



УДК 597.556.331.1:591.11:612.22

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

© 2018 г. А. А. Солдатов^{1,3}, Т. А. Кухарева¹, А. Ю. Андреева¹, И. А. Парфенова²

¹Институт морских биологических исследований имени А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

²Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского, Симферополь, Россия

³Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

E-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.07.2018; после доработки 16.08.2018;
принята к публикации 18.12.2018; опубликована онлайн 28.12.2018.

В условиях краткосрочного эксперимента исследовали влияние острой гипоксии на морфо-функциональное состояние эритроцитов морского ерша (*Scorpaena porcus* L. 1758). Рыб содержали при 8,5–8,7 мг О₂ · л⁻¹ (100 % насыщение, контроль), 2,6 мг О₂ · л⁻¹ (30 % насыщение) и 1,3 мг О₂ · л⁻¹ (15 % насыщение) в течение 90 минут. При 30 % насыщении воды кислородом не наблюдали каких-либо изменений, показатели состояния эритроцитов сохранялись на уровне контрольных значений. При 15 % насыщении воды кислородом происходило угнетение эритропоэтических процессов, выраженное в преимущественном снижении содержания в крови наименее дифференцированных эритроидных форм (базофильных нормобластов). Одновременно отмечались набухание циркулирующих эритроцитов и лизис осмотически низкостойких и аномальных клеток, что приводило к снижению кислородной ёмкости крови и к росту осмотической резистентности циркулирующей эритроцитарной массы. Выявленный порядок изменений в системе красной крови способен индуцировать продукцию эритропоэтинов в почках и активизировать эритроидный росток в гемопоэтической ткани.

Ключевые слова: гипоксия, эритроциты, гемоглобин, эритрограмма крови, морфометрия клеток, *Scorpaena porcus* L.

Механизм участия системы красной крови костистых рыб в адаптации к среде с низкой концентрацией кислорода наиболее активно исследуется последние 30 лет. Показано, что гипоксия и анемия усиливают продукцию эритропоэтина в почках рыб [18, 19]. Эритропоэтин впервые был идентифицирован у данной систематической группы с использованием методов иммунохимического анализа [30], а к настоящему времени уже подробно описана структура его гена на примере *Fugu rubripes* [12]. Эритропоэтин повышает темпы пролиферации и дифференцировки в эритроидном ростке гемопоэза, что с течением времени смещает эритроцитарный баланс в пользу продукционных процессов и сопровождается ростом кислородной ёмкости крови [6, 21]. Однако это сравнительно инерционный процесс, развивающийся на протяжении нескольких дней [6].

Другой, более лабильной компенсационной реакцией на гипоксию следует считать опорожнение кровяных депо [29], которое позволяет повысить кислородную ёмкость крови в относительно короткий промежуток времени. У рыб соответствующую функцию выполняет селезёнка [14, 17], при этом в крови появляются старые эритроциты, имеющие ограниченный срок циркуляции в периферическом русле [17]. Между тем продолжительность жизни клеток красной крови у рыб высока [2],

поэтому данная компенсационная реакция может быть эффективной на значительном временном отрезке. Сравнительная оценка резервов крови у пелагических и донных рыб показала, что у первых объём депо почти в 5 раз выше [7].

Рост кислородной ёмкости крови в условиях гипоксии может быть обусловлен и частичной дегидратацией плазмы, что сопровождается увеличением вязкости крови и негативно сказывается на работе сердца; в связи с этим процесс эффективен только на начальных этапах адаптации к дефициту кислорода. Ранее данный механизм был изучен в эксперименте у особей скорпены [9].

Существенным дополнением к процессам, происходящим на системном уровне, является также выявленная коррекция положения кривых диссоциации оксигемоглобина. В условиях гипоксии отмечаются количественные и качественные перестройки в гетерогенной системе данного белка [20]. Появляются компоненты, обладающие обратным эффектом Бора [13, 15], не чувствительные к рН [25, 28], сочетающие высокое сродство с выраженным эффектом Бора [8], и др.

В настоящей работе особое внимание уделяется процессам, происходящим в системе красной крови толерантных к гипоксии рыб, на начальных этапах адаптации к дефициту кислорода, которые впоследствии определяют многие из вышеперечисленных адаптивных изменений. Цель работы — исследование морфофункциональных характеристик эритроцитов циркулирующей крови морского ерша в условиях острой гипоксии (краткосрочный эксперимент).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на взрослых особях морского ерша (*Scorpaena porcus* L. 1758) в состоянии относительного физиологического покоя (III–IV стадия зрелости гонад): длина тела — 15–17 см, вес — 90–110 г. Данный вид отличается повышенной устойчивостью к гипоксии. Среди представителей донной ихтиофауны черноморского региона именно скорпена обладает устойчивостью к наиболее низким критическим и пороговым концентрациям кислорода [3]. Рыбу отлавливали при помощи ставного невода и доставляли в лабораторию в пластиковых баках объёмом 60 л с принудительной аэрацией. Транспортировка длилась не более трёх часов. После отлова скорпен рассаживали в аквариумы с естественным протоком, где выдерживали в течение одной недели для снятия состояния стресса, вызванного отловом и транспортировкой. Особей кормили фаршем из малоценных видов рыб. Суточный пищевой рацион составлял 6–7 % от массы тела. Исследовали только подвижных и активно питающихся особей.

