

**КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ ЭРИТРОИДНЫХ ФОРМ В КРОВИ И ГОЛОВНОЙ
ПОЧКЕ КЕФАЛИ-СИНГИЛЯ (*CHELON AURATUS* RISSO, 1810)
НА ПРОТЯЖЕНИИ ГОДОВОГО ЦИКЛА**

© 2023 г. А. А. Солдатов¹, *, В. Н. Рычкова¹, Т. А. Кухарева¹, А. Г. Рокотова¹

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

*E-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.04.2023 г.

После доработки 14.06.2023 г.

Принята к публикации 16.06.2023 г.

Исследовали изменение числа эритроцитов и содержание незрелых эритроидных форм в крови и гемопоэтической ткани кефали-сингиля (*Chelon auratus* Risso, 1810) на протяжении годового цикла. Отлов и доставку рыбы в аквариальную проводили ежемесячно. Определяли содержание эритробластов, базофильных и полихроматофильных нормобластов в головной почке (пронефрос) и циркулирующей крови. Установлено, что процессы эритропоэза в гемопоэтической ткани кефали-сингиля протекают нерегулярно. Активная продукция эритроидной массы приурочена в основном к постнерестовому периоду. Об этом свидетельствует увеличение содержания незрелых эритроидных форм в головной почке и крови. Это совпадает с общим увеличением числа клеток красной крови в системе циркуляции и свидетельствует о смещении эритроцитарного баланса в пользу продукционных процессов. В остальной период времени процессы противоположны. Допускается, что это связано с особенностями организации системы красной крови, которая исключает регулярную продукцию эритропоэтина в почках.

Ключевые слова: эритроциты, эритропоэз, головная почка, *Chelon auratus* Risso, 1810, годовой цикл

DOI: 10.31857/S0869813923070130, EDN: XNURLU

ВВЕДЕНИЕ

Кровь и кроветворная ткань морских и пресноводных рыб являются объектом исследования на протяжении многих лет. Работы, проведенные за последние годы, существенно расширили имеющиеся представления. Они нашли отражение в ряде обзоров [1–3]. Получены сведения об особенностях гуморальной регуляции эритропоэтических процессов [4–7], о гемопоэтических клетках [8–10], деструкции старых эритроидных форм и резервах депо крови [3, 11], продолжительности жизни, циркулирующей эритроцитарной массы [1, 3] и др. Все это позволяет рассматривать красную кровь рыб как физиологическую систему.

Анализ состояния данной системы на протяжении годового цикла позволил выявить в ней определенные периодические изменения. Это выразилось в моноцикличности динамики концентрации гемоглобина и числа эритроцитов крови [12–15], что косвенно отражало изменение баланса между продукционными и деструктивными процессами. Результаты исследований ряда авторов показали, что данная динамика определяется характером изменения температуры воды. Наиболее наглядно эта зависимость представлена в исследованиях, выполненных на тилипиях

(*Tilapia zilli*) [16]. Авторы определяли среднемесячную температуру воды на протяжении года и показали, что в условиях субтропиков температурный минимум (14°C) приходится на январь, а максимум (27°C) – на август. В соответствии с этим происходило и изменение числа циркулирующих эритроцитов. Положительная корреляция между температурой среды и кислородной емкостью крови отмечена и для других видов рыб [14, 17].

Однако в ряде работ показано отсутствие прямой связи между температурой воды и гематологическими характеристиками. У некоторых видов рыб максимальная концентрация гемоглобина и число эритроцитов отмечались в более холодные периоды годового цикла (осень, весна) [15]. Особый интерес представляют работы, в которых констатируется факт значительного увеличения кислородной емкости крови в зимний период [12, 18, 19]. Показано также, что гемопоэтическая ткань рыб сохраняет чувствительность к управляющим сигналам (гипоксия) даже в условиях гипотермии (1–2°C) [20]. Это означает, что в основе динамики гематологических характеристик рыб на протяжении годового цикла могут лежать какие-то иные процессы.

Известно, что в период нереста состояние многих физиологических систем претерпевает наиболее радикальные изменения [21]. Система красной крови в этом отношении не является исключением. Отмечено, что у мригала (*Cirrhinus mrigala*) концентрация гемоглобина и число эритроцитов в крови в преднерестовый период существенно понижается [22], что может быть связано с перераспределением пластических ресурсов организма в пользу генеративной ткани. Аналогичные изменения происходят у рыб и при искусственной стимуляции нереста (инъекции вытяжек гипофиза карпа, гонадотропина, эстрогена, рилизинг-факторов) [23, 24]. К концу нереста и в постнерестовый период (2–3 мес.) развиваются противоположные изменения: усиливаются процессы эритропоэза в гемопоэтической ткани [25], повышается кислородная емкость крови [22, 26]. Насколько нерест определяет сезонную динамику гематологических характеристик крови у рыб до конца неясно.

О нерегулярности эритропоэтических процессов в гемопоэтической ткани свидетельствует и значительная продолжительность жизни клеток красной крови у костистых рыб, определенная при помощи ³H-тимидина и флуоресцентных зондов [27, 28]. Она составила 270–310 дней. Это означает, что генерация клеток красной крови в кроветворной ткани у рыб происходит либо с крайне низкой скоростью, либо разово в течение ограниченного промежутка времени. Можно допустить, что она приурочена к нерестовому периоду, когда происходит значительное перераспределение пластических ресурсов в организме, о чем говорилось выше.

