

УДК [597.21.5:612.119]“32”

МОНОЦИКЛИЧНОСТЬ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ЭРИТРОИДНОГО РОСТКА ГЕМОПОЭЗА У КОСТИСТЫХ РЫБ, НА ПРИМЕРЕ *PLATICHTHYS FLESUS* (LINNAEUS, 1758)

© 2023 г. А. А. Солдатов^{1,*}

Представлено академиком РАН Н.Н. Немовой

Поступило 17.04.2023 г.

После доработки 28.04.2023 г.

Принято к публикации 02.05.2023 г.

Исследовали состояние эритрона у камбалы-гlossы (*Platichthys flesus*, Linnaeus, 1758) на протяжении годового цикла. Определяли число эритроцитов в крови и содержание незрелых эритроидных форм: базофильных и полихроматофильных нормобластов в головной почке (пронефрос) и кровяном русле. О пролиферативной активности клеток судили по включению ³H-тимидина в незрелые эритроциты циркулирующей крови. Установлено, что процессы эритропоэза в гемопоэтической ткани камбалы-гlossы протекают нерегулярно. Активная продукция эритроидной массы приурочена в основном к постнерестовому периоду. Об этом свидетельствует увеличение содержания незрелых эритроидных форм в ткани пронефроса и циркулирующей крови, а также рост их пролиферативной активности. Допускается, что это связано с особенностями организации системы красной крови у костистых рыб, которая исключает регулярную продукцию эритропоэтина в почках.

Ключевые слова: эритропоэз, гемопоэтическая ткань, ³H-тимидин, камбала-гlossа, годового цикл

DOI: 10.31857/S2686738923600395, **EDN:** OXAFKG

Общий принцип организации системы красной крови костистых рыб совпадает с высшими позвоночными. В ней выделяется продукционное и деструктивное звено. Продукция клеток красной крови осуществляется преимущественно передними почками (пронефрос) [1], а деструкция старых эритроидных форм происходит в селезенке [2]. Она же выполняет роль депо крови и способна осуществлять срочную коррекцию числа циркулирующих эритроцитов [1, 2]. Процессы контролируются нервно-гуморальным путем. Ключевым фактором является выработка эритропоэтинов. Данные соединения идентифицированы у рыб при помощи методов иммунохимического анализа [3]. Продукция их осуществляется почками [4]. Селезенка иннервируется холинергическими и адренергическими постганглиальными волокнами, которые являются частями чревного нерва [5].

Принципиальным отличием системы красной крови рыб от высших позвоночных является неспособность поддерживать баланс между продукционными и деструктивными процессами на значительном отрезке времени. Содержание эритроцитов в крови у них на протяжении годового цикла претерпевает периодические изменения [6]. Ряд авторов связывают это с температурой воды [7]. Однако это отмечается не во всех случаях [8]. Установлено также, что выработка эритропоэтина в почках рыб коррелирует с уровнем тестостерона в крови [9] и приурочена к нерестовому периоду. При этом продолжительность жизни клеток красной крови у костистых рыб, определенная при помощи ³H-тимидина и флуоресцентных зондов, составила 270–310 дней [10, 11]. Это позволяет допустить нерегулярность течения эритропоэтических процессов в гемопоэтической ткани на протяжении годового цикла.

В исследованиях, выполненных на кефали-сингиле (*Chelon auratus*, Risso, 1810), впервые удалось показать, что активная генерация эритроцитов гемопоэтической тканью приурочена к нерестовому и постнерестовому периодам [12].

¹ФИЦ “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН”, Севастополь, Россия

*e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Таблица 1. Характеристика эритрона камбалы-гlossы на протяжении годового цикла

Состояние организма	Число эритроцитов, млн кл-к мкл ⁻¹	Незрелые эритроидные формы, %		Включение ³ H-тимидина (БН кровь), %
		Пронефрос	Кровь	
Преднерестовое состояние	0.85 ± 0.06 (7)	4.59 ± 0.40 (8)	0.46 ± 0.26 (8)	—
Нерестовое состояние	1.16 ± 0.07 (6)	11.7 ± 0.37 (6)	1.38 ± 0.25 (6)	0.28 ± 0.10 (6)
Постнерестовое состояние	1.43 ± 0.12 (7)	12.7 ± 0.14 (6)	3.69 ± 0.34 (6)	0.75 ± 0.04 (6)
Функциональный покой	1.22 ± 0.09 (7)	7.58 ± 1.43 (6)	1.72 ± 0.72 (6)	—

В скобках указано число особей.

