Sodium Fluoride Toxicity in the Fresh Water Cat Fish *Clarias batrachus* (Linn.): Effects on the Erythrocyte Morphology and Antioxidant Enzymes / S. Gubta, A.N. Poddar // *Research Journal of Environmental Toxicology.* – 2014. – No. 8 (2). – 68-76.
180. Guijarro A.I. Seasonal changes in haematology and metabolic resources in the tench / A.I. Guijarro, M.A. Lopez-Patiño, M.L. Pinillos, E. Isorna, N. De pedro, A.L. Alonso-Gómez, M. Alonso-Bedate, M.J. Delgado // *J Fish Biol.* – 2003. – No. 62. – P. 803–815.
181. Gütgemann I. Significance of tear drop cells in peripheral blood smears / I. Gütgemann, H. Heimpel, C.T. Nebe // *J Lab Med.* – 2013. – 37. – P. 227-231.
182. Guha B. Efficacy of vitamin-C (L-ascorbic acid) in reducing genotoxicity in fish (*Oreochromis mossambicus*) induced by ethyl methane sulphonate / B. Guha, A.R. Khuda-Bukhsh // *Chemosphere* – 2002. – P. 47-49.
183. Gwozdziński K. Structural changes of proteins in fish red blood cells after copper and mercury treatment // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* – 1992. – No. 23. – P. 426.

184. Hardig J. Autoradiography on erythrokinesis and multihemoglobins in juvenile *Salmo salar* L. at various respiratory gas regimes / J. Hardig, L.B. Hoglund // Acta Physiol, Scand. – 1983. – V. 76A. – P. 27-34.
185. Harris J. Modulation of the fish immune system by hormones / J. Harris, D.J. Bird // Vet Immunol Immunopathol. – 2000. – No. 77. – P. 163-176.
186. Heise K. Oxidative stress and HIF-1 DNA binding during stressful cold exposure and recovery in the North Sea eelpout (*Zoarces viviparus*) / K. Heise, S. Puntarulo, M. Nikinmaa, M. Lucassen, H.O. Portner, D. Abele // Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. – 2006. – Vol. 143, No 4. – P. 494-503.
187. Hevesey G. Iron metabolism and erythrocyte formation in fish / G. Hevesey, D. Lockner, N. Sletten // Acta physiol. scand. – 1964. – No. 60. – P. 256-266.
188. Hille S.A. A literature review of the blood chemistry of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson // J Fish Biol. – 1982. – No. 20. – P. 535-69.
189. Hofer R. Heavy metal intoxication of arctic charr (*Salvelinus alpinus*) in a remote acid Alpine lake / R. Hofer, S. Weyrer, G. Kock, H. Pitttracher // FAO/EIFAC/XVII/92/Symp. E31, Lugano, Switzerland. – 1992. – P. 147-148.
190. Hoffman R. Hematology: Basic Principles and Practice / R. Hoffman, E.J. Benz, L.E. Silberstein, H.E. Heslop, J.I. Weitz, J. Anastasi // Elsevier. – 2013. – P. 2679-2687.
191. Hooftman R.N. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethylmethane sulphonate / R.N. Hooftman, W.K. Raat // Mutat. Res. – 1982. – No. 104. – P. 147-152.
192. Houston A.H. Haematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish / A.H. Houston, W.C. Roberts, J.A. Kennington // Fish Physiol Biochem. – 1996. – V. 15. – P. 481-489.
193. Houston A.H. Erythrokinetics in fish: recovery of the goldfish from acute anemia / A.H. Houston, A. Murad // Can. J. Zool. Rev. Can. Zool. – 1995. – Vol. 73. – P. 411-418.
194. Hose J.E. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off southern California / J.E. Hose, J.N. Cross, S.T. Smith, D. Diehl // Mar. Environ. Res. – 1987. – No. 22. – P. 167-176.

