

УДК 639.21:574.24:591.111.3

**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА КОАГУЛЯЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ
ПЛАЗМЫ КРОВИ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*Oncorhynchus mykiss*),
ОБЫКНОВЕННОГО КАРПА (*Cyprinus carpio*) И АФРИКАНСКОГО
КЛАРИЕВОГО СОМА (*Clarias gariepinus*) *in vitro***

© 2024 г. Д. И. Березина^{а, *}, Л. Л. Фомина^а, Т. С. Кулакова^а,
К. Э. Моданова^а, В. В. Попова^б

^аВологодская государственная молочно-хозяйственная академия им. Н.В. Верещагина, Вологда, Россия

^бОбщество с ограниченной ответственностью “Аквакультура”, Череповец, Россия

*e-mail: vetxwork@gmail.com

Поступила в редакцию 30.11.2023 г.

После доработки 07.01.2024 г.

Принята к публикации 10.01.2024 г.

Проанализированы данные коагулограмм радужной форели *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), африканского клариевого сома *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) и обыкновенного чешуйчатого карпа *Cyprinus carpio* (L., 1758), полученные клоттинговыми методами при температурах инкубации плазмы 43°C, 40°C, 37°C, 24°C, 28°C и 18°C. Выявлено, что у сома и карпа в активации свертывания крови преобладает внутренний путь, а у форели основные пути — внутренний и общий. Из всех исследованных рыб по количеству растворимых фибрин-мономерных комплексов лидировала форель. Установлены гипо- и гиперкоагуляционные сдвиги в плазменном гемостазе исследованных видов *in vitro* при низких и высоких температурах реакционной среды. Фибриноген и антитромбин III проявляют термолабильность при температурах, отличных от 37°C. Корреляционно-регрессионный анализ показал, что наиболее тесно связаны с изменением температуры протромбиновое время (на 50%) у карпа, и активность фибриногена и антитромбина III (на 77 и 52% соответственно) у сома. Выявленные закономерности могут стать основой для определения границ термической адаптации рыб и разработки биомаркеров теплового стресса.

Ключевые слова: рыбы, кровь, коагуляция, гемостаз, температура

DOI: 10.31857/S0320965224050127, **EDN:** XQSWIQ

ВВЕДЕНИЕ

Гемостаз — сложный защитный механизм сохранения жидкого состояния крови у позвоночных, включающий множественные взаимозависимые действия между тромбоцитами, эндотелием сосудов и плазменными белками. Плазменно-коагуляционное звено (вторичный гемостаз) представляет собой каскад протеолитических реакций, главная цель которого — формирование фибринового сгустка (Тюкавин, 2021). Очевидно, нарушения в одном или нескольких компонентах этой сложной системы могут приводить к обильным кровотечениям или тромбозам у животных.

Основные механизмы свертывания крови хорошо исследованы у высших животных и человека, но значительно меньше у низших позвоноч-

ных, в том числе у рыб. В связи с особенностями среды обитания и эволюционной ступени вопрос изучения основных механизмов их гемокоагуляции становится актуальным. Генетическая и эволюционная картины функционирования гемостатического каскада рыб достаточно полны (Jagadeeswaran, Sheehan, 1999; Jiang, Doolittle, 2003; Jagadeeswaran et al., 2007; Doolittle, 2009; Kim et al., 2009), а *Danio rerio* (Hamilton, 1822) используется как генетическая модель в современных медицинских коагулологических исследованиях (Jagadeeswaran et al., 2005). Также дана клинико-диагностическая характеристика свертывания крови некоторых видов костистых рыб (Doolittle, Surgenor, 1962; Van Vliet, 1985; Lewis, 1996; Tavares-Dias, Oliveira, 2009). Согласно этим данным, свертывание крови происходит по одной и той же фундаментальной схеме у всех позвоночных, а факторы свертывания крови рыб аналогичны таковым у млекопитающим, за исключением определенной степени видоспецифичности белков.

Сокращения: АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время, ПВ — протромбиновое время, ТВ — тромбиновое время.

Такая специфичность затрудняет количественное измерение многих компонентов свертывания крови и их качественную идентификацию. Также эти исследования выявили различия во времени свертывания и содержания определенных факторов свертывания крови у различных групп рыб и подчеркнули необходимость использования проверенных и однотипных процедур (например, природы используемого тромбопластина, вида лабораторной посуды) в исследованиях гемостаза этих гидробионтов.

Известно (Tavares-Dias, Oliveira, 2009; Жичкина и др., 2017), что время свертывания крови у рыб короче, чем у млекопитающих, вероятно, из-за высоких уровней некоторых компонентов коагуляции. Ускорителем процесса также может служить кожная слизь, в которой содержится, как предполагается, большое количество тромбопластина (тканевого фактора) (Кудряшов, 1960; Головина, 1996; Ботязова, 2000; Жичкина, 2017). Важно отметить, что тромбоциты рыб играют центральную роль во внутреннем преобразовании протромбина в тромбин и ответственны за ретракцию сгустка (Doolittle, Surgenor, 1962; Doolittle, 2009).

Некоторые данные коагулограмм, полученных с помощью рутинных лабораторных скрининговых тестов, охватывают небольшое количество пресноводных видов: мозамбикская тиляпия *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) (Smit, Schoonbee, 1988), карп обыкновенный *Cyprinus carpio* (L., 1758) (Fujikata, Ikeda, 1985a, 1985b, 1985c; Kawatsu, 1986; Kawatsu, Sato, 1987; Kawatsu, Kondo, 1989; Kawatsu et al., 1989, 1991; Jung, Kawatsu, 1994; Jung, Kawatsu, 1995a, 1995b; Березина, Фомина, 2022; Berezina, Fomina, 2022), радужная форель *Onchorynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Ruis, Bayne, 1997), нильская тиляпия *Oreochromis niloticus* (Peters, 1852) (Berezina, Fomina, 2022) и американский сомик *Ameiurus nebulosus* (Lesueur, 1819) (Langdell, 1965), а также морских видов рыб (Pavlidis et al., 1999). Перечисленные и другие исследования показывают, что свертывающая активность крови у рыб зависит от очень многих факторов: температуры, болезни, истощения, токсических веществ, антикоагулянтов, стресса. Наши исследования (Berezina, Fomina, 2022) подтверждают огромную вариабельность параметров коагуляции у рыб различных классов и видов и указывают на преобладание общего и внешнего путей активации гемокоагуляции у костно-хрящевых рыб (Chondrostei), тогда как функциональность внутреннего пути у костистых (Teleostei) варьируется между различными группами рыб. Важно подчеркнуть, что из-за отсутствия стандартизации используемых методик некоторые вопросы структурно-функциональной организации свертывания крови у рыб остаются открытыми.

