
ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 597.556.31:574.24:591.11

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СКОРПЕНЫ *SCORPAENA PORCUS* LINNAEUS, 1758 В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ *IN VIVO*

© 2024 г. Ю. А. Силкин¹, * (ORCID:0000-0002-1916-8327),
Е. Н. Силкина¹ (ORCID: 0000-0003-2059-1015), М. Ю. Силкин¹
(ORCID:0000-0001-7499-0375), В. Е. Василец¹ (ORCID:0009-0005-4690-4122)

¹Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского ФИЦ ИнБЮМ, Феодосия, 298187 Россия
*e-mail: ysilkin@mail.ru

Поступила в редакцию 18.05.2023 г.
После доработки 28.09.2023 г.
Принята к публикации 01.10.2023 г.

Исследованы линейные размеры эритроцитов, их ядер, количество клеток и гемоглобина в крови скорпены *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 в осенне-зимний период, при температуре воды 17, 13, 8 и 4°C. Результаты показали высокое и относительно равное содержание гемоглобина и количество эритроцитов в крови скорпены при 17 и 13°C. Однако значения исследуемых параметров при температуре воды 13°C были приняты за физиологическую норму, так как эта температура более соответствовала осенним температурам Карадагского побережья. Понижение температуры воды в аквариуме до 8°C снижало уровень гемоглобина на 25%, а количество эритроцитов на 26% в крови *S. porcus*. Линейные размеры эритроцитов при понижении температуры до 8°C не изменялись. При температуре 4°C в крови *S. porcus* резко снижалось количество эритроцитов (на 57%), гемоглобина (на 31%) и наблюдалось набухание эритроцитов. У рыб, содержащихся при этой температуре, большой диаметр красных клеток увеличивался на 11%, а малый — на 25%. Линейные размеры ядер эритроцитов *S. porcus* уже при температуре 8°C увеличивались на 12% по большой и малой осям. При 4°C ядра эритроцитов уменьшались в размерах, по большой оси — на 7%, по малой — на 9%, что свидетельствовало о нарушении структуры хроматина в ядерном аппарате клетки. Полученные результаты позволили провести четкую градацию температурной устойчивости *S. porcus*. При температуре воды ниже 8°C наступали деструктивные процессы в крови, свидетельствовавшие об исчерпании защитных резервов у данного вида рыб. Полученные данные могут быть использованы в марикультуре рыб как показатели устойчивости к температурному фактору.

Ключевые слова: линейные размеры, эритроциты, ядра клеток, гемоглобин, температура, рыбы

DOI: 10.31857/S0134347524010037

Одной из областей клеточной физиологии являются процессы адаптации рыб к действию температуры среды обитания. В прибрежной зоне Черного моря температура воды в зимние месяцы снижается до 3.0–5.0°C, а на большем удалении от Карадагского побережья — до 7.0°C. Вертикальное распределение температуры показывает, что самыми холодными в течение всего года являются глубины от 30 до 150 м (место зимовки рыб), где температура не превышает 7.5–8.5°C (Куклев и др., 2019). В летние месяцы

на глубине от 17 до 30 м наблюдается термоклин с конечной температурой не выше 8.0–9.0°C (Трошенко, Субботин, 2018). Эти данные свидетельствуют о том, что прибрежные донные и пелагические виды черноморских рыб подавляющую часть своей жизни проводят в условиях низких температур. Компенсаторно-приспособительные реакции клеток крови рыб на воздействие температур разного диапазона являются малоизученными, несмотря на широкий спектр исследований форменных элементов крови

позвоночных. На пресноводных рыбах было показано, что изменение линейных размеров эритроцитов при низкой температуре происходит у видов, температурный диапазон существования которых не совпадает с экспериментальным холодовым воздействием (До Хью Кует, 2016). Особенно этот “пресс” отражается на органах и тканях, обеспечивающих газотранспортные системы обитателей черноморских донных сообществ, которые испытывают периодическое воздействие низких температур в течение года. Изменения мембранных характеристик эритроцитов в ответ на низкую температуру часто носят противоречивый характер. Так, понижение температуры инкубации крови у сазана с 20°C до 5°C приводило к уменьшению микровязкостных характеристик мембран эритроцитов, в то время как у толстолобика, амура и карася — к увеличению данного показателя (До Хью Кует и др., 2015). Понижение микровязкостных характеристик плазматических мембран ядерных эритроцитов наблюдается у представителей пресноводных — озерной лягушки и краснобрюхой жерлянки (Чернявских, Недопекина, 2013). Одновременно изменяются размерные характеристики клеток. Эритроциты серебряного карася при 5°C набухают с одновременным увеличением их объема на 54.3% (Чернявских и др., 2018).

Ядерные эритроциты морских рыб прибрежья Карадага, большую часть времени проводящих при низкой температуре, также являются практически неизученными. Понижение температуры прибрежных вод в зимние месяцы может особенно влиять на выживаемость теплолюбивых донных обитателей. К таким формам можно отнести средиземноморского вселенца, скорпену *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758. В связи с этим целью исследования явилось изучение влияния температурных условий (17, 13, 8 и 4°C) на изменение линейных размеров эритроцитов, их ядер, содержания гемоглобина и количества эритроцитов у *S. porcus*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследования служил прибрежный малоподвижный вид, скорпена *Scorpaena porcus*. Скорпен отлавливали донной сетью в районе Карадагской бухты юго-восточного побережья Крыма, в 100 м от берега в осенне-зимний период (октябрь—декабрь), когда организм