195. Houchin D.N. A method for the measurement of red cell dimensions and calculation of mean corpuscular volume and surface area / D.N. Houchin, J.I. Munn, B.L. Parnell // *Blood*. – 1958. – Vol.13. – P. 1185-1191.
196. Houston A.H. Erythrodynamic in fish: recovery of the goldfish from acute anemia / A.H. Houston, A. Murad // *Can. J. Zool. Rev. Can. Zool.* – 1995. – Vol. 73. – P. 411-418.
197. Hrubec T.C. Effects of temperature on hematological and serum biochemical profiles of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) / T.C. Hrubec, J.L. Robertson, S.A. Smith // *Am J. Vet Res.* – 1997. – No. 58(2). – P. 126–130.
198. Hrubec T.C. Age-related changes in hematology and plasma chemistry values of hybrid striped bass (*Morone chrysops* - *Morone saxatilis*) / T.C. Hrubec, S.A. Smith, J.L. Robertson // *Vet Clin. Pathol.* 2001. – No. 30. – P. 8–15.
199. Icardo J.M. The spleen of the African lungfish *Protopterus annectens*: freshwater and aestivation / J.M. Icardo, W.P. Wong, E. Colvee, A.M. Loong, Y.K. Ip // *Cell Tissue Res.* – 2012. – Vol. 350, No 1. – P. 143-156.
200. Iorio R.J. Some morphological and kinetic studies of the developing erythroid cells of the common goldfish *Carassius auratus* // *Cell Tiss. Kinet.* – 1969. – No. 2. – P. 319-331.
201. Ivanova L. Micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes from barbel *Barbus Peloponnesius* revealing genotoxic pollution of the river Bregalnica / L. Ivanova, F. Popovska-Percinic, V. Slavevska-Stamenkovic, M. Jordanova, K. Rebok // *Macedonian Veterinary Review.* – 2016. – No. 39(2). – P. 159-166.
202. Ivanovsky O. Characterization of kidney marrow in zebrafish (*Danio rerio*) by using a new surgical technique / O. Ivanovsky, K. Kulkeaw, M. Nakagawa, T. Sasaki, Ch. Mizuochi, Y. Horio, T. Ishitani, D. Sugiyama // *Contributions, Sec Biol. Med. Sci. MASA* – 2009. – No. (2). – P. 71–80.
203. Jindal R. Phenotypic Alterations in Erythrocytes of *Ctenopharyngodon idellus* (*Cuvier & Valenciennes*) Induced by Chlorpyrifos: SEM Study / R. Jindal, M. Kaur // *International Journal of Fisheries and Aquaculture Sciences.* – 2014. – Vol. 4, No. 1. – P. 23-30.

204. Joerink M. Head kidney-derived macrophages of common carp (*Cyprinus carpio* L.) show plasticity and functional polarization upon differential stimulation / M. Joerink, C.M. Ribeiro, R.J. Stet, T. Hermsen, H.F. Savelkoul, G.F. Wiegertjes // J Immunol. – 2006. – No. 177. – P. 61-69.
205. Joyce S. The dead zones: oxygen-starved coastal waters / S. Joyce // Environmental health perspectives. – 2000. Vol. 108, No. 3. – P. A120-A125.
206. Ju Z. Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to hypoxia / Z. Ju, M.C. Wells, S.J. Heater, R.B. Walter // Comp. Biochem. Physiol. C. – 2007. – Vol. 145, No1. – P. 134-144.ϕ
207. Karuppasamy R. Hematological responses to exposure to sublethal concentration of cadmium in air breathing fish, *Channa punctatus* / R. Karuppasamy, S. Subathra, S. Puvaneswari // J. Environ. Biol. – 2005. – No. 26. – P. 123.
208. Katakura F. Demonstration of T cell and macrophage progenitors in carp (*Cyprinus carpio*) kidney hematopoietic tissues. Development of clonal assay system for carp hematopoietic cells / F. Katakura, T. Yamaguchi, M. Yoshida // Dev. and Comp. Immunol. – 2010. – V. 34, № 6. – P. 685–689.
209. Kavadias S. Seasonal variation in steroid hormones and blood parameters in cage-farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) / S. Kavadias, J. Castritsi-Catharios, A. Dessypris, H. Miliou // J App Ichthyol. – 2004. – No. 20. – P. 58-63.
210. Kawahara S. Severe hemolytic anemia with tear drop cells as initial manifestation of Wilson's disease / S. Kawahara, K. Morimoto, H. Nakazawa, T. Kumagai, T. Saito, S. Aikawa // Rinsho Ketsueki. – 1998. – No. 39. – P. 665–669.
211. Kemenade B.M.L.V. Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*) / B.M.L.V. Kemenade, A. Groeneveld, B.T.T.M. Rens, J.H.W.M. Rombout // J Exp Biol. – 1994. – No. 187. – P. 143-158.
212. Kila J. Release of erythrocytes from the spleen during exercise and splenic constriction by adrenaline infusion in the rainbow trout / J. Kila, Y. Itazawa // Jap. J. Ichthyol. – 1989. – V. 36. – P. 48–52.