Исследование влияния температурного фактора на коагуляционную активность крови у рыб актуально по нескольким причинам: во-первых,

в целях адаптации существующих скрининговых тестов, созданных в гуманной медицине; во-вторых, для уточнения знаний о реактивности коагуляционного ответа пойкилотермных рыб в ответ на гипо- и гипертермию.

Температура является вторым по важности после кислорода фактором водного образа жизни. Рыбы испытывают в природных условиях непрерывные колебания температуры, и воздействие колебаний температур на рыб может проявляться по-разному в зависимости от характера колебаний (Смит, 1986). В настоящих условиях потепления климата экстремным и стрессовым рыбам необходимо справляться с постепенным повышением температуры среды обитания и с увеличением частоты резких колебаний температуры. Также рыбы могут подвергаться резкому понижению температуры воды в результате естественных или антропогенных термоклинов.

Биохимически катализируемые реакции в организме любого животного имеют тенденцию протекать медленнее при низких температурах и быстрее при более высоких, вплоть до начала денатурации белков, после чего скорость реакции быстро снижается (Evans et al., 2014). Помимо этого, тепловой стресс, как и любой другой вид стресса, у рыб сопровождается выделением гормонов стресса — кортизола и катехоламинов, адреналина и норадреналина. Наличию коагуляционных сдвигов под влиянием гормонов стресса у *Cyprinus carpio* и *Oreochromis niloticus* посвящены наши более ранние исследования (Berezina et al., 2020; Березина, 2021).

Кровь, в том числе система гемостаза, — наиболее лабильная система и достаточно быстро реагирует на различные изменения, происходящие в окружающей среде. Известно, что при повышении температуры тела у животных и человека происходит резкая активация свертывающей системы крови (Николаев, 2016), тогда как при снижении — регистрируют как гипер-, так и гипокоагуляционные сдвиги (Лычева и др., 2017). Предполагается, что ферменты, принимающие участие в свертывании крови рыб, способны работать в более широком диапазоне температур, чем у теплокровных видов, поскольку температура их тела тесно связана с изменчивой температурой воды (Ботязова, 2000).

Цель данной работы — исследовать функциональное состояние плазменного гемостаза рыб стандартными клоттинговыми методами и установить закономерности в реагировании этой системы на воздействие термического фактора *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подробной клинко-диагностической характеристике параметров коагулограммы посвящена наша более ранняя работа (Березина, Фомина, 2022).

Опыт проводили в региональном центре развития аквакультуры “АкваБиоЦентр” Вологодской Государственной молочно-хозяйственной академии им. Н.В. Верещагина. В исследовании использовали кровь здоровых особей радужной форели *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) ($n = 15$) массой 800–1000 г (без половой идентификации), выращенных в ООО “Аквакультура” (Моткозеро Белозерского р-на Вологодской обл.); здоровых особей африканского клариевого сома *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) ($n = 10$) массой 200–1000 г (без половой идентификации), выращенных в “АкваБиоЦентре” Вологодской государственной молочно-хозяйственной академии им. Н.В. Верещагина; особей обыкновенного чешуйчатого карпа *Cyprinus carpio* ($n = 15$) массой 800–1000 г (без половой идентификации), выращенных в рыболовном хозяйстве ООО “Рыбоводарная фирма “Диана” (Вологодская обл.). Отбор проб крови проводили пункцией гемального канала в пробирки из силиконизированного стекла, содержащие 3.8%-ный раствор цитрата натрия в соотношении 1 : 9. Объектом исследования была бедная тромбоцитами плазма. До взятия крови рыб анестезировали, добавляя в воду гвоздичное масло в концентрации 0.033 мл/л (Namackova et al., 2006) и выдерживая в ней 15 мин.

Для определения показателей плазменно-коагуляционного гемостаза рыб использовали коагулометр “Thrombostat” (Behnk Elektronik, Германия) со стандартным температурным режимом 37°C (Фомина и др., 2017) и термостат медицинский водяной ELMi TW-2 с установленными температурами: 43°C, 40°C, 28°C (для *Clarias gariepinus*), 24°C и 18°C. Применяли медицинские наборы: “Тромбо-тест”, “Техпластин-тест”, “АПТВ-тест”, “РФ-МК-тест планшетный вариант”, “Хромотех-Анти-

тромбин” (ООО Технология-Стандарт, Россия) и активность фибриногена (НПО РЕНАМ, Россия). Все исследования проводили в соответствии с инструкциями к реагентам.