рыб физиологически перестраивался к зимовке. Масса отловленных особей 180–200 г, длина — 20–22 см. Рыб содержали в аэрируемых непроточных аквариумах (50 л на одну особь). Исследования гематологических и размерных показателей эритроцитов и их ядер проводили при дискретных значениях температуры воды 17, 13, 8 и 4°C. При каждом температурном режиме скорпен экспонировали 10 сут и кормили мясом рыб. После чего отбирали группу из 10 особей для анализа. Кровь получали путем пункции хвостовой артерии скорпены стеклянной пипеткой, смоченной раствором 5% гепарина. Длину и ширину клеток и их ядер определяли в сухих мазках крови, которые фиксировали этиловым спиртом и окрашивали краской Романовского-Гимза. Оптические исследования проводили на бинокулярном микроскопе STUDAR EK PZO (Польша) с использованием стандартных объективов PZO (Польша) 40/0.65 (160/0.17), 100/1.3 OI (160/0.17). Для работы с объективом PZO (Польша) 100/1.3 OI (160/0.17) использовали иммерсионное масло с $N_d = 1.515$ при 20°C. Стандартный ламповый источник света был заменен на светодиод (напряжение 12 В, мощность 5 Вт) для увеличения яркости подсветки. Для получения снимков использовали цифровую камеру MC-6.3 USB 3.0 фирмы ЛОМО со следующими параметрами: разрешение матрицы — 6.3 мпкс; сенсор — 1/1.8" SONY с улучшенной светочувствительностью и цветопередачей; размер пикселя — 2.4×2.4 ; разрешение полученных снимков — 3072×2048 пикс. Определение размеров эритроцитов и их ядер, проводили с помощью программы MCView фирмы ЛОМО. Измеряли эритроциты с целостной структурой клетки и ядра. Внешний вид эритроцитов при разных температурах содержания рыб представлен на рис. 1.

Расчет индекса формы эритроцита/ядра проводили по формуле: $I_f = h/l$, где I — длина эритроцита/ядра, мкм; h — ширина эритроцита/ядра, мкм. Первичную статистическую обработку проводили в программе Microsoft Excel.

Построение кривых распределения размерных характеристик клеток крови и их ядер у скорпены осуществляли с помощью метода сглаживания (Kernel Smooth), встроенного как функция программы Origin Pro (Origin Lab Corp.) Plot-> Statistical-> Distribution+Rug.

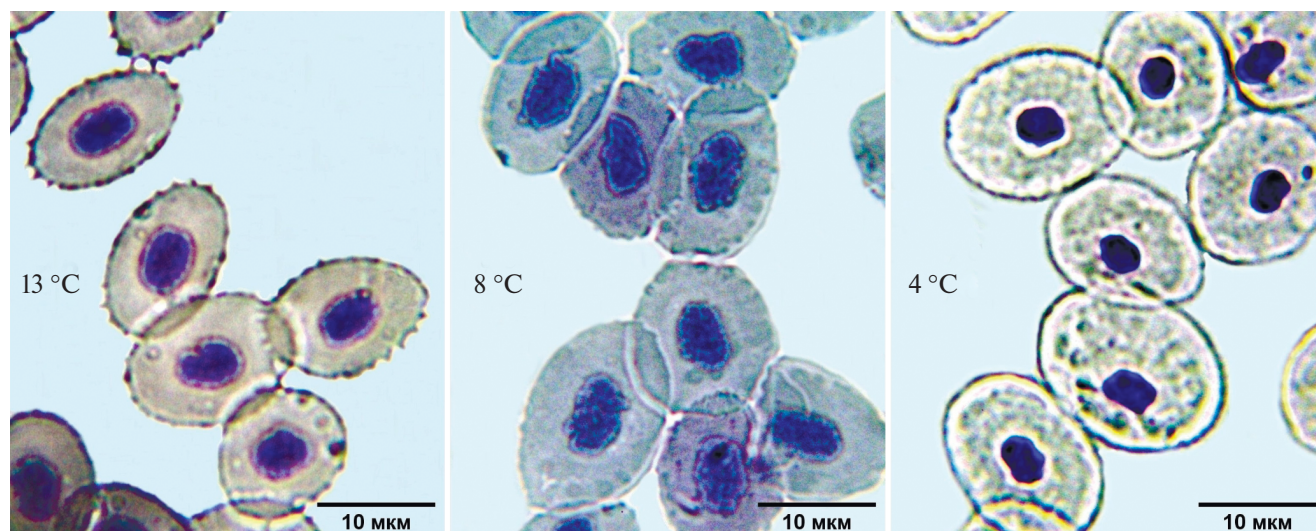


Рис. 1. Внешний вид эритроцитов при различной (13, 8, 4°C) температуре содержания скорпены.

Полученные кривые представляли собой огибающие гистограммы распределения размерных характеристик клеток, ядер (мкм) и проекции их площади (мкм²), на которых указывали максимальные значения для каждого вариационного ряда данных. Количество размерных диапазонов в каждом распределении равнялось 12. Для каждой статистической кривой использовали 200 клеток, взятых из 10 мазков, полученных от 10 рыб при каждой температуре (13, 8 и 4°C). Размерные характеристики клеток крови при 17°C не рассматривали ввиду того, что за контроль были взяты эритроциты и их ядра, полученные при 13°C.

Количество эритроцитов (10⁶/мкл) подсчитывали в камере Горяева. Содержание гемоглобина (в мг/%) определяли по методу Сали. Рассчитывали среднюю и ошибку среднего $M \pm n$. Средние значения линейных размеров были получены от 100 промеров, средние значения

концентрации гемоглобина и количества эритроцитов — от 10–12 особей (Лакин, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменения концентрации гемоглобина и количества эритроцитов в крови рыб при разных температурах представлены в табл. 1.

При температуре 17°C количество эритроцитов было на 11%, а содержание гемоглобина на 8% меньше, чем при 13°C. Эти данные показали, что 17°C — температура, негативно влияющая на физиологические показатели крови для этого вида рыб. Поэтому содержание гемоглобина, количество эритроцитов и их линейные размеры были приняты за норму (контроль) при температуре 13°C (табл. 1, 2).