213. Kirschbaum A.A. Acta Scientiarum / A.A. Kirschbaum, R. Seriani, C.D.S. Pereira, A. Assunção, D. M. Abessa, S. Rotundo, M.M. Seriani // Biological Sciences Maringá. – 2011. – V. 33, No. 1. – P. 107-112.
214. Kobayashi I. *In vivo* characterization of primitive hematopoietic cells in clonal ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorfii*) / I. Kobayashi, H. Kusakabe, H. Toda // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2008. – V. 126, № 1–2. – P. 74–82.
215. Kobayashi I. Characterization and localization of side population [SP] cells in zebrafish kidney hematopoietic tissue / I. Kobayashi, K. Saito, T. Moritomo, K. Araki, F. Takizawa, T. Nakanishi // Blood. – 2008. – No. 111. – P. 1131-1137.
216. Kobayashi I. Isolation and characterization of hematopoietic stem cells in teleost fish / I. Kobayashi, F. Katakura, T. Moritomo // Dev Comp Immunol. – 2016. – No. 58. – P. 86-94.
217. Kobayashi I. Demonstration of hematopoietic stem cells in ginbuna carp (*Carassius auratus langsdorfii*) kidney. / I. Kobayashi, M. Sekiya, T. Moritomo // Dev. Comp. Immunol. – 2006. – V. 30, № 11. – P. 1034–1046.
218. Kohanestani Z.M. Seasonal variations in hematological parameters of *Alburnoides eichwaldii* in Zaringol Stream-Golestan Province, Iran / Z.M. Kohanestani, A. Hajimoradloo, R. Ghorbani, S. Yulghi, A. Hoseini, M. Molae // World J Fish Mar Sci. –2013. – No. 5. – P. 121-126.
219. Kondera E. Haematopoiesis in the head kidney of common carp (*Cyprinus carpio* L.): a morphological study // Fish Physiol Biochem. – 2011. – V. 37, № 3. – P. 355–362.
220. Kulkeaw K. Zebrafish erythropoiesis and the utility of fish as models of anemia / K. Kulkeaw, D. Sugiyama // Stem Cell Research & Therapy. – 2012. – Vol. 3. – P. 55-64.
221. Kulkeaw K. Cold exposure down-regulates zebrafish hematopoiesis / K. Kulkeaw, T. Ishitani, T. Kanemaru, S. Fucharoen, D. Sugiyama // Biochem Biophys Res Comm. – 2010. – No. 394. – P. 859-864.
222. Kumar S.P. Micronucleus assay: a sensitive indicator for aquatic pollution // International Journal of Research in BioSciences. – 2012. – Vol. 1 Iss. 2. – P. 32-37.

223. Lai J.C.C. Effects of moderate and substantial hypoxia on erythropoietin levels in rainbow trout kidney and spleen / J.C.C. Lai, I. Kakuta, H.O.L. Mok, J.L. Rummer, D. Randall // J. Exp. Biol. – 2006. – Vol. 209. – P. 2734-2738.
224. Lane H.C. Effect of hyperoxia on some factors influencing the oxygen-carrying capacity of trout blood / H.C. Lane, C.G. Schmidt, N.N. Duke // Amer. Zool. – 1992. – V.32. – P. 73A.
225. Lane H.C. Progressive changes in hematology and tissue water of sexually mature trout, *Salmo gairdneri* Richardson during the autumn and winter // J. Fish. Biol. – 1979. – No. 34[15]. – P. 425–36.
226. Laurent P. Morphology of gill epithelia in fish / P. Laurent, S. Dunel // Am. J. Physiol. – 1980. – Vol. 238, Iss. 3. – P. 147-159.
227. Lecklin T. Erythropoiesis in Arctic charr is not stimulated by anaemia / T. Lecklin, M. Nikinmaa // J. Fish Biol. – 1998. – Vol. 53. – P. 1169-1177.
228. Levin L. A. Oxygen minimum zone influence on the community structure of deep-sea benthos // Fish physiology, toxicology, and water quality: Proceedings of the 6th international symposium (La Paz). – 2002. – P. 121.
229. Liu Y. The development of the lymphoid organs of flounder, *Paralichthys olivaceus*, from hatching to 13 months / Y. Liu, S. Zhang, G. Jiang, D. Yang, J. Lian, Y. Yang // Fish Shellfish Immunol. – 2004. – No. 16. – P. 621–632.
230. Liu Y. Ontogeny of the lymphoid organs of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [Text] / Y. Liu, G. Jiang, S. Zhang // Journal of Ocean University. – 2004. – China. – № 2, V. 3. – P. 161-165.
231. Livingstone D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms // Marine Pollution Bulletin. – 2001. – Vol. 42, iss. 8. – P. 656–666.
232. Llorent M.T. Detections of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp / M.T. Llorent, A. Martos, A. Castano // Ecotoxicology. – 2002. – V. 11, № 1. – P. 27-34.