Данные представлены в виде среднего значения и его стандартной ошибки ($M \pm m$). Нормальность распределения оценивали при помощи критерия Шапиро–Уилка. Для оценки достоверности различий параметров между видами в парных независимых выборках использовали критерий Манна–Уитни, для различий параметров при разных температурах в множественных зависимых выборках — критерий Вилкоксона. Силу парной линейной связи между переменными оценивали при помощи непараметрического коэффициента корреляции Спирмана (R). Качественную интерпретацию силы связи между показателями коагулограммы и температурой инкубации плазмы выполняли на основе шкалы Чеддока. Влияние температурного фактора оценивали с помощью теоретического коэффициента детерминации (R^2). Статистическую значимость коэффициентов корреляции проверяли с помощью статистического критерия Фишера (однофакторный дисперсионный анализ, One-way ANOVA) (Шихова, 2017).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе описания полученных результатов дан их сравнительный межвидовой анализ при стандартизированной для клоттинговых тестов температуре, равной 37°C. Нарушения конечного этапа свертывания (по общему пути) определяют с помощью измерения ТВ, а ПВ характеризует гемокоагуляцию по внешнему пути (путь тканевой активации). В процессе сравнения коагулограмм (табл. 1) достоверно выявля-

Таблица 1. Коагулограмма рыб при различных температурах инкубации плазмы

<i>T</i>	Вид	ТВ, с	ПВ, с	АЧТВ, с	Активность фибриногена, с	Активность антитромбина III, с
18 (а)	<i>O. mykiss</i>	91.76 ± 43.46 [#]	>250 ^{#°б}	34.64 ± 1.66 ^{#вд}	—	—
	<i>C. gariepinus</i>	>1000 [°]	>1000 [°]	425.00 ± 73.06 ^{°бвгд}	>300 [°]	—
	<i>C. carpio</i>	10.99 ± 1.47 ^{#бвгд}	23.27 ± 2.03 ^{#бвгд}	42.93 ± 4.94 ^{#бвгд}	28.17 ± 1.96 ^{#вг}	45.20 ± 8.48 ^{бвг}
24/28 (б)	<i>O. mykiss</i>	30.16 ± 1.16 ^{#вд}	98.39 ± 12.39 ^{#°авд}	31.64 ± 7.20 ^{#°вд}	21.39 ± 2.30 ^{#°в}	—
	<i>C. gariepinus</i>	>1000 [°]	>1000 [°]	189.46 ± 65.97 ^{°°а}	>300 [°]	297.40 ± 57.03 ^в
	<i>C. carpio</i>	26.62 ± 5.18 ^{#авгд}	11.47 ± 0.80 ^{#°авгд}	25.73 ± 2.74 ^{#°авгд}	25.83 ± 1.60 ^{#°вгд}	82.46 ± 10.77 ^{авгд}
37 (в)	<i>O. mykiss</i>	15.87 ± 1.44 ^{#°бд}	>250 ^{#°б}	15.21 ± 0.43 ^{#°абд}	14.18 ± 2.85 ^{бс}	—
	<i>C. gariepinus</i>	>1000 [°]	>1000 [°]	153.88 ± 52.49 ^{°°а}	7.03 ± 0.85 ^{°°г}	3.70 ± 0.11 ^{°б}
	<i>C. carpio</i>	535.13 ± 127.76 ^{°абгд}	212.74 ± 24.42 ^{°°абгд}	14.22 ± 1.20 ^{#°абг}	19.65 ± 1.25 ^{#°абд}	17.84 ± 1.84 ^{#°аб}
40 (г)	<i>C. gariepinus</i>	>1000 [°]	>1000 [°]	132.69 ± 68.39 ^{а°}	33.24 ± 8.09 ^в	—
	<i>C. carpio</i>	187.97 ± 12.89 ^{#°авд}	150.34 ± 13.01 ^{#°авд}	11.00 ± 0.99 ^{#°авв}	18.55 ± 0.57 ^{абд}	22.02 ± 2.42 ^{аб}
43 (д)	<i>O. mykiss</i>	12.84 ± 0.90 ^{#°бв}	>250 ^{#°б}	>250 ^{#°авв}	—	—
	<i>C. gariepinus</i>	>1000 [°]	>1000 [°]	96.70 ± 26.60 ^{°°а}	74.35 ± 2.96 [°]	—
	<i>C. carpio</i>	90.77 ± 10.39 ^{#°абвг}	670.93 ± 49.43 ^{#°абвг}	14.27 ± 1.43 ^{#°аб}	26.02 ± 2.66 ^{#°бвг}	27.95 ± 5.73 ^б

Примечание. *T* — температура инкубации плазмы, °C; а–д — значимые различия между значениями при разных температурах инкубации плазмы ($p \leq 0.05$).

* — значимые различия со значением *Oncorhynchus mykiss* ($p \leq 0.05$), # — значимые различия со значением *C. gariepinus* ($p \leq 0.05$);

° — значимые различия со значением *Cyprinus carpio* ($p \leq 0.05$).

