

Морфо-функциональные особенности эритроцитов природных и искусственно выращенных сиговых рыб озера Байкал

В. М. ЯХНЕНКО¹, И. В. КЛИМЕНКОВ¹, Н. П. СУДАКОВ², А. Ю. БЕЛЫШЕНКО¹, О. Ю. ГЛЫЗИНА¹,
А. М. МАМОНТОВ¹, Ю. П. САПОЖНИКОВА¹, Л. В. СУХАНОВА¹

¹ Лимнологический институт СО РАН
664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3

² Иркутский научный центр хирургии и травматологии
664003, Иркутск, ул. Борцов Революции, 1
E-mail: vera@lin.irk.ru

Статья поступила 05.06.2015

Принята к печати 05.10.2015

АННОТАЦИЯ

Исследованы структура, цитометрические индексы клеток красной крови, концентрация гемоглобина (Hb), кислородная емкость крови (КЕК) омулей, сигов и их гибридов из оз. Байкал (природные) и инкубированных и выращенных в аквариумах (аквариальные) пресноводного аквариального комплекса (ПАК).

У природных омулей и сигов и их гибридов цитометрические показатели эритроцитов больше в сравнении с аналогичными формами из аквариумов при одинаковых условиях содержания. Условия аквариумного содержания менее всего повлияли на форму клеток пыжьянов и гибридов (самки пыжьянов и самцы омулей F1 (f Sw × m Om)). Имеющие наиболее крупные эритроциты самки озерного сига определяют размеры клеток эритроцитов у гибридов: (самки озерного сига и самцы омулей F1 (f Lw × m Om)). Цитометрические параметры эритроцитов всех исследованных форм сиговых рыб из теплых аквариумов больше, чем из холодных. У искусственно полученных гибридов в отличие от природных ядра эритроцитов меньше в сравнении как с природными родителями, так и с сигами и омулями, выращенными в аквариумах в одинаковых с гибридами условиях.

Эритроциты природных сигов имеют на 20–30 % более обогащенный пул функционально активных митохондрий в сравнении с аквариальными сигами, у которых также выявлены нарушения в структуре митохондрий. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что у исследуемых форм байкальских сиговых рыб особенности метаболизма, связанные с транспортом кислорода, обусловлены адаптациями к условиям занимаемых экологических ниш.

Ключевые слова: эритроциты, цитометрические параметры, гемоглобин, кислородная емкость крови, митохондрии, сиговые рыбы, гибриды, оз. Байкал, пресноводный аквариальный комплекс.

Состав клеток крови рыб имеет индивидуальную изменчивость и зависит от состояния организма и окружающей среды [Яхненко,

1984; Глаголева, Бодрова, 1988; Моисеенко, 1998; Реакция..., 2001; Лугаськова, 2003; Камшылов, Камшылова, 2007; Wlasow

et al., 2010; Gomulka et al., 2014]. В отличие от лейкоцитов, форма и размер зрелых эритроцитов являются специфичными для определенных систематических групп животных [Hartman, Lessler, 1974; Gregory, 2001; Bhattacharyya et al., 2004], более древние рыбы имеют крупные эритроциты по сравнению с эволюционно молодыми видами [Заварзин, 1953; Флоренсов, 1966; Gregory, 2001]. По этому признаку выявлены различия у внутривидовых групп рыб и гибридов [Яхненко, 1984; Yakhnenko et al., 2012; Evans et al., 2012, 2014], поскольку на форму клеток большее влияние оказывает связанное с адаптациями состояние органов и систем.

Основная роль в газообмене в организме у рыб принадлежит эритроцитам. В отличие от высших позвоночных, в цитоплазме эритроцитов рыб обнаружены митохондрии, рибосомы, гликоген, ферменты цикла Кребса [Yakhnenko et al., 2010, 2012, 2013], что делает их функционально ближе к клеткам соматических тканей и позволяет участвовать в различных метаболических процессах. Показано, что эритроциты толерантны к гипоксии костистых рыб способны к сбалансированному угнетению мембранных и метаболических функций, при этом наблюдаются морфологические изменения клеток [Солдатов и др., 2014]. Размер молекулы гемоглобина, уровень ее родства с кислородом, КЕК и размер цитоплазматического района эритроцита определяют интенсивность дыхания рыб [Lay, Baldwin, 1999].

Исследование системы транспорта кислорода сигов показали, что основная причина внутривидовой дивергенции морфологических, поведенческих, физиологических признаков генетически близких симпатрических форм – это потребности в энергии и трофические адаптации [Najiah et al., 2008; Evans et al., 2012, 2014].

Размер клетки отрицательно коррелирует с уровнем активности, а интенсивность газообмена увеличивается с уменьшением размеров эритроцитов [Lay, Baldwin, 1999].

Таким образом, изучение морфологии эритроцитов может предоставить важную информацию об энергетических потребностях популяций, обитающих в разных средах.

Несмотря на сходные условия существования, у симпатрических эколого-морфоло-

гических групп омулей, озерных сигов, пыжьянов и гибридов между омулями и пыжьянами, двух видов голомянок оз. Байкал выявлены достоверные различия ряда цитометрических параметров эритроцитов [Yakhnenko V. M., Yakhnenko M. S., 2006; Yakhnenko et al., 2012], а у карликовой и нормальной формы *Coregonus clupeaformis* (Mitchill) в озерах Канады, у трех популяций европейского сига (*C. lavaretus* L.) выявлены различия цитометрических параметров и разные генетические варианты гемоглобинов [Evans et al., 2012, 2014]. Размеры эритроцитов коррелируют с размером генома, а отношение площади ядра и цитоплазмы (NCR) позволяют оценить уровень метаболизма и обнаружить проявление компенсаторных реакций [Gregory, 2001].

Клетки крови рыб подвержены функциональным расстройствам и патологическим изменениям при действии неблагоприятных факторов внешней среды, химических токсикантов и при заболеваниях [Ильинских и др., 1992; Моисеенко, 1998; Реакция..., 2001; Изюмов и др., 2003; Анохина и др., 2012]. Стресс вызывает изменения в размерах, форме, структуре эритроцитов [Серпунин, 2000, 2009; Андреева, Муханов, 2012]. В условиях гипоксии, при изменениях температурного режима и pH среды изменяется морфология, повышается деформируемость эритроцитов [Солдатов и др., 2014].

В связи с тем, что часть популяций омулей и сигов воспроизводится в условиях рыбозаводных заводов, стоит задача определения влияния искусственного разведения на физиологические, в том числе гематологические, показатели этих рыб. Исследования крови выявили большую трудность в определении нормы гематологических показателей для разных форм сиговых рыб [Серпунин, 2000, 2009; Микряков, 2001]. Поэтому малоизменяемые цитометрические индексы эритроцитов используются в качестве критерия состояния рыб [Серпунин, 2000, 2009; Evans et al., 2012, 2014].