Из представленной информации следует, что численность эритроцитов в крови рыб на протяжении годового цикла не является постоянной величиной. Прямой связи с температурой среды не обнаружено. Наиболее радикальные изменения числа клеток красной крови в кровяном русле у многих видов приурочены к нерестовому периоду. Продолжительность жизни эритроцитов в 270–310 дней позволяет предположить, что генерация клеточной массы должна происходить разово. Проверить эти предположения возможно только путем исследования функциональной активности гемопоэтической ткани на протяжении полного годового цикла, что и входило в задачу настоящего исследования.

Цель работы – исследовать клеточный состав эритроидных элементов крови и гемопоэтической ткани у кефали-сингиля (*Chelon auratus* Risso, 1810) и соотнести его с изменением числа эритроцитов в крови на протяжении годового цикла.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал

Объектом исследования являлась теплолюбивая кефаль-сингиль, нерест которой происходит в августе–сентябре. Рыбу отлавливали при помощи ставного нево-

да на протяжении года в районе Керченского пролива и юго-западе Крымского полуострова. Использовали взрослых особей обоих полов в возрасте 4–6 лет: масса тела – 183–275 г, длина – 21–28 см.

Рыбу перевозили в аквариальную в пластиковых баках емкостью 100 л с воздушной аэрацией. При транспортировке материала на значительные расстояния использовали полиэтиленовые мешки, атмосферу в которых заполняли кислородом. После транспортировки животных рассаживали в аквариумы и бассейны объемом 200–1500 л, имеющих естественный проток и освещение, и выдерживали в данных условиях в течение 5–7 суток. В течение этого времени особей кормили фаршем из малоценных видов рыб. Суточный пищевой рацион составлял 6–7% от массы тела. В работе использовали активно питающихся, подвижных особей.

Отбор проб

Для предотвращения развития состояния манипуляционного стресса за 60–70 мин до отбора проб рыб наркотизировали. В качестве анестезирующего препарата применяли уретан. Его растворяли в воде аквариума, где находились особи. Величины эффективных доз препарата были определены ранее [29]. Кровь получали пункцией хвостовой артерии. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (Рихтер, Венгрия). Образцы передней почки (пронефроса) получали путем вскрытия брюшной полости.

Лабораторные исследования

Число эритроцитов в крови подсчитывали в камере Горяева [30]. Одновременно изготавливали мазки крови и отпечатки передней почки, которые окрашивали по комбинированному методу Паппенгейма (Май-Грюнвальд + Романовский–Гимза) [30]. На препаратах определяли относительное содержание незрелых эритроидных форм, находящихся на разных стадиях созревания: пронормобластов, базофильных и полихроматофильных нормобластов. Расчет для цельной крови проводили с учетом числа зрелых эритроцитов, для головной почки – с учетом клеточных форм всех ростков гемопоэза. Объем выборочных совокупностей составлял 5000 клеток. В работе применяли светооптический микроскоп Biomed PR-2 Lum (Россия), оборуодованный камерой Levenhuk C NG Series (Китай).

Статистический анализ

При проведении сравнительного анализа применен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) PAST Version 4.09 [31]. Нормальность распределения выборочных совокупностей проверяли по Shapiro–Wilk (*W*-test). Статистические сравнения выполнены на основе параметрического *F*-критерия и непараметрического Welch *F*-критерия соответственно для выборок соответствующих и несоответствующих закону нормального распределения. Минимальный уровень значимости составлял $p < 0.05$. В работе использовали 31 особь кефали-сингиля. Объем выборочных совокупностей показан на графиках.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Циркулирующая кровь

На рис. 1а представлен полигон распределения значений числа эритроцитов в крови кефалей на протяжении годового цикла. Зависимость хорошо описывается уравнением параболической функции.

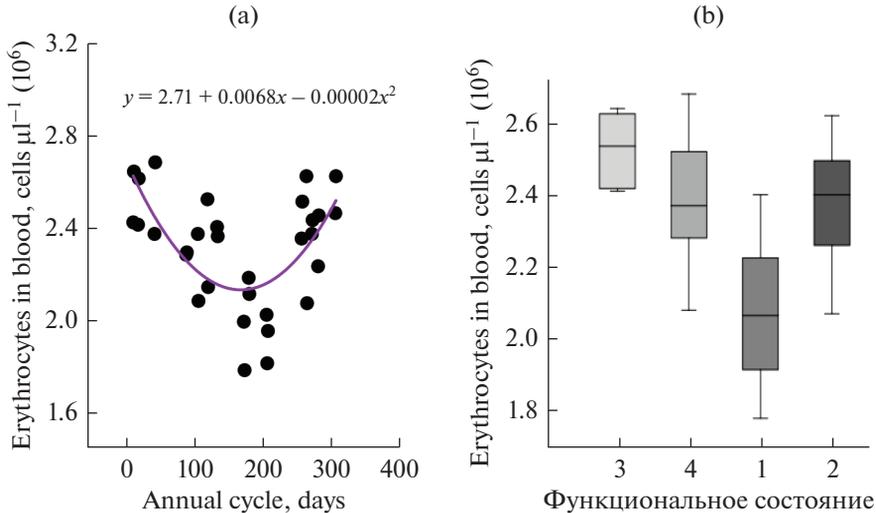


Рис. 1. Изменение числа эритроцитов в крови кефали-сингиля на протяжении годового цикла. (а) – Полигон распределения; (б) – после ранжирования; по оси абсцисс – нулевая точка соответствует началу календарного года; 1 – преднерестовый период, май–июль; 2 – нерестовый период, август–октябрь; 3 – постнерестовый период, ноябрь–январь; 4 – период относительного функционального покоя, февраль–апрель; $n = 31$; различия достоверны при $p < 0.001$.