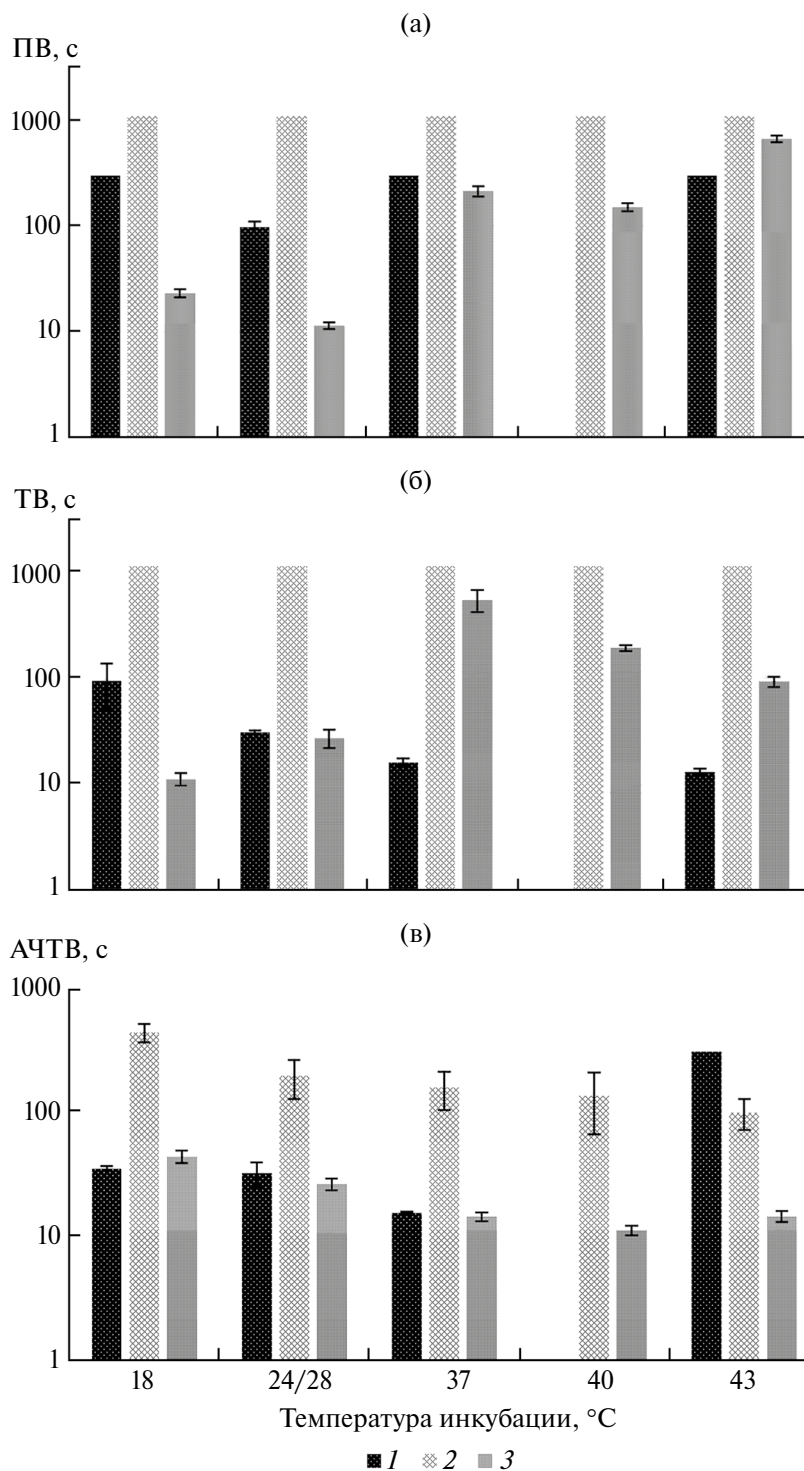


Рис. 1. ПВ (а), ТВ (б) и АЧТВ (в) при различных температурах инкубации плазмы. 1 – *Oncorhynchus mykiss*, 2 – *Clarias gariepinus*, 3 – *Cyprinus carpio*.

ны крайне удлиненные ТВ и ПВ у африканского клариевого сома по сравнению с обыкновенным карпом и радужной форелью. Также достоверно высокие значения ПВ были получены у радужной форели (рис. 1а), однако ТВ оказалось наиболее коротким по сравнению с остальными видами рыб. Эффективность внутреннего (путь контак-

ной активации) и общего путей свертывания, оцениваемая по АЧТВ, у радужной форели и обыкновенного карпа достоверно в 10 раз выше, чем у африканского клариевого сома (рис. 1в). Активность фибриногена – показатель, отражающий способность превращения фибриногена в фибрин под влиянием человеческого тромбина в

условиях разной температуры. У обыкновенного карпа при 37°C эта активность была достоверно выше на 64% по сравнению с африканским клариевым сомом и на 28% по сравнению с радужной форелью (рис. 2а). Активность антитромбина III отражает способность этого белка инактивировать факторы свертывания. Антикоагуляционные свойства крови при 37°C у африканского клариевого сома достоверно на 79% более выражены по сравнению с обыкновенным карпом (рис. 2б).

На втором этапе анализа наблюдений определен коагулологический ответ на изменение температуры реакционной среды (плазмы) у рыб с различным термобиологическим статусом. Анализируя свертывающую активность крови радужной форели, можно проследить ускорение ТВ по мере увеличения температуры инкубации в 7.1 раза. При исследовании ПВ зарегистрировано отсутствие или крайне сильное удлинение процесса свертывания как при увеличении, так и при уменьшении температуры инкубации. Длитель-

ность АЧТВ у этого вида рыб при минимальной температуре 18°C в 2.2 раза больше, чем при стандартной для данной методики (37°C), а при najwyżшей (43°C) можно наблюдать неактивность коагуляционных процессов. Скорость преобразования фибриногена у радужной форели оценивали при 24°C и 37°C, разница между которыми заключалась в замедлении этого процесса на 33% из-за уменьшения температуры инкубации.

Динамика ТВ и ПВ в ответ на изменение температурной среды у африканского клариевого сома *in vitro* отсутствовала. Самое длительное АЧТВ зафиксировано при температуре 18°C, и прямо пропорционально ускорялось по мере увеличения температуры до 43°C, образовав разницу в 4.4 раза. Аналогичная картина характерна и для активности фибриногена. При низких температурах активность фибриногена была чрезвычайно низкой, и крайнее ускорение перехода этого белка в нерастворимую форму происходило с повышением температуры инкубации от общеупотребимой (37°C),