Экспериментальная часть выполнена с применением специально разработанного стенда, который позволяет стабилизировать требуемую температуру и концентрацию кислорода в воде на протяжении неограниченного периода времени. Температура воды в рабочей камере поддерживалась на уровне 14–16 °С. Фотопериод — 12 ч день : 12 ч ночь. После адаптации к этим условиям (24 ч) содержание кислорода в воде в одной серии экспериментов снижали в течение 2,5–3,0 ч с 8,5–8,7 мг O₂ · л⁻¹ (100 % насыщение, контроль) до 2,6 мг O₂ · л⁻¹ (30 % насыщение, опыт), а в другой серии — до 1,3 мг O₂ · л⁻¹ (15 % насыщение, опыт) путём прокачивания азота. Экспозиция особей в обеих сериях эксперимента составляла 90 минут. Содержание кислорода в воде контролировали потенциометрически с помощью оксиметра ELWRO PRL T N5221 (Польша). При изъятии особей из камеры применяли уретановую анестезию [26].

Кровь получали пункцией хвостовой артерии. В качестве антикоагулянта применяли гепарин («Рихтер», Венгрия). Образцы крови помещали в пластиковую пробирку объёмом 0,5 мл. Концентрацию гемоглобина в крови определяли при помощи гемиглобинцианидного метода с применением стандартного набора реактивов («Агат», Россия). Количество эритроцитов подсчитывали в камере Горяева [1]. Осмотическую резистентность клеток красной крови оценивали по микроскопическому методу Яновского [1]. Одновременно изготавливали мазки крови, которые окрашивали по комбинированному методу Паппенгейма (Май-Грюнвальд + Романовский — Гимза) [1]. На мазках подсчитывали количество незрелых (базофильных и полихроматофильных нормобластов)

и аномальных эритроидных форм (дакриоцитов, эритроцитарных теней, клеток с микроядерными включениями и со случаями инвагинации ядер). Объём выборочных совокупностей составил 10 000 клеток на мазок, с учётом зрелых эритроцитов. На основании полученных значений рассчитывали долю незрелых и аномальных эритроидных форм в процентах. В работе использовали светооптический микроскоп «Биолар» (Польша), оборудованный камерой Olympus C-7070.

Линейные размеры клеток крови определяли по фотографиям с помощью программы ImageJ 1.44р [16]. Измеряли большую и малую оси клеток (C_1 и C_2) и их ядер (N_1 и N_2). На основании определённых значений рассчитывали объём эритроцита (V_c), с учётом объёма его ядра (V_n) и толщины клетки (h), по следующим уравнениям:

$$V_c = 0,7012 \times \left(\frac{C_1 + C_2}{2} \right) \times h + V_n,$$

$$V_n = \frac{\pi \times N_1 \times N_2^2}{6},$$

$$h = 1,8 + 0,0915 \times (C_1 - 7,5).$$

Статистическую обработку и графическое оформление полученных результатов проводили с применением стандартного пакета Grapher (версия 7). Результаты представлены в виде $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$. Достоверность различий оценивали при помощи t-критерия Стьюдента, нормальность распределения — по критерию Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

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

В условиях эксперимента также отмечено изменение объёма циркулирующих эритроцитов. При 15 % насыщении воды кислородом увеличение составило $(270,4 \pm 1,7) \text{ мкм}^3$, что на 4,1 % ($p < 0,01$) выше контрольных значений $[(259,7 \pm 1,3) \text{ мкм}^3]$. При 30 % насыщении эритроциты, напротив, уменьшались в объёме на 4,0 % ($p < 0,01$) $[(249,1 \pm 1,5) \text{ мкм}^3]$. Описанные выше изменения

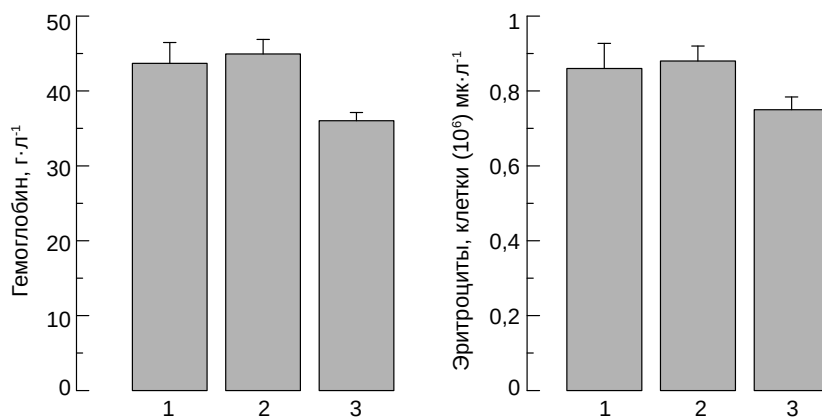


Рис. 1. Концентрация гемоглобина и число эритроцитов в крови морского ерша при различном насыщении воды кислородом (1 — нормоксия; 2 — 30 % насыщение; 3 — 15 % насыщение)

