



УДК 594.124:591.111.1:612.22

В. Н. Новицкая, аспирант, **А. А. Солдатов**, докт. биол. наук, зав. отд.

Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского Национальной академии наук Украины, Севастополь, Украина

ЭРИТРОИДНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ГЕМОЛИМФЫ *ANADARA INAEQUIVALVIS* (MOLLUSCA: ARCIDAE) В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АНОКСИИ: ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В экспериментальных условиях в течение 3 сут. исследовалось влияние аноксии на морфо-функциональные и цитометрические характеристики эритроидных элементов гемолимфы двустворчатого моллюска *Anadara inaequalvis* (Bruguiere, 1789). Аноксия вызывает гидратацию цитоплазмы и набухание (свеллинг) эритроидных элементов. Об этом свидетельствует характер изменения эритроцитарных индексов (*MCV*, *MCH*, *MCHC*) и линейных характеристик клеток. Это сопровождалось лизисом преимущественно старых клеточных форм, имеющих более низкую осмотическую стойкость. Разрушение старой эритроцитарной массы приводило к относительному росту содержания в гемолимфе клеток более ранних генераций. Последнее определяло увеличение средноклеточного объема ядра, содержания базофильных зернистых включений в цитоплазме и повышение устойчивости эритроидных элементов моллюска к осмотическому шоку.

Ключевые слова: аноксия, *Anadara inaequalvis*, гемолимфа, эритроциты, морфология, цитометрия, осмотическая резистентность

Организмы, населяющие зоны экстремальной гипоксии Мирового океана, обладают характерными особенностями в организации тканевого метаболизма. У них обнаружен некомпесированный тип стехиометрии цитохромов в дыхательной цепи митохондрий [3, 4], ферментативные системы цикла Кребса могут быть задействованы в анаэробных процессах генерации энергии и позволяют получать дополнительный ресурс макроэргов (АТР, GTP) без накопления токсичных метаболитов [12, 23, 27]. В условиях гипоксии в тканях повышается содержание соединений, несвойственных аэробному обмену (аланин, сукцинат, опины, пропионат) [8, 23], усиливается продукция NH_4^+ [7, 10], растёт активность аминотрансфераз [17], активизируются процессы переминирования аминокислот [17].

Реакции же клеточных систем изучены недостаточно. Удобным модельным объектом являются ядерные эритроциты низших позво-

ночных и беспозвоночных. У них обнаружены митохондрии, ферменты цикла Кребса [9, 22], что делает их функционально ближе к клеткам соматических тканей. Показано, что эритроциты толерантны к гипоксии костистых рыб способны к сбалансированному угнетению мембранных и метаболических функций [5], при этом наблюдаются закономерные морфологические изменения клеток [2].

Особый интерес представляют эритроидные элементы беспозвоночных, способных продолжительный период времени находиться в условиях внешней аноксии. К этой группе организмов относятся двустворчатые моллюски рода *Anadara*. Присутствие эритроцитарного гемоглобина значительно повышает кислородную ёмкость их гемолимфы [16]. В отсутствии кислорода, в сравнении с другими видами (*Chamelea gallina* L. и *Mytilus galloprovincialis* Lmk.), они показывают самое высокое сохранение энергии (АТР) [26]. Гемолимфа анадар, в

отличие от других двустворок, содержит не три, а четыре типа гемоцитов, среди которых наиболее многочисленны эритроидные клетки [11, 25]. В них выявлены плотные цитоплазматические гранулы, функциональное назначение которых остаётся открытым, хорошо развитый аппарат Гольджи, неровный эндоплазматический ретикулум, непостоянное число митохондрий, мелкие цитоплазматические микрокапальца [11]. Реакция этих клеток на условия аноксии не изучена и представляется интересной, так как позволяет судить об адаптивных процессах, реализуемых на уровне клеточных систем гидробионтов в столь экстремальных условиях среды.

Цель нашей работы – исследовать в условиях эксперимента влияние аноксии на функциональные и морфометрические характеристики эритроидных элементов гемолимфы *Anadara inaequalis* (Brugiere).