Понижение температуры воды в аквариуме до 8°C приводило к уменьшению уровня гемоглобина в крови скорпены на 26% по сравнению

Таблица 1. Количество эритроцитов и содержание гемоглобина в эритроцитах скорпены при разной температуре воды

	17°C	13°C (контроль)	8°C	4°C
Количество эритроцитов (10 ⁶ /мкл крови)	0.507 ± 0.05* n = 10	0.572 ± 0.05 n = 12	0.432 ± 0.04* n = 10	0.247 ± 0.05** n = 11
Содержание гемоглобина (%)	63.3 ± 3.0* n = 10	69.0 ± 2.0 n = 10	50.8 ± 3.0* n = 11	47.5 ± 2.5** n = 12

Различия с контролем достоверны: *при $p < 0.05$, **при $p < 0.001$.

Примечание. n — число рыб в опыте.

Таблица 2. Размерные характеристики эритроцитов скорпены и их ядер при разной температуре воды

Температура	Эритроциты, мкм			Ядро, мкм		
	Большая ось	Малая ось	Индекс формы	Большая ось	Малая ось	Индекс формы
17°C	14.5 ± 0.2 n = 10	9.4 ± 0.1 n = 10	0.70 ± 0.01 n = 10	4.6 ± 0.2 n = 10	3.3 ± 0.07 n = 10	0.67 ± 0.02 n = 10
13°C (контроль)	14.0 ± 0.2 n = 12	9.4 ± 0.1 n = 12	0.72 ± 0.6 n = 12	4.7 ± 0.1 n = 10	3.3 ± 0.1 n = 12	0.68 ± 0.03 n = 12
8°C	14.4 ± 0.5 n = 16	10.0 ± 0.1 n = 16	0.70 ± 0.03 n = 15	5.3 ± 0.3 n = 16	3.7 ± 0.2 n = 14	0.6 ± 0.06 n = 12
4°C	15.5 ± 0.6 n = 14	11.7 ± 0.5 n = 14	0.63 ± 0.06 n = 12	4.4 ± 0.2 n = 14	3.0 ± 0.1 n = 14	0.67 ± 0.05 n = 14

Примечание. n – число рыб в опыте.

с нормой (табл. 1). При более низкой температуре (4°C) уровень гемоглобина был еще ниже (на 31%) и составлял 69% от уровня пигмента в крови при температуре 13°C.

При 8°C количество красных клеток в крови скорпены уменьшалось на 25%, что закономерно совпадало с падением уровня гемоглобина практически на ту же величину. При 4°C снижение количества эритроцитов было еще более резким (на 33%), что составляло 57% от контрольного уровня (табл. 1).

Внешний вид и линейные размеры эритроцитов скорпены и их ядер при разных температурных условиях представлены на рис. 1 и в табл. 2. Тренды вариаций перераспределения размеров эритроцитов и их ядер в крови при разных температурах показаны на огибающих гистограммах (рис. 2–7).

Размерные характеристики эритроцитов скорпены различались при исследованных температурах (табл. 2). Так, при понижении температуры с 17 до 8°C средний размер больших и малых осей клеток и индекс формы находились в примерно одинаковом диапазоне. С понижением температуры до 4°C большой диаметр клеток увеличивался на 11%, а малый на 25% по сравнению с контролем, что приводило к снижению индекса до 0.63 и приобретению эритроцитами рыб округлой формы (рис. 1, табл. 2).

При 17 и 13°C линейные размеры ядер эритроцитов скорпены не изменялись (табл. 2). При снижении температуры в аквариуме до 8°C

линейные размеры ядер увеличивались по большой оси на 13%, по малой – на 12%. Таким образом, ядра приобретали еще более округлую форму, индекс формы уменьшался на 13% и при 8°C составлял 0.6. Напротив, при дальнейшем понижении температуры воды до 4°C линейные размеры ядер эритроцитов уменьшались на 7% по большой оси и на 10% по малой оси по сравнению с контролем (рис. 1, табл. 2).

Очень показательными для каждой температуры содержания рыб явились кривые распределения размерных характеристик эритроцитов (рис. 2, 3), а также их ядер (рис. 4, 5) и проекций площадей поверхности этих объектов (рис. 6, 7). Для выяснения направлений изменения размерных характеристик эритроцитов и их ядер при исследуемых температурах на каждой гистограмме выделяли модальные характеристики, фактически соответствовавшие максимумам распределения. Так, при 13°C модальная величина большой оси эритроцитов имела размер 13.76 мкм, а малой – 9.54 мкм (рис. 2, 3).

При температуре 8°C максимум распределения размеров клеток сдвигался в правую сторону – размер большой оси клеток 14.37 мкм, малой оси – 10.44 мкм (рис. 2, 3). При дальнейшем понижении температуры воды до 4°C сдвиг максимума продолжался вправо – размер большой оси эритроцитов 15.59 мкм, малой оси – 11.5 мкм (рис. 2, 3). Рост малой оси клеток был более выражен, и эта характеристика вносила бóльший вклад в изменение размеров эритроцитов. При этом происходило изменение

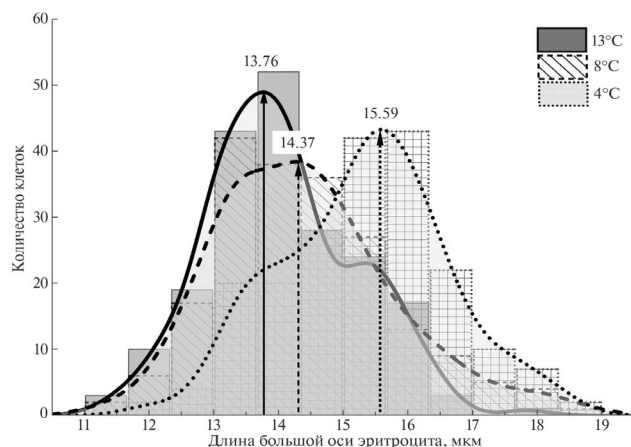


Рис. 2. Огибающая гистограмма распределения длины большой оси эритроцитов скорпены при температуре 13, 8 и 4°C.

