

На правах рукописи

КУХАРЕВА Татьяна Александровна

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

03.02.10 – *гидробиология*

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Севастополь-2019

Работа выполнена в отделе физиологии животных и биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О.Ковалевского РАН», г. Севастополь

Научный руководитель:

Солдатов Александр Александрович – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, руководитель отдела физиологии животных и биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О.Ковалевского РАН», г. Севастополь.

Официальные оппоненты:

Минеев Александр Константинович – доктор биологических наук, старший научный сотрудник Института экологии Волжского бассейна РАН – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Самарский федеральный исследовательский центр РАН», г. Тольятти.

Флёрова Екатерина Александровна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заместитель директора по научной работе, доцент Ярославского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии имени В.Р.Вильямса», п. Михайловский, Ярославская обл.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии внутренних вод имени И.Д.Папанина РАН», п. Борок, Ярославская обл.

Защита состоится «__» _____ 20__ г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д900.009.01 при ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О.Ковалевского РАН», по адресу: 299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2. email: dissovet@imbr-ras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О.Ковалевского РАН», по адресу: 299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2, или на сайте: <http://imbr-ras.ru/?p=5249>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук

Поспелова Наталья Валериевна

Общая характеристика работы

Актуальность и степень разработанности темы 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 подвержена прямому действию факторов водной среды. В настоящей работе исследуется состояние эритрона у донных рыб, включающего пролиферативный, созревающий и функциональный пул клеток красной крови (Липунова, Скоркина, 2004). 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 (Soldatov, 2005; Kondera, 2011; Witeska, 2013), другие отдают приоритет селезенке (Alford et al., 1993; Galindez, Aggio, 1995). По анализу клеточного состава эритроидных элементов циркулирующей крови отмечена определенная моноцикличность в функционировании эритрона у морских рыб, которая приурочена к нерестовому периоду (Маслова, Тавровская, 1991; Soldatov, 2005). При этом состояние эритроидного ростка гемопоэза на уровне кроветворной ткани не изучено.

Особое внимание следует обратить на влияние естественных абиотических факторов среды на состояние эритрона. 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 (Куликова, 1986; Шекк, 1990). При этом в тканях происходит усиление анаэробных процессов на фоне снижения содержания аденилатов и энергетического заряда (Арсан, 1986; Гулевский и др., 2007). 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 эритрон костистых рыб, напротив, хорошо изучено. Показано, что данный фактор индуцирует выработку эритропоэтинов в почках (Lai et al., 2006), что, в свою очередь, усиливает

процессы пролиферации в эритроидном ростке гемопоэза и, в конечном итоге, приводит к росту циркулирующей эритроцитарной массы (Moritz, 1997; Soldatov, 2005). 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. (Witeska et al., 2011; Pala, Dey, 2016; Farag, 2018). Некоторые аномалии проявляются при действии конкретных токсических и биологических агентов: тяжелых металлов, вирусных инвазий, анемичных состояний (Житенева и др., 2012; Tefferi, 2013; Robier, 2015). В настоящей работе предлагается использовать эти показатели для целей экодиагностики.

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 гемомезических 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.

Положения, выносимые на защиту.

1. Гемопозитические 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 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 «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) «Pontus Euxinus 2015», (г. Севастополь, 17-20 ноября 2015 г.); III Всероссийская конференция с международным участием «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 «Pontus Euxinus 2017» (г. Севастополь, 11-16 сентября 2017 г.); XXIII съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова. (г. Воронеж, 18-22 сентября 2017 г.); V научно-практическая молодежная конференция «Эко-биологические 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 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, подготовке рукописи диссертации и статей соответствующей тематики.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликована 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Эритрограмма крови и гемопоэтических органов рыб и ее использование в целях экодиагностики (обзор литературы). В настоящей главе дается краткая описание особенностей биологии ряда представителей донной ихтиофауны Черного моря. Рассматриваются вопросы, связанные с

локализацией очагов гемопоэза, приводятся морфологические и морфометрические характеристики клеток эритроидного ряда. Особое внимание уделяется содержанию аномальных эритроидных форм и возможности их использования для целей экодиагностики. Оценено влияние факторов естественной и антропогенной природы на состояние системы красной крови костистых рыб.