Это обеспечивает разовое поступление клеток в кровотоки, которые сохраняются в системе циркуляции на протяжении года, постепенно старея и подвергаясь процессам деградации (эритролизу). Насколько эта закономерность свойственна другим видам, неясно. В настоящей работе намеренно была взята холодолюбивая камбала-гlossа (*Platichthys flesus*, Linnaeus, 1758), нерест которой приурочен к другому периоду годового цикла (февралю-марту).

Цель исследования — при помощи методов автордиографии и светооптической микроскопии изучить интенсивность эритропоэтических процессов в кроветворной ткани камбала-гlossы на протяжении годового цикла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали взрослых особей камбалы (*Platichthys flesus*, Linnaeus, 1758) обоих полов. Рыбу перевозили в аквариальную в пластиковых баках емкостью 100 л с воздушной аэрацией. После транспортировки животных рассаживали в аквариумы и бассейны объемом 200, 500, 1000 и 1500 л, имеющих естественный проток и освещение, и выдерживали в данных условиях в течение 5–7 сут. В работе использовали подвижных, активно питающихся особей.

Для предотвращения развития состояния манипуляционного стресса за 60–70 мин до отбора проб рыб наркотизировали. В качестве анестезирующего препарата применяли уретан [13]. Кровь получали пункцией хвостовой артерии. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (Рихтер, Венгрия). Образцы передней почки (пронефроса) получали путем вскрытия брюшной полости. Затем изготавливали мазки крови и отпечатки передней почки, которые окрашивали

по комбинированному методу Паппенгейма (Май-Грюнвальд + Романовский-Гимза) [14]. На препаратах определяли относительное содержание незрелых эритроидных форм, находящихся на разных стадиях созревания: эритробластов (ЭБ), базофильных (БН) и полихроматофильных (ПН) нормобластов. Морфологические особенности данных клеточных форм для камбалы-гlossы подробно описаны ранее [15]. Расчет относительного содержания незрелых эритроидных форм для цельной крови проводили с учетом числа зрелых эритроцитов, для головной почки — с учетом клеточных форм всех ростков гемопоэза. Объем выборочных совокупностей составлял 5000 клеток. В работе применяли светооптический микроскоп Biomed PR-2 Lum (Россия), оборудованный камерой Levenhuk C NG Series (Китай). Число эритроцитов в крови подсчитывали в камере Горяева [14].

Для распознавания пролиферирующих групп клеток (S-фаза клеточного цикла) применяли ³H-тимидин [10]. Его вводили внутривентриально в дозе 5.0 мCi·г⁻¹ веса тела за 24 ч до отбора проб крови и образцов пронефроса. После изготовления мазков крови их фиксировали в метиловом спирте, промывали дистиллированной водой и покрывали фотоэмульсией MR (Россия). Препараты выдерживали в течение 3 нед для оптимального развития зерен. Идентификация пролиферирующих эритроидных элементов проводилась при условии, если каждый из них содержал не менее трех зерен на клетку.

При проведении сравнительного анализа применен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) PAST Version 4.09 software [16]. Графически цифровой материал обработан с использованием стандартного пакета Grapher (версия 11).

Результаты представлены как $M \pm m$. Минимальный уровень значимости составлял $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выборочные совокупности, полученные на протяжении годового цикла, ранжировали с шагом в три месяца: ноябрь-январь (преднерестовый период), февраль-апрель (нерестовый период), май-июль (постнерестовый период), август-октябрь (относительный функциональный покой). Результаты представлены в табл. 1.

Число эритроцитов в крови на протяжении года претерпевало значительные изменения. Максимум отмечали в мае-июле, минимум — ноябре-январе. Различия достигали более 40% ($p < 0.01$).

Незрелые эритроидные формы в крови встречались редко и были представлены в основном ПН и БН. Их минимальный уровень отмечали в ноябре-январе, а максимальный — в мае-июле (табл. 1). При этом клетки более ранних генераций (БН) наблюдались в крови только в постнерестовый период. ПН же встречались на протяжении всего года с явным максимумом в мае-июле. Наблюдаемые изменения были статистически значимы ($p < 0.01$). Включение ^3H -тимидина было характерно только для популяции ранних БН, которые попадали кровь из пронефроса. Первые признаки пролиферации отмечали в нерестовый период. Максимум приходился на май-июль. ^3H -тимидин включали исключительно БН. С августа по февраль пролиферирующие формы клеток в крови не были обнаружены.

В пронефросе популяция эритроидного ростка гемопоэза была представлена в основном двумя клеточными формами: ЭБ и БН. Доля ПН была незначительна. Общие размеры очага эритропоэза в головной почке камбал были не постоянны и имели выраженную сезонную динамику. Она полностью совпадала с изменением содержания незрелых эритроидных форм в крови. Максимальные число незрелых эритроидных форм в головной почке отмечали в постнерестовый период (табл. 1). На эритроидные формы приходилось более 13% от остальной клеточной массы отпечатков пронефроса. Минимальные значения были зарегистрированы в ноябре-январе — 4–5%. Различия были статистически выражены ($p < 0.01$).