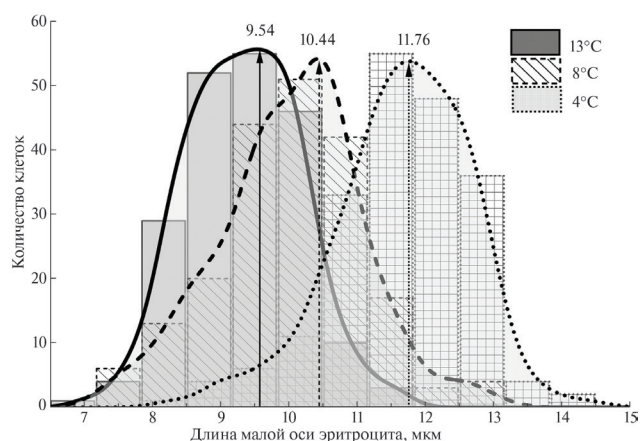


Рис. 3. Огибающая гистограмма распределения длины малой оси эритроцитов скорпены при температуре 13, 8 и 4°C.

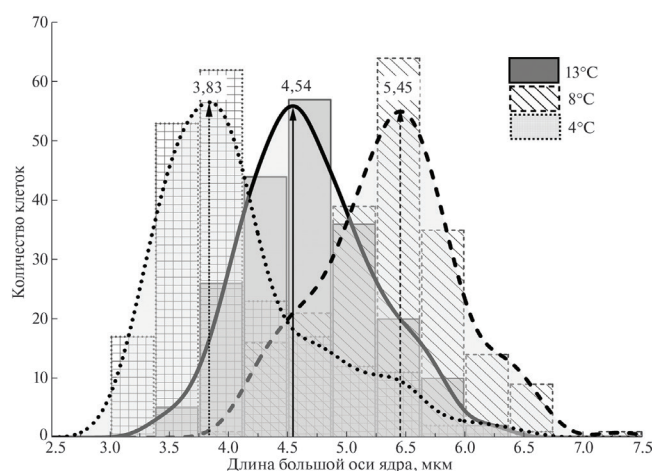


Рис. 4. Огибающая гистограмма распределения длины большой оси ядер эритроцитов скорпены при температуре 13, 8 и 4°C.

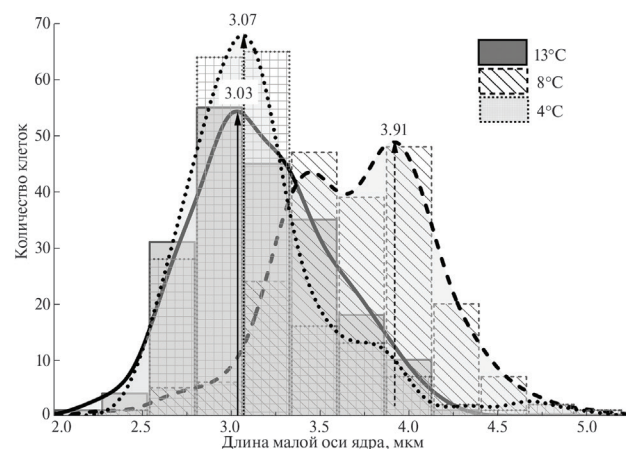


Рис. 5. Огибающая гистограмма распределения длины малой оси ядер эритроцитов скорпены при температуре 13, 8 и 4°C.

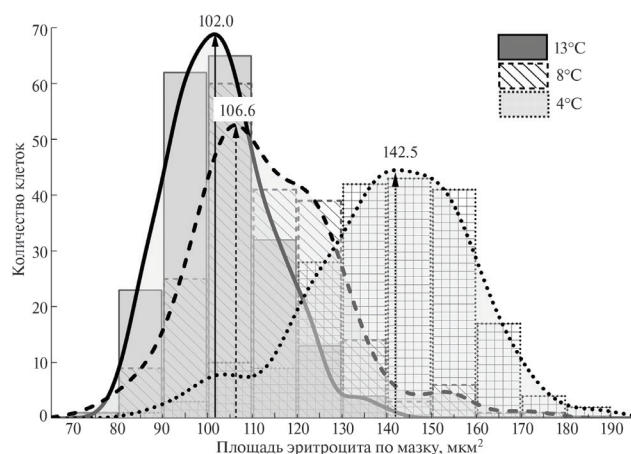


Рис. 6. Огибающая гистограмма распределения площади эритроцитов скорпены при температуре 13, 8 и 4°C.

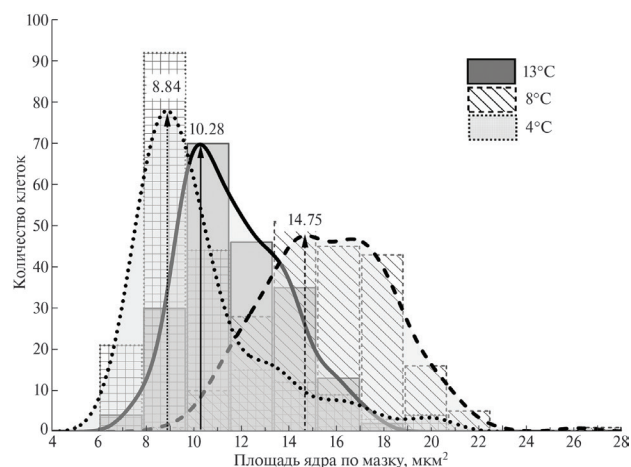


Рис. 7. Огибающая гистограмма распределения площади ядер эритроцитов скорпены при температуре 13, 8 и 4°C.

формы клеток, которые при температуре 4°C набухали и становились более округлыми (индекс формы 0.63) (табл. 2).

При 13°C большинство клеток исследованной выборки имели максимальный размер ядер — 4.54 мкм по длине большой оси (рис. 4), и — 3.03 мкм по длине малой (рис. 5). Со снижением температуры до 8°C наблюдали рост количества эритроцитов с увеличенными линейными размерами ядер — максимальная длина большой оси — 5.45 мкм, малой оси — 3.91 мкм (рис. 4, 5).

При понижении температуры до 4°C тенденция увеличения числа клеток с большими ядрами менялась на противоположную, и в исследованной выборке максимум составляли клетки с ядрами, имеющими размер по длине большой оси 3.83 мкм, а по длине малой оси — 3.07 мкм (рис. 5).