Материал и методы исследований. 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).

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 особь. В аквариумах поддерживался естественный проток. Фотопериод: 12 часов день – 12 часов ночь. В данных условиях рыбу выдерживали в течение одной недели с целью снятия стресса, вызванного отловом и транспортировкой. Особей кормили фаршем из малоценных видов рыб. Суточный пищевой рацион составлял 6-7 % от массы тела. В работе использовали подвижных активно питающихся рыб.

Влияние температуры. Работа выполнена на особях бычка-кругляка. Контрольная группа рыб содержалась при температуре 19-20°C. Экспериментальные группы – при 1-2°C и 14-16°C. Изменение температуры воды в аквариумах осуществляли со скоростью 1-2°C 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°C. 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. В работе применяли оксиметр ELWRO PRL T N 5221 (Poland).

В обеих экспериментальных сериях перед изъятием рыб из аквариума применяли уретановую анестезию (Soldatov, 2005). Экспериментальная часть работы выполнена с применением специально разработанного экспериментального стенда, который позволяет поддерживать требуемую концентрацию кислорода в воде и температуру в течение неограниченного периода времени.

Гематологические исследования. Кровь получали пункцией хвостовой артерии. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (“Рихтер”, Венгрия).

Концентрацию гемоглобина в крови контролировали при помощи гемиглобинцианидного метода. Число эритроцитов в крови подсчитывали в камере Горяева. Гематокрит определяли путем центрифугирования образцов крови в гепаринизированных капиллярах (750 g; 15 минут). На основании полученных значений рассчитывали эритроцитарные индексы: среднеклеточный объем (*MCV*), среднеклеточное содержание (*MCH*) и среднеклеточную концентрацию гемоглобина (*MCHC*) (Золотницкая, 1987).

Образцы кроветворных органов: головной почки (про- и мезонефрос) и селезенки, подвергались механическому измельчению в среде, содержащей: 128 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1,5 mM MgCl₂, 15 mM HEPES, 2,2 mM D-глюкозы (pH 7,8) (Tiihonen, Nikinmaa, 1991). 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. Мазки окрашивали по комбинированному методу Паппенгейма (Май-Грюнвальд + Романовский-Гимза) (Золотницкая, 1987). 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».

Линейные размеры клеток крови определяли по фотографиям в компьютерной программе ImageJ 1.44p (Girish, Vijayalakshmi, 2004). Измеряли большую и малую оси клетки (C_1 и C_2) и их ядер (N_1 и N_2). Объем выборочной совокупности – 100 клеток на мазок. На основании определенных значений рассчитывали ряд метрических характеристик: объем клетки (V_c) (Houchin, 1958;), объем ядра (V_n) (Ташкэ, 1980), площадь поверхности клетки (S_c) (Houchin, 1958; Ташкэ, 1980), на основании значений V_c и V_n определяли величину ядерно-плазматического отношения (NCR), значения S_c и V_c позволяли также рассчитать удельную поверхность эритроцитов (SS_c).

Осмотическую резистентность клеток красной крови оценивали по микроскопическому методу Яновского (Золотницкая, 1987).

Другие показатели. Содержание лактата в плазме крови определяли ферментативным методом по количеству образовавшегося $\text{НАД}\cdot\text{H}_2$ в результате дегидрирования молекул молочной кислоты с участием лактатдегидрогеназы в присутствии НАД (Камышников, 2004).

Статистический анализ. 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.

Результаты исследований и их обсуждение

Клеточный состав кроветворных органов, созревание и дифференцировка форм эритроидного ряда.

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: мелкие клетки (диаметр 4-7 мкм), средние клетки (диаметр 8-9 мкм) и крупные клетки (диаметр более 10 мкм) (Рисунок 1).

