

УДК 595.3:591.11:57.033

## ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ АВСТРАЛИЙСКОГО КРАСНОКЛЕШНЕВОГО РАКА *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) ПРИ ЭКСПОЗИЦИИ НА ВОЗДУХЕ

© 2023 г. Д. Н. Скафарь<sup>a, b, d, \*</sup>, О. В. Стрелкова<sup>a, b</sup>, Д. В. Шумейко<sup>c, d</sup>

<sup>a</sup>Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

<sup>b</sup>Азово-Черноморский филиал Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии, Ростов-на-Дону, Россия

<sup>c</sup>Международный Таразский инновационный институт им. Ш. Муртазы, Тараз, Казахстан

<sup>d</sup>Научно-производственный центр “АкваТехБиотоп”, Краснодар, Россия

\*e-mail: skafden@mail.ru

Поступила в редакцию 19.12.2022 г.

После доработки 27.05.2023 г.

Принята к публикации 31.05.2023 г.

Исследовано влияние экспозиции на воздухе на гематологические показатели австралийского красноклешневого рака *Cherax quadricarinatus* Von Martens 1868. Гемолимфу отбирали сразу после извлечения рака из воды через 2, 4, 8 ч экспозиции на воздухе и спустя 24 и 72 ч после возвращения в воду. Определены общее число гемоцитов (ОЧГ), гемограмма, концентрация общего белка и гемоцианина. Рассмотрена динамика полученных гематологических показателей во временном аспекте: ОЧГ и доля гранулоцитов увеличивалась на протяжении всей экспозиции на воздухе, доля агранулоцитов и содержание общего белка и гемоцианина статистически достоверно не изменялись, доля полугранулоцитов снижалась. После экспозиции на воздухе цвет гемолимфы изменялся с голубоватого с сероватым оттенком на мутный серо-зеленый (отклонение от нормы). Полученные данные свидетельствуют о развитии компенсаторных механизмов и патологических явлений в ответ на стресс, вызванный пребыванием в воздушной среде, позволяют применять их на практике при оценке состояния австралийского красноклешневого рака в процессе транспортировки.

**Ключевые слова:** австралийский красноклешневый рак, *Cherax quadricarinatus*, гемолимфа, гемоциты, общий белок, гемоцианин, стресс, экспозиция на воздухе

**DOI:** 10.31857/S0320965223050157, **EDN:** FBDRLN

### ВВЕДЕНИЕ

Хотя раки – водные животные, они могут не продолжительное время пребывать и передвигаться на суше (Grote, 1981). Наземные миграции свойственны многим декаподам. Так, некоторые ракообразные, например луизианский рак (*Procambarus clarkii*), американский сигнальный рак (*Pacifastacus leniusculus*) и ржавый рак (*Orconectes rusticus*), способны перемещаться на расстояние 20–1000 м, пересекать дамбы между прудами, преодолевать плотины или водопады (Claussen et al., 2000; Souty-Grosset et al., 2016; Lemmers et al., 2022; Qing et al., 2022). Этим можно объяснить активное освоение обширных новых территорий североамериканскими раками (*Procambarus clarkii* и *Pacifastacus leniusculus*) (Kerby et al., 2005; Puku,

2014; Ramalho, Anastácio, 2015). Выход из водоема также способствует обмену особями между соседними популяциями и позволяет использовать наземные пути отхода в случае высыхания или загрязнения водоема (Puku, 2014). Ряд декапод, например, белоклешневый (атлантический) речной рак (*Austropotamobius pallipes*), выживают в течение нескольких суток на воздухе (Pond, 1975). Некоторые виды, особенно относящиеся к роющим, могут существовать в течение нескольких месяцев без воды в норах (Huner, Lindqvist, 1995; Kouba et al., 2016). Основная масса коммерчески важных ракообразных не подвергается воздействию воздуха в своей естественной среде, за исключением периода вынужденных миграций. Однако процедуры отлова и последующей обработки могут включать длительное нахождение вне воды (Paterson, Spanoghe, 1997; Taylor, 1997).

Способность покидать воду и находиться не продолжительное время на суше характерна и для

**Сокращения:** ГПТ – гемопоэтическая ткань; ОЧГ – общее число гемоцитов; УЗВ – установки замкнутого водоснабжения.

перспективного объекта тепловодной аквакультуры – австралийского красноклешневого рака *Cherax quadricarinatus* Von Martens 1868 (Лагуткина и др., 2020). Он может покидать пруды для разведения (Jones, 1990), осваивать новые водоемы (Coughran, Leckie, 2007; Leland et al., 2012; Beatty et al., 2019) и, вероятно, дышать атмосферным кислородом при нехватке его в воде (Morris, Callaghan, 1998).

Во время пребывания раков на суше происходят гематологические и биохимические изменения гемолимфы, возрастают концентрации лактата и наступает ацидоз (Taylor, 1997; Morris, Oliver, 1999; Speed et al., 2001; Lorenzon et al., 2007). Под действием воздуха повышается уровень гипергликемических гормонов и собственно глюкозы (Webster, 1996; Van Nam, 1998; Chang et al., 2005), накапливаются ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  в гемолимфе (Jackson et al., 2001). При изучении гемолимфы узкопалых раков (*Astacus leptodactylus*) во время пребывания в течение 24 ч вне воды фиксировали изменения общего содержания белка, что указывало на реакцию раков на стресс (Malev et al., 2010). Гематологические изменения, вызванные пребыванием на воздухе, выглядят следующим образом: происходит снижение доли гранулярных клеток, увеличение времени свертываемости крови (Fotadar et al., 2001), снижение ОЧГ в течение 24 ч после выдерживания вне воды (Cheng, 2003). Однако такие изменения характерны не для всех видов (Malev et al., 2010).

С точки зрения фундаментальной биологии интересно изучение гематологических показателей австралийского красноклешневого рака, находящегося вне воды. Прикладная сторона исследования обуславливается наличием нескольких подходов транспортировки ракообразных – в водной среде с принудительной аэрацией и вне воды в емкостях с влажным субстратом. Наиболее распространен второй способ, однако он вызывает сильный стресс у этого вида, что нежелательно при транспортировке ремонтно-маточного стада и посадочного материала.