Следует отметить, что при 4°C средние размеры ядер эритроцитов скорпены возвращались к контрольному состоянию (табл. 2). Однако, как показали исследования, максимумы профилей распределения длины большой оси ядер эритроцитов скорпены смещались в сторону количества клеток с меньшими размерами ядер, равными 3.83 мкм (рис. 4). По длине малой оси ядра этого смещения не было вовсе и максимум малой оси ядер большинства эритроцитов при 4°C составлял 3.07 мкм (рис. 5).

Тенденцию вариационных колебаний клеточных популяций в зависимости от понижения температуры содержания рыб хорошо продемонстрировали максимумы проекций площадей эритроцитов и их ядер (рис. 6, 7). Максимумы проекции площадей эритроцитов с понижением температуры имели четкий тренд к постоянному смещению вправо, т.е. к увеличению (рис. 6). При температуре 13°C модальная характеристика проекции площадей эритроцитов имела величину 102.0 мкм². При понижении температуры до 8°C максимум проекции площадей клеток незначительно увеличивался (до 106.6 мкм²). Понижение температуры до 4°C вызывало рост модальной величины проекции площадей эритроцитов скорпены до 142.5 мкм² (рис. 6).

Варьирование максимума проекций площадей ядер эритроцитов носило разнонаправленный

характер. В норме модальное распределение площади проекции ядра эритроцитов рыб составляло 10.28 мкм². При 8°C эта величина возрастала и составляла 14.75 мкм². При дальнейшем понижении температуры до 4°C максимум распределения проекции площадей ядер эритроцитов скорпены резко смещался в сторону меньших значений, составляя 8.84 мкм² (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Температура среды обитания является наиболее важным фактором, изменяющим величину растворенного в морской воде кислорода и определяющим скорость биохимических процессов, протекающих на молекулярном уровне в клетках и тканях рыб. Как известно, при понижении температуры на 10°C скорость ферментативных процессов у пойкилотермных организмов снижается в 2–4 раза, подчиняясь общему правилу Вант-Гоффа (Громаков и др., 2005). Температурный диапазон жизнедеятельности многих морских и пресноводных рыб колеблется от 1.5 до 44°C (До Хыу Куэт, 2016). Резкие перепады температуры в осенне-зимний период проявляются как стресс и изменяют метаболические процессы в организме рыб, затрагивая, прежде всего, размерные характеристики эритроцитов и другие гематологические показатели крови.

Скорпена — малоподвижная рыба, отличается от других морских рыб побережья невысокой скоростью метаболизма, имея в норме низкие гематологические показатели обмена (гемоглобин и количество эритроцитов) (Беляев и др., 1983). Количество эритроцитов в крови рыб является лабильной характеристикой. Содержание красных клеток зависит от естественной подвижности рыбы, сезона, качества и количества пищи и даже от времени суток, когда их количество уменьшается в утренние часы и увеличивается в дневные (Точилина, 1990; Жичкина и др., 2021). Число эритроцитов является первым показателем интенсивности окислительных процессов в организме скорпены, которые в норме составляют 0.5–0.6 10⁶/мкл крови (табл. 1). Температурным оптимумом для скорпены, как показали наши исследования, является температура 13°C, поведение рыб при этой температуре было наиболее естественным. Особи охотно питались, довольно

активно передвигались по аквариуму, при наличии живого корма совершали броски для поимки жертвы.

Было показано, что в ответ на снижение температуры воды с 13 до 8°C в организме скорпены происходило уменьшение количества эритроцитов на 25% и уровня гемоглобина на 20%. Уменьшение количества эритроцитов при холодовом стрессе у скорпены могло быть связано с отсутствием потребности в переносе большого количества кислорода в этих условиях. Уменьшение уровня этих показателей при низкой температуре было отмечено также в крови теплолюбивых рыб: кефали-сингиля и бычка-кругляка (Солдатов, 1987). Причины падения гематокрита нами не установлены, но из литературных источников известно, что в результате охлаждения может происходить частичное депонирование эритроцитарной массы (Солдатов, 1987).

Несмотря на довольно значительный гематологический ответ, морфологические изменения эритроцитов были не так заметно выражены. Линейные размеры красных клеток были сходны с таковыми при более высокой температуре 13°C (табл. 1). Стабильность линейных размеров эритроцитов может свидетельствовать о слабом стрессовом воздействии и идентичности физиолого-биохимических процессов в клетке при температурах 8 и 13°C. Поведение скорпены при понижении температуры до 8°C вполне укладывалось в норму реакции, особи при этом, хотя и уменьшили двигательную активность, но на корм реагировали охотно, брали его 1 раз в 5 сут, что является вполне естественным для этого вида рыб. Показано, что скорость переваривания пищи у скорпены зависит от температуры воды: от одних суток летом и до четырех — зимой, поэтому промежутки приема пищи колеблются от одних до 6 или даже до 16 сут (Световидов, 1964). Однако отмеченные нами изменения линейных размеров, а также рост проекции площадей поверхности эритроцитов и ядра при понижении температура воды до 8°C, снижение количества эритроцитов и гемоглобина на 15–20% все-таки свидетельствовали о росте физиолого-биохимического напряжения в организме скорпены в этих условиях (рис. 2–7).