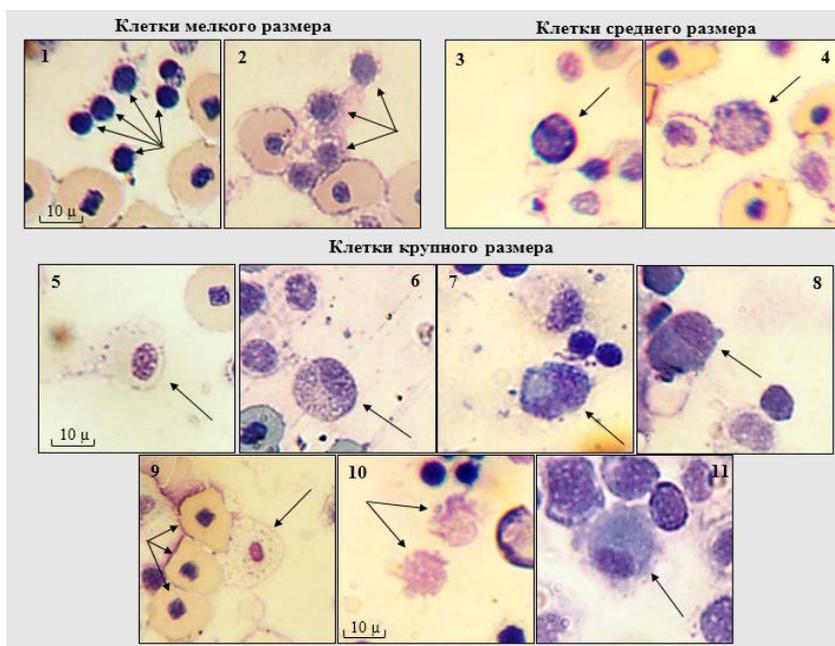


Рисунок 1 – Клеточный состав головной почки и селезенки морского ерша
 1 – КОЕ (или малые лимфоциты и тромбоциты); 2 – большие лимфоциты; 3 – эритробласт; 4 – миелобласт; 5 – незрелый нейтрофил; 6 – незрелый эозинофил; 7 – незрелый базофил; 8 – незрелый моноцит; 9 – зрелые эритроциты (слева) и макрофаг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

Кластер мелких клеток имел темно-фиолетовое ядро со значительной долей гетерохроматина, а также узким ободком цитоплазмы светло-базофильных оттенков. 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) (Spangrude et al., 1988). По-видимому, в данном случае часть подобных форменных элементов принадлежала именно к классу КОЕ.

Средний кластер был представлен бластными клетками крови всех ростков гемопоэза. Ввиду схожести морфологических признаков у всех бластных форм при использовании методов световой микроскопии, нами было выделено 2 типа данных 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.

В кластер крупных клеток входили все типы гранулоцитов, зрелые эритроциты, моноциты, макрофаги и плазматические клетки, находящихся на различных этапах дифференцировки.

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, что позволяет рассматривать данный орган, как место, где протекают процессы эритродиереза. Вместе с тем, 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.

Показано, что активный эритропоэз у донных рыб был приурочен к нерестовому и постнерестовому периоду. Размеры очага эритробластов в гемопоэтической ткани в этот момент были максимальны, в крови повышалось число эритроцитов с микроядерными включениями.

Определенные закономерности были выявлены и на уровне созревающего пула клеток крови (БН→ПН→нормоцит). В настоящей работе впервые предложено использовать ряд алгоритмов для оценки морфометрических характеристик эритроцитов рыб. Это позволило показать, что приобретение клетками эллипсоидной формы на стадии: ПН → нормоциты, увеличивает их удельную поверхность (SS_c) почти на 20 % и

обеспечивает рост общей поверхности (S_c) почти на 40 %, что важно в последующем для выполнения газотранспортной функции (Рисунок 2)

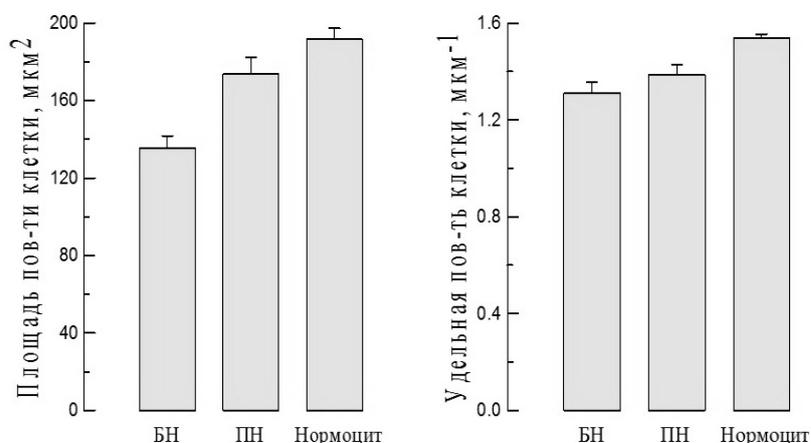


Рисунок 2 – Площадь поверхности (S_c), удельная поверхность (SS_c) эритроидных элементов в процессе созревания (БН – базофильные нормобласты; ПН – полихроматофильные нормобласты)