233. Lochmiller R.L. Hematological assessment of temperature and oxygen stress in a reservoir population of striped bass / R.L. Lochmiller, J.D. Weichman, A.V. Zale // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1989. – Vol. 93A. – P. 535-541.
234. Maiti M. Characterization of erythropoietic cells in *Oreochromis niloticus* (L.) and *Cirrhinus mrigala* [Ham.] / M. Maiti, S.K. Saha, S. Homechattdhuri, S. Banerjee // *J. Aquacult. Trop.* – 2000. – V. 15. – P. 81-90.
235. Mahajan C.L. An autoradiographic and cytochemical study of erythropoiesis in a fresh water fish, *Channa punctatus* Bloch / C.L. Mahajan, J.M.S. Dheer // *Journal of Fish Biology.* – 1980. – No. 17. – P. 641–648.
236. Mahoney J.B. Disease-associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson-Raritan Estuary / J.B. Mahoney, J.K. McNulty // *Trans. Am. Fish. Soc.* – 1992. – Vol. 121. – P. 261-268.
237. Marinsky C.A. Effect of hypoxia on hemoglobin isomorph abundance in rainbow trout, *Salmo gairdneri* / C.A. Marinsky, A.H. Houston, A. Murad // *Can J. Zool.* – 1990. – Vol. 68. – P. 884-888.
238. Maslova M.N. Dynamics of seasonal changes in the red blood system of the lower vertebrates: seasonal dynamics of erythropoiesis in the trout *Salmo gairdneri* / M.N. Maslova, T.V. Tavrovskaya // *Zhurn evoliuts biokhim fiziol.* – 1991. – No. 27. – P. 796–798.
239. Maslova M.N. Seasonal dynamics in the state of the red blood system of several Black sea fish / M.N. Maslova, A.A. Soldatov, T.V. Tavrovskaya // *J. Evolutionary Biochem. Physiol.* – 1988. – Vol. 24, No 4. – P.398–402.
240. Meseguer J. Stromal cells, macrophages and lymphoid cells in the head-kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). An ultrastructural study / J. Meseguer, M.A. Esteban, B. Agulleiro // *Archives of Histology and Cytology.* – 1991. – No. 54. – P. 299–309.
241. Meseguer J. Reticulo-endothelial stroma of the head-kidney form the seawater teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): an ultrastructural and cytochemical study / J. Meseguer, A. Lopez-Ruiz, A. Garcia-Ayala // *Anatomical Record.* – 1995. – No. 241. – P. 303–309.

242. Meseguer J. Granulopoiesis in the head-kidney of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural study / J. Meseguer, M.A. Esteban, A. Garcia Ayala, A. Lopez Ruiz, B. Agulleiro // Arch Histol Cytol. – 1990. – No. 53. – P. 287–296.
243. Metcalfe C.D. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnows (*Umbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*) // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 1988. – No. 40. – P. 489–495.
244. Middelburg J. J. Coastal hypoxia and sediment biogeochemistry / J. J. Middelburg, L.A. Levin // Biogeosciences Discuss. – 2009. – Vol. 6, no. 2. – P. 3655–3706.
245. Mitchelmore C.L. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring / C.L. Mitchelmore, J.K. Chipman // Mutation Research. – 1998. – V. 399, No. 2. –P. 135-147.
246. Mohammad M.G. Anatomy and cytology of the thymus in juvenile Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri* / M.G. Mohammad, S. Chilmonczyk, D. Birch, S. Aladaileh, D. Raftos, J. Joss // Journal of Anatomy. – 2007. – Vol. 211. – P. 784–797.
247. Moritz K.M. Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis / K.M. Moritz, G.B. Lim, E.M. Wintour // Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 1997. – Vol. 273, No.6. – P. 1829-1844.
248. Moritomo T. Cell culture of clonal ginbuna crucian carp hematopoietic cells: differentiation of cultured cells into erythrocytes in vivo. / T. Moritomo, N. Asakura, M. Sekiya // Dev. Comp. Immunol. – 2004. – V. 28. № 9. – P. 863–869.
249. Muiswinkel W. B. Structural and functional aspects of the spleen in bony fish / W. B. van Muiswinkel, C.H.J. Lamers, J.H.W.M. Rombait // Res Immunol. – 1991. – V. 142. – P. 962–966.
250. Murad A. Division of goldfish erythrocytes in circulation / A. Murad, S. Everill, A.H. Houston // Can. J. Zool. – 1993. – V. 71. – P. 2190-2198.
251. Murad A. Haematological response to reduced oxygen-carrying capacity, increased temperature and hypoxia in goldfish / A. Murad, A.H. Houston, L. Samson // J. Fish Biol. – 1990. – Vol. 36, No 3. – P. 289-305.
252. Nasci C. Clam transplantation and stress-related biomarkers as useful tools for assessing water quality in coastal environments / C. Nasci, L. Da Ros, G. Campesan,