Цель настоящей работы – характеристика особенностей морфологии и структуры эритроцитов и количественных характеристик гемоглобинов у природных и выращенных в искусственных условиях сиговых рыб оз. Байкал.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследованные рыбы. Сиговые рыбы из природных популяций в возрасте 4–7+ отлавливались в течение нерестового периода на местах нереста: омуль *Coregonus migratorius* Georgi в р. Верхняя Ангара, сиг-пыжьян *C. lavaretus pidschian* Gmelin. в р. Баргузин, озерный сиг *C. l. baicalensis* Dyb в Чивыркуйском заливе и Малом Море [Яхненко и др., 1992; Мамонтов, Яхненко, 1995; Яхненко, Мамонтов, 2006]. В качестве контрольных использовались данные, полученные при анализе молоди омуля в возрасте 1–3+, отловленной в июне 2003 и 2011 гг. пелагическим тралом во время гидроакустической съемки запасов омуля на озере Байкал [Мельник и др., 2009], а также молоди пыжьянов, омулей и их гибридов в возрасте 1–2+, выловленной на мелководьях Северного Байкала [Яхненко, Мамонтов, 2006]. Пол родителей природных гибридов не установлен.

Икру от искусственно полученных гибридов и от природных производителей сиговых рыб инкубировали и подращивали в аквариумах ПАК с холодной ($T = 7 - 10$ °C) и теплой ($T = 16 - 21$ °C) водой. Родителями F1 (f Sw × m Om) оказались самки пыжьянов баргузинской популяции и самцы омулей природной эколого-морфологической группы, у F1 (Lw × Om) – сиг озерный чивыркуйской популяции (самки и самцы) и омули прибреж-

ной эколого-морфологической группы (самки и самцы).

Условия эксперимента. В экспериментах использованы классические и адаптированные методы инкубации и долгосрочного обслуживания байкальских сегов и их гибридов в контролируемых условиях. Условия инкубации икры и выращивания рыбы для всех вариантов скрещивания были идентичны. Качество роста и развития на всех этапах жизненного цикла контролировалось. Высококочувствительные методы использованы для систематического мониторинга условий содержания рыб, качества воды (табл. 1) и корма [Глызин и др., 2011]. Все работы с лабораторными животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных.

Гематологический анализ, морфология эритроцитов. Проведены стандартные гематологический [Srivastava, 1968, 1969; Blaxhall, Daisley, 1973; Lehmann, Sturenberg, 1981; Иванова, 1983; Felip et al., 2009] и ультраструктурный [Уикли, 1975] анализы.

Клетки эритроцитов измерены с применением компьютерной программы Image-Pro Plus 6.0. Площадь клетки (S) и площадь ядра (s), ядерно-цитоплазматические отношения (NCR) рассчитаны по формуле площади эллипса [Флоренсов, 1966; Felip et al., 2009]. Форма эритроцитов определена по числовой

Т а б л и ц а 1
Химический состав воды

Химический состав воды	Оз. Байкал	Водопроводная вода		
		без фильтрации	фильтрация	
			без аэрации	аэрация
Жесткость	1,17	1,05	1,04	1,04
pH	7,5	7,1	7,0	7,5
O ₂	11,7	3,5	3,0	8,0
Si	0,67	1,0	0,51	0,43
Fe	0,02	0,1	0,08	0,08
NO ₂ ⁻	0,055	0,004	0,003	0,011
NH ₄ ⁺	0,49	0,03	0,01	0,20
Mg ₂ ⁺	3,04	3,01	3	3
NO ₃ ⁻	0,25	0,25	0,17	0,19

П р и м е ч а н и е. Содержание ионов измерено в мг/л, жесткость воды – в ppm.

эксцентричности (E) [Green, Thomas, 2007; Скоркина, Сладкова, 2008].

Микроскопическая техника. Окрашенные азур-эозином мазки периферической крови рыб исследованы на световом микроскопе Axiostar plus с фотокамерой AxioCam ICc1, Zeiss, (Germany).

Для исследования структуры клетки крови фиксировали в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида на 0,1М фосфатном буфере с последующей фиксацией в 2%-ном растворе четырехоксида осмия и заливали в смолу эпон. Срезы, полученные на ультрамикротоме “Ultracut R” (“Leica”, Австрия), контрастировали в цитрате свинца по Рейнольдсу [Reinolds, 1963] и исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе Leo 906 E (Zeiss, Germany) с ускоряющим напряжением 80 кВ.

Для сканирующей микроскопии клетки крови фиксировали в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4). После промывания тем же буфером с добавлением глюкозы клетки крови фиксировали 1%-ным раствором четырехоксида осмия на фосфатном буфере с последующим обезвоживанием в спиртах восходящей концентрации (30–50–70 %, по 20 мин) и сушкой в критической точке с использованием аппарата Balzers CPD 030. После напыления золотом препараты исследовали на сканирующем электронном микроскопе Philips 525М (Голландия).

Для выявления функционально активных митохондрий в эритроцитах использовали специфическую окраску, при которой флуоресцирующий реагент MitoTracker® Orange (Life Technologies, USA) селективно связывался только с нативными митохондриями, сохраняющими мембранный потенциал. После инкубации эритроцитов с MitoTracker® в течение 25 мин образцы фиксировали 2%-м параформальдегидом в течение 15 мин. Ядра клеток окрашивали раствором DAPI (0,5 мкг/мл) (Sigma-Aldrich, USA) в течение 15 мин. Полученные препараты заключали в ProLong® Gold antifade reagent (Life Technologies, USA) и исследовали на лазерном конфокальном микроскопе LSM 710 (Zeiss). Полученные при сканировании трехмерные изображения обрабатывались математически в программной

среде Imaris® Bitplane 7.2.3. Общий объем митохондрий оценивали в $1 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ крови.

Клетки крови идентифицировали в соответствии с морфологическими, ультраструктурными и гистохимическими признаками [Иванова, 1983; Zapata et al., 2006; Hartenstein, 2006; Prihirunkit et al., 2007; Самсуев, Капитонова, 2010].

Статистическая обработка данных. Для сравнительного анализа данных использовали средства “Описательной статистики” и “Двухвыборочный t -тест” в пакете “Анализ данных” в Microsoft Office Excel 10, версия 14. Достоверность различий количественных данных определялась по критерию Стьюдента [Урбах, 1963; Животовский, 1991].