Эритроциты циркулирующей крови морского ерша в условиях острой экспериментальной гипоксии. 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 3). При более глубокой гипоксии (15% насыщения) концентрация гемоглобина и число эритроцитов в крови ерша понижались соответственно на 17,6% и 12,8% ($p \leq 0,05$).

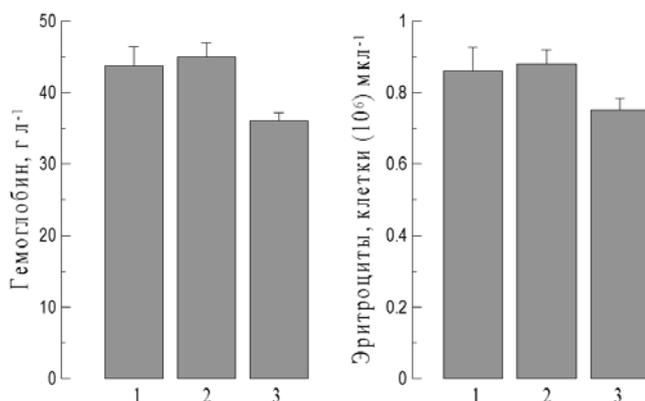


Рисунок 3 – Концентрация гемоглобина и число эритроцитов в крови морского ерша при различном насыщении воды кислородом (1 – нормоксия; 2 – 30% насыщение; 3 – 15% насыщение)

При данных условиях наблюдали также увеличение объема циркулирующих эритроцитов. При 15% насыщении он составил $270,4 \pm 1,7$ мкм^3 , что на 4,1% ($p \leq 0,01$) выше контрольных значений ($259,7 \pm 1,3$ мкм^3). При 30% насыщении воды кислородом эритроциты, напротив, уменьшались в объеме на 4,0% ($p < 0,01$) ($249,1 \pm 1,5$ мкм^3). Отмеченные выше изменения происходили на фоне роста осмотической стойкости эритроцитов при 15% насыщении воды кислородом, что допускает лизис части клеток.

Анализ содержания незрелых эритроидных форм 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). Это в большей степени затрагивало мало дифференцированные эритроидные формы: БН, чем ПН. Индекс БН/ПН уменьшался на 26%. При более высоком насыщении воды кислородом (30%) этого не наблюдали.

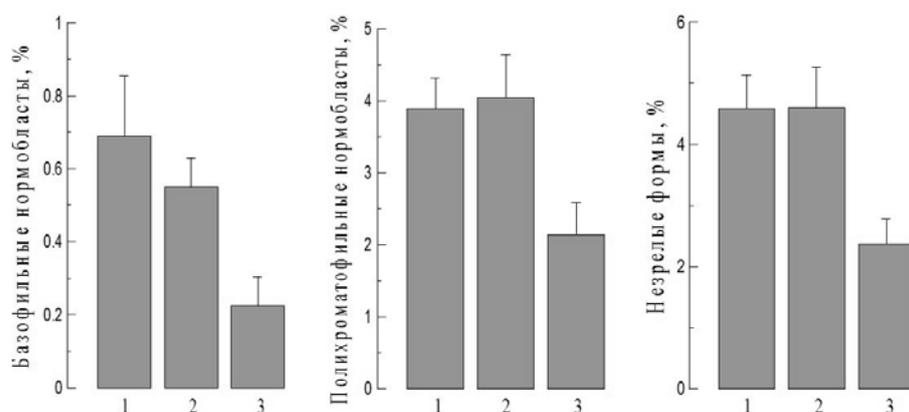


Рисунок 4 – Содержание незрелых эритроидных форм в крови морского ерша при различном насыщении воды кислородом (1 – нормоксия; 2 – 30% насыщение; 3 – 15% насыщение)

Одновременно наблюдали понижение числа эритроцитарных аномалий в крови. Это происходило только при 15% насыщении кислородом воды. Единственной аномалией, содержание которой сохранялось в крови на уровне контрольных значений, являлись клетки со случаями инвагинации ядра.