Необходимы данные по динамике показателей системы крови, с помощью которых можно оценить стрессовое состояние, вызванное транспортировкой вне водной среды. Некоторые физиологические и биохимические показатели кровеносной системы позволяют судить о состоянии здоровья рака (Александрова, Ковачева, 2010; Paterson et al., 2005), что необходимо для мониторинга физиологического состояния при культивировании гидробионтов.

Информация о воздействии нахождения вне воды на физиологическое состояние австралийского красноклешневого рака недостаточна. Известно, что экспозиция на воздухе вызывает гистологические изменения в гепатопанкреасе и

кишечнике, а также подавляет антиоксидантный и иммунный статус (Lu, et al., 2021).

Цель работы – исследовать динамику некоторых физиолого-биохимических показателей гемолимфы австралийского красноклешневого рака при экспозиции в воздушной среде и после его возвращения в воду.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили в лаборатории перспективных технологий в аквакультуре на базе бизнес-инкубатора Кубанского государственного университета.

Объектом исследования служили австралийские красноклешневые раки. Их содержали в УЗВ – бассейнах объемом  $2.5 \text{ м}^3$  и площадью  $3.14 \text{ м}^2$  каждый, при температуре воды  $22.5\text{--}24.0^\circ\text{C}$ . Там же размещали укрытия из поливинилхлоридных труб для снижения внутривидовой агрессии. Для кормления использовали корм Sorpens Start Premium 1.5 мм (Нидерланды) (белок 54, жиры 15, зола 10.4, фосфор 1.59%), суточная норма – 3% биомассы ракообразных. Кормление прекращали за двое суток до начала эксперимента. В течение всего эксперимента гидрохимические показатели воды находились в пределах рыбоводных норм. Концентрация кислорода в воде была  $5 \text{ мг/л}$ , рН – 7.9, фотопериод – 12 ч.

Исследовали физиолого-биохимические показатели гемолимфы при экспозиции на воздухе в течение 8 ч, а также в течение нескольких суток после возвращения раков в воду. Для опыта использовали 20 экз. раков (10 самцов и 10 самок) массой  $64 \pm 18 \text{ г}$  (от 29 до 90 г). Их перемещали из системы УЗВ в пенопластовые коробки с внутренними габаритами  $35.5 \times 48.0 \times 32.0 \text{ см}$  по 10 экз. в каждую и выдерживали в течение 8 ч при температуре воздуха  $24^\circ\text{C}$ . Гемолимфу отбирали сразу после извлечения из УЗВ и через 2, 4 и 8 ч пребывания на воздухе. После 8 ч экспозиции раков возвращали в УЗВ и отбирали гемолимфу спустя 24 и 72 ч.

Гемолимфу для анализа отбирали прижизненно шприцом объемом 2 мл с иглой 23G с соблюдением правил асептики и антисептики методом пункции вентрального синуса раков. Такой способ позволяет прижизненно отбирать кровь, не нанося здоровью раков значительного ущерба (Александрова, Ковачева, 2010). В качестве антикоагулянта использовали 4%-ный раствор Трилона-Б ( $\text{ЭДТА-Na}_2$ ) (BASF, Китай).

Подсчет гемоцитов проводили в камере Горяева с помощью светового микроскопа Микромед-1, определяли процентную долю каждого типа гемоцитов. Для подсчета ОЧГ применяли следующую формулу:

$$\text{ОЧГ в 1 мкл} = N \times 5,$$

где  $N$  – число всех гемоцитов в 50 больших квадратах на сетке камеры (Скафарь, Шумейко, 2022).

Гемолимфу в объеме 40 мкл центрифугировали при 3000 об./мин в течение 15 мин, затем к пробе добавляли 3960 мкл дистиллированной воды. Оптическую плотность проб определяли при 335 нм на спектрофотометре Leki SS2107UV, концентрацию гемоцианина выражали в ммоль/л и рассчитывали по формуле (Wu et al., 2017):

$$E_{335} = 2.69 \times \text{ОП}_{335},$$

где  $\text{ОП}_{335}$  – оптическая плотность пробы, 2.69 – экстинкция для гемоцианина при длине волны 335 нм (Nickerson, Van Holde, 1971).

Общий белок определяли рефрактометрическим методом на рефрактометре ИРФ-22 (Ковачева, Александрова, 2010), концентрацию белка выражали в процентах.

Расчеты и графическое оформление полученных данных проводили с помощью программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и Statistica v. 14 (TIBCO Software Inc.). Для проверки статистической достоверности различий в группах использовали  $U$ -критерий Манна–Уитни и критерий Краскела–Уоллиса. Различия считали статистически достоверными при  $p < 0.05$ . Результаты представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение (на графиках использованы медианные значения).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Гемограмма. Общее число гемоцитов.** После 2 ч экспозиции ОЧГ увеличивалось с  $2615 \pm 1016$  до  $3575 \pm 1125$  кл./мкл ( $p < 0.001$ ), т.е. в 1.4 раза (рис. 1а). Через 4 ч выдерживания ОЧГ достигало  $3648 \pm 1684$  кл./мкл, что статистически достоверно ( $p < 0.05$ ) превышало таковое в начале опыта. При этом ОЧГ после 2-го и 4-го часа экспозиции статистически ( $p = 0.89$ ) не различалось. За 8 ч опыта ОЧГ выросло в 1.6 раза ( $4279 \pm 1239$  кл./мкл) по сравнению с первоначальными показателями ( $p = 0.0001$ ), различия ОЧГ 4-го и 8-го часа эксперимента статистически недостоверны ( $p = 0.35$ ). За 8 ч экспозиции на воздухе отмечено статистически достоверное ( $p < 0.01$ ) увеличение ОЧГ. Через 24 ч после экспозиции ОЧГ снизилось до  $2352 \pm 1090$  кл./мкл, что сопоставимо с уровнем ОЧГ до экспозиции ( $p = 0.4$ ), а после 72 ч оно упало до минимальной за период наблюдений величины.