Резкое снижение количества эритроцитов (до 50%) и гемоглобина (на 25%) при температуре воды 4°C, по сути, отражает уже патологическое состояние организма рыб. Скорпены в таком состоянии почти не двигались и не реагировали на корм, но проявляли активность при заборе крови. С одной стороны, понижение температуры у пойкилотермных животных само по себе является фактором, замедляющим обмен. С другой стороны, низкие показатели количества эритроцитов в крови скорпены при снижении температуры до 4°C свидетельствовали о нарушении гематокритного гомеостаза. Хотя само по себе кроветворение — достаточно инерционный процесс, длительное содержание рыб при низкой температуре способствовало глубокому смещению равновесия в сторону значительного сокращения продукционных процессов кроветворения. Это объяснимо с точки зрения пойкилотермности рыб и обусловлено снижением их общей энергетики при низкой температуре и, соответственно, транспортного кислородного потенциала крови. Как уже отмечалось, уменьшение количества красных клеток в крови можно рассматривать и как процесс резервирования части эритроидной массы в кровяном депо. Эту роль у рыб выполняет селезенка (Fänge, Nilsson, 1985). Скорее всего, из русла крови, особенно из его активной части, выводятся зрелые эритроциты вследствие того, что их мембраны уже имеют измененный антигенный комплекс, который позволяет строме селезенки избирательно связывать данные клетки (Bartos, 1991). Однако, по мнению Солдатова (1992, 2005) функция депо крови у донных видов рыб, к которым относится и скорпена, развита гораздо хуже, чем у пелагических форм. Тем не менее извлечение клеток из русла крови не следует исключать из рассмотрения. Более вероятным процессом, объясняющим понижение количества эритроцитов в русле крови скорпены, может быть избирательный лизис старых и аномальных клеток (Солдатов и др., 2018). Наши исследования подтверждают эту точку зрения, так как на мазках крови рыб, содержащихся при температуре ниже 8°C, было отмечено почти полное отсутствие аномальных и крупных зрелых эритроцитов. Причиной такого лизиса эритроцитов при температуре ниже 8°C может стать упомянутое ранее набухание клеток. В основе

лизиса клеток при набухании может лежать и смещение равновесия Na^+/H^+ обмена в мембране эритроцитов. Оно было описано у скорпены, причем как *in vitro*, так и *in vivo* в ответ на резкое повышение концентрации катехоламинов во внеклеточном пространстве (Андреева, 2014; Borgese et al., 1987; Andreeva et al., 2017).

Вслед за снижением количества эритроцитов естественным является и снижение количества гемоглобина (на 25%). Причиной этого, по мнению Солдатов (1987), является переход части гемоглобина в окисленную форму вследствие уменьшения активности фермента, защищающего этот пигмент (Солдатов, Парфенова, 2001). Итогом этого процесса при гипотермии являлось снижение потребления кислорода рыбами из-за внешних и внутренних причин.

Как показали исследования, снижение температуры воды до 4°C, как стрессовый фактор, вызывало хорошо выраженный β -адренергический ответ (Nikinmaa, 1990), что и приводило к увеличению линейных размеров эритроцитов и проекций их площадей (рис. 2, 3, 6). Следствием роста катехоламинов в крови также явилось набухание эритроцитов. Явление оводненности эритроцитов у рыб ранее отмечали исследователи и при гипоксических состояниях (Андреева, 2014; До Хью Куэт, 2016; Солдатов и др., 2018). Снижение количества эритроцитов при низкой температуре могло происходить ввиду изменения баланса между продукцией и деструкцией эритроидных клеток в системе красной крови рыб. При низкой температуре (4°C) линейные размеры эритроцитов скорпены увеличивались по большой оси на 10%, а по малой — на 24% (табл. 2), что существенно больше, чем при воздействии острой гипоксии. При острой гипоксии эти изменения были не столь существенны и составляли до 3% по большой оси и до 6% по малой оси клеток (Андреева, 2014). Такое расхождение в изменении размерных характеристик свидетельствовало о том, что воздействие низких температур было гораздо более сильным стрессом для этих клеток, чем экспериментальная гипоксия.

Повышение сферичности эритроцитов при понижении температуры является свойством, присущим не только рыбам. Так, при понижении температуры суспензии эритроцитов человека с 37°C до 5°C показано резкое увеличение

сферичности красных клеток крови в диапазоне от 15°C до 5°C, с максимумом в диапазоне 12–10°C (Давыдова, Гордиенко, 2009). Эти результаты хорошо согласуются с данными о температурной зависимости времени обмена молекул воды эритроцитами (Гордиенко и др., 1985). По мнению этих исследователей, изменение проницаемости мембран эритроцитов обусловлено структурно-фазовыми переходами липидных и белковых компонентов плазматической мембраны. Для эритроцитов человека это происходит при 15°C, а для мембран ядерных эритроцитов рыб, согласно нашим наблюдениям, при более низкой температуре, около 4°C.

При низкой температуре существенные морфологические изменения происходят и в ядерном аппарате эритроцитов скорпены. Причем, морфологические изменения ядер являются более чувствительными параметрами, чем размерные изменения самих эритроцитов (табл. 2). Эти изменения были четко видны на кривых распределения площадей поверхности ядер эритроцитов при снижении температуры воды до 8°C. На рисунках гистограмма площади ядер сдвигалась в сторону роста ее размеров (рис. 7). Тенденция роста размеров ядер и их площадей при 8°C сменялась на существенное уменьшение этих показателей при 4°C (рис. 4, 5, 7). По нашему мнению, это демонстрировало особую “тяжесть” низкотемпературного стресса. Согласно современным представлениям, за морфологию и метаболизм ядра ответственен ядерный матрикс, который является оболочкой ядра, состоящей из негистоновых белков. Функциональная роль ядерного матрикса заключается в поддержании общей формы ядра, в организации не только пространственного расположения многочисленных и деконденсированных хромосом, но и их активности (Гурова, 2020). Можно предположить, что понижение температуры до 8°C вызывает стимуляцию активности биосинтетических процессов в эритроцитах рыб, внешним проявлением которого является увеличение размерных характеристик их ядерного аппарата. Напротив, понижение температуры до 4°C вызывает необратимое торможение функциональной активности в ядре, а возможно и гибель ферментативных комплексов, участвующих в компактизации хромосом и биосинтезе РНК и ДНК. Возможно, проявлением этого процесса является наблюдаемое

при 4°C резкое уменьшение размеров ядер эритроцитов скорпены.