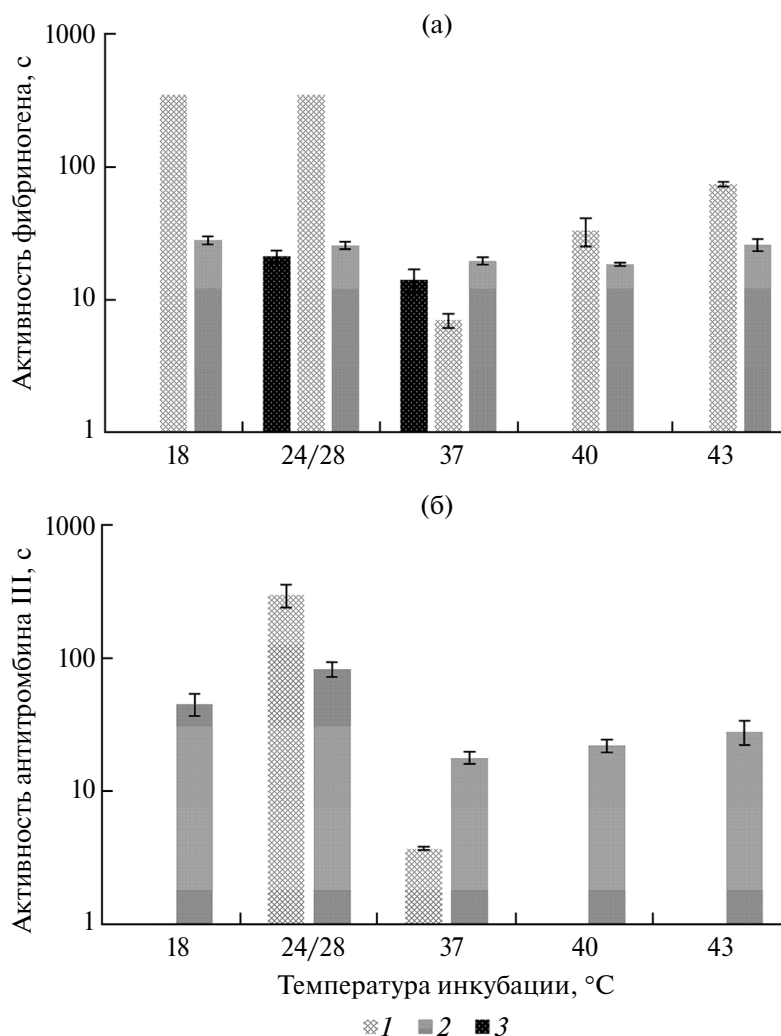


Рис. 2. Активность фибриногена (а) и антитромбина III (б) у рыб при различных температурах инкубации плазмы. Обозначения, как на рис. 1.

разница была в 10.5 раз. Активность антифibrиногена (АТ III) при 28°C в 80.3 раза превышала таковую при стандартной температуре (37°C).

В плазме обыкновенного карпа возникал комплекс гипер- и гипокоагуляционных реакций в процессе изменения температуры. Самое длительное ТВ зафиксировано при стандартной температуре (37°C), тогда как с ее уменьшением до 18°C или увеличением до 43°C оно сокращалось в 49 и 6 раз соответственно. Также отмечено общее удлинение ПВ от низких температур к высоким в 29 раз. Напротив, АЧТВ в 3 раза сокращалось с повышением температуры инкубации плазмы, минимум зафиксирован при 40°C. Активность фибриногена при падении или подъеме температуры линейно снижалась на 30.2 и 24.4% соответственно относительно минимума при 37°C. Наибольшую активность антифibrиноген III у обыкновенного карпа проявлял в диапазоне 18–24°C, наименьшую – в 37–43°C.

Также выявлена разница в содержании промежуточных продуктов распада фибринового сгустка вследствие фибринолиза, называемых фибрин-мономерными комплексами (РФМК). Их количество, определенное при температуре 22–24°C, у радужной форели и карпа достигало 91.76 ± 43.46 и 7.47 ± 1.09 соответственно. Количество РФМК форели было достоверно наибольшим из всех исследованных нами ранее рыб (Berezina, Fomina, 2022). В крови сома зафиксировано отсутствие РФМК.

На третьем этапе обработки данных выявлена связь параметров коагулограммы с температурным фактором, и оценены качество и значимость полученных корреляций. Корреляционно-регрессионный и однофакторный дисперсионный анализы показали, что степень влияния температурного фактора на изучаемые параметры у разных видов рыб неодинакова и разнонаправлена. Наиболее тесные ($R = 0.7–0.9$) достоверные зависимости были получены у двух видов рыб: положительная связь между температурой и ПВ у обыкновенного карпа ($R = 0.8$), а также отрицательная связь между температурой и активностью фибриногена ($R = -0.7$) и антифibrиногена III ($R = -0.8$) у африканского клариевого сома. У форели тесных достоверных связей не было выявлено. Поля указанных корреляций даны на рис. 3. Основываясь на полученных зависимостях и теоретическом коэффициенте детерминации, можно утверждать, что ПВ у карпа на 50% зависит от температуры инкубации плазмы. Для показателей активности фибриногена и антифibrиногена III сома были характерны доли влияния температуры в 77 и 52% соответственно.

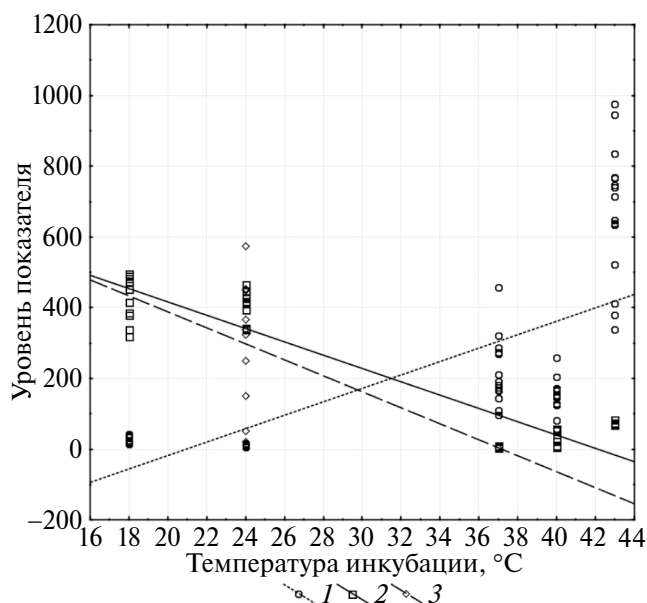


Рис. 3. Регрессионная модель корреляции между температурой инкубации плазмы и ПВ у *Cyprinus carpio* (1), активностью фибриногена (2) и антифibrиногена III (3) у *Clarias gariepinus*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При интерпретации полученных данных необходимо учитывать, что не существует стандартизированных температурных условий при проведении коагулологических анализов у рыб. По-видимому, следует принимать “зону температурного комфорта” того или иного вида как более корректную при оценке физиологических реакций. Для форели она находится в пределах 10–18°C (Григорьев, Седова, 2008), для обыкновенного карпа – 20–24°C (Oyugi et al., 2012), и для африканского клариевого сома – 25–30°C (Ярмош, 2020). Однако при проведении сравнительных межвидовых исследований актуален вопрос, какую температуру инкубации принимать как стандартную с учетом подтвержденной термальной реактивности коагуляционных процессов. Вместе с тем, в исследованиях гемостаза важен правильный подбор лабораторной посуды (Kawatsu, 1986; Smit, Schoonbee, 1988) и вида тканевого фактора, из-за которых получаемые значения могут различаться (Langdell, 1965; Kawatsu, Kondo, 1989). Например, множество авторов подчеркивают, что использование тромбопластина мозга рыб в исследованиях сильно ускоряет формирование сгустка (Smit, 1988; Lewis, 1996; Pavlidis et al., 1999; Tavares-Dias, Oliveira, 2009).