- E.S. Van Vleet, M. Salizzato, L. Sperti // *Marine Pollution Bulletin*. – 1999. – Vol. 39, iss. 1-12. – P. 255–260.
253. Nikinmaa M. Blood oxygen transport of hypoxic *Salmo gairdneri* / M. Nikinmaa, A. Soivio // *The journal of experimental zoology*. – 1982. – V. 21, I. 91. – P. 173-178.
254. Nikinmaa M. The effect of adrenaline on the oxygen transport properties of *Salmo gairdneri* blood. *Comp. Biochem. Physiol.* – 1982. – Vol. 71A, No 2. – P. 353-356.
255. Nikinmaa M. Red cell function of carp (*Cyprinus carpio*) in acute hypoxia / M. Nikinmaa, J.J. Cech, L. Ryhaenen, A. Salama // *J. Exp. Biol.* – 1987. – Vol. 47, no 1. – P. 53-58.
256. Nikinmaa M. Control of red cell pH in teleost fishes // *Ann. Zool. Fenn.* – 1986. – Vol. 23, no 2. – P. 223-235.
257. Nilsson S. Fish physiology: recent advances // Dordrecht. Springer. – 2012. – 198 p.
258. Nunez R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry // *Cur Iss Mol Biol.* – 2001. – No. 3. – P. 67-70.
259. Obiakor M.O. Eco-genotoxicology: Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as *In situ* Aquatic Pollution Biomarker: a Review / M.O. Obiakor, J.C. Okonkwo, P.C. Nnabude, C.D. Ezeonyejaku // *J Anim Sci Adv.* – 2012. – No. 2(1). – P. 123-133.
260. Ochiai A. Change of blood properties of maturing japan eel at hormonal influences / A. Ochiai, M. Ogawa, S. Umeda, N. Taniguchi // *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* – 1975. – Vol. 41, No 6. – P. 609-614.
261. Oehlmann J. Molluscs as bioindicators / J. Oehlmann, U. Schulte-Oehlmann // *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*. – 2003. – No. 6. – P. 577-635.
262. Pala E.M. Microscopy and Microanalysis of Blood in a Snake Head Fish, *Channa gachua* Exposed to Environmental Pollution / E. M. Pala, S. Dey // *Microscopy and microanalysis*. – 2016. – No. 22. – P. 39-47.
263. Pallavi S. Evidence of micronuclei in fish blood as a biomarker of genotoxicity due to surface run off agricultural fungicide (Propiconazole) / Pallavi S., Ajay S. // *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*. – 2015. – Vol. 7(1). – P. 4-8.
264. Pellegrini M. Structure/Function relationship in the hemoglobin components from moray (*Muraena Helena*). *Eur.* / M. Pellegrini, B. Giardina, A. Olianus, M.T. Sanna,

- A.M. Deiana, S. Salvadori, G. Di Prisco, M. Tamburrini, M. Corda // *J. Biochem.* – 1995. – Vol. 234. – P. 431-436.
265. Peng Ji. Formation of mammalian erythrocytes: chromatin condensation and enucleation / Ji. Peng, M. Murata-Hori, H.F. Lodish // *Trends in Cell Biology.* – 2011. – Vol. 21, No. 7. – P. 409–415.
266. Pickering A.D. Changes in blood cell composition of the brown trout, *Salmo trutta* L., during the spawning season // *J Fish Biol.* – 1986. – No. 29. – P. 335–347.
267. Pottinger T.G. Androgen levels and erythrocytosis in maturing brown trout, *Salmo trutta* L. / T.G. Pottinger, A.D. Pickering // *Fish Physiol. Biochem.* – 1987. – Vol. 3. – P. 121-126.
268. Press C.M. The morphology of the immune system in teleost fish / C.M. Press, L.O. Evensen // *Fish and Shellfish Immunology.* – 1999. – № 9. – P.309-318.
269. Prisco G. Physiological and biochemical adaptations in fish to a cold marine environment // *Antarc. Commun.: Species, Struct. Surviv. Battaglia.* – Cambridge Univ. Press [UK]. – 1997. – P. 251-260.
270. Quentel C. The cellular composition of the blood and haematopoietic organs of turbot *Scophthalmus maximus* L. / C. Quentel, A. Obach // *J Fish Biol.* – 1992. – No. 41. – P. 709-716.
271. Ram-Bhaskar B. Influence of environmental variables on hematology, and compendium of normal hematological ranges of milkfish, *Chanos chanos* (Forsk.) in brackish culture / B. Ram-Bhaskar, K. Srinivasa-Rao // *Aquaculture.* – 1989. – No. 83. – P. 123–136.
272. Ranzani-Paiva M.J.T. Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, São Paulo, Brazil // *Genetics and Molecular Biology.* – 2009. – V. 32, N. 1. – P. 151-154.
273. Robier C. Dacryocytes are a common morphologic feature of autoimmune and microangiopathic haemolytic anaemia / C. Robier, D. Klescher, G. Reicht, O. Amouzadeh-Ghadikolai, F. Quehenberger, M. Neubauer // *Clin Chem Lab Med.* – 2015. – No. 53[7]. – P. 1073–1076.