Fig. 1. The hemoglobin concentration and erythrocytes number in the scorpionfish blood under water with different oxygen saturation (1 – normoxia; 2 – 30 % saturation; 3 – 15 % saturation)

происходили на фоне роста осмотической стойкости эритроцитов при 15 % насыщении воды кислородом, что допускает лизис части клеток (табл. 1). Максимальная (полный лизис) и минимальная (начало лизиса) резистентность эритроцитов повышалась на 17–18 % ($p < 0,01$), то есть разрушение клеток происходило при более низких концентрациях NaCl в инкубационной среде.

Таблица 1. Показатели осмотической стойкости циркулирующих эритроцитов морского ерша в условиях экспериментальной гипоксии

Table 1. Parameters of osmotic resistance of circulating red blood cells of scorpionfish under experimental hypoxia

Условия эксперимента	Число особей	Осмотическая резистентность, % NaCl	
		минимальная	максимальная
Нормоксия	7	0,484 ± 0,013	0,311 ± 0,013
Насыщение 30 %	5	0,429 ± 0,029	0,293 ± 0,025
Насыщение 15 %	6	0,400 ± 0,020	0,225 ± 0,014

Одновременно наблюдали понижение числа эритроцитарных аномалий в крови в контрольной группе рыб: дакриоцитов — на 0,4 % ($p < 0,05$), клеток с микроядерными включениями — на 0,05 % ($p < 0,001$), эритроцитарных теней — на 0,26 % ($p < 0,001$). Данное явление происходило только при 15 % насыщении воды кислородом (рис. 2).

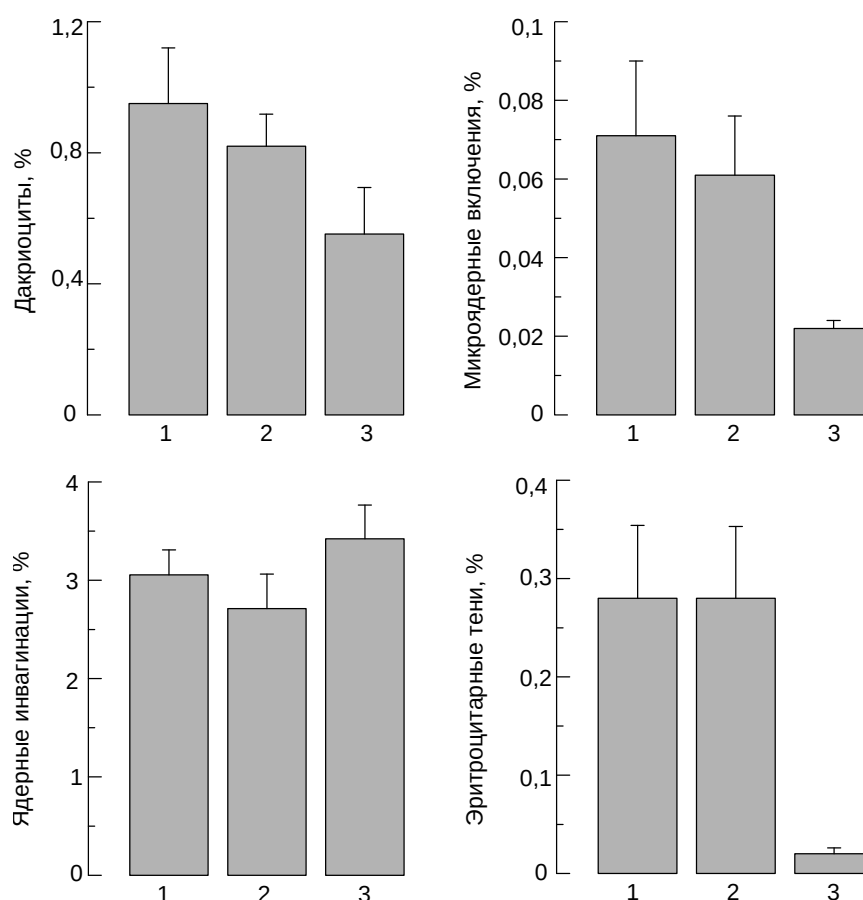


Рис. 2. Содержание аномальных эритроидных форм в крови морского ерша при различном насыщении воды кислородом (1 — нормоксия; 2 — 30 % насыщение; 3 — 15 % насыщение)

Fig. 2. The content of abnormal erythroid forms in the scorpionfish blood under water with different oxygen saturation (1 – normoxia; 2 – 30 % saturation; 3 – 15 % saturation)

Единственной аномалией, процентное содержание которой сохранялось в крови на уровне контрольных значений, являлись клетки со случаями инвагинации ядра. При 30 % насыщении воды кислородом, в сравнении со 100 % (контрольная группа рыб), различия не были выражены. Морфологические особенности аномальных клеток показаны на рис. 3.