В связи с небольшими выборками некоторых групп рыб, кровь которых исследовалась на содержание гемоглобина, оценивалась общая картина состояния рыб в конкретных условиях без сравнительного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гематологические характеристики красной крови. Исследованные группы сиговых рыб, выращенных в условиях аквариумов, имеют более низкие показатели Hb и КЕК по сравнению с одновозрастными идентичными группами природных сиговых рыб. Половозрелые природные омули и пыжьяны значительно превосходят по этим показателям как природную, так и аквариальную молодь (табл. 2).

Морфология эритроцитов. Красная периферическая кровь у исследованных рыб представлена зрелыми эритроцитами (до 90 %) и их созревающими формами – эритробластами (рис. 1). В ядрах эритроцитов выявлен гетерохроматин, в цитоплазме – шероховатый эндоплазматический ретикулум, митохондрии (рис. 2).

Анализ данных, полученных с помощью конфокальной микроскопии, показал, что эритроциты природных сигов имеют на 20–30 % более обогащенный пул функционально активных митохондрий (рис. 3) в сравнении с сигами, содержащимися в аквариальных условиях (рис. 4), у которых также выявлены нарушения в структуре митохондрий (рис. 5).

Концентрация гемоглобина и кислородная емкость крови сиговых рыб

Группы рыб	Hb (г/л) ± m	КЕК(об. ед.) ± m	n
Lw Б ¹	113 ± 0,45	16 ± 0,03	31
Lw Б ²	98,5 ± 0,27	14,5 ± 0,15	34
Lw ПАК**	88 ± 2,2	13,43 ± 0,08	2
Om Б ¹	108 ± 0,14	15,49 ± 0,13	176
Om Б ²	118,2 ± 0,3	16,54 ± 0,11	44
Om ПАК**	82 ± 0,17	12,81	34
Sw Б ¹	118 ± 0,3	16,5 ± 0,33	50
Sw Б ²	83,6 ± 0,8	12,98 ± 0,12	9
F1(Sw × Om) Б ²	92 ± 0,43	13,84 ± 0,07	5
F1 (f Sw × m Om) ПАК**	73 ± 1,5	11,88 ± 0,09	2
F1 (f Lw × m Om) ПАК*	76,5 ± 0,15	12,24 ± 1,8	10
F1 (f Om × m Lw) ПАК*	80,5 ± 0,12	12,61 ± 0,95	10
F1 (f Om × m Lw) ПАК**	83 ± 0,8	12,11 ± 0,07	3

П р и м е ч а н и е. Lw – озерный сиг, Om – омуль, Sw – пыжьян, m – самец, f – самка. F1 – гибрид первого поколения, КЕК – кислородная емкость крови, Hb – концентрация гемоглобина. ± m – ошибка средней. Возраст рыб: ¹ 4–7+ (нерестовые), ² 0–1+, n – число исследованных рыб. Б – Байкал (природные), ПАК (аквариальные). Температурные условия содержания: * теплые, ** холодные.

Характеристика цитометрических параметров эритроцитов (табл. 3). Особенности цитометрических показателей эритроцитов у природных сиговых рыб. Байкальские озерные сиги имеют наиболее крупные клетки и ядра эритроцитов по сравнению с омулями и пыжьянами ($p < 0,001$), по NCR отличий не выявлено. Площадь клетки эритроцита у омулей больше ($p < 0,05$), s, NCR и E мало отличаются от соответствующих параметров эритроцитов пыжьянов. Цитометрические параметры эритроцитов F1 (Sw × Om) в сравнении с омулями и пыжьянами достоверно больше ($p < 0,001$). По форме клеток эритроцитов природные формы мало отличаются.

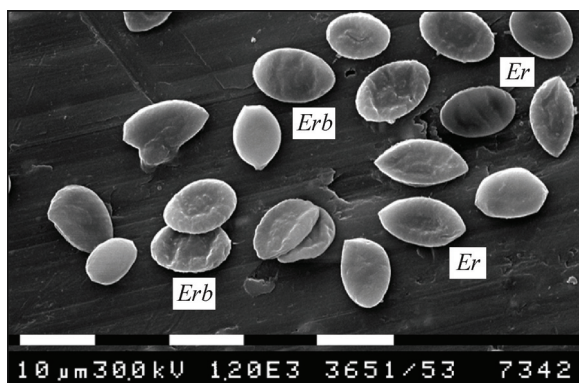


Рис. 1. Зрелые эритроциты (Er) и эритробласт (Erb) в периферической крови омуля (Philips 525M)

Особенности цитометрических показателей эритроцитов у природных и выращенных в холодных аквариумах сиговых рыб.

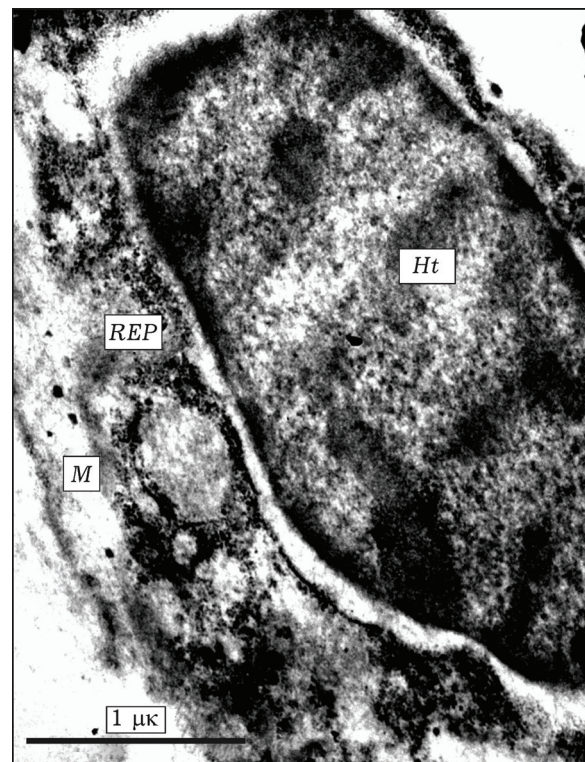


Рис. 2. Митохондрия (M), шероховатый эндоплазматический ретикулум (REP) в цитоплазме, Ht – гетерохроматин в ядре зрелого эритроцита омуля (LEO 906E)