274. Rodriguez F.A. Basic hematology of *Oncorhynchus mykiss* (Salmonidae), in Cundinamarca, Colombia // *Rev. Biol. Trop.* – 1995. – V. 43. – P. 283–288.
275. Romano N. Histological observations on lymphoid organs of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* (Teleostei: Nototheniidae) / N. Romano, M.R. Baldassini, F.R. Terribili, L. Abelli, L. Mastrolia, M. Mazzini // *Polar Biology.* – 1997a. – Vol. 18. – P. 358–362.
276. Romano N. Cytology of lymphomyeloid head kidney of Antarctic fishes *Trematomus bernacchii* (Nototheniidae) and *Chionodraco hamatus* (Channichthyidae) / N. Romano, S. Ceccariglia, L. Mastrolia, M. Mazzini // *Tissue Cell.* – 2002. – No. 34. – P. 63–72.
277. Romano N. Leucocyte subpopulations in developing carp (*Cyprinus carpio* L.): immunocytochemical studies / N. Romano, J.J. Taverne-Thiele, J.C. van Maanen, J.H.M.W. Rombout // *Fish and Shellfish Immunology.* – 1997b. – Vol. 7. – P. 439–453.
278. Rombout J.H.W.M. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes / J.H.W.M. Rombout, H.B.T. Huttenhuis, S. Picchiatti, G. Scapigliati // *Fish Shellfish Immunol.* – 2005. – No. 19. – P. 441-455.
279. Rosefort C. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay / C. Rosefort, E. Fauth, H. Zankl // *Mutagenesis.* – 2004. – Vol. 19, N 4. – P. 277-284.
280. Rothman C. Spectral imaging of red blood cells in experimental anemia of *Cyprinus carpio* / C. Rothman, T. Levinshal, B. Timan, R. R. Avtalion, Z. Malik // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2000. – V. 125A. – P. 75-83.
281. Rudneva I.I. Bioindication of the environmental state of marine areas with the use of fish biomarkers / I.I. Rudneva, E.N. Skuratovskaya, I.I. Dorokhova, Yu.A. Grab, I.N. Zalevskaya, S.O. Omel'chenko // *Water Resources.* – 2011 – Vol. 38, № 1 – P. 107–112.
282. Sailendri K. Morphology of lymphoid organs in a cichlid teleost, *Tilapia mossambica* (Peters) / K. Sailendri, V.R. Muthukkaruppan // *Journal of Morphology.* – 1975. – Vol. 147. – P. 109–122.

283. Sala-Rabanal M. Effects of low temperatures and fasting on hematology and plasma composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) / M. Sala-Rabanal, J. Sánchez, A. Ibarz, J. Fernández-Borràs, J. Blasco, M.A. Gallardo // *Fish Physiol Biochem.* – 2003. – No. 29. – P. 105-115.
284. Santos A.A. Morphocytochemical, immunohistochemical and ultrastructural characterization of the head kidney of fat snook *Centropomus parallelus* / A.A. Santos, R.C. Gutierrez, M.M. Antoniazzi, M.J.T.-Paiva Ranzani, M.R.R. Silva, C.T.F. Oshima, M.I. Egami // *Journal of Fish Biology.* – 2011. – Vol. 79. – P. 1685–1707.
285. Schwerte T. Non-invasive imaging of blood cell concentration and blood distribution in zebrafish *Danio rerio* incubated in hypoxic conditions *in vivo* / T. Schwerte, D. Überbacher, B. Pelster // *The Journal of Experimental Biology.* – 2003. – No. 206. – P. 1299-1307.
286. Serpunin G.G. Use of the ichthyohaematological studies in ecological monitoring of the reservoirs / G.G. Serpunin, O.A. Likhatchyova // *Acta Vet. Brno.* – 1998. – Vol. 67. – P. 339-345.
287. Silkin Yu.A. Effect of Hypoxia on Physiological and Biochemical Blood Parameters in Some Marine Fish / Yu.A. Silkin, E.N. Silkina // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* – 2005. – Vol. 41, No. 5. – P. 527-532.
288. Smit G.L. The effect of hypoxia on haemoglobins and ATP levels in three freshwater fish species / G.L. Smit, J. Hattingh // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology.* – 1981. – V. 68, I. 3. – P. 519-521.
289. Smith A.M. Plasmacytogenesis in the pronephros of the carp (*Cyprinus carpio* L.) / A.M. Smith, N.A. Wivel, M. Potter // *Anatomical Record.* – 1970. – No. 167, – P. 351-370.
290. Soldatov A.A. Localization and proliferative activity of erythropoietic tissue in ontogenesis of the Golden mullet *Liza aurata* R. // *J Evol Bioch Physiol.* – 1994. – V. 30, No. 4. – P. 347-351.
291. Soldatov A.A. The effect of hypoxia on red blood cells of flounder: a morphologic and autoradiographic study // *J. Fish Biol.* – 1996. – V. 48. – P. 321-328.