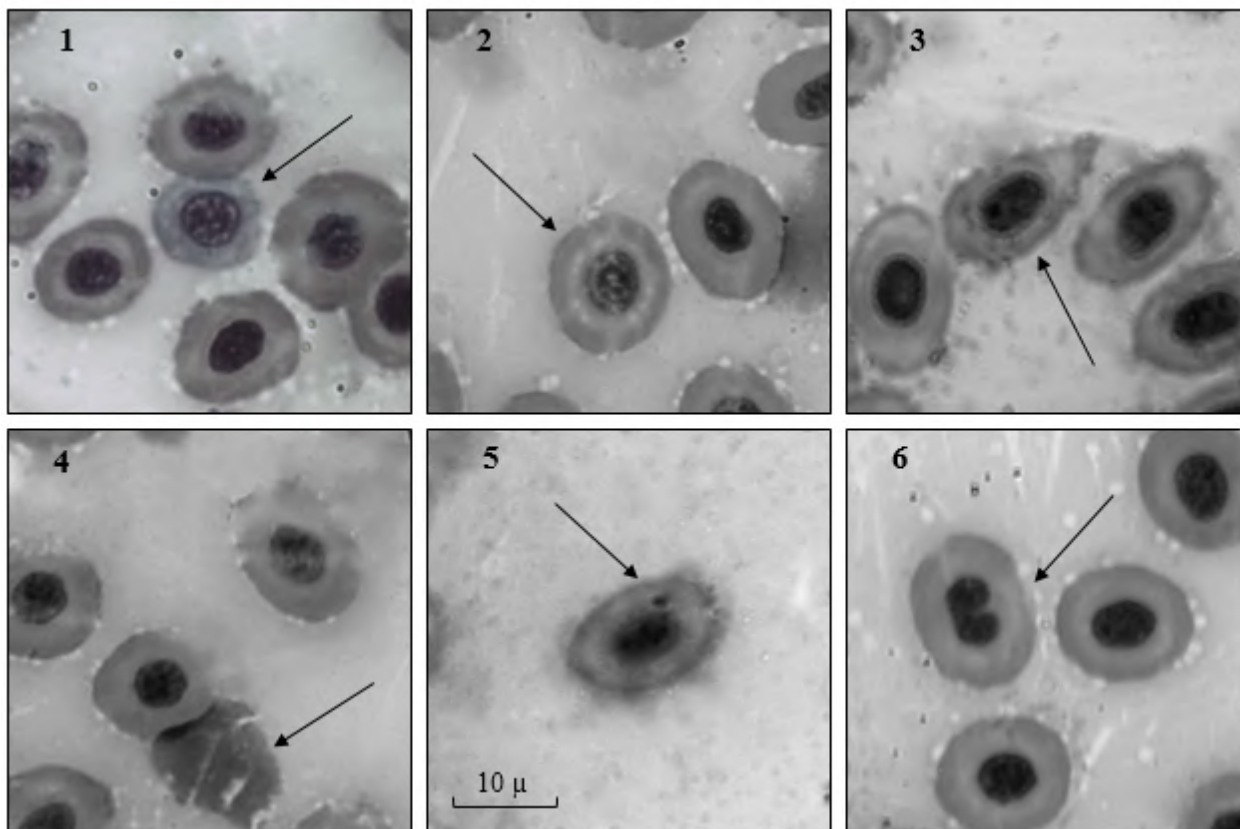


Рис. 3. Морфологические особенности незрелых и аномальных эритроидных форм крови морского ерша (1 — базофильные нормобласты; 2 — полихроматофильные нормобласты; 3 — дакриоциты; 4 — эритроцитарные тени; 5 — клетки с микроядерными включениями; 6 — клетки со случаями инвагинации ядер)

Fig. 3. Morphological features of immature and abnormal erythroid forms of the scorpionfish blood (1 – basophilic normoblasts; 2 – polychromatophilic normoblasts; 3 – dacryocytes; 4 – erythrocyte shadows; 5 – cell with a micronucleus inclusions; 6 – cell with nuclear invaginations)

Анализ содержания незрелых эритроидных форм (базофильных и полихроматофильных нормобластов) в крови ерша показал (рис. 3), что при 15 % насыщении воды кислородом их показатели относительно контрольных значений уменьшались на 2,2 % ($p < 0,05$) (рис. 4). В большей степени это затрагивало мало дифференцированные эритроидные формы (базофильные нормобласты, далее — БН), чем полихроматофильные нормобласты (далее — ПН), причём индекс БН/ПН уменьшался на 26 %. При более высоком насыщении воды кислородом (30 %) данное явление не наблюдали.