Материал и методы. В работе использовали особей *A. inaequalis* (далее анадара) с длиной раковины 30 – 33 мм, которых собирали с коллекторных установок рыбодобывающего предприятия «Дон-Комп» (б. Стрелецкая, Севастополь). Транспортировку животных осуществляли в контейнере насыпью без воды в течение 1 ч от момента сбора. Перед проведением исследований моллюсков выдерживали в аквариумах с проточной морской водой в течение 2 – 3 сут. для снятия состояния стресса.

Экспериментальная часть работы выполнена на специально разработанном стенде, который позволяет поддерживать заданную температуру и концентрацию кислорода в воде. В камеру объёмом 13.5 л помещали 30 особей анадары. Содержание кислорода в воде снижали в течение 2.5 – 3.0 ч с 8.5 – 8.7 до 0 мг л⁻¹ прокачиванием N₂. Контроль за величиной PO₂ осуществляли потенциометрически. В работе применяли оксиметр ELWRO N 5221 (Польша). Температуру воды поддерживали на уровне 20±1°C. Фотопериод – 12 ч день : 12 ч ночь. Экспозиция – 3 сут. Контрольная группа моллюсков содержалась в аналогичных условиях

при концентрации кислорода в воде 8.5 – 8.7 мг л⁻¹ (95 – 97 % насыщения). Ежедневно в опыте и контроле в ёмкостях производили полную смену воды для удаления метаболитов.

Образцы гемолимфы получали пункцией из экстрапаллиальной полости. Концентрацию гемоглобина в пробах контролировали при помощи гемиглобинцианидного метода. Применяли стандартный набор реактивов ООО «Агат-мед» (Россия). Число эритроидных элементов подсчитывали в камере Горяева [1]. Гематокрит определяли путём центрифугирования образцов гемолимфы в гепаринизированных капиллярах (750 г; 30 мин). Центрифугирование проводили в специальном гематокритном роторе (центрифуга MPW-310, Польша). На основании полученных значений рассчитывали эритроцитарные индексы: среднеклеточный объём (MCV), среднеклеточное содержание (MCH) и среднеклеточную концентрацию гемоглобина (MCHC) [2]. Расчёты выполняли по формулам:

$$MCH = \frac{Hb}{Er}; MCHC = \frac{Hb}{Ht} \times 10; MCV = \frac{Ht}{Er} \times 10,$$

где *Hb* – концентрация гемоглобина (г л⁻¹); *Er* – число эритроидных элементов (шт. мкл⁻¹); *Ht* – гематокрит (%).

Осмотическую резистентность клеток оценивали при помощи макроскопического метода Лимбека, Рибьера в концентрационном диапазоне 0.10 – 0.85 % NaCl [1].

Перед изготовлением мазков для цитологических исследований эритроидную массу трижды отмывали в изотоничном растворе NaCl (0.85 %) путём центрифугирования (3500 об мин⁻¹ в течение 15 мин). Последнее связано с высоким содержанием солей, активно кристаллизующихся при высыхании мазка. Затем изготавливали мазки, которые окрашивали по комбинированному методу Паппенгейма [1]. На мазках изучали морфологические и цитометрические характеристики эритроидных элементов. В работе применяли светооптический микроскоп «Биолар» (Польша).

При помощи окуляр-микрометра измеряли большой и малый диаметры клеток (C_1 ; C_2) и их ядер (N_1 ; N_2). Измерения проводили под иммерсией при увеличении в 1500×. Объём выборки – 100 клеток на один мазок. На основании значений N_1 и N_2 по формуле эллипсоида вращения рассчитывали объём ядра эритроцита (V_n) [6]:

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

Для сравнительной оценки изменений MCV и V_n определяли индекс V_n/MCV (ядерно-плазматическое отношение).

Статистическая обработка и графическое оформление полученных результатов проведены с применением стандартного пакета Grapher (версия 1.25). Результаты представлены в виде $\bar{x} \pm S\bar{x}$. Достоверность различий оценивали при помощи t-критерия Стьюдента.