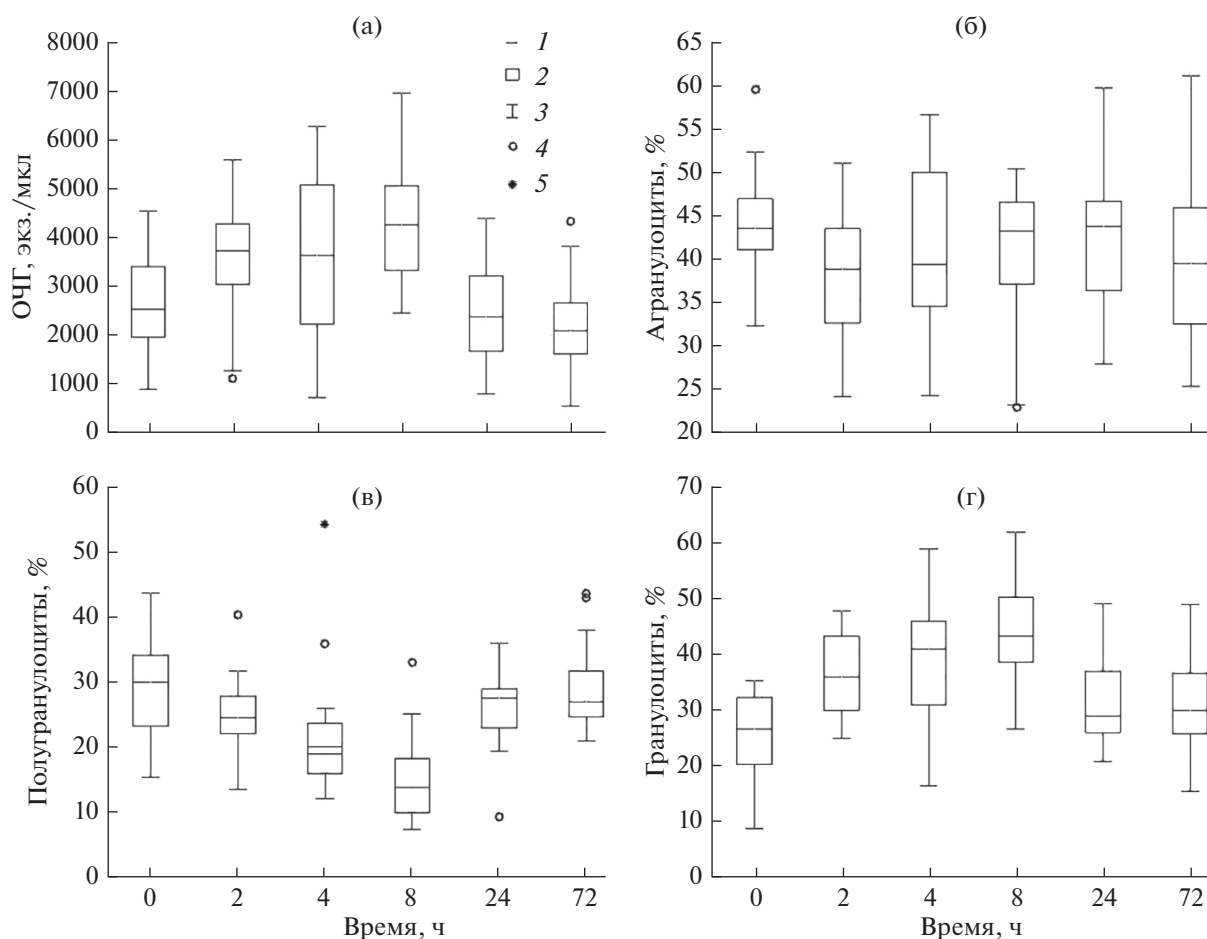
**Агранулоциты.** Дисперсионный анализ с помощью критерия Краскела–Уоллиса показал, что доля агранулоцитов за время экспозиции статистически достоверно ( $p = 0.14$ ) не изменялась. При этом различия в показателях между началом опыта и двумя часами экспозиции были статисти-

чески достоверны ( $p < 0.05$ ), средние значения достигали  $44.0 \pm 5.9$  и  $38.1 \pm 7.3\%$  соответственно (рис. 1б). Через 4 ч выдерживания вне воды доля агранулоцитов была  $40.8 \pm 9.6\%$ , что статистически недостоверно по сравнению с началом опыта ( $p > 0.05$ ) и двумя часами экспозиции ( $p > 0.05$ ). Через 8 ч экспозиции данный показатель достиг  $40.6 \pm 8.4\%$ , что статистически недостоверно ( $p > 0.05$ ) по сравнению с началом опыта и четырьмя часами экспозиции. Через 24 ч после экспозиции показатели вернулись в исходное состояние (начало эксперимента) –  $42.2 \pm 7.9\%$ ,  $p = 0.51$ ; однако через 72 ч после воздействия воздуха процент агранулярных клеток незначительно уменьшился –  $40.0 \pm 8.7\%$ ,  $p = 0.36$ .

**Полугранулоциты.** После 2 ч экспозиции данный показатель был равен  $25.0 \pm 7.3\%$ , что статистически достоверно ( $p = 0.05$ ) меньше доли полугранулоцитов в начале эксперимента (рис. 1в). Через 4 ч опыта доля полугранулоцитов не превышала  $21.6 \pm 9.9\%$ , что меньше таковой в начале опыта и через 2 ч экспозиции ( $p = 0.05$ ). Через 8 ч этот показатель снизился до  $14.8 \pm 6.4\%$ , что в 2 раза меньше по сравнению с таковыми в начале эксперимента –  $29.5 \pm 7.9\%$  и через 4 ч воздействия воздуха ( $p < 0.01$ ). Таким образом, снижение доли полугранулоцитов за время экспозиции было статистически достоверным ( $p < 0.001$ ). Через 24 ч после экспозиции показатели начали возвращаться к значениям в начале эксперимента –  $25.8 \pm 5.9\%$  ( $p = 0.07$ ), после 72 ч экспозиции среднее значение доли полугранулоцитов было  $29.0 \pm 6.5\%$ , что максимально близко к таковому в начале эксперимента ( $p = 0.48$ ).

**Гранулоциты.** Через 2 ч экспозиции доля гранулоцитов ( $36.9 \pm 7.1\%$ ) превышала таковую в начале эксперимента ( $26.5 \pm 7.1\%$ ),  $p < 0.001$  (рис. 1г). Через 4 ч экспозиции данный показатель остался примерно на том же уровне, что и после 2 ч опыта –  $37.6 \pm 11.1$ ,  $p = 0.74$ . Через 8 ч экспозиции доля гранулярных клеток увеличилась в 1.7 раз ( $43.8 \pm 9.3\%$ ) по сравнению с началом опыта ( $p < 0.001$ ); различия показателя между 4-м и 8-м часом экспозиции также были статистически недостоверны ( $p = 0.16$ ), доля гранулоцитов за время экспозиции (8 ч) статистически достоверно возросла ( $p < 0.001$ ). Через 24 ч после экспозиции различия между началом эксперимента были статистически недостоверны ( $p = 0.1$ ), средние значения снизились до  $32.1 \pm 8.0\%$ . На 72 ч различия между началом эксперимента были статистически недостоверны ( $p = 0.15$ ), средние значения были  $31.0 \pm 8.1\%$ , что несколько превышало таковые в начале эксперимента.