ОБСУЖДЕНИЕ

Необходимо обратить внимание на то, что основные эффекты выявлены только при акклимации рыб к условиям 15 % насыщения воды кислородом. Ключевыми результатами являются:

- понижение концентрации гемоглобина и числа эритроцитов в крови;
- рост осмотической стойкости клеток красной крови;
- уменьшение относительного содержания в крови аномальных и незрелых эритроидных форм.

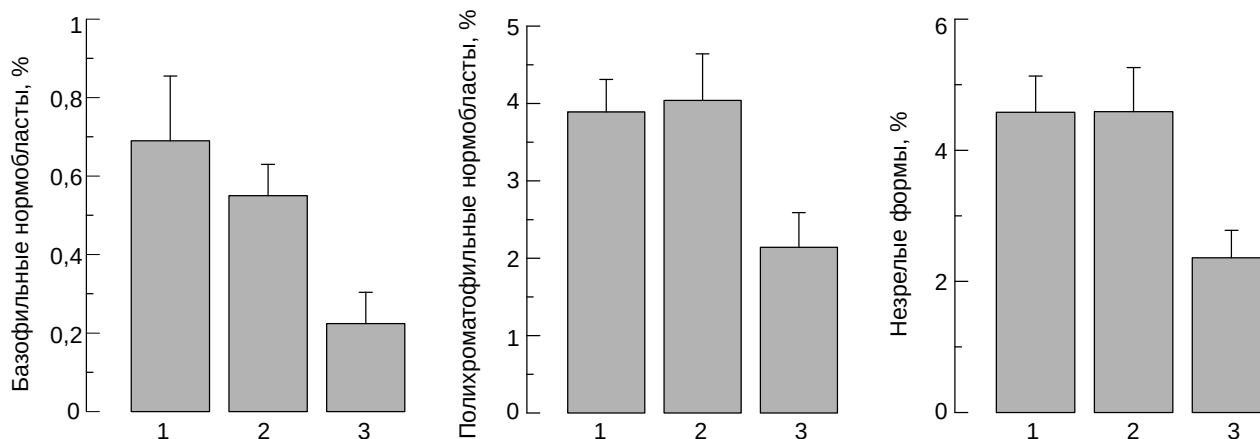


Рис. 4. Содержание незрелых эритроидных форм в крови морского ерша при различном насыщении воды кислородом (1 — нормоксия; 2 — 30 % насыщение; 3 — 15 % насыщение)

Fig. 4. The content of immature erythroid forms in the scorpionfish blood under water with different oxygen saturation (1 – normoxia; 2 – 30 % saturation; 3 – 15 % saturation)

Уменьшение концентрации гемоглобина и числа эритроцитов в крови в условиях краткосрочной адаптации к гипоксии отмечено и у высших позвоночных [4, 5]. В основе наблюдаемых изменений могут лежать несколько процессов:

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

Последние два упомянутых процесса могут дополнять друг друга.

Изменение баланса между продукцией и деструкцией эритроидных клеток в системе красной крови — весьма инерционный процесс, эффект от которого можно наблюдать только спустя несколько суток (в течение 90 минут это сделать не удастся). Данный процесс можно исключить из рассмотрения, поскольку гипоксия обычно не подавляет, а индуцирует продукцию эритроцитов в кроветворной ткани на значительном отрезке времени [21].

Резервирование части циркулирующей эритроцитарной массы в кровяных депо — реакция, которая может протекать в относительно короткий промежуток времени. Соответствующую роль у рыб, как и у других организмов, в основном выполняет селезёнка [14, 17]. Мембраны старых эритроцитов имеют изменённый антигенный комплекс [11], что позволяет строме селезёнки избирательно аттрагировать данные клетки на своей поверхности, выводя их из системы циркуляции. Вместе с тем маловероятно предположение, что за 90 минут экспериментальной гипоксии число этих клеток может существенно возрасти. К тому же, как уже отмечалось, функция депо крови у донных видов рыб, к которым относится и морской ёрш, развита значительно хуже, чем у пелагических [7]. Тем не менее процесс извлечения клеток из депо не следует исключать из рассмотрения.

Также лишь теоретическим является предположение о возможности частичной гидратации плазмы крови в условиях гипоксии. Ранее показано, что у ерша при гипоксии, напротив, незначительной дегидратации подвергается кровь [9], что должно приводить к относительному росту числа эритроцитов в крови, а не к его понижению.