292. Soldatov A.A. Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system. // J. Evol. Biochem. Physiol. – 2005. – Vol. 41. – P.272–281.
293. Soldatov A.A. Physiological Aspects of Effects of Urethane Anesthesia on the Organism of Marine Fishes // Hydrobiol. J. – 2005. –V. 41, No 1. – P. 113-126.
294. Soldatov A.A. Organ blood flow and vessels of microcirculatory bed in fish [review] // J. Evolut. Biochem. Physiol. – 2006. – Vol. 42, No 3. – P.243-252.
295. Soldatov A.A. The Functional Morphology of Erythrocytes of the Black Scorpion Fish *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) (Scorpaeniformes: Scorpaenidae) during Hypoxia. / A.A. Soldatov, T.A. Kukhareva, A.Yu. Andreeva, I.A. Parfenova, V.N. Rychkova, D.S. Zin'kova // *Russian Journal of Marine Biology*. – 2017. – Vol. 43, no. 5. – P. 368-373.
296. Soitamo A.J. Characterization of a Hypoxia-inducible Factor (HIF-1) from Rainbow Trout: Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension / A.J. Soitamo, C.M.I. Raabergh, M. Gassmann, L. Sistonen, M. Nikinmaa // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, No 23. – P. 19699-19705.
297. Sordyl H. Erythropoiesis in the head kidney of rainbow trout / H. Sordyl, A. Osterland // *Fischerei-Forschung*. – 1991. – V 29. – P. 61–63.
298. Spadacci Morena D.D. Ultrastructure of maturing fish (*Oreochromis Mozambiqueus*) and snake (*Waglerophis Merremii*) erythroid cells with regard to hemoglobin biosynthesis / D.D. Spadacci Morena, E.R. Matushima, P. Morena, A.M. Cianciarullo and A. J.R. Brunpr // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1991. – Vol. IOOA. – No. 4. – P. 945-955.
299. Spangrude G.J. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells / G.J. Spangrude, S. Heimfeld, I.L. Weissman // *Science*. – 1988. – No. 241. – P. 58–62.
300. Stohlman F. Regulation of erythropoiesis. XX. Kinetics of red cell production / F. Stohlman, S. Ebbe, B. Morse // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1968. – No. 149. – P. 156-172.
301. Strunjak-Perovic, N. Nuclear abnormalities of marine fish erythrocytes / N. Strunjak-Perovic, R. Topic Popovic, Coz-Rakovac, M. Jadan // *Journal of Fish Biology*. – 2009. – No. 74. – P. 2239-2249.

302. Strunjak-Perovic I. Seasonality of nuclear abnormalities in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) erythrocytes / I. Strunjak-Perovic, R. Coz-Rakovak, N. Topic Popovik, M. Jadan // Fish Physiol. Biochem. – 2009. – No. 35. – P. 287-296.
303. Taiwo F.A. Hemoglobin of the lungfish *Clarias lazera*: isolation and oxygen equilibrium studies // Comp. Biochem. Physiol. – 1995. – Vol. 110A. – P. 147-150.
304. Tatner M.F. The ontogenetic development of the reticuloendothelial system in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson / M.F. Tatner, M.J. Manning // Journal of Fish Diseases. – 1985. – No. 8. – P. 35–41.
305. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management / Am J Hematol. – 2013. – No. 88. – P. 141–150.
306. Tiihonen K. Short communication: Substrate utilization by carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes / K. Tiihonen, M. Nikinmaa // J Exp Biol. – 1991. – V. 161. – P. 509-514.
307. Toda H. Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes in a teleost fish / Toda H, Saito Y, Koike T, Takizawa F, Araki K, Yabu T, Moritomo T. // Dev Comp Immunol. – 2011. – No. 35. – P. 650-660.
308. Tort L. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses / L. Tort, J.C. Balasch, S. Mackenzie // Inmunología. – 2003. – No. 22. – P. 277-286.
309. Travares-Dias M. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. – J. Fish Biol. – 2006. – No. 68. – P. 1822–1833.
310. Tsioros K.K. Distribution of iron during embryogenesis and early larval life in sea lampreys / K.K. Tsioros, J.H. Youson // Can. J. Zool. Rev. Can. Zool. –1997. – V. 75. – P. 137-147.
311. Tsvilikhovskiy M.I. Blood Indexes of animals under Pathology. – Methodological Juidelines for «Clinical Diagnosis of Animal Diseases» / M.I. Tsvilikhovskiy, Yakymchuk, T.I. Levischenko // Classes for the students of Veterinary Medicine specialty in Master's educational qualification level (8.130501) / K., Publ. centr of NUBiP. – 2010. – P. 29-38.
312. Valenzuela A. Effect of acute hypoxia in trout (*Oncorhynchus mykiss*) on immature erythrocyte release and production of oxidative radicals / A. Valenzuela, V. Silva, E.