Постольку процентное отношение каждого из типов гемоцитов не дает представления о количественном содержании всех типов гемоцитов, относительные значения процентного соотноше-



**Рис. 1.** Гематологические показатели *Cherax quadricarinatus* во время экспозиции на воздухе и после возвращения в воду: а – ОЧГ, б – агранулоциты, в – полугранулоциты, г – гранулоциты. По оси абсцисс – время отбора гемолимфы. 1 – медиана, 2 – процентиль (25–75%), 3 – диапазон без выбросов, 4 – выбросы, 5 – экстремум.

ния типов гемоцитов переводили в количественные (выражающие число клеток определенного типа гемоцитов в 1 мкл гемолимфы) (табл. 1). Число агранулоцитов после 8 ч экспозиции увеличилось в 1.5 раза что статистически достоверно ( $p < 0.01$ ). Число полугранулоцитов незначительно снизилось в 0.8 раз с 732 до 617 кл./мкл,  $p = 0.2$ , а гранулоцитов – увеличилось в 2.7 раз ( $p < 0.01$ ).

**Биохимические показатели. Общий белок.** Изменение содержания общего белка крови (рис. 2а) было статистически недостоверным ( $p = 0.32$ ). Через 2 ч после нахождения рака вне воды содержание общего белка крови снизилось с  $5.3 \pm 1.9$  до  $4.5 \pm 2.0\%$ , что статистически недостоверно ( $p = 0.22$ ). Через 4 ч экспозиции данный показатель снизился до  $4.5 \pm 1.9\%$  и статистически недостоверно отличался от такового в начале опыта и через 2 ч ( $p > 0.05$ ). Через 8 ч опыта концентрация общего белка была  $4.4 \pm 1.9\%$ , различия с началом опыта и четырьмя часами экспозиции были недостоверны ( $p > 0.05$ ).

Однако через 24 ч после экспозиции показатели белка были достоверно ( $p < 0.01$ ) ниже в 1.4 раз по сравнению с таковыми в начале эксперимента. Средние значения составляли  $3.8 \pm 1.8\%$ . Такую же картину наблюдали и через 72 ч после экспозиции –  $4.0 \pm 1.7\%$  ( $p < 0.01$ ), статистически достоверные различия между показателями, полученными через 24 ч и 72 ч отсутствовали ( $p = 0.88$ ).

**Содержание гемоцианина** (рис. 2б). Через 2 ч выдерживания раков вне воды концентрация гемоцианина была  $0.38 \pm 0.04$  ммоль/л. Различия статистически недостоверны ( $p = 0.36$ ) по сравнению с началом опыта –  $0.40 \pm 0.05$  ммоль/л. Через 4 ч опыта данный показатель был  $0.38 \pm 0.06$  ммоль/л, различия с таковым в начале опыта и после 2 ч экспозиции недостоверны ( $p > 0.05$ ). Через 8 ч экспозиции концентрация достигла  $0.41 \pm 0.08$  ммоль/л, различия между началом опыта и четырьмя часами экспозиции статистически тоже недостоверны ( $p > 0.05$ ). Таким образом, статистически значимо концентрация гемоцианина не изменялась на протяжении всех 8 ч экспозиции ( $p = 0.47$ ). Че-

**Таблица 1.** Число клеток трех типов гемоцитов австралийского красноклещевого рака за время экспозиции на воздухе и после возвращения в воду

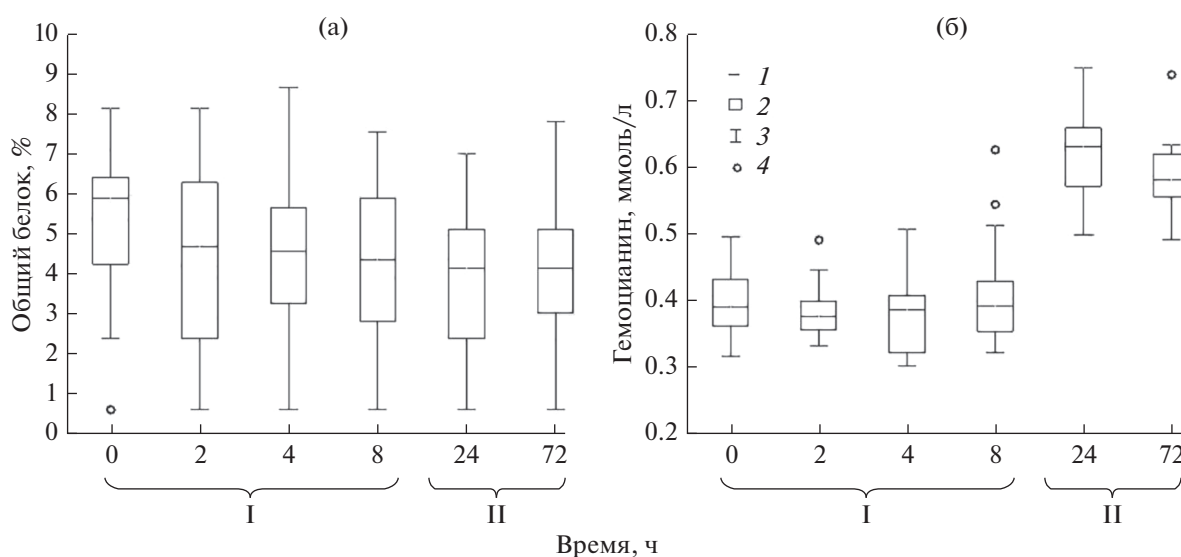
Время опыта, ч	Агранулоциты	Полугранулоциты	Гранулоциты
	кл./мкл		
Во время экспозиции			
	1170 ± 515	732 ± 263	712 ± 360
2	1394 ± 545	874 ± 304	1307 ± 510
4	1512 ± 737	700 ± 296	1438 ± 829
8	1720 ± 596	617 ± 250	1905 ± 804
После экспозиции			
24	932 ± 542	594 ± 338	695 ± 391
72	907 ± 438	624 ± 220	695 ± 380

рез 24 ч после экспозиции концентрация гемоцианина увеличилась до  $0.62 \pm 0.07$  ммоль/л и в 1.6 раза превышала таковую в начале эксперимента ( $0.40 \pm 0.05$  ммоль/л) ( $p < 0.001$ ), однако через 72 ч после экспозиции содержание гемоцианина незначительно снизилось ( $p > 0.05$ ) по сравнению с таковым после 24 ч.