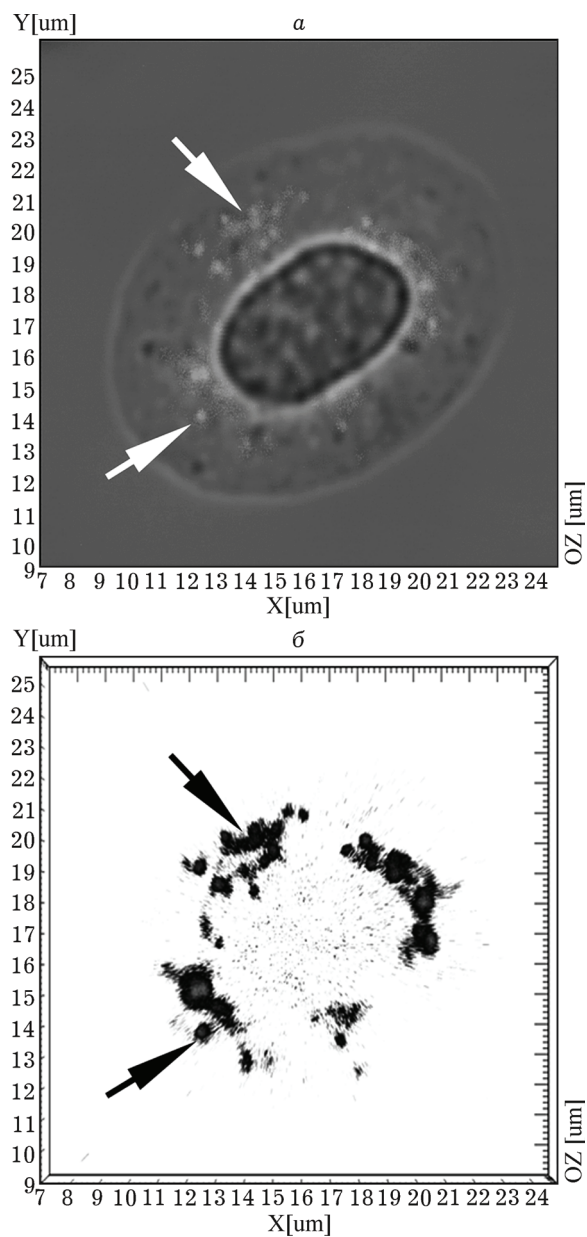


Рис. 3. Функционально активные митохондрии (отмечены стрелками), локализованные в эритроцитах у природного озерного сига. *a* – просвечивающий режим; *б* – изображение митохондрий в красном канале (Z-реконструкция). Конфокальный микроскоп LSM-710, $\times 100$. Окраска флуоресцентными красителями Dapi и MitoTracker

При сравнении идентичных форм сиговых рыб между собой определено, что *E*, *S*, *s* у аквариальных рыб меньше, чем у природных (*S*: все виды $p < 0,001$; *s*: сига озерные $p < 0,001$, пыжьяны и омули $p < 0,05$; *E*: озерные сига и омули $p < 0,001$, пыжьяны $p < 0,05$). *NCR* у

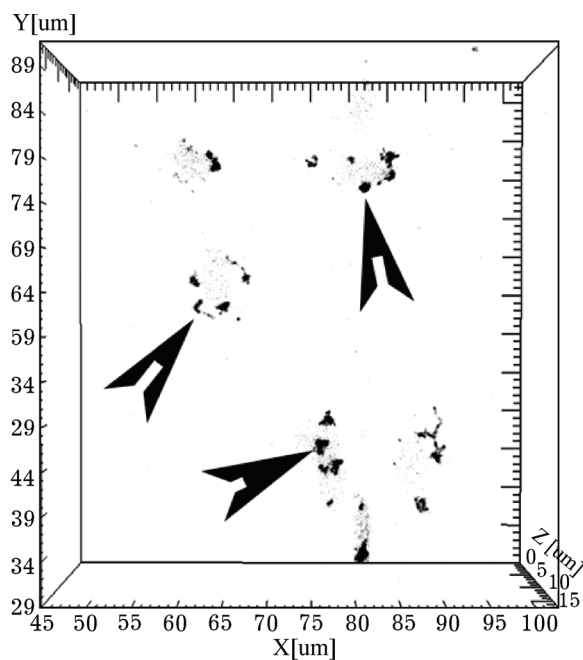


Рис. 4. Функционально активные митохондрии (отмечены стрелками), локализованные в эритроцитах аквариального озерного сига. Конфокальный микроскоп LSM-710, $\times 100$. Окраска флуоресцентными красителями Dapi и MitoTracker

аквариальных озерных сигов F1 (*f Sw* \times *m Om*) меньше ($p < 0,001$), у пыжьянов ($p < 0,001$) и омулей ($p < 0,05$) больше, чем у природных форм. У аквариальных F1 (*f Sw* \times *m Om*) *NCR*, *S* не отличаются, *E*, *s* меньше ($p < 0,001$) в сравнении с природными омулями и пыжьянами. У аквариальных F1 (*f Om* \times *m Lw*) цитометрические параметры достоверно ниже ($p < 0,001$) в сравнении с природными омулями и озерными сигами. Однако у аква-

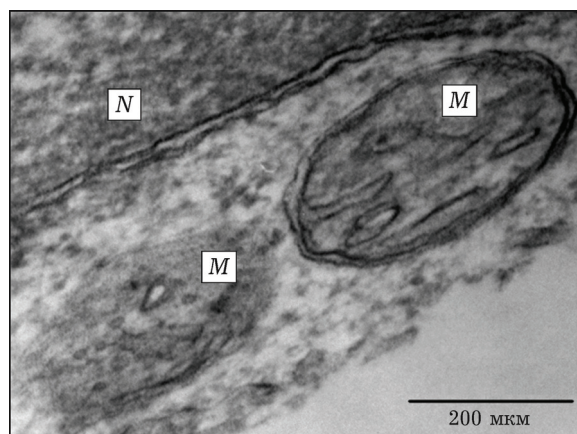


Рис. 5. Дефектная (слева) и нормальная митохондрии эритроцита озерного сига. *N* – ядро (LEO 906E)