О нормальности распределения судили по сопоставлению абсолютных величин средней арифметической и моды.

Результаты. Влияние аноксии на организм анадары изучали на уровне циркулирующей гемолимфы и отдельных эритроидных клеток.

Гематологические исследования. Концентрация гемоглобина, число эритроцитов и гематокрит у контрольной группы моллюсков составляли соответственно 21.1 ± 3.1 г л⁻¹, 53.5 ± 12.8 (10³) клеток мкл⁻¹, 4.79 ± 1.07 %. В условиях экспериментальной аноксии они не претерпевали существенных изменений. Отмечалась лишь некоторая тенденция понижения значений первых двух показателей и рост последнего (рис 1). Однако различия статистически не выражены.

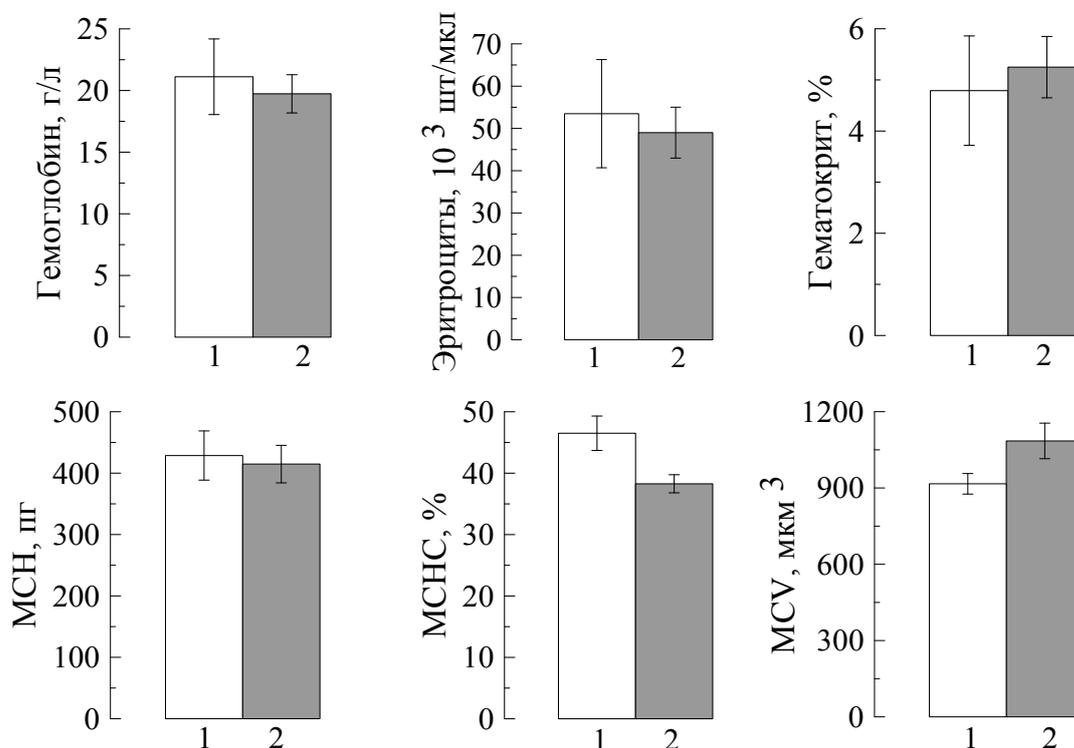


Рис. 1 Гематологические характеристики и эритроцитарные индексы анадары в условиях (1) нормоксии (объём выборки – 10 особей) и (2) аноксии (объём выборки – 13 особей)

Fig. 1 Hematological parameters and erythrocyte indexes of *Anadara inaequalvis* under (1) normoxic (n – 10 specimens) and (2) anoxia conditions (n – 13 specimens)

Расчёт же эритроцитарных индексов, проведённый на основе гематологических характеристик гемолимфы анадары, напротив, показал наличие значимых изменений (рис. 1). Среднеклеточный объём (*MCV*) увеличивался на 18.4 % ($p < 0.01$) и составил 1085 ± 70 мкм³. Это происходило на фоне снижения *MCHC* при сохранении значений *MCH*. Такое соотношение показателей предполагает набухание клеток (свеллинг).