Следует отметить изменение цвета гемолимфы раков после экспозиции на воздухе. До выдерживания раков на воздухе гемолимфа была голубоватая с сероватым оттенком (характерная для здоровых особей; после экспозиции она приобрела серо-зеленый оттенок и стала мутной, что свидетельствует об отклонении от нормы.

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Повышение ОЧГ также наблюдали у другого представителя рода *Cherax*. Во время нахождения вне воды речного Мэррона (*Cherax tenuimanus*) (Jussila et al., 1999a), число гемоцитов у ракообразного значительно увеличивалось. Через 1 ч экспозиции ОЧГ возрастало в 1.5 раза, однако, после 4 и 8 ч с начала эксперимента уровень ОЧГ незначительно снижался и в 1.4 раза превышал таковой по сравнению с началом эксперимента. Аналогичные изменения обнаружены у норвежского омара (*Nephrops norvegicus*) (Powell et al., 2017), ОЧГ этого ракообразного увеличивалось в 1.3–1.6 раза в зависимости от типа транспорти-



**Рис. 2.** Показатели общего белка и гемоцианина *C. quadricarinatus* во время экспозиции на воздухе (I) и после возвращения в воду (II): а – общий белок, б – гемоцианин. Обозначения, как на рис. 1.

ровки вне воды в течении 1 ч. Примерно такое же повышение ОЧГ наблюдали при экспозиции американского омара (*Homarus americanus*) (Bernardi et al., 2015). Однако при экспозиции колючего лобстера (*Panulirus cygnus*) на воздухе с предварительным спуском воды из емкостей выдерживания, показатели ОЧГ через 5 мин снижались, но по прошествии 120 мин устанавливались на уровне, соответствующем контролю. При принудительном изъятии со встряхиванием гидробионта в сети и последующей экспозицией на воздухе, показатели ОЧГ колючего лобстера возрастали (Jussila et al., 1999b). У речных раков *Astacus astacus* и *Pontastacus leptodactylus* в ответ на транспортировку вне воды происходило снижение ОЧГ примерно в два раза (Пронина, Корягина, 2011), по другим данным у узкопалого рака ОЧГ в ответ на экспозицию увеличивалось также, как и у других ракообразных (Malev et al., 2010). Однако следует отметить различные методологические подходы в указанных нами работах. Приведенные примеры могут свидетельствовать о неспецифическом изменении ОЧГ различных видов ракообразных в ответ на вызванный экспозицией на воздухе стресс.

Возможно, стресс стимулирует (усиливает) пролиферацию циркулирующих гемоцитов (Sequeira et al., 1996). По данным Мартыновой и др. (2008), пролиферирующей способностью обладают только агранулоциты, однако в нашем случае при возрастании ОЧГ уменьшалась доля агранулоцитов и полугранулоцитов и увеличивалась таковая гранулоцитов. Гипотеза о развитии полугранулоцитов из пролиферирующих агранулоцитов, а из полугранулоцитов – гранулоцитов, неактуальна, поскольку по данным Ли и др. (Li et al., 2021), из агранулярных гемоцитов не развиваются гранулярные. Общая характеристика изменений гемограммы за 8 ч экспозиции следующее – увеличение ОЧГ и доли гранулоцитов и уменьшении доли полугранулоцитов, однако доля агранулоцитов статистически достоверно не изменялась. Предположительно, эти изменения могли быть вызваны несколькими причинами.

Одна из них – пролиферация гемоцитов. Как отмечено выше, такой способностью обладают только агранулоциты. В этом случае доля агранулоцитов должна увеличиваться, однако авторы наблюдали увеличение доли гранулоцитов, что сходно с увеличением доли гранулоцитов у гигантской устрицы (*Crassostrea gigas*) при гипоксии (Кладченко и др., 2022). Причем, наблюдаемое снижение доли агранулоцитов, вызвано не уменьшением числа агранулоцитов, а увеличением числа гранулярных гемоцитов. При увеличении количества агранулоцитов и гранулоцитов доля полугранулоцитов

снижалась. Полученная картина свидетельствует, что пролиферативная способность агранулоцитов может объяснять изменение гемограммы вызванной экспозицией на воздухе.

Вторая причина связана с появлением полугранулоцитов из ГПТ и их ускоренное созревание до гранулоцитов. Имеются данные, что острый дефицит гемоцитов, вызванный инъекцией  $\beta$ 1.3-глюкана, стимулирует созревание гемопоэтических стволовых клеток в ГПТ, которые затем высвобождаются в кровотоки (Söderhäll et al., 2003). Хотя доля полугранулоцитов снижается, их число остается примерно на том же уровне, что и до экспозиции. Несмотря на это, есть вероятность, что стресс стимулирует (усиливает) появление полугранулоцитов из ГПТ и переход уже циркулирующих полугранулоцитов в гранулоциты, однако это не отражается на количестве полугранулоцитов. Проверить влияние стресса на скорость гематопоэза и созревание гранулярных гемоцитов можно несколькими способами: мечением ГПТ флуоресцентным красителем с последующим подсчетом флуоресцирующих гемоцитов и обнаружением доли новых циркулирующих гемоцитов с учетом времени, за которое они пролиферировали из прогемоцитов; подсчетом молодых форм гранулоцитов. По данным Сухачева (Sukhachev et al., 2013), у асцидии *Halocynthia aurantium* отмечена гетерогенность популяции гранулоцитов. Они выделяют молодые и старые формы, которые морфологически различаются. Предположительно, такое явление наблюдается у ракообразных (Li et al., 2021), что подтверждают работы некоторых исследователей (Battison et al., 2003; Zhang et al., 2006) и изучение гемолимфы австралийского красноклещевого рака (Скафарь, Шумейко, 2022). Исходя из нашего предположения, что стресс вызывает ускоренную пролиферацию гемоцитов из ГПТ и переход из полугранулоцитов в гранулоциты, в гемолимфе раков после воздействия воздуха должны преобладать молодые формы гранулоцитов. Однако это предположение требует дополнительно изучения.