Максимальные величины были отмечены в зимний период времени, а минимальные – в летние месяцы, то есть зависимость от температурного фактора фактически не была выражена. Для оценки статистической значимости выявленных различий выборочные совокупности ранжировали с шагом в три месяца: май–июль (преднерестовый период), август–октябрь (нерестовый период), ноябрь–январь (постнерестовый период), февраль–апрель (относительный функциональный покой). Результаты представлены на рис. 1б. Как видно из рисунка, различия между максимальными и минимальными величинами были статистически выражены и составляли 19–20% ($p < 0.001$). Из графика видно, что рост числа клеток красной крови приходился на нерестовый и постнерестовый период.

В массе циркулирующая кровь была представлена зрелыми оксифильными эритроцитами, имеющими эллипсоидную форму. Продольная ось клетки составляла 14.0 мкм. Ядро компактное, с высокой долей гетерохроматина расположено в центре клетки (рис. 2а). Незрелые эритроидные формы встречались редко и были представлены в основном полихроматофильными нормобластами (ПН), реже базофильными нормобластами (БН). БН имели округлую форму, базофильную цитоплазму и относительно крупное ядро с высокой долей эухроматина (рис. 2с). ПН представляют собой более дифференцированные клеточные системы. Они приобретали эллипсоидную форму, цитоплазма сочетала базофильные и ацидофильные свойства (цвет серый), ядро крупное с хорошо выраженной перинуклеарной зоной (рис. 2д).

Анализ присутствия незрелых эритроидных форм в крови кефалей на протяжении годового цикла показал нерегулярность их появления и относительного содержания в кровяном русле (рис. 3а, 3б). Их минимальный уровень (не более 2% клеточной массы) отмечали в начале весны (март, 100 сут), а максимальных значений (6–7% клеточной массы) этот показатель достигал в начале осени (250–300 сут), что совпадало с нерестовым и постнерестовым периодом. При этом клетки более ранних генераций (БН) наблюдались в крови только в постнерестовый период (сентябрь–октябрь, 250–300 сут) (рис. 4а). ПН же встречались на протяжении все-

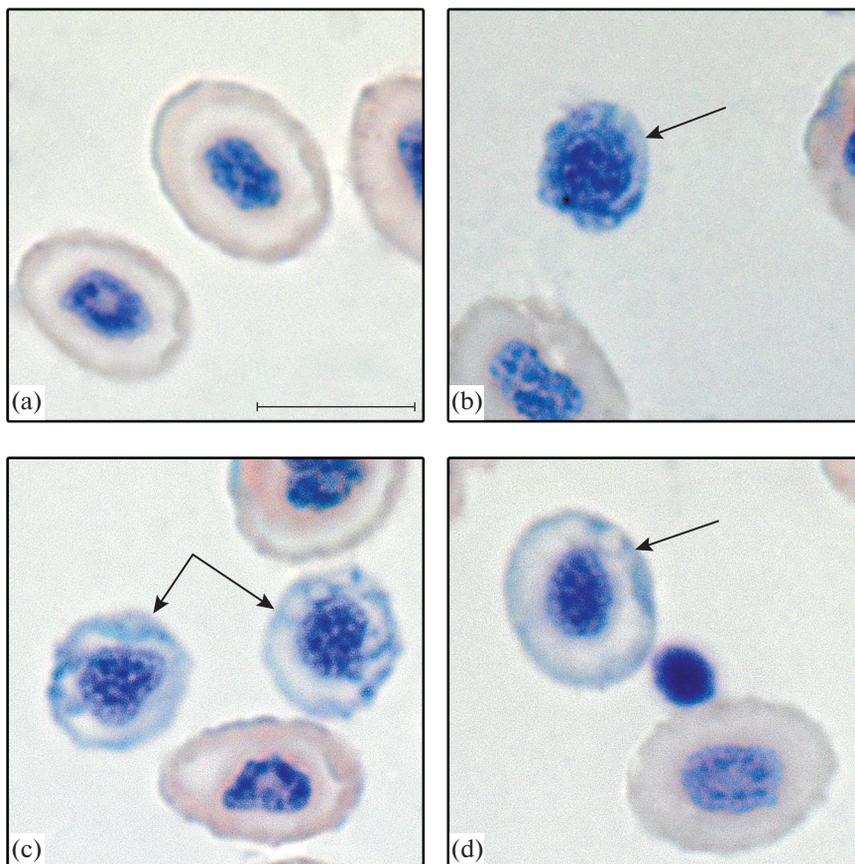


Рис. 2. Эритроидные элементы крови и головной почки кефали. (а) – Зрелые эритроциты; (б) – стрелкой показан эритробласт; (с) – стрелками показаны базофильные нормобласты; (d) – стрелкой показан полихроматофильный нормобласт; масштабная линейка – 10 мкм.

го года с явным максимумом в начале осени. Наблюдаемые изменения были статистически значимы ($p < 0.001$).

Головная почка (пронефрос)

В головной почке популяция эритроидного ростка гемопоэза была представлена тремя видами клеток: эритробластиками (ЭБ), БН и ПН. Особенности морфологии двух последних форм были рассмотрены выше (рис. 2с, 2d). ЭБ – наименее дифференцированная группа эритроидных элементов (рис. 2б). Это небольшие округлые клетки. Крупное ядро с высокой долей эухроматина занимает почти весь их объем. Резко базофильная цитоплазма представлена в виде узкой полосы.