Осмотическая стойкость эритроидных элементов. Первые признаки лизиса эритроидных клеток у контрольной группы животных отмечали при 0.52 ± 0.02 % NaCl (минимальная резистентность). Полное разрушение наблюдала при 0.18 ± 0.01 % NaCl (максимальная резистентность) (рис. 2).

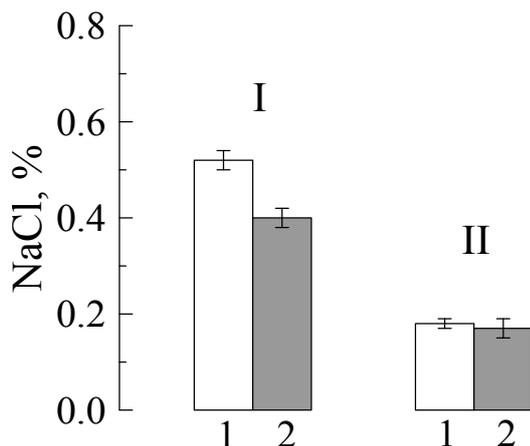


Рис. 2 Осмотическая резистентность эритроцитов анадары в условиях (1) нормоксии (объём выборки – 10 особей) и (2) аноксии (объём выборки – 13 особей): I – минимальная, II – максимальная

Fig. 2 Osmotic resistance of *Anadara inaequalvis* erythrocyte under (1) normoxic (n – 10 specimens) and (2) anoxia conditions (n – 13 specimens): I – minimal, II – maximal

Диапазон резистентности был сравнительно широк и составлял 0.34 ± 0.01 % NaCl, что отражает достаточно высокую степень гетерогенности циркулирующей эритроцитарной массы в отношении данных характеристик.

В условиях аноксии наблюдался значительный рост значений минимальной резистентности клеток красной крови. Начало ли-

зиса эритроидных элементов происходило при более низких концентрациях NaCl – 0.40 ± 0.02 %, что на 23.1 % ($p < 0.001$) ниже значений, отмеченных для контрольной группы моллюсков. Значения же максимальной резистентности сохранялись на уровне контрольных величин. Одновременно уменьшался и диапазон резистентности на 22.4 % ($p < 0.01$), то есть эритроидная популяция клеток становилась более гомогенной.

Морфометрические характеристики эритроидных элементов. Эритроидные элементы гемолимфы моллюска имеют слегка эллипсоидную форму (рис. 3).

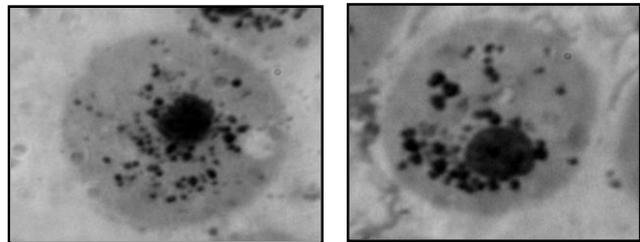


Рис. 3 Эритроидные элементы гемолимфы анадары (масляная иммерсия, 1500×)
Fig. 3 Erythroid elements of *Anadara inaequalvis* hemolymph (oil immersion, 1500×)

Большой (C_1) и малый (C_2) диаметры клетки у контрольной группы особей составили 11.3 ± 0.3 и 10.2 ± 0.3 мкм соответственно (табл. 1). Зависимость между C_1 и C_2 хорошо описывается уравнением линейной регрессии (рис. 4) с достаточно высоким коэффициентом детерминации – 0.68 ± 0.06 , что свойственно клеткам, имеющим округлую форму (табл. 1).