Третья причина – циркуляция сидячих форм гемоцитов. Выделяют несколько форм гемоцитов – циркулирующие (циркулируют по кровеносной системе) и сидячие (не циркулируют, могут находиться в тканях и органах (в основном, в жабрах) и возобновлять циркуляцию, переходя в циркулирующие гемоциты). К обеим формам могут относиться гемоциты всех трех типов (агранулоциты, полугранулоциты, гранулоциты) (Zheng et al., 2021). Циркулирующие гемоциты способны переходить в сидячие формы. При этом между популяциями циркулирующих и сидячих гемоцитов может

происходить динамический обмен (Zheng et al., 2021). Так, через 2 ч после забора гемолимфы в объеме 5% массы тела у раков, наблюдали увеличение ОЧГ примерно в два раза, кроме того, увеличилась доля гранулоцитов. Установлено, что основной источник циркулирующих гемоцитов – мобилизованные сидячие формы гемоцитов, поступающие в кровь из жабр. При этом доля гемоцитов, поступивших в кровь в результате гемопоэза после стрессового воздействия достигала 6.5%. Это свидетельствует об основной роли сидячих гемоцитов в быстром снабжении организма гемоцитами (Zheng et al., 2021).

Таким образом, наиболее вероятная причина изменения клеточного состава гемолимфы – высвобождение сидячих форм гемоцитов из жабр. Не исключена роль усиленной пролиферации агранулоцитов и клеток ГПТ с переходом высвободившихся в кровотоки форм в полугранулоциты и ускоренного созревания гранулоцитов из уже циркулирующих полугранулоцитов.

Понижение содержания общего белка также наблюдали при нахождении вне воды речного маррона: на 4-й час экспозиции содержание общего белка снижалась в 0.8 раз, на 6-й час опыта концентрация белка была в 0.86 раз ниже по сравнению с контрольной группой (Jussila et al., 1999a). При различных способах транспортировки у норвежского омара концентрация белка существенно не менялась относительно контроля (Powell et al., 2017). Однако у большого сухопутного краба (*Cancer pagurus*) отмечено повышение общего белка гемолимфы при транспортировке двумя различными способами – в воде и вне воды. Его концентрация значительно колебалась и в большую, и в меньшую сторону при транспортировке вне воды на протяжении всего эксперимента (Lorenzon et al., 2008). Такую же картину наблюдали у американского омара (Lorenzon et al., 2007). По данным Донга с соавт. (Dong et al., 2019), концентрация общего белка в гемолимфе голубого японского краба (*Portunus trituberculatus*) разнонаправленно колебалась на протяжении всего опыта, как и у узкопалого рака (Malev et al., 2010).

По-видимому, увеличение концентрации гемоцианина в 1.6 раза ( $p < 0.05$ ) через 24 ч после экспозиции можно интерпретировать как физиологический ответ рака, направленный на компенсацию стресса, вызванного гипоксией.

**Выводы.** Исследована изменчивость гематологических показателей австралийского красноклешневого рака при его экспозиции на воздухе. Полученные данные могут свидетельствовать о развитии компенсаторных механизмов или пато-

логических процессов в ответ на стрессовое воздействие, вызванное нахождением вне воды. Результаты вносят вклад в накопление фундаментальных знаний о биологии ракообразных и позволяют применять их на практике при оценке состояния австралийского красноклешневого рака при транспортировке.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов выражает слова благодарности Редакции журнала “Биологии внутренних вод” и анонимным рецензентам за ценные замечания и советы, данные для улучшения статьи.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена на личные средства авторов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александрова Е.Н., Ковачева Н.П. 2010. Прижизненное определение физиологического статуса десятиногих ракообразных (Crustacea: Decapoda) по гематологическим показателям // Успехи физиол. наук. Т. 41. № 2. С. 51.
- Кладченко Е.С., Андреева А.Ю., Кухарева Т.А. 2022. Влияние краткосрочной ранжированной гипоксии на функциональные и морфологические показатели гемоцитов Тихоокеанской устрицы *Crasostrea gigas* (Thunberg, 1793). Журн. эвол. биохим. физиол. Т. 58. № 1. С. 43.
- Ковачева Н.П., Александрова Е.Н. 2010. Гематологические показатели как индикаторы физиологического состояния декапод: камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* и речных раков родов *Astacus* и *Pontastacus*. М.: ВНИРО.
- Лагуткина Л.Ю., Кузьмина Е.Г., Таранина А.А. и др. 2020. Фактологическое обеспечение практик повышения эффективности выращивания тропических пресноводных видов // Вест. Астрахан. гос. тех. ун-та. Сер.: Рыбн. хоз-во. № 2. С. 94. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2020-2-94-105>
- Мартынова М.Г., Быстрова О.М., Парфенов В.Н. 2008. Синтез нуклеиновых кислот и локализация предсердного натрийуретического пептида в гемоцитах речного рака // Цитология. Т. 50. № 3. С. 243.
- Пронина Г.И., Корягина Н.Ю. 2011. Влияние транспортного стресса на гематологические показатели речных раков // Зоотехния. Т. 4. С. 27.
- Скафарь Д.Н., Шумейко Д.В. 2022. Гемоциты австралийского красноклешневого рака (*Cherax quadricarinatus*): морфология и гемограмма // Журн. эвол. биохим. и физиол. Т. 58. № 6. С. 507. <https://doi.org/10.31857/S0044452922060109>
- Battison A., Cawthorn R., Horney B. 2003. Classification of *Homarus americanus* hemocytes and the use of differential hemocyte counts in lobsters infected with *Aerococ-*