Из литературных источников известно, что подобные гематологические изменения, происходящие в результате холодового стресса, были отмечены и при других воздействиях на рыб. Так, было показано (Солдатов и др., 2018), что при гипоксии снижается осмотическая резистентность клеток. Одновременно понижается и связанное с этим количество эритроидных аномалий, число эритроцитов в крови и гемоглобина. В целом наблюдается однотипная картина, но под действием другого внешнего фактора — гипоксии. При гипоксии характер изменения линейных размеров ядра отличается от изменений при воздействии температурного фактора. Как показано в исследованиях Андреевой (2014), небольшая гипоксия приводит к уменьшению линейных размеров ядер эритроцитов скорпены на 4%, тогда как более глубокое гипоксическое воздействие провоцирует увеличение линейных размеров этих органелл клетки на 4%. Изменение размеров ядерного аппарата, по мнению Андреевой (2014), обусловлены функциональной активностью данной структуры.

Таким образом, эти результаты позволяют предположить наличие, похожей по своему конечному результату, ответной реакции крови скорпены на холодовой и гипоксический стрессы, направленной на минимизацию энергетических издержек и повышение общей резистентности оставшихся форменных элементов крови. Полученные результаты позволяют провести четкую градацию температурной устойчивости организма скорпены к данному фактору внешней среды. Хотя при 17°C отмечено небольшое понижение гематокрита, можно допустить, что условия существования от 17 до 8°C являются для скорпены зоной комфортного физиологического состояния. Температура ниже 8°C подводит черту толерантности этого вида к низким температурам, при которых наступают патологические, деструктивные процессы в крови, свидетельствующие об истощении защитных резервов организма данного вида рыб.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Большое количество родов и видов семейства Scorpaenidae обитает главным образом в тропических, субтропических и отчасти в умеренных

водах. В Черном море встречается один вид *Scorpaena porcus* (Световидов, 1964). Температурные условия побережья в летние месяцы имеют тенденцию к снижению средней температуры от Лигурийского моря до Черного с 18.2 до 15.4°C (Куцын и др., 2019). Остальные 8 мес. скорпены живут при низких температурах 7.5–9.0°C (Куклев и др., 2019). Многочисленными исследованиями было показано, что температурные изменения накладывают отпечаток на темп роста, межполовые различия, скорость метаболических процессов скорпены (Куцын и др., 2019; Mesa et al., 2010; Manilo, Pescov, 2016). Поэтому пребывание рыб в аквариумах при температуре около 4°C необходимо рассматривать как острый стресс, следствием которого является изменение параметров кровеносной системы. Можно констатировать, что двукратное падение количества эритроцитов в крови и гемоглобина свидетельствовало не только об угнетении эритропоэтических процессов в гемопоэтической ткани, но и о разрушительном воздействии холода на мембраны эритроцитов. Это воздействие вызывало набухание и лизис аномальных и осмотически нестойких клеток. Кроме того, холодовое воздействие не только изменяло параметры мембран эритроцитов, но и оказывало влияние на морфологию ядерного аппарата. Предположительно эти изменения затрагивали энергетические и связанные с ними биосинтетические и регенерационные способности эритроцитов. Следствием такого воздействия являлась неспособность эритроцитов к восстановлению белков и других поврежденных компонентов, что и вызывало массовую гибель клеток.

Scorpaena porcus, обитающая у восточного побережья Крыма, как теплолюбивый вид и переселенец из южных морей, не способна длительное время переносить температурные условия ниже 8°C. Полученные данные о влиянии низкой температуры на параметры крови скорпены могут быть использованы в марикультуре морских рыб и как индикаторы их физиологического состояния.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского в рамках темы гос. задания

№ 075-00744-21-00 “Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов”. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными (рыбами) проводились в соответствии с Руководством выполнения работ при осуществлении рыболовства в научно-исследовательских и контрольных целях на 2022–2024 гг. “Комплексные исследования водных биоресурсов и среды их обитания в азово-черноморском бассейне (Черное и Азовское моря)” на основании Приказа Росрыболовства № 793 от 28 декабря 2022 года.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева А.Ю. Морфофункциональные характеристики эритроцитов *Scorpaena porcus* L. в условиях гипоксии // Автореф. дис. ... к.б.н. СПб. 2014. 22 с.
- Беляев В.И., Николаев В.М., Шульман Г.Е., Юнева Т.В. Тканевый обмен у рыб. Киев: Наукова думка. 1983. 142 с.
- Гордиенко О.И., Емец Б.Г., Жиликова Т.А. и др. Температурная зависимость водной диффузионной проницаемости мембран эритроцитов в средах с различной ионной силой // Биологические мембраны. 1985. Т. 2. № 3. С. 310–314.
- Громаков Н.С., Бойчук В.А., Овчинников В.В. Основные закономерности химических процессов. Казань: КГАСУ. 2005. 62 с.
- Гурова С.В. Морфология. Гистология. Учебное пособие. Пермь: ИПЦ. “Прокрость”. 2020. 172 с.
- Давыдова Е.В., Гордиенко О.И. Влияние температуры на распределение эритроцитов по индексу сферичности // Біофізичний вісник. 2009. Вып. 23. № 2. С. 114–119.
- До Хью Куэт. Компенсаторно-приспособительные реакции эритроцитов и лейкоцитов рыб на действие температурного фактора // Автореф. дис. ... к.б.н. Белгород. 2016. 20 с.
- До Хью Куэт, Чернявских С.Д., Во Ван Тхань. Действие температурного фактора на морфометрические и физические показатели эритроцитов и полиморфоядерных лейкоцитов *Stenopharyngodon idella* // Науч. результат. Сер. Физиология. 2015. Т. 1. № 3. С. 18–25. doi: 10.18413 / 2409-0298-2015-1-3-18-25
- Жичкина Л.В., Карпенко Л.Ю., Касумов М.К., Скопичев В.Г. Физиология рыб. Книга 1. Физиология крови и кровообращения рыб. Иммунная система рыб. СПб.: Квадро. 2021. 200 с.
- Куклев С.Б., Зацепин А.Г., Подымов А.И. Формирование холодного промежуточного слоя в шельфово-склоновой зоне северо-восточной части Черного моря // Океанологические исследования. 2019. Т. 47. № 3. С. 58–71.
- Куцын Д.Н., Скуратовская Е.Н., Чеснокова И.И. Размерно-возрастная структура, рост и созревание морского ерша *Scorpaena porcus* (Scorpaenidae) из вод Юго-западного Крыма (Черное море) // Вopr. ихтиологии. 2019. Т. 59. № 6. С. 1–7.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа. 1990. 352 с.
- Световидов А.Н. Рыбы Черного моря. 1964. 550 с.
- Солдатов А.А. Влияние температуры на состояние системы красной крови некоторых азово-черноморских рыб // Автореф. дис. ... к.б.н. Ленинград. 1987. 22 с.
- Солдатов А.А. Формирование резервов депо крови в онтогенезе морских рыб // Экология моря. 1992. Вып. 42. С. 46–55.
- Солдатов А.А. Особенности организации и функционирования системы красной крови рыб (обзор) // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2005. Т. 41. № 3. С. 217–223.
- Солдатов А.А., Кухарева Т.А., Андреева А.Ю. и др. Эритроциты циркулирующей крови морского ерша *Scorpaena porcus* L. 1758 в условиях острой экспериментальной гипоксии // Мор. биол. журн. 2018. Т. 3. № 4. С. 92–100.
- Солдатов А.А., Парфенова И.А. Уровень метгемоглобина в крови, устойчивость циркулирующих эритроцитов скорпены *Scorpaena porcus* к осмотическому шоку в условиях экспериментальной гипоксии // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2001. Т. 37. № 6. С. 477–479.
- Точилина Л.В. Морфофизиологическая характеристика крови морских рыб // Биоэнергетика гидробионтов / Ин-т биологии южных морей им. А.О. Ковалевского. Киев: Наукова думка. 1990. С. 166–177.
- Троценко О.А., Субботин А.А. Гидрологические особенности // Абиотические факторы и условия обитания