С учетом настоящих и наших предыдущих исследований (Березина, Фомина, 2022) неактивность коагуляционного гемостаза у африканского клариевого сома весьма сходна с таковой

обыкновенного карпа, где ТВ и ПВ были достаточно длинными. Короткое относительно них АЧТВ свидетельствует о преобладании внутренней активации свертывания. Исходя из данных коагулограммы форели, активность гемостаза по общему пути у форели является основной. Нельзя точно сказать о видоспецифичности строения собственных белков каскада коагуляции (тканевый фактор, тромбин) исследованных видов рыб, поскольку воздействие стресса (Березина, 2021) показало активацию коагуляционного процесса у карпа и тиляпии с использованием тех же реактивов. Однако при использовании аутореагентов вероятно ускорение свертывания.

В описании методик исследований гемокоагуляции у рыб температура инкубации в основном устанавливается согласно утвержденной для медицинских наборов (37°C), либо равна комнатной (22–24°C) или вовсе не указывается, однако есть немногочисленные данные о вариативности температур. Известно, что кровь антарктических рыб, способных жить при температуре ~0°C (*Pagothenia borchgrevinki* и *Salmo gairdnerii*), быстро сворачивается в холоде, и скорость свертывания увеличивается при нагреве до 25°C, после чего процесс свертывания инактивируется (Feeney et al., 1972). В этой же работе указано, что наименьшее время коагуляции у *Cyprinus carpio* — при температуре от 26°C до 42°C, после чего процесс прекращается. В работе (Langdell et al., 1965) авторы, определяя коагуляционную активность крови *Ameiurus nebulosus* при 28°C, отмечают, что плазма рыбы быстро разрушается при более высоких температурах. Также, помимо времени свертывания крови, имеются описания коагулограмм рыб (ПВ, АЧТВ, время рекальцификации). По данным (Kawatsu, 1986), цитратная плазма *Cyprinus carpio* теряет свертывающую активность в течение 12 ч при инкубации при 37°C, тогда как при 25°C свертывающая активность поддерживается в течение долгих часов. Автор делает вывод о хорошо развитом внутреннем пути активации коагуляции у карпа и предполагает наличие двух или более термолабильных факторов свертывания крови в его плазме, которые быстро разрушаются при высокой температуре. В работе (Smit, Schoobee, 1988) не выявлено различий в активности протромбина у *Oreochromis mossambicus* и *Cyprinus carpio* при 25°C и 34°C.

Повышение свертывающей активности крови (времени свертывания) также было зафиксировано в результате воздействия теплового стресса на *Oreochromis mossambicus* и объяснено увеличением количества тромбоцитов и катализом превращения фибриногена в фибрин (Zaragoza et al., 2008). Аналогичные изменения в гемокоагуляции

Oncorhynchus mykiss под влиянием термического шока и других стрессоров отмечают другие авторы (Ruis, Bayne, 1997). Судя по этим данным, система свертывания крови также участвует в общей реакции рыб на стресс. Фактическая кровопотеря, по-видимому, не является необходимой для повышения активности механизма гемостаза. Внутрисосудистое свертывание крови — проблема, встречающаяся у млекопитающих из-за дисфункции противосвертывающих и фибринолитических механизмов, может быть особенно важной и в белых мышцах рыб с плохой перфузией, где тромбообразование способно усугубляться застоем крови. Об этом свидетельствует сохранение гиперкоагуляции у *Salmo gairdneri* в течение 5 ч после действия стрессора при нормальном уровне тромбоцитов (Casillas, Smith, 1977). В обоих исследованиях авторы приходят к заключению, что изменения в свертывающей системе крови служат чувствительными индикаторами сублетальных стрессов у рыб.

Наши наблюдения частично подтверждают вышеуказанные эффекты у млекопитающих и рыб. Обобщенные данные свидетельствуют об активации свертывающих процессов при нагреве реакционной среды по общему и внутреннему путям коагуляции у форели, и только по внутреннему — у сома и карпа. В то же время, увеличение температуры плазмы угнетает свертывание (гипокоагуляция) по общему и внешнему путям у карпа. Крайне высокие (43°C) температуры инактивируют или сильно замедляют активацию гемостаза по внутреннему пути у форели, а относительно быстрое превращение протромбина в тромбин у этого вида рыб происходит исключительно при 24°C. Наибольшая активность фибриногена и антитромбина у всех видов рыб наблюдается при ~37°C, отклонение от нее приводит к угнетению разной степени, что, вероятно, вызвано частичным разрушением этих белков или видоспецифичностью тромбина, используемого в лабораторных тестах.

Учитывая вышеизложенное, очевидно, что изменение климата негативно повлияет на продуктивность рыб, увеличивая частоту экстремальных температурных явлений, которые будут иметь острые физиологические последствия. В это число входит также дисбаланс функционирования системы гемостаза и других параметров гемодинамики.

Полученные экспериментальные данные, характеризующие реактивность плазменного гемостаза рыб, можно использовать для разработки лабораторных клоттинговых тестов, адаптированных для экологии, ихтиологии и рыбоводства.