- cus viridans* var. *homari* (Gafemia) // J. Invertebr. Pathol. V. 84. P. 177.  
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.11.005>
- Beatty S., Ramsay A., Pinder A., Morgan D. 2019. Reservoirs act as footholds for an invasive freshwater crayfish // Pacific Conservation Biol. V. 26.  
<https://doi.org/10.1071/PC19012>
- Bernardi C., Baggiani L., Tirloni E. et al. 2015. Hemolymph parameters as physiological biomarkers in American lobster (*Homarus americanus*) for monitoring the effects of two commercial maintenance methods // Fish. Res. V. 161. P. 280.  
<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2014.08.013>
- Chang E.S. 2005. Stressed-out lobsters: crustacean hyperglycemic hormone and stress proteins // Integ. Comp. Biol. V. 45. № 1. P. 43.  
<https://doi.org/10.1093/icb/45.1.43>
- Cheng W., Liu C., Kuo C. 2003. Effects of dissolved oxygen on hemolymph parameters of freshwater giant prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) // Aquaculture. V. 220. P. 843.  
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00534-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00534-3)
- Claussen D.L., Hopper R.A., Sanker A.M. 2000. The Effects of Temperature, Body Size, and Hydration State on the Terrestrial Locomotion of the Crayfish *Orconectes Rusticus* // J. Crustacean Biol. V. 20. № 2. P. 218.  
<https://doi.org/10.1163/20021975-99990033>
- Coughran J., Leckie S. 2007. Invasion of a New South Wales stream by the Tropical Crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) // Royal Zoological Society of New South Wales.  
<https://doi.org/10.7882/FS.2007.007>
- Dong Z., Mao S., Chen Y. et al. 2019. Effects of air-exposure stress on the survival rate and physiology of the swimming crab *Portunus trituberculatus* // Aquaculture. V. 500. P. 429.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10>
- Fotadar S., Tsvetnenko E., Evans L. 2001. Effect of air exposure on the immune system of the rock lobster *Panulirus cygnus* // Mar. Freshwater Res. V. 52. № 8. P. 1351.  
<https://doi.org/10.1071/MF01098>
- Grote J.R. 1981. The effect of load on locomotion in crayfish // J. Exp. Biol. V. 92. № 1. P. 277.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.92.1.277>
- Hall M.R., van Ham E.H. 1998. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn, *Penaeus monodon* // J. World Aquacult. Soc. V. 29. № 3. P. 290.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1998.tb00649.x>
- Huner J.V., Lindqvist O.V. 1995. Physiological adaptations of freshwater crayfishes that permit successful aquacultural enterprises // Integr. Comp. Biol. V. 35. P. 12.  
<https://doi.org/10.1093/icb/35.1.12>
- Jackson D.C., Wang T., Koldkjaer P., Taylor E.W. 2001. Lactate sequestration in the carapace of the crayfish *Austropotamobius pallipes* during exposure in air // J. Exp. Biol. V. 204. № 5. P. 941.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.204.5.941>
- Jones C.M. 1990. The Biology and Aquaculture Potential of the Tropical Freshwater Crayfish, *Cherax quadricarinatus*. Report No. QI90028. Department of Primary Industries, Queensland, Brisbane, Australia. P. 109.
- Jussila, J., Paganini M., Mansfield S., Evans L.H. 1999a. On physiological responses, plasma glucose, total hemocyte counts and dehydration, of marron *Cherax tenuimanus* (Smith) to handling and transportation under simulated conditions // Freshwater Crayfish. V. 12. P. 154.
- Jussila, J., Jago J., Tsvetnenko E., Evans L.H. 1999b. Effects of handling or injury disturbance on total hemocyte counts in western rock lobster (*Panulirus cygnus* George) // International Symposium on Lobster Health Management, 19–21 September, 1999. Australia, Adelaide. P. 52.
- Kerby J.L., Riley S.P.D., Kats L.B., Wilson P. 2005. Barriers and flow as limiting factors in the spread of an invasive crayfish (*Procambarus clarkii*) in Southern California streams // Biol. Conserv. V. 126. P. 402.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.06.020>
- Kouba A., Tikal J., Císar P. et al 2016. The significance of droughts for hyporheic dwellers: evidence from freshwater crayfish // Sci. Rep. V. 6. № 26569.  
<https://doi.org/10.1038/srep26569>
- Leland J.C., Coughran J., Furse J.M. 2012. Further translocation of the Redclaw, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae), to Lake Ainsworth in northeastern New South Wales, Australia // Crustacean Res. Special Number V. 7. P. 1.  
[https://doi.org/10.18353/crustacea.Special2012.7\\_1](https://doi.org/10.18353/crustacea.Special2012.7_1)
- Lemmers P., Kroon Rvd., Kleef HHv. et al. 2022. Limiting burrowing activity and overland dispersal of the invasive alien red swamp crayfish *Procambarus clarkii* by sophisticated design of watercourses // Ecol. Engineering. V. 185. № 106787.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2022.106787>
- Li F., Zheng Z., Li H. et al. 2021. Crayfish hemocytes develop along the granular cell lineage // Sci. Rep. V. 11. № 1. P. 13099.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-92473-9>
- Lorenzon S., Giulianini P.G., Martinis M., Ferrero E.A. 2007. Stress effect of different temperatures and air exposure during transport on physiological profiles in the American lobster *Homarus americanus* // Comp. Biochem. Physiol. Part A.: Mol. Int. Physiol. V. 147. № 1. P. 94.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.11.028>
- Lorenzon S., Giulianini P.G., Libralato S. et al. 2008. Stress effect of two different transport systems on the physiological profiles of the crab *Cancer pagurus* // Aquaculture. V. 278. P. 156.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.011>
- Lu Y.-P., Zhang X.-X., Zheng P.-H. et al. 2021. Effects of air exposure on survival, histological structure, non-specific immunity and gene expression of red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) // Aquacul. Rep. V. 21. P. 100898.  
<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100898>