Эритрограмма циркулирующей крови *Neogobius melanostomus* в условиях экспериментальной гипотермии. Гипотермия индуцировала процессы пролиферации в эритроидном ряду клеток. В периферической крови появлялись малодифференцированные формы (пронормобласты и ранние базофильные нормобласты), способные к активной пролиферации. Из результатов, представленных на рисунке 5, 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 14-16°C уже более 3 %, а при 1-2°C более 4 %. Фактически доля незрелых форм увеличивалась более чем в 2 раза ($p < 0,001$). Аналогичные изменения претерпевали популяции Про, БН и ПН.

Показательными являются значения индексов Про/БН и БН/ПН (рис. б). 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.

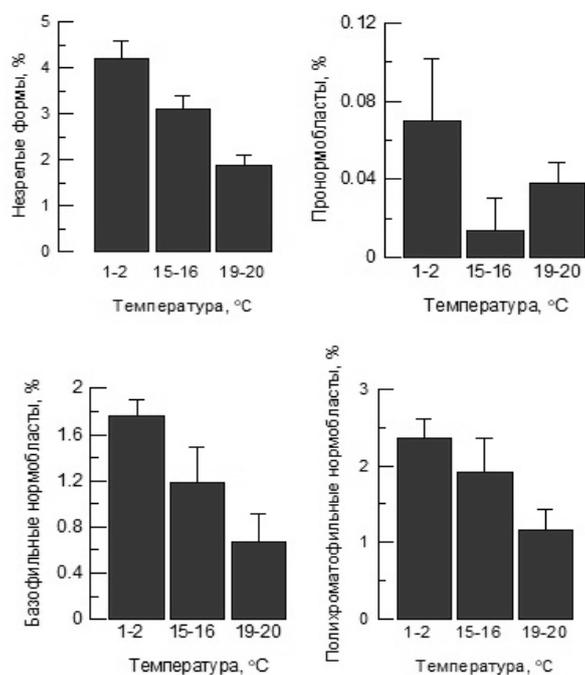


Рисунок 5 – Содержание незрелых эритроидных элементов в крови бычка-кругляка при адаптации к различным температурам

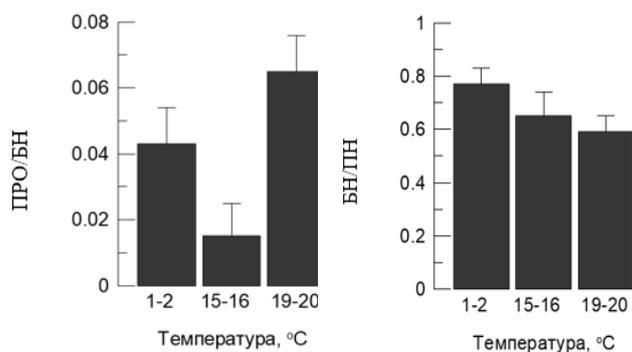


Рисунок 6 – Значение индексов Про/БН и БН/ПН у бычка-кругляка при адаптации к различным температурам

Основной причиной активизации процессов эритропоэза в кроветворной ткани особей бычка-кругляка следует считать развитие состояния гипоксии. В качестве критерия 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 14-16°C не вызывало заметного изменения значений данного показателя – $105,9 \pm 7,6(5)$ мг л⁻¹ крови. При адаптации же особей к 1-2°C, 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 ($p < 0,001$). Известно, что гипоксия является ключевым фактором индукции выработки эритропоэтина в почках костистых рыб (Wickramasinghe, 1993; Moritz et al., 1997; Chou et al., 2004; Soldatov, 2005), что объясняет описанную выше последовательность процессов.