Из представленной информации видно, что продукция эритроцитов гемопоэтической тканью камбалы-глоссы на протяжении годового цикла протекает не регулярно и совпадает с состоянием нереста. Причину этого отчасти следует искать в особенностях организации системы красной крови костистых рыб и, в частности, ее терминального звена — зрелых эритроцитов. Это клеточные системы, которые по своей морфофункциональной организации близки к соматическим тканям.

В сравнении с высшими позвоночными они имеют более крупные размеры (15–17 мкм), содержат ядро, митохондрии [1, 6]. Цитоплазма их хорошо структурирована. Клетки поддерживают аэробный тип метаболизма. Это определяет более высокую их продолжительность жизни [10, 11] и снижает интенсивность процессов регенерации в системе в целом.

Как известно, продукция эритроцитов гемопоэтической тканью в значительной степени определяется выработкой эритропоэтинов почками [17]. Синтез данного соединения зависит от величины напряжения кислорода в данном органе. В условиях гипоксии повышается выработка HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1-alpha), который является субъединицей гетеродимерного фактора транскрипции эритропоэтина. Данное соединение выявлено и у рыб [18]. Эритропоэтин тормозит апоптоз и усиливает пролиферативную активность колониеобразующих единиц (КОЕ-Э), в частности ЭБ. Возникновение дефицита O_2 может быть следствием нескольких процессов.

- Старение циркулирующей эритроцитарной массы, которое к концу годового цикла (преднерестовый период) должно быть наиболее заметно. Это обычно сопровождается усилением окислительных процессов в клетках, части старых эритроцитов, ростом содержания метгемоглобина, что в целом понижает кислородную емкость крови [1, 6]. В нашем случае число эритроцитов в преднерестовый период достигало минимальных значений — 0.85 ± 0.06 млн кл-к мкл^{-1} . Это более чем на 40% ниже, чем в постнерестовый период и в полной мере соответствует анемичному состоянию, которое должно сопровождаться продукцией эритропоэтина.

- В период нереста, который реорганизует большинство физиологических процессов в организме рыб [19], происходит перераспределение пластических ресурсов в пользу генеративной ткани. В значительной степени это затрагивает циркулирующую кровь и часто сопровождается развитием анемии [20], что ограничивает приток кислорода к почкам и также должно усиливать продукцию эритропоэтина.

- Стимулировать продукцию эритропоэтина могут и половые гормоны, а точнее их производные — 5- β -Н-метаболиты. Подобная корреляция отмечена и у рыб [9].

Сравнительная оценка состояния эритрона камбалы-глоссы, представленная в настоящей работе, с кефалью-сингилом [12] позволяет говорить об общих принципах организации системы красной крови у костистых рыб. В отличие от высших позвоночных система в целом является неравновесной. В ней периодически преобладают то продукционные, то деструктивные процессы, оказывающие влияние на кислородную ем-

кость крови. Выработка эритропоэтина, по-видимому, происходит разово в преднерестовый период и связана с развитием анемичного состояния вследствие разрушения части циркулирующей эритроцитарной массы.

Таким образом, из представленной выше информации следует, что процессы эритропоэза в гемопоэтической ткани камбалы-гlossы протекают нерегулярно. Активная продукция эритроидной массы приурочена в основном к постнерестовому периоду. Об этом свидетельствует увеличение содержания незрелых эритроидных форм в ткани пронефроса и циркулирующей крови, а также рост их пролиферативной активности. Допускается, что это связано с особенностями организации системы красной крови у данного вида, которая исключает регулярную продукцию эритропоэтина в почках.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 23-24-00061.