- гидробионтов прибрежной зоны Юго-восточного Крыма. Симферополь: ИТ “Ариал”. 2018. С. 46–60.
- Чернявских С.Д., До Хью Кует, Во Ван Тхань. Влияние температуры на морфологические и физические показатели эритроцитов и полиморфно-ядерных лейкоцитов *gibelio* Bloch. // Биол. внутр. вод. 2018. № 1. С. 95–99.
- Чернявских С.Д., Недопекина С.В. Сезонные колебания относительной микровязкости, полярности и сорбционной способности эритроцитарных мембран *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda* // Научные ведомости БелГУ. Сер. Естественные науки. 2013. № 3. (146). С. 99–103.
- Andreeva A.Y., Soldatov A.A., Mukhanov V.S. The influence of acute hypoxia on the functional and morphological state of the black scorpionfish red blood cells // In Vitro Cellular and Developmental Biology // Animal. 2017. V. 53. iss. 4. P. 312–319.
- Bartosz G. Erythrocyte aging: Physical and chemical membrane changes // Gerontology. 1991. V. 37. P. 33–67.
- Borgese F., Carsia-Romeu F., Moteis R. Control of cell volume and ion transport by β -adrenergic catecholamines in erythrocytes of rainbow trout *Salmo gairdneri* // J. Physiol. 1987. V. 382. № 1. P. 123144.
- Fänge R., Nilsson S. The fish spleen: structure and function // Experientia. 1985. V. 41. Iss. 2. P. 152–158.
- Manilo L.G., Peskov V.N. Comparative morphometric analysis of the smallscaled scorpionfish, *Scorpaena porcus* (Scorpaenidae, Scorpaeniformes), from the southern coast of the Crimea and eastern part of the Adriatic Sea // Vestnic Zoologii. 2016. V. 50. № 6. P. 533–538.
- Mesa M., Scarcella G., Grati F. et al. Age and growth of the black scorpionfish, *Scorpaena porcus* (Pisces: Scorpaenidae) from artificial structures and natural reefs in the Adriatic Sea // Sci. Mar. 2010. V. 74. № 4. P. 677–685.
- Nikinmaa M. Vertebrate Red Blood Cells. London, Berlin, New York: Springer-Verlag. 1990. 262 p.

Hematological Parameters of Black Scorpionfish *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 under Experimental Hypothermia *in vivo*

Yu. A. Silkin^a, E. N. Silkina^a, M. Yu. Silkin^a, V. E. Vasilets^a

^aVyazemsky Karadag Scientific Station, Federal Scientific Center Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Feodosia, 298187 Russia

The linear dimensions of erythrocytes, their nuclei, the number of cells and hemoglobin in the blood of the black scorpionfish *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 were studied in the autumn-winter period, at water temperatures of 17, 13, 8 and 4°C. The results showed high and relatively equal hemoglobin content and the number of erythrocytes in the blood of black scorpionfish at 17 and 13°C. However, the studied parameters values at a water temperature of 13°C were taken as the physiological norm since this temperature more corresponded with the autumn temperatures of the Karadag coast. Lowering the water temperature in the aquarium to 8°C reduced the hemoglobin level by 25% and the number of erythrocytes by 26% in the blood of *S. porcus*. The linear dimensions of erythrocytes did not change when the temperature dropped to 8°C. At a temperature of 4°C the number of erythrocytes and hemoglobin in the blood of *S. porcus* rapidly decreased by 57% and by 31% respectively, and swelling of erythrocytes was observed. The large diameter of red blood cells increased by 11%, and the small diameter by 25%. The linear dimensions of the nuclei of erythrocytes increased by 12% along the major and minor axes already at a temperature of 8°C. At 4°C, the nuclei of erythrocytes decreased in size, along the major axis by 7%, along the minor axis by 9%, indicating a disruption of the chromatin structure in the nuclear apparatus of the cell. The results obtained made it possible to carry out a clear gradation of the temperature resistance of *S. porcus*. At water temperatures below 8°C, destructive processes occurred in the blood, indicating the exhaustion of protective reserves in this species of fish. The data obtained can be used in fish mariculture as indicators of resistance to temperature factors.

Keywords: linear dimensions, erythrocytes, cell nuclei, hemoglobin, temperature, fish