Размеры популяции эритроидных элементов в головной почке были непостоянны и имели выраженную динамику на протяжении годового цикла. Она полностью совпадала с изменением числа эритроцитов и незрелых эритроидных форм в крови кефали. Максимальные размеры очага эритропоэза в головной почке отмечали в постнерестовый период (сентябрь–октябрь, 250–300 сут) (рис. 3а, 3с). На эритроидные формы приходилось до 14% от остальной клеточной массы отпечатков про-

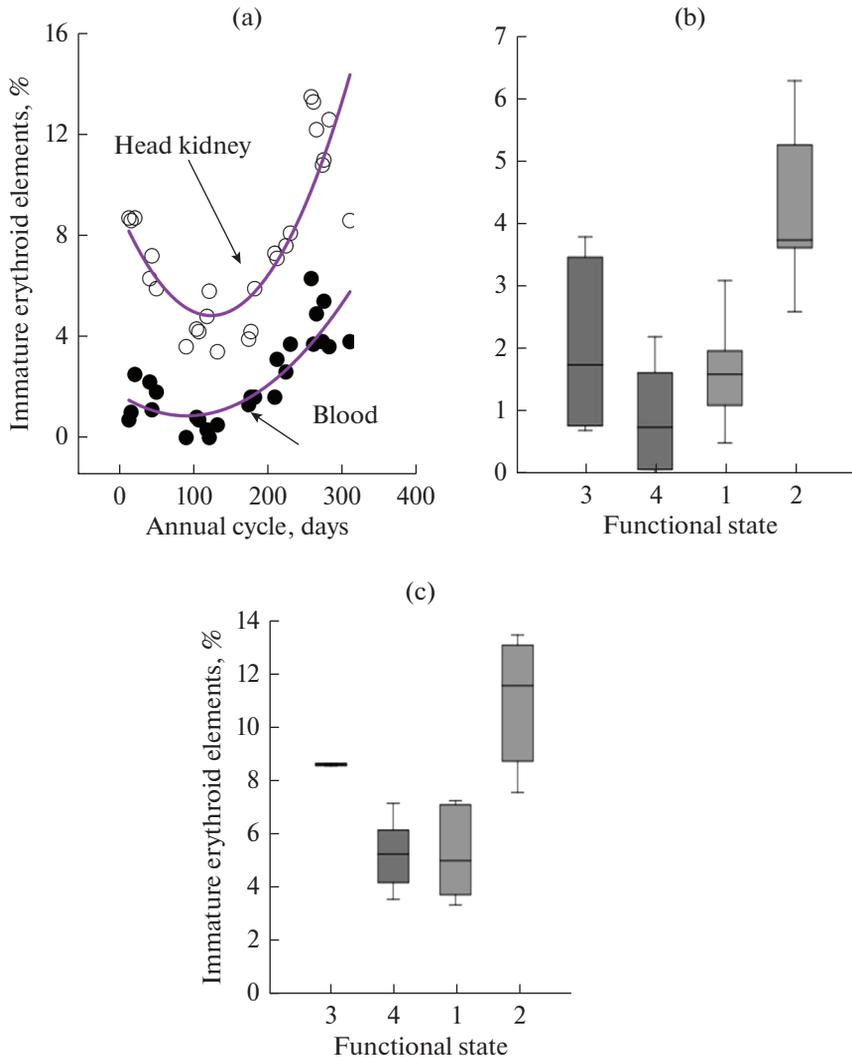


Рис. 3. Общее содержание незрелых эритроидных элементов в крови и головной почке кефали-сингиля на протяжении годового цикла. (а) – Полигоны распределения; (б) – циркулирующая кровь; (с) – головная почка (пронефрос); по оси абсцисс – нулевая точка соответствует началу календарного года; 1 – преднерестовый период, май–июль; 2 – нерестовый период, август–октябрь; 3 – постнерестовый период, ноябрь–январь; 4 – период относительного функционального покоя, февраль–апрель; $n = 24$; различия достоверны при $p < 0.001$.

нефроса. Минимальные значения были зарегистрированы на начало весны (март, 100 сут) – 3–6%. Различия были статистически выражены ($p < 0.001$). Аналогичную динамику отмечали со стороны ЭБ и БН ($p < 0.01$) (рис. 4б). Их присутствие в головной почке кефали отмечали на протяжении всего годового цикла. При этом изменений со стороны ПН не наблюдали. Число данных клеточных форм в гемопоэтической ткани сохранялось на уровне не более 1% в течение всего периода наблюдений.

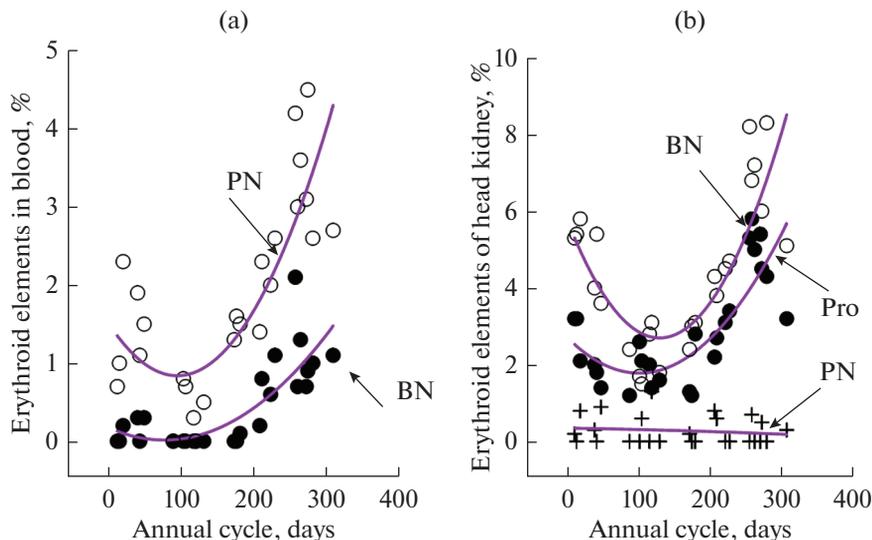


Рис. 4. Содержание отдельных эритроидных элементов в крови и головной почке кефали-сингиля на протяжении годового цикла. (а) – Циркулирующая кровь; (б) – головная почка (пронефрос); Pro – пронормобласты; BN – базофильные нормобласты; PN – полихроматофильные нормобласты; $n = 24$; различия достоверны при $p < 0.01$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Процессы, ответственные за изменение числа эритроцитов в крови