Учет содержания аномальных эритроидных форм в крови рыб в целях экодиагностики. Представители семейства Gobiidae являются важнейшей составляющей ихтиокомплекса прибрежных акваторий Чёрного и Азовского морей. Gobiidae характеризуются значительным видовым разнообразием (Световидов, 1964; Атлас..., 2002). Согласно последней сводке на шельфе обоих морей встречаются 35–36 видов бычков (Болтачев, Карпова, 2017). Обитая в прибрежных водах, представители этого семейства испытывают 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 (Болтачев, Карпова, 2017). Это позволяет провести сравнительную оценку влияния фоновой токсической нагрузки на их организм на основе учета присутствия в крови эритроцитарных аномалий.

Исследование выполнено на трех видах черноморских бычков: двух массовых – мартовик *Mesogobius batrachocephalus* и кругляш *Gobius cobitis*, и одного редкого – травяник *Zosterisessor ophiocephalus*. Рыбу отлавливали одномоментно в Севастопольской бухте. Особенности транспортировки, содержания материала и проведения лабораторных исследований описаны выше.

Из рассмотренных результатов следует, что максимальное число эритроцитарных аномалий (микроядерные включения, дакрициты, эритроцитраные тени) при сходных условиях существования наблюдается в циркулирующей крови травяника (Рисунок 7). 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.

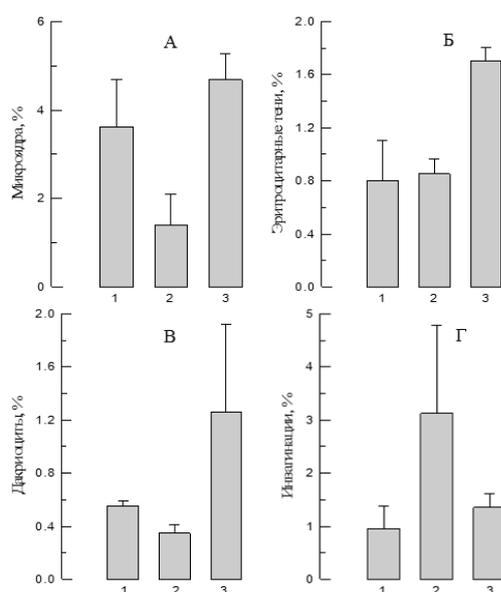


Рисунок 7 – Содержание аномальных эритроидных форм в крови бычков (А – клетки с микроядерными включениями; Б – эритроцитарные тени; В – дакриоциты; Г – клетки с ядерными инвагинациями; 1 – бычок-кругляш; 2 – бычок-мартовик; 3 – бычок-травяник)

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 (Световидов, 1964). Травяник, напротив, имеет ограниченное распространение (южный берег Крыма, северо-восток Сиваша), а с 1996 г. занесён в Красный список МСОП (Атлас..., 2002). 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.

Заключение

В заключении обобщается полученная в диссертационной работе информация. Акцентируется внимание на ряде выявленных эффектах. В частности, отмечается присутствие в головной почке донных рыб практически всех ростков гемопоэза: лимфо-миелоидного, эритроидного и монобластического. Впервые был описан мелкий кластер клеток по морфологическим признакам близкий к колониеобразующим единицам (КОЕ). Отмечено также, что в момент активной пролиферации в эритроидном ряду клеток в головной почке эта функция частично передается селезенке. Это позволило высказать предположение о том, что селезенка может выполнять функцию органа вторичного гемопоэза. Показано, что активный эритропоэз у донных рыб был приурочен к нерестовому и постнерестовому периоду. Размеры очага эритробластов в гемопоэтической ткани в этот момент были максимальны.

Использование ряда алгоритмов для оценки морфометрических характеристик эритроцитов показало, что приобретение клетками эллипсоидной формы на стадии: полихроматофильные нормобласты → нормоциты, увеличивает их удельную поверхность почти на 20 % и обеспечивает рост общей поверхности почти на 40 %, что важно в последующем для выполнения газотранспортной функции.

Впервые описано состояние системы красной крови у донных рыб в условиях краткосрочной (90 минут) острой гипоксии. Отмечено угнетение эритропоэтических процессов, 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 в последующем активизацию эритроидного ростка гемопоэза.

Впервые удалось показать, что гипотермия оказывает гипоксический эффект на организм рыб, индуцируя продукцию бластных эритроидных форм в гемопоэтической ткани, которые появляются даже в системе циркуляции.