Выявленные закономерности, если они будут подтверждены *in vivo*, также послужат основой для более глубокого понимания термоустойчивости организма рыб и разработки биомаркеров теплового стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При определении гемостатического статуса лабораторными скрининговыми методами установлено, что у африканского клариевого сома и обыкновенного карпа в активации свертывания крови преобладает внутренний (контактный) путь, у радужной форели активация идет по общему и внутреннему путям. Количество промежуточных продуктов распада фибринового сгустка вследствие фибринолиза у форели наибольшее из исследованных рыб, у сома они отсутствуют. Также описанные гемостазиологические картины свидетельствуют о выраженном влиянии температуры на активность коагуляции *in vitro*. При нагреве она растет или снижается у всех видов рыб с различной выраженностью ответа тех или иных механизмов. Крайне высокие температуры инактивируют или сильно замедляют активацию гемостаза по внутреннему и внешнему путям у форели и по внешнему — у карпа. Вместе с тем, фибриноген и антитромбин III проявляют термолабильность при температурах, отличных от 37°C. Выявлены наиболее зависимые от температуры реакционной среды параметры коагулограммы: тесная положительная связь протромбинового времени с нагревом у карпа, (причем изменение этого параметра на 50% можно объяснить влиянием температурного фактора); тесная отрицательная связь активности фибриногена и антитромбина у сома — эти параметры на 77 и 52% соответственно зависят от температуры. Выявленные закономерности следует учитывать при определении границ термоустойчивости рыб и разработки биомаркеров теплового стресса.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование проведено при финансовой поддержке Российского научного фонда № 23-26-00115, <https://rscf.ru/project/23-26-00115>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Березина Д.И. 2021. Гематологические показатели рыб при индуцированном стрессе: Дис. ... канд. биол. наук: 06.02.01. Вологда; Молочное.
- Березина Д.И., Фомина Л.Л. 2022. Влияние аналогов кортизола на показатели вторичного гемостаза

карпа *Cyprinus carpio* // Биология внутр. вод. № 5. С. 586.
<https://doi.org/10.31857/S0320965222050047>

- Ботязова О.А. 2000. Физиология системы крови: сравнительные, экологические и эволюционные аспекты: Уч. пособие. Ярославль: Ярослав. гос. ун-т.
- Головина Н.А. 1996. Морфофункциональная характеристика крови рыб — объектов аквакультуры: Дис. ... докт. биол. наук: 03.00.10. М. 228 с.
- Григорьев С.С., Седова Н.А. 2008. Перспективы товарного лососеводства на Камчатке // Рыбоводство и рыбное хозяйство. № 12. С. 2.
- Жичкина Л.В., Карпенко Л.Ю., Касумов М.К., Скопичев В.Г. 2017. Физиология рыб. Книга 1. Физиология крови и кровообращения рыб. Иммунная система рыб. СПб.: Квадро.
- Журашова Б.А. 1960. Проблемы свертывания крови и тромбообразования. М.: Высш. шк.
- Лычева Н.А., Шахматов И.И., Киселев В.И. 2017. Влияние среды охлаждения на состояние системы гемостаза у крыс // Бюллетень сибирской медицины. Вып. 16(1). С. 50.
- Николаев В.Ю. 2016. Состояние системы гемостаза при общем перегревании у крыс: Дис. ... канд. мед. наук: 03.03.01. Барнаул.
- Смит Л.С. 1986. Введение в физиологию рыб: сокращ. пер. с англ. В.И. Лапина. М.: Агропромиздат. (Smith L.S. 1982. Introduction to fish physiology. TFH.).
- Тюкавин А.И., Черешнев В.А., Яковлев В.Н., Гайворонский И.В. 2021. Физиология с основами анатомии: Учебник. М.: ИНФРА-М.
- Фомина Л.Л., Кулакова Т.С., Березина Д.И. 2017. Определение активности плазменно-коагуляционного звена системы гемостаза рыб клоттинговыми методами с использованием коагулометра // Актуальные вопросы вет. биологии. Т. 35. № 3. С. 54.
- Шихова О.А. 2017. Математическая биостатистика: Методические указания и индивидуальные задания. Вологда; Молочное: ФГБОУ ВО Вологодская ГМХА.
- Ярмош В.В. 2020. Клариевый сом — перспективный объект индустриального рыбоводства: монография. Пинск: ПолесГУ.
- Berezina D.I., Fomina L.L., Goreva A.D. 2020. Effect of stress factors on the coagulogram of common carp, *Cyprinus carpio* // Biosci. Biotechnol. Res. Asia. V. 17. № 3. P. 629.
- Berezina D.I., Fomina L.L. 2022. Comparative physiological aspects of plasma hemostasis of some commercial fish species // Egyptian J. Aquat. Biol. and Fish. V. 25. № 6. P. 33.
- Casillas E., Smith L.S. 1977. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // J. Fish Biol. V. 10(5). P. 481.