Более вероятным процессом, определяющим сокращение числа эритроцитов в крови ерша, нам представляется избирательный лизис старых и аномальных клеток. В проведённом эксперименте действительно отмечено понижение содержания большинства аномальных эритроидных форм в крови скорпены в условиях гипоксии (15 % насыщение).

Причиной лизиса клеток красной крови в условиях экстремальной гипоксии может стать также их набухание (свеллинг), упомянутое во многих работах. Впервые данная реакция была отмечена

финскими исследователями у радужной форели [22], а затем — и у многих других видов рыб [24]. В основе процесса лизиса лежит трансмембранный Na^+/H^+ -обмен [23]. Это явление было описано и у морского ерша, причём как *in vitro*, так и *in vivo* [10, 27].

Продукты лизиса эритроцитов должны индуцировать выработку эритропоэтинов в почках [18], а те, в свою очередь, — повышать темпы пролиферации в эритроидном ростке гемопоэза [21]. Однако это происходит, по-видимому, не сразу. В нашем эксперименте содержание незрелых эритроидных форм в крови понижалось на 48 % ($p < 0,05$) (рис. 3) и в большей степени затрагивало мало дифференцированные формы БН, чем ПН. Индекс БН/ПН относительно контрольных значений уменьшался на 26 %. Сходные результаты были получены и в экспериментах на высших позвоночных [4, 5]. Всё вышеизложенное свидетельствует об определённой степени инерционности процессов эритропоэза, активизация которых при гипоксии происходит опосредованно, через выработку эритропоэтинов в почках.

Заключение. Краткосрочная гипоксическая нагрузка (15 % насыщение воды кислородом в концентрации $1,3 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ в течение 90 минут) вызывает ряд однонаправленных изменений в системе красной крови рыб. Отмечено угнетение эритропоэтических процессов в гемопоэтической ткани, что выражается в преимущественном снижении содержания в крови малодифференцированных эритроидных форм (базофильных нормобластов). Одновременно наблюдается набухание циркулирующих эритроцитов и лизис осмотически низкостойких и аномальных клеток, что приводит к снижению концентрации гемоглобина и числа эритроцитов в крови, а также к росту осмотической резистентности циркулирующей эритроцитарной массы. Рассмотренные изменения в системе красной крови способны индуцировать продукцию эритропоэтинов в почках и активизировать эритроидный росток в гемопоэтической ткани.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУН ИМБИ по теме «Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом» (№ гос. регистрации АААА-А18-118021490093-4) и при частичной поддержке гранта РФФИ («Метгемоглобин и антиоксидантный ферментный комплекс в поддержании окислительного метаболизма тканей гидробионтов в условиях экстремальных форм внешней гипоксии», проект № 16-04-00135).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Золотницкая Р. П. Методы гематологических исследований // *Лабораторные методы исследования в клинике: справочник* / ред. В. В. Меньшиков. Москва : Медицина, 1987. С. 106–148. [Zolotnitskaya R. P. Metody gematologicheskikh issledovaniy. In: *Laboratornye metody issledovaniya v klinike: spravochnik* / V. V. Menshikov (Ed.). Moscow: Meditsina, 1987, pp. 106–148. (in Russ.).]
2. Золотова Т. Е. *Экспериментальное исследование кроветворения у рыб* : автореф. ... дис. канд. биол. наук. Москва : МГУ, 1987. 24 с. [Zolotova T. E. *Ekspierimental'noe issledovanie krovetvoreniya u ryb*: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Moscow: MSU, 1987, 24 p. (in Russ.).]
3. Парфенова И. А. Критические и пороговые напряжения кислорода у морских рыб различной толерантности к внешней гипоксии // *Экология. Людина. Суспільство* : VII Міжнар. наук.-практ. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених, Київ, 13–15 травня 2004. Київ, 2004. С. 53. [Parfenova I. A. Kriticheskie i porogovye napryazheniya kisloroda u morskikh ryb razlichnoi tolerantnosti k vneshnei gipoksii. In: *Ekologiya. Liudyna. Suspiilstvo*: VII Mizhnar. nauk.-prakt. konf. studentiv, aspirantiv ta molodykh vchenykh, Kiev, 13–15 May, 2004. Kiev, 2004, pp. 53. (in Russ.).]
4. Пахрова О. А., Криштоп В. В., Ленчер О. С., Курчанинова М. Г., Румянцева Т. А. Динамика клеточных показателей эритроцитарной системы при адаптации к острой экспериментальной гипоксии головного мозга в зависимости от уровня стрессоустойчивости // *Успехи современной науки*. 2016. Т. 9, № 12. С. 99–104. [Pakhrova O. A., Krishtop V. V., Lencher O. S., Kurchaninova M. G., Rumyantseva T. A. Dinamika kletochnykh pokazatelei eritrotsitarnoi sistemy pri adaptatsii k ostroi