Цитометрические параметры эритроцитов сиговых рыб Байкала

Выборки рыб	Цитометрические параметры					
	$E \pm (m \times 10^{-3})$	$S \pm m$	$s \pm m$	$NCR \pm (m \times 10^{-3})$	n^1	n^2
Lw Б	0,616 ± 4	255 ± 2,6	49,2 ± 0,7	0,243 ± 4	18	263
Lw ПАК*	0,706 ± 8	281 ± 3,3	53,5 ± 0,8	0,237 ± 5	4	46
Lw ПАК**	0,522 ± 4	238 ± 2,0	32,6 ± 0,5	0,158 ± 2	12	257
Sw Б	0,614 ± 3	236 ± 2,6	43,3 ± 0,5	0,23 ± 3	18	339
Sw ПАК*	0,611 ± 5	203 ± 1,8	39 ± 1,6	0,24 ± 5	11	375
Sw ПАК**	0,604 ± 5	198 ± 1,6	42,2 ± 0,3	0,274 ± 3	3	194
Om Б	0,606 ± 2	241 ± 1,1	43,1 ± 0,2	0,23 ± 2	38	1581
Om ПАК*	0,630 ± 6	291 ± 2,9	48,7 ± 0,5	0,203 ± 3	6	74
Om ПАК**	0,545 ± 6	213 ± 1,8	41,3 ± 0,8	0,244 ± 6	5	86
F1 (Sw × Om) Б	0,612 ± 4	244 ± 1,8	61,8 ± 1	0,35 ± 7	7	135
F1 (f Sw × m Om) ПАК*	0,577 ± 6	260 ± 2,5	49,3 ± 0,4	0,2 ± 4	10	100
F1 (f Sw × m Om) ПАК**	0,556 ± 5	239 ± 2	39,3 ± 0,7	0,238 ± 4	10	100
F1 (f Lw × m Om) ПАК*	0,737 ± 3	285,3 ± 1	45,3 ± 0,2	0,189 ± 3	6	312
F1 (f Lw × m Om) ПАК**	0,607 ± 4	268,8 ± 2	40,2 ± 0,6	0,179 ± 3	5	277
F1 (f Om × m Lw) ПАК*	0,703 ± 5	204,1 ± 3	40,3 ± 0,6	0,259 ± 6	6	195
F1 (f Om × f Lw) ПАК**	0,510 ± 9	169,2 ± 2	30,0 ± 0,6	0,219 ± 4	4	186

П р и м е ч а н и е. Средние значения: E – числовая эксцентricность, S – площадь клетки, s – площадь ядра, NCR – ядерно-цитоплазматические отношения, $\pm m$ – ошибка средней. n^1 – число исследованных рыб, n^2 – число исследованных эритроцитов. Остальные обозначения см. в табл. 2.

риальных F1 (f Lw × m Om) S больше ($p < 0,001$), s и NCR меньше ($p < 0,001$), а E не отличается от соответствующих параметров природных омулей и сигов.

Особенности цитометрических показателей эритроцитов у выращенных в холодных аквариумах сиговых рыб. При сравнении инкубированных и выращенных в условиях аквариумов омулей, сигов и их гибридов выявлено, что у F1 (f Sw × m Om) S больше ($p < 0,001$), s и NCR меньше ($p < 0,001$), в сравнении с омулями и пыжьянами E различий не имеет. У F1 (f Om × m Lw) все цитометрические параметры меньше ($p < 0,001$) в сравнении с омулями, S и s меньше ($p < 0,001$), NCR больше ($p < 0,001$), а E не различаются в сравнении с озерными сигами. У F1 (f Lw × m Om) все цитометрические параметры больше ($p < 0,001$), чем у озерных сигов, E , S больше ($p < 0,001$), NCR меньше ($p < 0,001$), s не отличается от показателей омулей.

Особенности цитометрических показателей эритроцитов у выращенных в холодных и теплых аквариумах сиговых рыб. У выращенных в теплых аквариумах озерных сигов F1 (f Om × m Lw) и F1 (f Lw × m Om)

все цитометрические параметры ($p < 0,001$), у омулей и F1(f Sw × m Om) – E , S , s ($p < 0,001$), у пыжьянов – E и S ($p < 0,05$) больше в сравнении с аналогичными формами из холодных аквариумов. У F1(f Sw × m Om) – по NCR , у пыжьяна – по NCR и s различий не выявлено.

Таким образом, у природных омулей и сигов и их гибридов цитометрические показатели эритроцитов больше в сравнении с аналогичными формами из аквариумов при одинаковых условиях содержания. Условия аквариумного содержания менее всего повлияли на форму клеток пыжьянов и гибридов (f Sw × m Om). Имеющие наиболее крупные эритроциты самки озерного сига определяют размеры клеток эритроцитов у F1 (f Lw × m Om). Цитометрические параметры эритроцитов всех исследованных форм сиговых рыб из теплых аквариумов больше в сравнении с рыбами из холодных аквариумов.

У искусственно полученных гибридов, в отличие от природных, ядра эритроцитов не только не увеличиваются в размерах, а даже становятся меньше в сравнении как с природными родителями, так и с сигами и омулями, выращенными в аквариумах в одина-

ковых с гибридами условиях. В целом размеры клеток и ядер эритроцитов определяются видовыми особенностями разных форм сиговых рыб. Ядерно-цитоплазматические отношения являются производными размеров ядра и клетки. Наибольшее влияние экологические факторы оказывают на форму эритроцита.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований показали, что гематологические и цитометрические показатели красной крови в целом отражают экологические особенности рыб, цитометрические показатели эритроцитов в пределах опытной группы сиговых – малоизменчивый признак. Выявлено сходство по исследованным параметрам у генеративно-речных омулей и пыжьянов и отличие от генеративно-озерных сигов.

Популяционные различия в каждой из исследованных форм рыб также связаны с адаптациями к определенным условиям обитания [Yakhnenko et al., 2012]. Выявленные ранее генетические различия байкальских сиговых рыб [Яхненко и др., 1992; Мамонтов, Яхненко, 1995; Суханова, 2004; Sukhanova et al., 2002, 2004] подтверждают тот факт, что отличия в размерах эритроцитов у симпатрических популяций байкальских сиговых рыб, с одной стороны, генетически детерминированны, а с другой, – это адаптации к внешним условиям, что позволяет этим сигам занимать и использовать разные трофические ниши. Подобным образом М. Л. Эванс с соавт. связывают генетически детерминированные различия гемоглобинов и морфологические особенности эритроцитов с адаптациями кислородной транспортной системы к энергетическим затратам и соответствующим пищевым потребностям у разных экологических форм североамериканского озерного сига *Coregonus clupeaformis* (Mitchill, 1818) [Evans et al., 2012, 2014].

Выявленные различия цитометрических параметров эритроцитов и концентрации гемоглобина разных форм сиговых рыб, содержащихся в аквариумах, и соответствующих природных форм из одинаковых температурных условий дает основание предполагать,

что в кислородной транспортной системе крови рыб при содержании в условиях ПАК произошли изменения. Обнаружено изменение цитометрических индексов, снижение концентрации гемоглобина и количества функционально активных митохондрий на 20–30 % и изменение их структуры.