Предложено использовать содержание аномальных эритроидных форм в крови донных рыб для целей экодиагностики 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. При этом клетки приобретают форму эллипса.
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 основных работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК РФ

1. **Kukhareva T.A.** Micronuclei inclusions in erythrocytes of round goby at various intensity of erythropoietic processes / A.A. Soldatov, E.V. Pashkova, **T.A. Kukhareva** // Hydrobiological Journal. - 2012. - Vol. 48, no. 4. - P. 81–85.
2. **Kukhareva T.A.** Erythropoiesis and the Contents of Abnormal Erythroid Forms in the Blood of Round Goby, *Neogobius melanostomus* Pallas 1811 (Osteichthyes, Gobiidae) / A.A. Soldatov, **T.A. Kukhareva** // Russian Journal of Marine Biology. – 2015. – Vol. 41, iss. 4. – P. 315–320.
3. **Kukhareva T.A.** Comparative Estimation of Circulating Blood Erythrograms of the Family Gobiidae Representatives from the Water Areas of Southwestern Crimea / A.A. Soldatov, **T.A. Kukhareva** // Journal of Ichthyology. – 2015. – Vol. 55, iss. 3. – P. 442–445.
4. **Kukhareva T.A.** Functional morphology of blood erythroid cells in *Neogobius melanostomus* P. during cell differentiation / **T.A. Kukhareva**, A.A. Soldatov // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2016. – Vol. 52, iss. 3. – P. 261–266.
5. **Kukhareva T.A.** Black scorpionfish (*Scorpaena porcus*) hemopoiesis. Analysis by flow cytometry and light microscopy / A.Y. Andreyeva, A.A. Soldatov, **T.A. Kukhareva** // The Anatomical Record (USA). – 2017. – Vol. 300, Iss. 11. – P. 1993–1999.
6. **Kukhareva T.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.
7. **Kukhareva T.A.** 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 (USA). – 2019. – Vol. 302, iss. 7. – P. 1136–1142.

8. **Кухарева Т.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.

Материалы и тезисы конференций

9. **Кухарева Т.А.** Интенсивность эритропоэза и содержание микроядер в эритроцитах бычка-кругляка в нерестовый период / Е.В. Пашкова, **Т.А. Кухарева**, А.А. Солдатов // Биосфера XXI века: материалы III Всеукр. конф. молодых ученых, аспирантов, магистрантов и студентов, Севастополь, 4-7 апр. 2011 г. СевНТУ. – Севастополь, 2011. – С. 98–99.
10. **Кухарева Т.А.** Аномалии эритроцитов донных рыб в оценке токсичности водной среды / **Т.А. Кухарева** // Современные проблемы физики, химии и биологии (ФизХимБио 2012): материалы I Междунар. науч.-техн. конф., 28-30 нояб., 2012 г., Севастополь, СевНТУ. – Севастополь, 2012. – С. 157–159.
11. **Кухарева Т.А.** Сравнительная оценка эритрограмм циркулирующей крови некоторых представителей семейства Gobiidae / **Т.А. Кухарева** // Биоразнообразие и устойчивость живых систем: Материалы XIII международной научно-практической экологической конференции. (г. Белгород, 6-11 октября 2014 г.). – Белгород: ИД «Белгород» НИУ БелГУ, 2014. – С. 42–43.
12. **Кухарева Т.А.** Темпы эритропоэза и содержание аномальных форм эритроцитов бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* Pallas 1811 / **Т.А. Кухарева** // «Pontus Euxinus 2015»: тез. IX Всерос. науч.-практ. конф. молодых учёных (с междунар. участием) по проблемам водных экосистем, посвящ. 100-летию со дня рожд. д.б.н., проф., чл.-кор. АН УССР В.Н. Грезе (Севастополь, 17-20 нояб. 2015 г.). – Севастополь, 2015. – С. 92.
13. **Кухарева Т.А.** Эритропоэз и функциональная морфология циркулирующих эритроцитов морских рыб / А.А. Солдатов, **Т.А. Кухарева**, А.Ю. Андреева, И.А. Парфенова // Современные проблемы эволюционной морфологии животных: материалы III Всерос. конф. с междунар. участием к 100-летию со дня рожд. акад. В.И. Иванова, 26-28 сент., 2016 г., Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2016. – С. 113–114.
14. **Кухарева Т.А.** Эритроциты и гемоглобины толерантных к экстремальным формам гипоксии и аноксии гидробионтов / А.А. Солдатов, А.Ю. Андреева, И.А. Парфенова, **Т.А. Кухарева**, В.Н. Рычкова // Материалы XV Всерос. совещ. с междунар. участием и VIII школе по эволюционной физиологии, посвящ. памяти акад. Л.А. Орбели и 60-летию ИЭФБ РАН, 17-22 окт. 2016 г. – Санкт-Петербург, 2016. – С. 293.