Из представленной информации видно, что число эритроцитов в крови кефали на протяжении годового цикла претерпевало существенные изменения. Различия между минимальными и максимальными значениями составляли 22–23%, что соответствует $0.46 - 0.47 (10^6)$ клеток мкл^{-1} . При этом отсутствовала какая-либо связь с температурой среды и числом эритроцитов в крови, которая ранее была показана в отношении *Tilapia zilli* [16] и ряда других видов костистых рыб [14, 17]. Максимальные значения приходились на конец осени–начало зимы: $2.35-2.55 (10^6)$ клеток мкл^{-1} .

В основе данных изменений может лежать несколько процессов [1]:

- изменение баланса между продукционными и деструктивными процессами в системе красной крови;
- опорожнение кровяных депо;
- гидратация и дегидратация плазмы крови.

Первый механизм наиболее вероятен. Приrost числа эритроцитов в крови кефалей совпадал с активной продукцией клеток красной крови гемопоэтической тканью (головная почка), снижение – с подавлением данных процессов. Значения коэффициентов детерминации превышали 0.78. Головная почка (пронефрос) является основным органом эритропоэза у костистых рыб [32]. Участие в этом процессе других органов и тканей менее значимо [1]. Поэтому активная генерация эритроидных элементов данным органом способна сместить баланс в системе красной крови в пользу продукционных процессов. Описанная в статье моноцикличность функционирования гемопоэтической ткани (эритроидный росток) у кефали также хорошо совпадает с известной продолжительностью жизни для клеток красной крови у костистых рыб – 270–310 дней [27, 28].

Участие селезенки в коррекции числа эритроцитов крови также следует исключить из рассмотрения. Селезенку большинство авторов рассматривают как орган вторичного эритропоэза [1, 3]. Появление малодифференцированных эритроидных форм здесь наблюдается в момент, когда размеры очагов эритропоэза в почках достигают критических значений. Считается, что здесь сосредоточены преимущественно очаги лимфо-, тромбо- и гранулопоэза [1, 3, 33]. Основная же функция селезенки, как и у высших позвоночных, связана с резервированием старой эритроцитарной массы, которая затем подвергается деградации [34]. В разрушении принимают активное участие мелано-макрофагальные элементы [35, 36]. Селезенка также обладает развитой ретикулярной тканью, которая обеспечивает ее сокращение [37, 38]. В критических состояниях (стресс, острые формы гипоксии) эти эритроциты могут возвращаться в кровотоки, повышая кислородную емкость крови [1, 3]. Рост их числа в крови при этом может достигать 30%. Считается, что у пелагических рыб, к которым относится и кефаль, эта функция развита лучше, чем у донных [39]. Вместе с тем данный процесс не может быть положен в основу наблюдаемых в крови кефали изменений. Это связано с тем, что селезенка содержит старые эритроидные формы, которые не могут длительно (на протяжении года) находиться в системе циркуляции. С другой стороны, в настоящей работе была использована уретановая анестезия, которая препятствовала развитию состояния манипуляционного стресса у кефалей в момент отбора проб крови и тканей.

Относительное изменение числа эритроцитов в крови может наблюдаться при частичной гидратации и дегидратации плазмы крови. Однако эти процессы чаще всего отмечаются в условиях изменения солености среды, при адаптации к условиям гипоксии и ряду других фактов [40, 41]. Участие их в изменении числа эритроцитов в крови рыб на протяжении годового цикла маловероятно.

Нерест и состояние гемопоэтической ткани

Размножение (нерест) является важным этапом жизненного цикла любого организма. Это особое состояние, для которого характерно значительное перераспределение пластических ресурсов в пользу генеративной ткани [21]. Оно сказывается на состоянии многих физиологических систем, и красная кровь не является исключением. У ряда видов костистых рыб в этот период отмечается развитие анемии [42]. Концентрация гемоглобина и число эритроцитов существенно понижаются. Это происходит на фоне ограничения двигательной и пищевой активности [21]. Следует отметить, что дефицит пищевого субстрата не возникает при искусственном выращивании рыбы, и анемичные состояния здесь обычно не наблюдаются.

Развитие преднерестовой анемии может являться следствием разрушения части эритроцитарной массы ввиду ее старения. Как отмечали в настоящей работе, активная продукция эритроцитов происходила в постнерестовый период. Об этом свидетельствовало повышение содержания в крови и головной почке малодифференцированных эритроидных форм. Процесс наблюдался на протяжении 2–3 месяцев. Продолжительность жизни эритроцитов у костистых рыб составляет 270–310 дней [27, 28]. Это означает, что в преднерестовый и нерестовый период в крови должны преобладать старые клетки, которые в норме утрачивают эластичность и отфильтровываются селезенкой, где происходит их последующая деградация [1–3].

Для старых эритроцитов рыб характерно снижение активности антиоксидантных ферментных систем, что приводит к усилению процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [43]. Не исключено, что этот процесс может усугубляться изменением гормонального статуса организма. Показано, что инъекции вытяжек гипофиза карпа, гонадотропина, эстрогена, рилизинг-факторов часто сопровождаются понижением числа эритроцитов в крови рыб [23, 24].