Одним из факторов, вызывающих изменения в размерах и форме эритроцитов рыб при искусственном выращивании, является снижение содержания кислорода в воде [Серпунин, 2009; Андреева, Муханов, 2012; Солдатов и др., 2014]. Выяснено, что гипоксия вызывает нарушение внутриклеточного Ca^{2+} -баланса, концентрацию которого контролируют митохондрии. Возникает вазоконстрикция, которая является результатом увеличения внутриклеточных объемов Ca^{2+} , что в результате приводит к сжатию сосудов [Новицкая, Солдатов, 2011; Солдатов и др., 2014], в связи с чем эритроциты приобретают вытянутую форму. При потере способности митохондрий поддерживать электрохимический градиент ионов водорода на внутренней мембране теряется их способность эффективно осуществлять окислительное фосфорилирование, производство АТФ и сбалансированный митохондриальный Ca^{2+} ионный гомеостаз. При этом наблюдается дегенеративные изменения структуры митохондрий, которые приводят к угнетению дыхательной функции эритроцитов и смерти клетки. При индукции апоптоза происходит изменение размеров и формы митохондрий, увеличивается число крист, происходит уплотнение матрикса, деградация крист [Реакция..., 2001; Сапрунова и др., 2008; Савицкая и др., 2009].

В условиях гипоксии не индуцируется окисление гемоглобина [Солдатов, Парфенова, 2000]. Причем выявлены тепло- и холодоустойчивые компоненты гемоглобинов у лососевых рыб [Бушуев, 1973], трески [Brix et al., 2004], сигов [Ермоленко, Викторский, 1983]. Согласно исследованиям М. Л. Эванса с соавт. [Evans et al., 2012, 2014], разные фракции гемоглобинов генетически различаются и адаптированы к разным кислородным и температурным условиям. Для байкальских сиговых рыб оптимальными являются температуры от 9 до 17 °С [Козлова, Вещева, 1988; Топорков, Козлова, 1994; Голованов,

2013]. Увеличение размеров клетки у рыб из теплых аквариумов может быть связано с необходимостью увеличения интенсивности дыхания в неблагоприятных кислородных условиях с помощью увеличения цитоплазматического района клетки [Lay, Baldwin, 1999]. Уменьшение цитометрических показателей, концентрации гемоглобина и КЕК связано с уменьшением содержания кислорода в аквариумах. Это подтверждается еще и тем, что NCR у аквариальных рыб больше, чем у природных. Считается, что в условиях дефицита кислорода увеличение размеров ядра может быть связано с повышенным производством продуктов транскрипции [Nikinmaa, 2001; Webster et al., 2009].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленные в результате исследования изменения цитометрических параметров эритроцитов, количественных показателей содержания гемоглобина, уменьшения количества и изменения структуры митохондрий в цитоплазме эритроцитов свидетельствуют о том, что эритроциты рыб, обитающих в естественной среде, обогащенной кислородом и привычным кормом, имеет более высокие показатели метаболизма, в отличие от рыб в условиях ПАК.

Авторы благодарят Е. В. Лихошвай, А. П. Лопатина, В. И. Егорова, И. В. Ханаева, И. А. Небесных, И. Н. Смолина за помощь в сборе материала и проведении эксперимента.

Работа выполнена при поддержке интеграционной программы СО РАН № 6 “Виварии, коллекции клеточных культур, уникальных штаммов бактерий, микроорганизмов, коллекции растений” и гранта РФФИ № 140401242 “Изучение наследственно обусловленных адаптаций симпатрических популяций сиговых рыб с использованием молекулярно-генетических, биохимических и поведенческих маркеров”.

ЛИТЕРАТУРА

- Андреева А. Ю., Муханов В. С. . Метод морфометрии *in vivo* ядерных эритроцитов // Гидробиология. 2012. Т. 48, № 3. С. 115–120.
- Анохина В. С., Квасоварова А. Н., Щербак К. С. Характеристика крови и гистология гонад заводской и дикой озерной форели // Бюл. Моск. гос. техн. ун-та. 2012. Т. 15, № 4. С. 691–700.
- Бушуев В. П. Двухкомпонентность гемоглобинов лососевых как отражение их аллотетраплоидного происхождения / Биохимическая генетика рыб / под ред. В. С. Кирпичникова, А. С. Трошина. Л.: Изд-во ин-та цитологии АН СССР, 1973. С. 62–67.
- Глаголева Т. П., Бодрова Т. И. Диагностическое значение гематологического анализа у лососевых видов рыб / Корма и методы кормления объектов марикультуры. Тр. ВНИРО. 1988. С. 121–127.
- Глызин А. В., Глызина О. Ю., Любочко С. А. Изучение байкальских гидросимбионтов с помощью экспериментальных аквариальных установок // Вода: химия и экология. 2011. № 2. С. 35–40.
- Голованов В. К. Температурные критерии жизнедеятельности пресноводных рыб. М.: Полиграф-плюс, 2013. 300 с.
- Ермоленко Л. Н., Викторовский Р. М. Электрофоретическое изучение гемоглобинов у рыб подсемейства Coregoninae / Экология и систематика пресноводных организмов Ближнего Востока / под ред. И. М. Леванидова. Владивосток: Изд-во Дальневосточного науч. центра, 1983. С. 1309–1315.
- Животовский А. А. Популяционная биометрия / под ред. Н. В. Глотова. М.: Наука, 1993. 271 с.
- Заварзин А. А. Избранные труды / под ред. А. А. Стрелкова, Л. Н. Жинкун. М.; Л.: Изд-во АН СССР. 379 с.
- Иванова Н. Т. Атлас клеток крови рыб / под ред. П. А. Коржуева, И. Н. Остроумовой. М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983. 184 с.
- Изюмов Ю. Г., Таликина М. Г., Чеботарева Ю. В. Количество микроядер в эритроцитах периферической крови плотвы *Rutilus rutilus* (L.) и леща *Abramis brama* (L.) Рыбинского и Горьковского водохранилищ // Биология внутр. вод. 2003. № 1. С. 98–101.
- Ильинских Н. Н., Новицкий В. В., Ванчугова Н. Н., Ильинских И. Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск: Изд-во Том. гос. ун-та, 1992. 272 с.
- Камшылов И. М., Камшылова Т. В. Влияние температуры на функциональные свойства гемоглобина карася (*Carassius carassius* L.) // Вопр. ихтиологии. 2007. Т. 47, № 4. С. 562–565.
- Козлова Н. И., Вещева Т. Н. Оптимальная и летальная температура воды для молоди некоторых сиговых рыб (омуль, сиг, пелядь) // Проблемы экологии Прибайкалья: тез. докл. III Всесоюз. науч. конф. 5–10 сентября 1988 г. Иркутск, 1988. С. 121.
- Лугаськова Н. В. Эколого-физиологические особенности крови сиговых рыб в период нагула в субарктической зоне бассейна реки Оби // Вопр. ихтиологии. 2003. Т. 43, № 6. С. 835–841.
- Мамонтов А. М., Яхненко В. М. Морфологическая и генетико-биохимическая оценка популяционной дифференциации байкальского озерно-речного сига *Coregonus lavaretus pidschian* Gmelin (Coregonidae) // Там же. 1995. Т. 35, № 2. С. 175–181.
- Мельник Н. Г., Смирнова-Залуми Н. С., Смирнов В. В. и др. Гидроакустический учет байкальского омуля / под ред. В. И. Кудрявцева, Е. В. Дзюба. Новосибирск: Наука, 2009. 244 с.
- Моисеенко Т. И. Гематологические показатели рыб в оценке их токсикозов (на примере сига *Coregonus lavaretus* L.) // Вопр. ихтиологии. 1998. Т. 38, № 3. С. 371–380.
- Новицкая В. Н., Солдатов А. А. Эритроидные элементы гемолимфы *Anadara inaequalis* Bruguiere, 1789