- eksperimental'noi gipoksii golovnogo mozga v zavisimosti ot urovnya stressoustoichivosti. *Uspekhi sovremennoi nauki*, 2016, vol. 9, no. 12, pp. 99–104. (in Russ.).
5. Пахрова О. А., Ефремочкина О. С., Смолина Е. О., Криштоп В. В. Реакция эритроидного ростка кроветворных органов белых крыс при моделировании острой тотальной гипоксии головного мозга // *Актуальные вопросы научных исследований* : сб. науч. тр. III Междунар. науч.-практ. конф., Иваново, 15 июня 2016. Иваново : ИП Цветков А. А., 2016. С. 73–77. [Pakhrova O. A., Efremochkina O. S., Smolina E. O., Krishtop V. V. Reaktsiya eritroidnogo rostka krovetvornykh organov belykh krysov pri modelirovanii ostroi total'noi gipoksii golovnogo mozga. In: *Aktual'nye voprosi nauchnykh issledovaniy*: sb. nauch. tr. III Mezhdunar. nauch.-prakt. konf., Ivanovo, 15 June, 2016. Ivanovo: IP Tsvetkov A. A., 2016, pp. 73–77. (in Russ.).]
 6. Солдатов А. А. Особенности организации и функционирования системы красной крови рыб (обзор) // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2005. Т. 41, № 3. С. 217–223. [Soldatov A. A. Osobennosti organizatsii i funktsionirovaniya sistemy krasnoi krovi ryb (obzor). *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii*, 2005, vol. 41, no. 3, pp. 217–223. (in Russ.).]
 7. Солдатов А. А. Формирование резервов депо крови в онтогенезе морских рыб // *Экология моря*. 1992. Вып. 42. С. 46–55. [Soldatov A. A. Development of the blood depot stores in the ontogenesis of the marine fishes. *Ekologiya morya*, 1992, vol. 42, pp. 46–55. (in Russ.).]
 8. Солдатов А. А., Парфенова И. А., Коношенко С. В. Гемоглобиновая система черноморского бычка-кругляка в условиях экспериментальной гипоксии // *Украинский биохимический журнал*. 2004. Т. 76, № 3. С. 85–90. [Soldatov A. A., Parfenova I. A., Konoshenko S. V. Haemoglobin system of Black Sea round goby under experimental hypoxia conditions. *Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal*, 2004, vol. 76, no. 3, pp. 85–90. (in Russ.).]
 9. Солдатов А. А., Русинова О. С., Трусевич В. В., Звездина Т. Ф. Влияние гипоксии на биохимические показатели эритроцитов скорпены // *Украинский биохимический журнал*. 1994. Т. 66, № 5. С. 115–118. [Soldatov A. A., Rusinova O. S., Trusevich V. V., Zvezdina T. F. Vliyanie gipoksii na biokhimicheskie pokazateli eritrotsitov skorpeny. *Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal*, 1994, vol. 66, no. 5, pp. 115–118. (in Russ.).]
 10. Andreyeva 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 & Developmental Biology – Animal*, 2017, vol. 53, iss. 4, pp. 312–319. <https://doi.org/10.1007/s11626-016-0111-4>.
 11. Bartosz G. Erythrocyte aging: Physical and chemical membrane changes. *Gerontology*, 1991, vol. 37, pp. 33–67. <https://doi.org/10.1159/000213251>.
 12. Chou C.-F., Tohari S., Brenner S., Venkatesh B. Erythropoietin gene from a teleost fish, *Fugu rubripes*. *Blood*, 2004, vol. 104, no. 5, pp. 1498–1503. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3404>.
 13. Fago A., Carratore V., Di Prisco G., Feuerlein R. J., Sottrup-Jensen L., Weber R. E. The cathodic hemoglobin of *Anguilla anguilla*. Amino acid sequence and oxygen affinity and phosphate sensitivity. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, vol. 270, pp. 18897–18902. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.32.18897>.
 14. Fänge R., Nilsson S. The fish spleen: structure and function. *Experientia*, 1985, vol. 41, iss. 2, pp. 152–158. <https://doi.org/10.1007/BF02002607>.
 15. Feuerlein R. J., Weber R. E. Oxygen equilibria of cathodic eel hemoglobin analysed in terms of the NWC model and Adiar's successive oxygenation theory. *Journal of Comparative Physiology B*, 1996, vol. 165, iss. 8, pp. 597–606. <https://doi.org/10.1007/BF00301127>.
 16. Girish V., Vijayalakshmi A. Affordable image analysis using NIH Image / Image J. *Indian Journal of Cancer*, 2004, vol. 41, iss. 1, pp. 47. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.474.9608&rep=rep1&type=pdf>.
 17. Houston A. H., Roberts W. C., Kennington J. A. Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1996, vol. 15, iss. 6, pp. 481–489. <https://doi.org/10.1007/BF01874922>.
 18. Kulkeaw K., Sugiyama D. Zebrafish erythropoiesis and the utility of fish as models of anemia. *Stem Cell Research & Therapy*, 2012, vol. 3, pp. 55. <https://doi.org/10.1186/scrt146>.
 19. Lai J. C. C., Kakuta I., Mok H. O. L., Rummer J. L., Randall D. Effects of moderate and substantial hypoxia on erythropoietin levels in rainbow trout kidney and spleen. *Journal of Experimental Biology*, 2006, vol. 209, pp. 2734–2738. <https://doi.org/10.1242/jeb.02279>.