- Doolittle R.F., Surgenor D.M. 1962. Blood coagulation in fish // Amer. J. Physiol.—Legacy Content. V. 203. № 5. P. 964.
- Doolittle R.F. 2009. Step-by-step evolution of vertebrate blood coagulation // Cold Spring Harbor Laboratory Press. V. 74. P. 35.
- Evans D.H., Claiborne J.B., Currie S. 2014. The physiology of fishes. USA, FL. CRC Press.
- Feeney R.E., Vandenheede J., Osuga D.T. 1972. Macromolecules from cold-adapted antarctic fishes // Die Naturwissenschaften. V. 59. № 1. P. 22.
- Fujikata A., Ikeda Y. 1985b. Effect of handling on blood coagulation in carp (*Cyprinus carpio*) // Bull. Japanese Soc. Sci. Fish. V. 51. P. 1093.
- Fujikata A., Ikeda Y. 1985c. Relation between blood-coagulation and thrombocyte in carp // Bull. Japanese Soc. Sci. Fish. V. 51. № 10. P. 1613.
- Fujikata A., Ikeda Y. 1985a. Blood-coagulation and clotting tests in carp // Bull. Japanese Soc. Sci. Fish. V. 51. № 6. P. 933.
- Hamackova J., Kouril J., Kozak P., Stupka Z. 2006. Clove oil as an anaesthetic for different freshwater fish species // Bulgarian J. Agricult. Sci. V. 12. № 2. P. 185.
- Jiang Y., Doolittle R.F. 2003. The evolution of vertebrate blood coagulation as viewed from a comparison of puffer fish and sea squirt genomes // Proceedings of the National Academy of Sciences. V. 100. № 13. P. 7527.
- Jung S.H., Kawatsu H. 1994. Russell's viper venom clotting time of common carp plasma // Fisheries Science. V. 60. № 5. P. 511.
- Jung S.H., Kawatsu H. 1995a. Anticoagulant Effects of Warfarin in the Common Carp // Fisheries Sci. V. 61. № 4. P. 653.
- Jung S.H., Kawatsu H. 1995b. Effects of the herbicide molinate on Russell's viper venom clotting time and chromogenic substrate assay for factor x in the plasma of common carp, *Cyprinus carpio* // Aquaculture Sci. V. 43. № 1. P. 153.
- Jagadeeswaran P., Gregory M., Day K. et al. 2005. Zebrafish: a genetic model for hemostasis and thrombosis // J. Thromb. and Haemost. V. 3. № 1. P. 46.
- Jagadeeswaran P., Kulkarni V., Carrillo M. et al. 2007. Zebrafish: from hematology to hydrology // J. Thromb. and Haemost. V. 5. № 1. P. 300.
- Jagadeeswaran P., Sheehan J.P. 1999. Analysis of blood coagulation in the zebrafish // Blood Cells, Molecules, and Diseases. V. 25. № 4. P. 239.
- Kim S., Carrillo M., Kulkarni V. et al. 2009. Evolution of primary hemostasis in early vertebrates // PLoS ONE. V. 4. № 12. e8403.
- Kawatsu H. 1986. Clotting time of common carp blood // Bull. Japanese Soc. Sci. Fish. V. 52. № 4. P. 591.
- Kawatsu H., Kondo K., Kubono K. 1989. Hemostatic disorder in common carp induced by exposure to the herbicide molinate // Nippon Suisan Gakkaishi. V. 55. № 5. P. 779.
- Kawatsu H., Kubono K., Wakabayashi T. 1991. Effect of oral administration of warfarin on blood coagulation in the common carp // Nippon Suisan Gakkaishi. V. 57. № 4. P. 619.
- Kawatsu H., Sato M. 1987. Effect of glass contact on the clotting time of carp blood // Nippon Suisan Gakkaishi. V. 53. № 9. P. 1533.
- Kawatsu H., Kondo K. 1989. Prothrombin time of common carp blood // Nippon Suisan Gakkaishi. V. 55. № 1. P. 183.
- Lewis J.H. 1996. Comparative hemostasis in vertebrates. N.Y.: Springer Science & Business Media.
- Langdell R.D., Bryan F.T., Gibson Jr.W.S. 1965. Coagulation of catfish blood // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. V. 118. № 2. P. 439.
- Oyugi D.O., Cucherousset J., Baker D.J. et al. 2012. Effects of temperature on the foraging and growth rate of juvenile common carp, *Cyprinus carpio* // J. Thermal Biol. V. 37. № 1. P. 89.
- Pavlidis M., Berry M., Kokkari C., Kentouri M. 1999. Prothrombin time, activated partial thromboplastin time and fibrinogen values in Mediterranean marine teleosts // Fish Physiol. and Biochem. V. 21. № 4. P. 335.
- Ruis M.A.W., Bayne C.J. 1997. Effects of acute stress on blood clotting and yeast killing by phagocytes of rainbow trout // J. Aquat. Anim. Health. V. 9. № 3. P. 190.
- Smit G.L., Schoonbee H.J. 1988. Blood coagulation factors in the freshwater fish *Oreochromis mossambicus* // J. Fish Biol. V. 32. № 5. P. 673.
- Tavares-Dias M., Oliveira S.R. 2009. A review of the blood coagulation system of fish // Revista Brasileira de Biociências. V. 7. № 2. P. 205.
- Van Vliet K.J., Smit G.L., Pieterse J.J. et al. 1985. Thromboelastographic diagnosis of blood coagulation in two freshwater fish species // Comp. Biochem. Physiol. V. 82A. № 1. P. 19.
- Zaragoza O.D.R., Rodríguez M.H., Bückle Ramirez L.F. 2008. Thermal stress effect on tilapia *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichlidae) blood parameters // Mar. Freshwater Behav. and Physiol. V. 41(2). P. 79.

**Effect of Temperature on the Coagulation Activity of Blood Plasma
in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*), Common Carp (*Cyprinus Carpio*)
and the African Catfish (*Clarias Gariepinus*) *in vitro***

D. I. Berezina^{1, *}, L. L. Fomina¹, T. S. Kulakova¹, K. E. Modanova¹, V. V. Popova²

¹*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
"Vologda State Dairy Farming Academy by N.V. Vereshchagin"*

²*Limited Liability Company "Aquaculture"*

**e-mail: vetxwork@gmail.com*

Data from coagulograms of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), african sharptooth catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) and common scaly carp *Cyprinus carpio* (L., 1758) obtained by clotting methods at plasma incubation temperatures of 43°C, 40°C, 37°C, 24°C, 28°C and 18°C were analyzed. It was revealed that in catfish and carp the internal pathway predominates in the activation of blood coagulation, and in trout the main ones are the formation of a clot along the internal and general pathways. The amount of soluble fibrin-monomer complexes in trout is the highest of all fish studied. Hypo- and hypercoagulable states in the plasma hemostasis of the studied fish species *in vitro* were established at both low and high temperatures of the reaction medium. Fibrinogen and antithrombin III exhibit thermolabile at temperatures other than 37°C. Correlation and regression analysis showed that the most closely related to changes in temperature in carp are prothrombin time (PT), and the activity of fibrinogen and antithrombin III in catfish. A change in PT of 50% can be explained by the influence of the temperature factor, and the fibrinogen and antithrombin III activity by 77% and 52%, respectively. The identified patterns can become the basis for determining the boundaries of thermal adaptation of fish and developing biomarkers of heat stress.

Keywords: fish, blood, coagulation, hemostasis, temperature