- (Mollusca: Arcidae) в условиях экспериментальной аноксии: функциональные и морфометрические характеристики // Морской экол. журн. 2011. Т. 10, № 1. С. 56–64.
- Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды / под ред. В. Р. Микрякова. М.: Наука, 2001. 126 с.
- Савитская М. А., Кизурина-Евгеньева О. П., Онищенко Г. Е. Исследование механизма активации 6-токоферилсукцината клеточных культур человека эпидермоидной карциномы A431 // Наука 21 века: тез. докл. Междунар. шк.-конф. ученых биологов. 2009. С. 118–119.
- Самсеев Р. П., Капитонова М. Ю. Общая и частная гистология / под ред. С. Л. Кузнецова. М.: ОНИКС; Мир, 2010. 336 с.
- Сапрунова В. Б., Солодовникова И. М., Бакеева Л. Е. Выявление цитохром с оксидазной активностью в митохондриях кардиомиоцитов изолированной ткани миокарда при длительном действии гипоксии // Цитология. 2008. Т. 50, № 3. С. 268–274.
- Серпунин Г. Г. Морфологическая характеристика крови молоди атлантического лосося (*Salmo salar* L.), выращиваемой в садках // Атлантический лосось: биология, охрана и воспроизводство: тез. докл. Междунар. конф., 4–8 сентября, 2000 г. Петрозаводск, 2000. № 98. С. 49–50.
- Серпунин Г. Г. Биологические основы рыбоводства. М.: Колос, 2009. 384 с.
- Скоркина М. Ю., Сладкова Е. А. Исследование морфометрических параметров эритроцитов лягушек методом сканирующей зондовой микроскопии // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии. Минск, 2008. С. 215–218.
- Солдатов А. А., Парфенова И. А. Влияние температуры на устойчивость гемоглобинов морских рыб к окислению // Экология моря. 2000. Т. 53. С. 49–53.
- Солдатов А. А., Андреева А. Ю., Новицкая В. Н., Парфенова И. А. Сопряжение мембранных и метаболических функций в ядерных эритроцитах при гипоксии *Scorpaena porcus* L. (эксперименты *in vivo* и *in vitro*) // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. 2014. Т. 50, № 5. С. 358–363.
- Суханова Л. В. Молекулярно-филогенетическое исследование байкальского омуля: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2004. 17 с.
- Топорков И. Г., Козлова Н. И. Оптимальная и верхняя летальная температура воды для омуля в раннем онтогенезе: Оценка состояния водных и наземных экосистем // Экологические проблемы Прибайкалья. Новосибирск, 1994. С. 39–42.
- Уикли В. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир, 1975. 324 с.
- Урбах В. Ю. Биометрические методы / под ред. Н. Н. Лившиц. М.: Наука, 1963. 295 с.
- Флоренсов В. А. Филогенез и онтогенез кроветворной функции позвоночных // Журн. экспериментальной биол. 1966. № 187. С. 143–158.
- Яхненко В. М. Морфологическая характеристика крови рыб озера Байкал / под ред. В. А. Флоренсова. Новосибирск: Наука, 1984. 120 с.
- Яхненко В. М., Осинов А. Г., Мамонтов А. М. Морфологическая и популяционно-генетическая дифференциация байкальского озерного сига *Coregonus lavaretus baicalensis* Dybowski // Генетика. 1992. № 28(7). С. 139–150.
- Яхненко В. М., Мамонтов А. М. Генетико-биохимический анализ гибридов омуля *Coregonus autumnalis migratorius* (Georgi) и озерно-речного сига *C. lavaretus pidschian* (Gmelin) озера Байкал // Вопр. ихтиологии. 2006. № 46 (4). С. 495–502.
- Bhattacharyya K., Guna T., Bhar R., Ganesan V., Khan M., Brahmachary R. L. Atomic force microscopic studies on erythrocytes from an evolutionary perspective // The anatomical record. 2004. Part A. Vol. 297. P. 671–675.
- Blaxhall P. C., Daisley K. W. Routine haematological methods for use fish with blood // J. Fish Biol. 1973. N 5. P. 771–781.
- Brix O., Thorkildsen S., Colosimo A. Temperature acclimation modulates the oxygen binding properties of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) genotypes *HbI*1/1*, *HbI*1/2*, and *HbI*2/2* by changing the concentrations of their major hemoglobin components (results from growth studies at different temperatures). Comparative Biochemistry and Physiology A // Molec. and Integrative Physiol. 2004. N 138. P. 241–251.
- Evans M. L., Praebel K., Peruzzi S., Bernatchez L. Parallelism in the oxygen transport system of the lake whitefish: the role of physiological divergence in ecological speciation // Molec. Ecol. 2012. N 21. P. 4038–4050.
- Evans M. L., Praebel K., Peruzzi S., Amundsen P. A., Bernatchez L. Phenotype-environment association of the oxygen transport system in trimorphic European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) populations. Evolution. 2014. N 68 (8). P. 2197–2210.
- Felip A., Carrillo M., Herraiz M. et al. Advances in fish reproduction and their application to broodstock management: a practical manual for sea bass // Options Mediterraneennes, B. Protocol K. // Erythrocyte measurements. 2009. N 63. P. 71–74.
- Gomulka P., Wlasow T., Szczepkowski M., Misiewicz L., Ziomek E. The effect of propofol anaesthesia on haematological and biochemical blood profile of European whitefish // Turkish Journ. Fish. Aquatic Sci. 2014. N 14. P. 331–337.
- Green N. G., Thomas B. J. Numerical determination of the effective moments of non spherical particles // J. Phys. D: Appl. Phys. 2007. N 40. P. 78–85.
- Gregory T. R. The bigger the C-value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates // Blood Cells Molecules and Diseases. 2001. N 27. P. 830–843.
- Hartenstein V. Blood cells and blood cell development in the animal kingdom // Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 2006. N 22. P. 677–712.
- Hartman F. A., Lessler M. A. Erythrocyte measurements in fishes, amphibian and Reptiles // Comparative Biochem. Physiol Part A: Physiology. 1974. Vol. 47, N 1. P. 341–345.
- Lay P. A., Baldwin J. What determines the size of teleost erythrocytes? Correlations with oxygen transport and nuclear volume // Fish Physiol. and Biochem. 1999. N 20. P. 31–35.
- Lehmann J., Sturenberg F. J. Die Auswertbarkeit von Blutparametern und Methoden zu der Fischtoxikologie // Beitrage zur Fischtoxikologie und Histologie Fisch und Umwelt / eds. H. H. Reichenbank-Klinke, W. Ahne. Vol. 9, P. 26–50.
- Najiah M., Nadirah M., Marina H., Lee S. W., Nazaha W. H. Quantitative comparisons of erythrocyte morphology