ЭТИЧЕСКИЕ СТАНДАРТЫ

Этические нормы: все процедуры с использованием рыбы были выполнены в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ (2010/63/EU) и одобрены местным учреждением по уходу и использованию животных (протокол № 28 от 15.02.2018).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Witeska M. Erythrocytes in teleost fishes: a review // *Zoology and Ecology*. 2013. V. 23. Iss. 4. P. 275–281.
2. Sales C.F., Silva R.F., Amaral M.G.C., et al. Comparative histology in the liver and spleen of three species of freshwater teleost // *Neotropical Ichthyology*. 2017. V. 15. № 1 e160041.
3. Chu C.Y., Cheng C.H., Yang C.H., et al. Erythropoietins from teleosts // *Cellular & Molecular Life Sciences*. 2008. V. 65. P. 3545–3552.
4. Kulkeaw K., Sugiyama D. Zebrafish erythropoiesis and the utility of fish as models of anemia // *Stem Cell Research & Therapy*. 2012. V. 3. Iss. 6. P. 55–64.
5. Mahabady M.K., Morovvati H., Arefi A., et al. Anatomical and Histomorphological Study of Spleen and Pancreas in Berzem (*Barbus pectoralis*) // *World Journal of Fish & Marine Sciences*. 2012. V. 4. Iss. 3. P. 263–267.
6. Soldatov A.A. Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system (review) // *Journal Evolutionary Biochemistry & Physiology*. 2005a. V. 41. № 3. P. 272–281.
7. Joshi P.C. Seasonal changes in the blood parameters of a hill-stream teleost, *Channa gachua* // *Comparative Physiology & Ecology*. 1989. V. 14. № 2. P. 71–73.
8. Mahoney J.B., McNulty J.K. Disease-associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson-Raritan Estuary // *Transactions of the American Fisheries Society*. 1992. V. 121. № 2. P. 261–268.
9. Pottinger T.G., Pickering A.D. Androgen levels and erythrocytosis in maturing brown trout, *Salmo trutta* L. // *Fish Physiology & Biochemistry*. 1987. V. 3. № 3. P. 121–126.
10. Золотова Т.Е. Экспериментальное изучение гемопоэза у рыб: Дис.... канд. биол. наук. М.: МГУ; 1989.
11. Fischer U., Ototake M., Nakanishi T. Life span of circulating blood cells in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorffii*) // *Fish & Shellfish Immunology*. 1998. V. 8. P. 339–349.
12. Солдатов А.А. Эритропоэз и концентрация метгемоглобина в крови кефали-сингиля (*Liza aurata*, Risso) на протяжении годового цикла / Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2005. V. 1. С. 182–187.
13. Soldatov A.A. Physiological Aspects of Effects of Urethane Anesthesia on the Organism of Marine Fishes // *Hydrobiology Journal*. 2005b. V. 41. № 1. P. 113–126.
14. Houston A.H. Blood and circulation // *Methods for fish biology*. N.Y.: American Fisheries Society, 1990. P. 273–334.
15. Soldatov A.A. The effect of hypoxia on red blood cells of flounder: a morphologic and autoradiographic study // *Journal of Fish Biology*. 1996. V. 48. № 3. P. 321–328.
16. Hammer Ø., Harper D.A.T. Paleontological data analysis. Blackwell, 2006. 351 pp.
17. Obeagu E.I. A Review on Erythropoietin // *International Journal of Advanced Research in Biological Science*. 2015. V. 2. Iss. 4. P. 35–47.
18. Lai J.C.C., Kakuta I., Mok H.O.L., et al. Effects of moderate and substantial hypoxia on erythropoietin levels in rainbow trout kidney and spleen // *Journal of Experimental Biology*. 2006. V. 209. P. 2734–2738.
19. Shulman G.E., Love R.M. The Biochemical Ecology and Marine Fishes // *Advances in Marine Biology*. Vol. 36. London: Academic press, 1999. 347 p.
20. Jawad L.A., Al-Mukhtar M.A., Ahmed H. K. The relationship between haematocrit and some biological parameters of the Indian shad, *Tenualosa ilisha* (Family Clupeidae) // *Animal Biodiversity & Conservation*. 2004. V. 27. Iss. 2. P. 47–52.

MONOCYCLICITY IN THE FUNCTIONING OF THE ERYTHROID GERM OF HEMATOPOIESIS IN TELEOSTEAN FISH, FOR EXAMPLE OF *Platichthys flesus* (LINNAEUS, 1758)

A. A. Soldatov^{a, #}

^aA. O. Kovalevsky Institute of Biology of the South Seas of the Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russian Federation

[#]e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Presented by Academician of the RAS N.N. Nemova

The erythron state was studied in the flounder-gloss (*Platichthys flesus*, Linnaeus, 1758) during the annual cycle. The number of erythrocytes in the blood and the content of immature erythroid forms were determined: basophilic and polychromatophilic normoblasts in the head kidney (pronephros) and bloodstream. The proliferative activity of cells was judged by the inclusion of ³H-thymidine in immature erythrocytes of circulating blood. It has been showed that the processes of erythropoiesis in the hematopoietic tissue of the flounder-gloss proceed irregularly. The active production of erythroid mass is mainly confined to the post-spawning period. This is evidenced by an increase in the content of immature erythroid forms in the tissue of the pronephros and circulating blood, as well as an increase in their proliferative activity. It is assumed that this is due to the peculiarities of the organization of the red blood system in teleostean fish, which excludes the regular production of erythropoietin in the kidneys.

Keywords: erythropoiesis, hematopoietic tissue, ³H-thymidine, flounder-gloss, annual cycle