Старение эритроцитов может приводить и к развитию метгемоглобинемии. Известно, что респираторные пигменты рыб отличаются низкой устойчивостью к окислению в сравнении с высшими позвоночными [44, 45]. В них выявлена NADH-дифораза, которая вместе с цитохромом b способствует поддержанию гемоглобина в ферро-форме [46, 47]. В этом также принимают участие и ряд восстановителей: глутатион (GSH), аскорбиновая кислота, токоферол [48]. В старых клетках красной крови этот комплекс может оказаться малоэффективным, что должно повышать долю ферри-формы и снижать кислородную емкость крови в целом. Описаны случаи повышения уровня метгемоглобина в крови до 27% (*Gadus morhua*) без видимых признаков токсической нагрузки [49].

Из представленной информации следует, что в циркулирующей крови кефалей в преднерестовый период должна находиться старая эритроцитарная масса, которая подвергается деградации, скорее всего, в селезенке. Это приводит к развитию анемии и метгемоглобинемии. Последнее должно индуцировать выработку эритропоэтинов и сопровождаться продукцией эритроцитов в гемопоэтической ткани [50, 51]. Данные соединения были идентифицированы в крови рыб при помощи методов иммунохимического анализа [52]. Наиболее высокая их концентрация обнаружена в почках [5, 53]. Полная структура гена эритропоэтина в настоящее время аннотирована для бурого фугу (*Takifugu rubripes*) [4]. Установлено, что выработка эритропоэтина в почках рыб коррелирует с уровнем тестостерона в крови [54], что позволяет говорить о реальности происходящих событий в организме кефали на протяжении годового цикла.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, численность эритроцитов в крови кефали-сингиля на протяжении годового цикла претерпевает моноциклические изменения, которые хорошо описываются уравнением параболической регрессии. Прямой связи с температурой морской среды не установлено. Продукция эритроцитов гемопоэтической тканью совпадает с постнерестовым периодом и наблюдается на протяжении 2–3 мес. Об этом свидетельствует рост содержания в крови и головной почке популяции малодифференцированных эритроидных элементов. Это совпадает с увеличением числа эритроцитов в системе циркуляции и свидетельствует о смещении эритроцитарного баланса в пользу продукционных процессов. В остальной период времени процессы противоположны. Полученная информация может быть также интересна для хозяйств, занимающихся садковым выращиванием кефалей.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с использованием рыбы были выполнены в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ (2010/63/ЕС) и одобрены местным институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию (протокол № 75од от 06.06.2023).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках проекта РНФ “Определение причин спонтанного роста концентрации метгемоглобина в крови морских рыб на протяжении годового цикла” (номер проекта 23-24-00061).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента – А.А.С.; сбор данных – А.А.С., Р.В.Н., К.Т.А., Р.А.Г.; обработка данных – А.А.С., Р.В.Н., К.Т.А., Р.А.Г.; написание и редактирование манускрипта – А.А.С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Soldatov AA* (2005) Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system (review). *J Evol Biochem Physiol* 41(3): 272–281.
<https://doi.org/10.1007/s10893-005-0060-0>
2. *Chu CY, Cheng CH, Yang CH, Huang CJ* (2008) Erythropoietins from teleosts. *Cell Mol Life Sci* 65: 3545–3552.
<https://doi.org/10.1007/s00018-008-8231-y>
3. *Witeska M* (2013) Erythrocytes in teleost fishes: a review. *Zool and Ecol* 23(4): 275–281.
<https://doi.org/10.1080/21658005.2013.846963>
4. *Chou C-F, Tohari S, Brenner S, Venkatesh B* (2004) Erythropoietin gene from a teleost fish, *Fugu rubripes*. *Blood* 104: 1498–1503.
<https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3404>
5. *Lai JCC, Kakuta I, Mok HOL, Rummer JL, Randall D* (2006) Effects of moderate and substantial hypoxia on erythropoietin levels in rainbow trout kidney and spleen. *J Exp Biol* 209: 2734–2738.
<https://doi.org/10.1242/jeb.02279>
6. *Paffett-Lugassy N, Hsia N, Fraenkel PG, Paw B, Leshinsky I, Barut B, Bahary N, Caro J, Handin R, Zon LI* (2007) Functional conservation of erythropoietin signaling in zebrafish. *Blood* 110: 2718–2726.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-016535>
7. *Kulkeaw K, Sugiyama D* (2012) Zebrafish erythropoiesis and the utility of fish as models of anemia. *Stem Cell Res Ther* 3(6): 55–64.
<https://doi.org/10.1186/scrt146>
8. *Gering M, Patient R* (2005) Hedgehog signaling is required for adult blood stem cell formation in zebrafish embryos. *Dev Cell* 8: 389–400.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.01.010>
9. *Jin H, Xu J, Wen Z* (2007) Migratory path of definitive hematopoietic stem/progenitor cells during zebrafish development. *Blood* 109: 5208–5214.
<https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-069005>
10. *Zhang Y, Jin H, Li L, Qin FX, Wen Z* (2011) cMyb regulates hematopoietic stem/progenitor cell mobilization during zebrafish hematopoiesis. *Blood* 118: 4093–4101.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-342501>
11. *Sales CF, Silva RF, Amaral MGC, Domingos FFT, Ribeiro AIMA, Thomé RG, Santos HB* (2017) Comparative histology in the liver and spleen of three species of freshwater teleost. *Neotrop Ichthyol* 15(1): e160041.
<https://doi.org/10.1590/1982-0224-20160041>
12. *Bhagat RP, Banerjee V* (1986) Haematology of an Indian fresh water eel *Amphipnous cuchia*: erythrocyte count and related parameters with special reference to body length, sex and season. *Comp Physiol Ecol* 11(1): 21–27.
13. *Maslova MN, Soldatov AA, Tavrovskaya TV* (1988) Seasonal dynamics in the state of the red blood system of several Black sea fish. *J Evol Biochem Physiol* 24(4): 398–402.
14. *Joshi PC* (1989) Seasonal changes in the blood parameters of a hill-stream teleost, *Channa gachua*. *Comp Physiol Ecol* 14(2): 71–73.
15. *Al-Hassan LAJ, Al-Abood AY, Al-Seyab AA* (1990) Seasonal variations in the haemoglobin concentration and haematocrit values of *Silurus triostegus*. *Acta Ichthyol et Piscatoria* 20(1): 99–103.
16. *Ezzat AA, Shabana MB, Farghaly AM* (1974) Studies on the blood characteristics of *Tilapia zilli*. I. Blood cells. *J Fish Biol* 6(1): 1–12.
17. *Sharma T, Joshi BD* (1985) Effect of seasonal variation on some haematologic values of hill stream fish *Torputitora*. *J Adv Zool* 6(1): 39–45.
18. *Lochmiller RL, Weichman JD, Zale AV* (1989) Hematological assessment of temperature and oxygen stress in a reservoir population of striped bass. *Comp Biochem Physiol* 93A(3): 535–541.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(89\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(89)90007-8)
19. *Mahoney JB, McNulty JK* (1992) Disease-associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson-Raritan Estuary. *Trans Am Fish Soc* 121(2): 261–268.
[https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1992\)121<0261:NDBCAN>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1992)121<0261:NDBCAN>2.3.CO;2)