- Tarifeno, A. Klempau // *Fish Physiology and Biochemistry*. – 2005. – No. 31. – P. 65–72.
313. Valenzuela A.E. Some changes in the hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to three artificial photoperiod regimes / A.E. Valenzuela, V.M. Silva, A.E. Klempau // *Fish Physiol Biochem*. – 2007. – No. 33. – P. 35–48.
314. Van der Oost R.V. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review / R.V. Van der Oost, J., Beyer, N.P.E. Vermeulen // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 13. – P. 57–149.
315. Vera C. Mapping the tropomyosin isoform 5 binding site on human erythrocyte tropomodulin: further insights into E-Tmod/TM5 interaction / C. Vera, J. Lao, D. Hamelberg, L.A. Sung // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2005. – Vol. 444, No 2. – P. 130–138.
316. Verde C. Erythropoiesis in fishes / C. Verde, D. Giordano, G. di Prisco // *On-Line Encyclopaedia of Fish Physiology, from Genome to Environment*. – 2011. – No. 2. – P. 992-997.
317. Voitovich A.M. The level of aberrant cells in various tissues of bank vole depending on doses and radionuclide balance in organism / A.M. Voitovich, V.Y. Afonin, E.V. Krupnova, V.D. Trusova, E.S. Dromashko // *Tsitol. Genet.* – 2003. – Vol. 37, No 4. – P.10-15.
318. Vosyliene M.Z. The effect of heavy metals on hemalogical indices of fish (survey). – *Acta Zool. Lituanica*. – 1999. – No. 9. – P. 76-85.
319. Wael A.O. Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats / A.O. Wael, K.H. Zaghoul, A.A. Abdel-Khalek, S. Abo-Hegab // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2012. – No. 746 (1). – P. 7-14.
320. Wells R.W.G. The spleen in hypoxic and exercised rainbow trout / R.W.G. Wells, R.E. Weber // *J. Exp. Biol.* – 1990. – V. 150. – P. 461–466.

321. Wickramasinghe S.N. Erythropoietin and the human kidney: evidence for an evolutionary link from studies of *Salmo gairdneri* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1993. – Vol. 104A. – P. 63-65.
322. Witeska M. The effect of toxic chemicals on blood cell morphology in fish // *Fresenius Environmental Bulletin.* – 2004. – 12a. – P. 11-21.
323. Witeska M. Erythrocytes in teleost fishes: a review // *Zool and Ecol.* – 2013. – V. 23. №4. – P. 275–281.
324. Witeska M. The effects of cadmium on Common Carp erythrocyte morphology / M. Witeska, E. Kondera, K. Szczgielska // *Polish J. of Environment Stud.* – Vol. 20, No. 3. – 2011. – P. 783-788.
325. Witeska M. Hematological changes in common carp [*Cyprinus carpio* L.] after a short-term lead (Pb) exposure / M. Witeska, E. Kondera, M. Szymanska, M. Ostrysz // *Polish Journal of Environmental Studies.* – 2010. – No. 19. – P. 825.
326. Witeska M. Respiratory and hematological response of tench *Tinca tinca* [L.] to a short-term cadmium exposure / M. Witeska, B. Jezierska, J. Wolnicki // *Aquacult. Int.* – 2006. – No. 14. – P. 141.
327. Wong P. A hypothesis on the role of the electrical charge of haemoglobin in regulating the erythrocyte shape // *Med. Hypotheses.* – 2004. – Vol. 62, No 1. – P. 124-129.
328. Yuan Sh. Micro and ultrastructure of peripheral blood cells of the mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky) / Y. Yuan Sh., Yao W. Zhang, P. Nie // *Acta Hydrobiol. Sin.* – 1998. – V. 22. – P.39-47.
329. Zapata A.G. Ultrastructural study of the teleost fish kidney // *Dev. Comp. Immunol.* – 1979. – P. 55-65.
330. Zapata A. Phylogeny of the fish immune system // *Bulletin de l'Institut Pasteur.* – 1983. – Vol. 81. – P. 165-186.
331. Zapata A. Ultrastructure of Elasmobranch and Teleost Erythrocytes / A. Zapata, A. Carrato // *Acta Zoologica.* – 1981. – Vol. 62, No. 2. – P. 129-135.
332. Zapata A. Lymphoid organs or teleost fish. II Ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio* [Text] / A. Zapata // *Developmental and Comparative Immunology.* – 1981. – V. 5. – P. 685-690.

333. Zeni C. Occurrence of echinocytosis in circulating RBC of black bullhead, *Ictalurus melas* (Rafinesque), following exposure to an anionic detergent at sublethal concentrations / C. Zeni, M.R. Bovolenta, A. Stagni // *Aquat. Toxicol.* – 2002. – No. 57. – P. 217.
334. Zhu C.D. Strategies for hypoxia adaptation in fish species: a review / C.D. Zhu, Z.H. Wang, B. Yan // *J Comp Physiol B.* – 2013. – No. 183(8). – 1005–1013.
335. Zuasti A. Haemopoiesis in the head kidney of *Sparus auratus* / A. Zuasti, C. Ferrer // *Arch. Histol. Cytol.* – 1989. – V. 52. – P. 249–255.