- in healthy freshwater fish species from Malaysia // Res. Journ. Fish. Hydrobiol. 2008. Vol. 3, N 1. P. 32–35.
- Nikinmaa M. Haemoglobin function in vertebrates: evolutionary changes in cellular regulation in hypoxia // Respiration Physiol. 2001. N 128. P. 317–329.
- Prihirunkit K., Salakij C., Apibal S., Narkkong N. Hematological, cytochemical and ultrastructural features of blood cells in fishing cat (*Felis viverrina*) // J. Vet. Sci. 2007. Vol. 8, N 2. P. 163–168.
- Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. 1963. N 17. P. 208–212.
- Srivastava A. K. Studies on the haematology of certain freshwater teleosts. IV. Leucocytes // Anatomischer Anzeiger. 1968. N 123. P. 520–533.
- Srivastava A.K. Studies on the haematology of certain freshwater teleosts. V. Thrombocytes and clotting of blood // Ibid. 1969. N 124. P. 368–374.
- Sukhanova L. V., Smirnov V. V., Smirnova-Zalumi N. S., Kirilchik S. V., Griffiths D., Belikov S. I. The taxonomic position of the Lake Baikal omul *Coregonus autumnalis migratorius* (Georgi) as revealed by sequence analysis of mtDNA cytochrome b and control region. Archiv für Hydrobiologie, Special Iss. // Advances in Limnology. 2002. Vol. 57. P. 97–106.
- Sukhanova L. V., Smirnov V. V., Smirnova-Zalumi N. S., Kirilchik S. V., Shimizu I. Grouping of Baikal omul *Coregonus autumnalis migratorius* (Georgi) within the *C. lavaretus* complex confirmed by using a nuclear DNA marker // Ann. Zoologici Fennici. 2004. Vol. 41. P. 41–49.
- Webster M., Witkin K. L., Cohen-Fix O. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly // J. Cell Sci. 2009. Vol. 122. P. 1477–1486.
- Wlasow T., Demska-Zakes K., Gomulka P., Jarmolowicz S. Various aspects of Piscine toxicology // Interdisc Toxicol. 2010. Vol. 3, N 3. P. 100–104.
- Yakhnenko V., Klimenkov I., Mamontov A., Dzuba E., Chetverikova O. Blood cell structure in Baikal omul (*Coregonus migratorius* Georgi) and changes under phenol exposure // Advanc. Limnol. 2013. Vol. 64. P. 25–37.
- Yakhnenko V., Klimenkov I., Mamontov A., Yakhnenko M. Intra- and inter-specific features of the composition and structure of blood cells of coregonid fishes from the East-Siberian region // Ibid. 2012. Vol. 63. P. 285–297.
- Yakhnenko V., Klimenkov I., Pastukhova N. Response of olfactory receptors and blood cells of Lake Baikal fish to phenol exposure // Environ. biotechnol. 2010. Vol. 6, N 2. P. 30–37.
- Yakhnenko V. M., Yakhnenko M. S. Haematological parameters of Lake Baikal oilfish (golomyanka) (*Comephorus dybowskii* Korotneff and *Comephorus baicalensis* Pallas) // Hydrobiologia. 2006. N 568 (S). P. 233–237.
- Zapata A., Cejalvo T. G., Guttierrez-de Frias C., Cortes A. Ontogeny of the immune system of fish // Fish Shellfish Immunol. 2006. Vol. 20, N 2. P. 126–136.

Morpho-Functional Peculiarities of Erythrocytes of Baikal Coregonid Fishes Grown in Natural and Artificial Conditions

V. M. YAKHNENKO¹, I. V. KLIMENKOV¹, N. P. SUDAKOV², A. Yu. BELYSHENKO¹,
L. V. SUKHANOVA¹, O. Yu. GLYZINA¹, A. M. MAMONTOV¹, Yu. P. SAPOZHNIKOVA¹

¹ Limnological Institute, SB RAS
664033, Irkutsk, Ulan-Batorskaya str., 3

² Scientific Center of Surgery and Traumatology
664033, Irkutsk, Bortsov Revolyutsii str., 1
E-mail: vera@lin.irk.ru

The structure and cytometric indices of red blood cells (RBC), hemoglobin content (Hb), oxygen capacity of blood (OCB) of the omul, whitefish and their hybrids from Lake Baikal and grown in the Freshwater Aquarium Complex (FAC) were analyzed. Cytometric indicators of red blood cells of omul and whitefish from natural populations were higher than that of the same fishes from aquariums under identical conditions. The conditions of aquariums had the least effect on the form of red blood cells of Siberian whitefish and hybrids: female Siberian whitefish and male omul F1 (f Sw × m Om). Female Lacustrine whitefishes, that had the largest erythrocytes, determined the size of the cells in hybrids: female Lacustrine whitefish and male omul (f Lw × m Om). Among all the studied forms of Coregonid fishes cytometric parameters of erythrocytes of the fishes from warm aquariums were higher than that of the fishes from cold aquariums. The size of the erythrocyte nucleus in artificially propagated hybrids was smaller both in comparison to their parents from natural populations and to whitefish and omul grown in aquariums under the same conditions.

Erythrocytes of the whitefish from natural populations had a pool that was 20–30 % richer in functionally active mitochondria than that of the whitefish from aquariums. Disrupted mitochondrial structure was also observed in the latter. The obtained results indicate that the peculiarities of metabolism connected with oxygen transport in the studied forms of Baikal coregonids are determined by adaptation to the conditions of the occupied ecological niches.

Key words: erythrocytes, cytometric parameters, hemoglobin, mitochondria, coregonid fishes, hybrids, Lake Baikal, freshwater aquarium complex.