20. Soldatov AA, Kladchenko ES, Kukhareva TA, Andreyeva AY (2020) Erythrocyte profile of circulating blood of *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) under conditions of experimental hypothermia. *J Ther Biol* 2020 89: 102549.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102549>
21. Shulman GE, Love RM (1999) *The Biochemical Ecology and Marine Fishes*. Adv. Mar. Biol. 36. London. Acad Press.
<https://doi.org/10.1023/A:1012639928289>
22. Raizada MN, Singh CP (1981) Seasonal variations in the erythrocyte counts and haemoglobin content of *Cirrhinus mrigala* (Ham.). *Proc Indian Nat Sci Acad* 47(5): 656–658.
23. Ochiai A, Ogawa M, Umeda S, Taniguchi N (1975) Change of blood properties of maturing japan eel at hormonal influences. *Bull Jap Soc Sci Fish* 41(6): 609–614.
24. Hilge V, Klinger H (1978) Changes in the hemogram of the male European eel (*Anguilla anguilla*) during induced maturation. *ICES CM*.
25. Andreyeva AY, Soldatov AA, Kukhareva TA (2017) Black scorpionfish (*Scorpaena porcus*) hemopoiesis: Analysis by flow cytometry and light microscopy. *The Anatom Rec* 300(11): 1993–1999.
<https://doi.org/10.1002/ar.23631>
26. Ranzani-Paiva MJT (1995) Hematological characteristics of the mullet, *Mugil platanus* G. from Cananea lagoon-estuarine region. *Bol Inst Pesca-Sao-Paulo* 22(1): 1–22.
27. Khrushchov NG, Lange MA, Zolotova TE, Bessonov AV (1993) Characteristics of erythroid sprout cells in mirror carp (perspectives of use in estimating the fish physiological-state). *Izvest akad nauk ser biol* (1): 83–87.
28. Fischer U, Ototake M, Nakanishi T (1998) Life span of circulating blood cells in *Ginbuna crucian* carp (*Carassius auratus langsdorffii*). *Fish Shellfish Immunol* 8: 339–349.
<https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0144>
29. Soldatov AA (2005) Physiological aspects of effects of urethane anesthesia on the organism of marine fishes. *Hydrobiol J* 41(1): 113–126.
<https://doi.org/10.1615/HydroBJ.v41.i1.130>
30. Houston AH (1990) Blood and circulation. In: Schreck CB, Moyles PH (ed) *Methods for fish biology*. Bethesda. Am Fish Soc. 273–322.
31. Hammer Ø, Harper DAT (2006) *Paleontological data analysis*. Blackwell. Oxford.
<https://doi.org/10.1002/jqs.1107>
32. Verde C, Giordano D, Russo R, Di Prisco G (2011) Blood. Erythropoiesis in Fishes. In: Farrell AP (ed) *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Acad Press. 992–997.
33. Mahabady MK, Morovvati H, Arefi A, Karamifar M (2012) Anatomical and Histomorphological Study of Spleen and Pancreas in Berzem (*Barbus pectoralis*). *World J Fish and Marine Sci* 4(3): 263–267.
<https://doi.org/10.5829/idosi.wjfm.2012.04.03.61283>
34. Borgioli G, Frangioni G (1997) Blood and splenic respiratory compensation in larval newts. *Ital J Zool* 64: 221–226.
<https://doi.org/10.1080/11250009709356200>
35. Galindez EJ, Aggio (1998) MC The spleen of *Mustelus schmitti* (*Chondrichthyes, Triakidae*): a light and electron microscopic study. *Ichthyol Res* 45: 179–186.
<https://doi.org/10.1007/BF02678560>
36. Kurtović B, Teskeredžić E, Teskeredžić Z (2008) Histological comparison of spleen and kidney tissue from farmed and wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Acta Adriat* 49(2): 147–154.
37. Muiswinkel WB, Lamers CHJ, Rombait JHWM (1991) Structural and functional aspects of the spleen in bony fish. *Res Immunol* 142: 962–966.
[https://doi.org/10.1016/0923-2494\(91\)90093-X](https://doi.org/10.1016/0923-2494(91)90093-X)
38. Sundaesan M (2014) Ultrastructure of Spleen in the Freshwater Fish, *Tilapia mossambica* (Peters). *Eur Acad Res* 2(2): 2894–2908.
39. Soldatov AA (1992) Развитие депо крови в онтогенезе морских рыб. *Экология моря* 42: 46–55. [Development of the blood depot stores in the ontogenesis of the marine fishes. *Ekologiya morya* 42: 46–55. (In Russ)].
40. Freire CA, Prodocimo V (2007) Special Challenges to Teleost Fish Osmoregulation in Environmentally Extreme or Unstable Habitats. In: *Baldisserotto B* (ed) *Fish Osmoregulation*. Sci Publ. 249–276.
41. Sudesh R, Sabhlok VP (2014) Effect of pinealectomy on plasma Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ in catfish *Clarias batrachus* under different salinity levels. *Ind J Fundament Appl Life Sci* 4(2): 67–69.
42. Jawad LA, Al-Mukhtar MA, Ahmed HK (2004) The relationship between haematocrit and some biological parameters of the Indian shad, *Tenulosa ilisha* (Family Clupeidae). *Anim Biodiver and Conservat* 27 (2): 47–52.
43. Phillips MCL, Moyes CD, Tufts BL (2000) The effects of cell ageing on metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. *J Exp Biol* 203(6): 1039–1045.
<https://doi.org/10.1242/jeb.203.6.1039>