15. **Кухарева Т.А.** Клеточный состав и пролиферативная активность очагов гемопоэза в головной почке и селезенке морского ерша / А.Ю. Андреева, А.А. Солдатов, **Т.А. Кухарева** // Биология – наука XXI века: сб. тез. 21-й Междунар. Пущинской шк.-конф. молодых ученых, г. Пущино, 17-21 апр. 2017 г. – Пущино, 2017. – С. 183.
16. **Кухарева Т.А.** Респираторные характеристики эритроцитов бычка-кругляка в процессе клеточной дифференцировки / **Т.А. Кухарева**, А.А. Солдатов // Биология – наука XXI века: сб. тез. 21-й Междунар. Пущинской шк.-конф. молодых ученых, г. Пущино, 17-21 апр. 2017 г. – Пущино, 2017. – С. 199.
17. **Кухарева Т.А.** Эритроциты низших позвоночных при адаптации к экстремальным формам гипоксии / А.А. Солдатов, А.Ю. Андреева, **Т.А. Кухарева**, Т.И. Андреевко, И.А. Парфенова // Мат-лы XXIII съезда Физиологического об-ва им. И.П. Павлова. 18-22 сент. 2017 г. (Воронеж, Россия). – Воронеж: Изд-во «Истоки», 2017. – С. 1497–1499.
18. **Кухарева Т.А.** Эритрограмма циркулирующей крови *Neogobius melanostomus* P. в условиях гипо- и гипертермии / Е.С. Ефремова, **Т.А. Кухарева** // «PontusEuxinus 2017»: тезисы X Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых по проблемам водных экосистем, в рамках проведения Года экологии в Российской Федерации (11-16 сентября 2017 г.). – Севастополь: DigitPrint, 2017. – С.76–77.
19. **Кухарева Т.А.** Морфологические характеристики эритроцитов *Scorpaena porcus* L. В условиях экспериментальной гипоксии. Эксперименты *in vivo* / А.А. Солдатов, **Т.А. Кухарева**, А.Ю. Андреева, И.А. Парфенова, В.Н. Рычкова, Д.С. Зинькова // Научная конференция молодых ученых «Комплексные исследования Мирового океана», 21 по 25 мая 2018 г.– Процессы в геосредах. – Санкт-Петербург, 2018. – №3 (17). – С. 42–43.
20. **Кухарева Т.А.** Особенности клеточного состава кроветворных органов скорпены (*Scorpaena porcus* L.) в зимний и летний период / **Т.А. Кухарева**, А.Ю. Андреева, А.А. Солдатов // ЭКОБИО–2018: Экобиологические проблемы Азово-Черноморского региона и комплексное управление биологическими ресурсами: сб. материалов V науч.-практ. молодежной конф., Севастополь, 8–11 октября 2018 г. – Севастополь : Филиал МГУ в г. Севастополе, 2018. – С.104–107.
21. **Кухарева Т.А.** Пролиферативная активность клеток гемопоэтических органов морского ерша (*Scorpaena porcus* L.) в период нереста и зимовки / А.Ю. Андреева, **Т.А. Кухарева**, А.А. Солдатов // ЭКОБИО–2018: Экобиологические проблемы Азово-Черноморского региона и комплексное управление биологическими ресурсами: сб. материалов V науч.-практ. молодежной конф., Севастополь, 8–11 октября 2018 г. – Севастополь : Филиал МГУ в г. Севастополе, 2018. – С. 69–72.