20. Marinsky C. A., Houston A. H., Murad A. Effect of hypoxia on hemoglobin isomorph abundance in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Canadian Journal of Zoology*, 1990, vol. 68, no. 5, pp. 884–888. <https://doi.org/10.1139/z90-128>.
21. Moritz K. M., Lim G. B., Wintour E. M. Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 1997, vol. 273, no. 6, pp. R1829–R1844.
22. Nikinmaa M. The effect of adrenaline on the oxygen transport properties of *Salmo gairdneri* blood. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1982, vol. 71, iss. 2, pp. 353–356. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(82\)90416-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(82)90416-9).
23. Nikinmaa M. Control of red cell pH in teleost fishes. *Annales Zoologici Fennici*, 1986, vol. 23, no. 2, pp. 223–235.
24. Nikinmaa M., Cech J. J., Ryhaenen L., Salama A. Red cell function of carp (*Cyprinus carpio*) in acute hypoxia. *Experimental Biology*, 1987, vol. 47, no. 1, pp. 53–58.
25. Pellegrini M., Giardina B., Olianus A., Sanna M. T., Deiana A. M., Salvadori S., Di Prisco G., Tamburrini M., Corda M. Structure/Function relationship in the hemoglobin components from moray (*Muraena helena*). *European Journal of Biochemistry*, 1995, vol. 234, iss. 2, pp. 431–436. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.431_b.x.
26. Soldatov A. A. Physiological aspects of effects of urethane anesthesia on the organism of marine fishes. *Hydrobiological Journal*, 2005, vol. 41, no. 1, pp. 113–126.
27. Soldatov A. A., Kukhareva T. A., Andreeva A. Yu., Parfenova I. A., Rychkova V. N., Zin'kova D. S. The functional morphology of erythrocytes of the black scorpion fish *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) (Scorpaeniformes: Scorpaenidae) during hypoxia. *Russian Journal of Marine Biology*, 2017, vol. 43, iss. 5, pp. 368–373. <https://doi.org/10.1134/S1063074017050091>.
28. Taiwo F. A. Hemoglobin of the lungfish *Clarias lazera*: isolation and oxygen equilibrium studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1995, vol. 110, iss. 2, pp. 147–150. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(94\)00144-I](https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)00144-I).
29. Wells R. W. G., Weber R. E. The spleen in hypoxic and exercised rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 1990, vol. 150, pp. 461–466.
30. Wickramasinghe S. N. Erythropoietin and the human kidney: Evidence for an evolutionary link from studies of *Salmo gairdneri*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1993, vol. 104, iss. 2, pp. 63–65. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90009-S](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90009-S).

ERYTHROCYTES OF CIRCULATING BLOOD OF SCORPIONFISH *SCORPAENA PORCUS* L. 1758 UNDER ACUTE EXPERIMENTAL HYPOXIA

A. A. Soldatov^{1,3}, T. A. Kukhareva¹, A. Yu. Andreeva¹, I. A. Parfenova²

¹Kovalevsky Institute of Marine Biological Research RAS, Sevastopol, Russian Federation

²V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russian Federation

³Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: alekssoldatov@yandex.ru

The effect of short-term hypoxia on the black scorpionfish (*Scorpaena porcus* L.) red blood cells has been investigated. Fish were exposed to 8.5–8.7 mg O₂ · l⁻¹ (100 % saturation, control), 2.6 mg O₂ · l⁻¹ (30 % saturation) and 1.3 mg O₂ · l⁻¹ (15 % saturation) for 90 minutes. At 30 % saturation all parameters were kept at the control values. At oxygen-saturation level of 15 % we observed inhibition of erythropoietic processes in hematopoietic tissue, as number of immature erythroid forms (basophilic normoblasts) in the blood has reduced. This process was accompanied with circulating red blood cells swelling and lysis of osmotically fragile erythrocytes and abnormal cells. Thus, blood oxygen capacity declined, and osmotic resistance of red blood cells increased. It is supposed, that such changes of blood characteristics should induce the production of erythropoietin in fish kidneys and also enhance proliferation of erythroid cells in hematopoietic tissue.

Keywords: hypoxia, red blood cells, hemoglobin, blood erythrograms, cell morphometry, *Scorpaena porcus* L.