44. *Maestre R, Pazos M, Medina I* (2009) Involvement of methemoglobin (MetHb) formation and hemin loss in the pro-oxidant activity of fish hemoglobins. *J Agric Food Chem* 57(15): 7013–7021.
<https://doi.org/10.1021/jf9006664>
45. *Blair B, Barlow C, Martin E, Schumaker R, McIntyre J* (2020) Methemoglobin determination by multi-component analysis in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) possessing unstable hemoglobin. *Methods* 7: 100836.
<https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100836>
46. *Schoore EJ, Simco BA, Davis KB* (1995) Responses of blue catfish and channel catfish to environmental nitrite. *J Aquat Anim Health* 7: 304–311.
[https://doi.org/10.1577/15488667\(1995\)007<0304:ROBCAC>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/15488667(1995)007<0304:ROBCAC>2.3.CO;2)
47. *Saleh MC, McConkey S* (2012) NADH-dependent cytochrome b5 reductase and NADPH methemoglobin reductase activity in the erythrocytes of *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol Biochem* 38: 1807–1813.
<https://doi.org/10.1007/s10695-012-9677-2>
48. *Krishna MS, Venkataramana G* (2007) Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with pregnancy-induced hypertension. *Ind J Physiol Pharmacol* 51: 284–288.
49. *Graham MS, Fleicher GL* (1986) High concentrations of methemoglobin in five species of temperate marine teleosts. *J Exp Zool* 239: 139–142.
<https://doi.org/10.1002/jez.1402390117>
50. *Houston AH, Roberts WC, Kennington JA* (1996) Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish. *Fish Physiol Biochem* 15(6): 481–489.
<https://doi.org/10.1007/BF01874922>
51. *Rothmann C, Levinshal T, Timan B, Avtalion RR, Malik Z* (2000) Spectral imaging of red blood cells in experimental anemia of *Cyprinus carpio*. *Comp Biochem Physiol* 125: 75–83.
[https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(99\)00157-9](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(99)00157-9)
52. *Wickramasinghe SN* (1993) Erythropoietin and the human kidney: evidence for an evolutionary link from studies of *Salmo gairdneri*. *Comp Biochem Physiol* 104A: 63–65.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\).90009-s](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93).90009-s)
53. *Moritz KM, Lim GB, Wintour EM* (1997) Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *Am J Physiol* 273: R1829–R1844.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.6.R1829>
54. *Pottinger TG, Pickering AD* (1987) Androgen levels and erythrocytosis in maturing brown trout, *Salmo trutta* L. *Fish Physiol Biochem* 3(3): 121–126.
<https://doi.org/10.1007/BF02180413>

Cellular Composition of Erythroid Forms in the Blood and Head Kidney of the Golden Grey Mullet (*Chelon auratus* Risso, 1810) during the Annual Cycle

A. A. Soldatov^a, *, V. N. Rychkova^a, T. A. Kukhareva^a, and A. G. Rokotova^a

^a*Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation*

*e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

The changes in the number of erythrocytes in the blood and the production of erythrocytes by the hematopoietic tissue of the golden grey mullet (*Chelon auratus* Risso, 1810) during the annual cycle were studied. Catching and delivery of fish to the aquarium was carried out monthly. The content of immature erythroid forms was determined: erythroblasts, basophilic and polychromatophilic normoblasts, in the head kidney (pronephros) and circulating blood. It has been established that the processes of erythropoiesis in the hematopoietic tissue of the golden grey mullet proceed irregularly. The active production of erythroid mass is mainly confined to the post-spawning period. This is evidenced by an increase in the content of immature erythroid forms in the head kidney and blood. This coincides with a general increase in the number of red blood cells in the circulation system and indicates a shift in the erythrocyte balance in favor of production processes. In the rest of the time, the processes are opposite. It is assumed that this is due to the peculiarities of the organization of the red blood system, which excludes the regular production of erythropoietin in the kidneys.

Keywords: erythrocytes, erythropoiesis, head kidney, *Chelon auratus* Risso, 1810, annual cycle