- Malev O., Šrut M., Maguire I. et al. 2010. Genotoxic, physiological and immunological effects caused by temperature increase, air exposure or food deprivation in freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* // Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. and Pharmacol. V. 152. № 4. P. 433.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.07.006>
- Morris S., Callaghan J. 1998. The emersion response of the Australian Yabby *Cherax destructor* to environmental hypoxia and the respiratory and metabolic responses to consequent air-breathing // J. Comp. Physiol. Part B: Biochem. Syst. Environ. Physiol. V. 168. № 5. P. 389.  
<https://doi.org/10.1007/s003600050158>
- Morris S., Oliver S. 1999. Circulatory, respiratory and metabolic response to emersion and low temperature of *Jasus edwardsii*: simulation studies of shipping methods // Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Int. Physiol. V. 122. № 3. P. 299.  
[https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00003-3](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00003-3)
- Nickerson K.W., Van Holde K.E. 1971. A comparison of molluscan and arthropod hemocyanin. I. Circular dichroism and absorption spectra // Comp. Biochem. Phys. B. V. 39. P. 855.  
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(71\)90109-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(71)90109-X)
- Paterson B.D., Spanoghe P.T. 1997. Stress indicators in marine decapod crustaceans, with particular reference to the grading of western rock lobsters (*Panulirus cygnus*) during commercial handling // Mar. Fresh. Res. V. 48. № 8. P. 829.  
<https://doi.org/10.1071/MF97137>
- Paterson B.D., Spanoghe P.T., Davidson G.W. et al. 2005. Prediction survival of western rock lobster *Panulirus cygnus*, using discriminant analysis of hemolymph parameters taken immediately following simulated handling treatments // New Zealand J. Mar. Freshwater Res. V. 39. № 5. P. 1129.  
<https://doi.org/10.1080/00288330.2005.9517380>
- Pond C.M. 1975. The role of the "walking legs" in aquatic and terrestrial locomotion of the crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) // J. Exp Biol. V. 62. № 2. P. 447.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.62.2.447>
- Powell A., Cowing D.M., Eriksson S.P., Johnson M.L. 2017. Stress response according to transport protocol in Norway lobster, *Nephrops norvegicus* // Crustacean Res. V. 46. P. 17.  
[https://doi.org/10.18353/crustacea.46.0\\_17](https://doi.org/10.18353/crustacea.46.0_17)
- Puky M. 2014. Invasive Crayfish on Land: *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817) (Decapoda: Cambaridae) Crossed a Terrestrial Barrier to Move from a Side Arm into the Danube River at Szeremle, Hungary // Acta Zoologica Bulgarica. V. 7. P. 143.
- Qing Li., He B., Chen Y. et al. 2022. Factors Inducing the Crayfish *Procambarus clarkii* Invasion and Loss of Diversity in Caohai Wetland // Inland Water Biol. V. 15. P. 446.  
<https://doi.org/10.1134/S199508292204040X>
- Ramalho R.O., Anastácio P.M. 2015. Factors inducing overland movement of invasive crayfish (*Procambarus clarkii*) in a ricefield habitat // Hydrobiologia. V. 746. P. 135.  
<https://doi.org/10.1007/s10750-014-2052-9>
- Sequeira T., Tavares D., Arala-Chaves M. 1996. Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus* // Develop. Comp. Immunol. V. 20. № 2. P. 97.  
[https://doi.org/10.1016/0145-305x\(96\)00001-8](https://doi.org/10.1016/0145-305x(96)00001-8)
- Söderhäll I., Bangyeekhun E., Mayo S., Söderhäll K. 2003. Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus* // Develop. Comp. Immunol. V. 27. № 8. P. 661.  
[https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(03\)00039-9](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(03)00039-9)
- Souty-Grosset C., Anastácio P.M., Aquiloni L. et al. 2016. The red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in Europe: impacts on aquatic ecosystems and human well-being // Limnologica. V. 58 P. 78.  
<https://doi.org/10.1016/j.limno.2016.03.003>
- Speed S.R., Baldwin J., Wong R.J., Wells R.M.G. 2001. Metabolic characteristics of muscles in the spiny lobster, *Jasus edwardsii*, and responses to emersion during simulated live transport // Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol. V. 128. № 3. P. 435.  
[https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(00\)00340-7](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(00)00340-7)
- Sukhachev A.N., Dyachkov I.S., Romanyuk D.S. et al. 2013. Morphological analysis of hemocytes of ascidian *Halicynthia aurantium* // Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 55. № 12. P. 901.
- Taylor H.H., Paterson B.D., Wong R.J., Wells R.M.G. 1997. Physiology and live transport of lobsters: report from a workshop // Mar. Fresh. Res. V. 48. № 8. P. 817.  
<https://doi.org/10.1071/MF97197>
- Webster S.G. 1996. Measurement of crustacean hyperglycaemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress // J. Exp Biol. V. 199. № 7. P. 1579.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.199.7.1579>
- Wu M., Chen N., Huang C.X. et al. 2017. Effect of low temperature on globin expression, respiratory metabolic enzyme activities, and gill structure of *Litopenaeus vannamei* // Biochem. Moscow. V. 82. P. 844.  
<https://doi.org/10.1134/S0006297917070100>
- Zhang Z.F., Shao M., Kang K.H. 2006. Classification of hematopoietic cells and haemocytes in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis* // Fish Shellfish Immunol. V. 21. P. 159.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.11.003>
- Zheng Z., Li F., Li H. et al. 2021. Rapid regulation of hemocyte homeostasis in crayfish and its manipulation by viral infection // Fish and Shellfish Immunol. Reports. № 2. P. 100035  
<https://doi.org/10.1016/j.fsirep.2021.100035>

## Hematological Parameters of the Australian Red-Clawed Crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) when Exposed to Air

D. N. Skafar<sup>1, 2, 4, \*</sup>, O. V. Strelkova<sup>1, 2</sup>, and D. V. Shumeyko<sup>3, 4</sup>

<sup>1</sup>Kuban State University, Krasnodar, Russia

<sup>2</sup>Azov-Black Sea Branch of the Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Rostov-on-Don, Russia

<sup>3</sup>International Taraz innovative institute named after Sh. Murtaza, Taraz, Kazakhstan

<sup>4</sup>Scientific-Productional Centre "Aquatechbiotop", Krasnodar, Russia

\*e-mail: skafden@mail.ru

The effect of exposure on the hematological parameters of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* Von Martens 1868 was studied. Hemolymph was taken immediately after extraction from the water after 2, 4, 8 hours of exposure on the shore and 24 and 72 hours after returning to the water. Determined total hemocyte counts (THC), hemogram, general protein and hemocyanin disease. The dynamics of the growth of hematological parameters in the temporal aspect was revealed: THC and the proportion of granulocytes increased to reveal the entire pattern of growth, the proportion of agranulocytes and the total content of protein and hemocyanin. After exposure on the shore, the color of the hemolymph changed from bluish with a grayish tint to cloudy gray-green (deviation from the norm). The data obtained indicate the development of compensatory factors and pathological properties in response to stress, the occurrence of symptoms in the air, which can be used in practice in assessing the state of the red claw cancer in the process of transport.

**Keywords:** australian red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, hemolymph hemocytes, total protein, hemocyanin, stress, exposure on air