Цитоплазма ацидофильная, что отражает присутствие гемоглобина. Она также содержит зернистые базофильные включения в количестве 21.8 ± 0.7 единиц на клетку. На мазках обнаруживаются разрушенные клетки – эритроцитарные тени. Их количество не превышает 14 % от общей клеточной массы.

Клетки содержат небольшое ядро эллипсоидной формы. Продольные (N_1) и поперечные (N_2) размеры этой структуры – 3.79 ± 0.09 и 3.09 ± 0.11 мкм (табл. 1).

Табл. 1 Цитометрические и морфо-функциональные характеристики эритроидных элементов гемолимфы анадары в условиях нормоксии (объём выборки – 10 особей) и аноксии (объём выборки – 13 особей)
 Table 1 Cytometrical parameters of *Anadara inaequivalvis* erythroid elements of hemolymph under normoxic (n – 10 specimens) and anoxia conditions (n – 13 specimens)

Показатели	Контроль	Аноксия
C ₁ , мкм	11.34±0.24	11.56±0.13
C ₂ , мкм	10.20±0.26	10.55±0.13
N ₁ , мкм	3.93±0.10	4.13±0.05
N ₂ , мкм	3.18±0.07	3.46±0.03
(C ₁ -C ₂), мкм	1.14±0.06	1.01±0.03
(N ₁ -N ₂), мкм	0.75±0.06	0.67±0.02
Число зёрен, шт	21.8 ± 0,7	29.8 ± 0,6
Повреждённые клетки, %	13.3 ± 2.1	56.3 ± 5.0
Коэффициент <i>a</i>	2.53±0.53	0.85±0.23
Коэффициент <i>b</i>	0.86±0.05	1.02±0.02
Коэффициент R ²	0.68±0.06	0.84±0.02

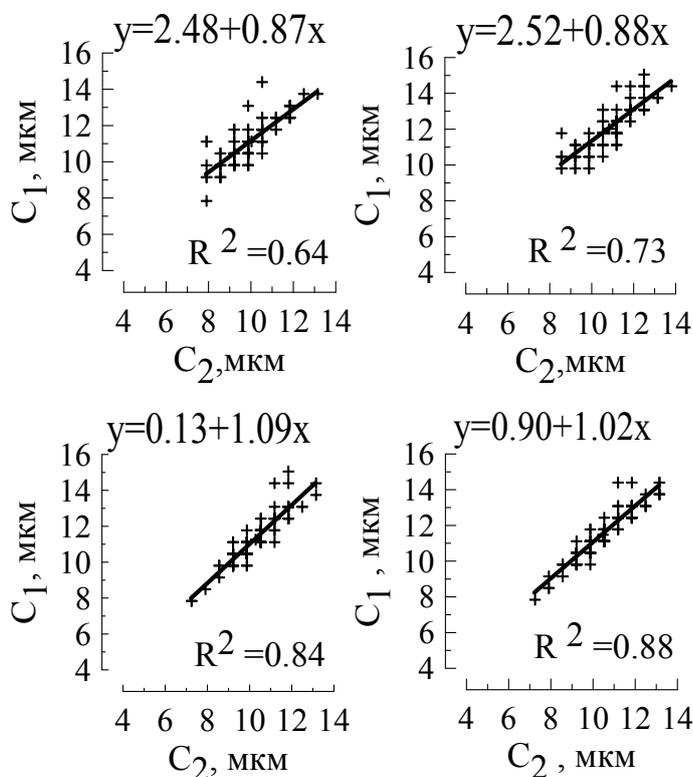


Рис. 4 Зависимость C₁ от C₂ у отдельных особей анадары в условиях нормоксии (верхний ряд) и аноксии (нижний ряд) (объём выборки – 100 клеток)
 Fig. 4 Dependence C₁ from C₂ at single individuals of *Anadara inaequivalvis* under normoxic (upper series) and anoxic (lower series) conditions (n – 100 cells)

Объём ядра (V_n), рассчитанный по формуле эллипсоида вращения, составил 19.3±1.9 мкм³. Распределение величин V_n носило сложный характер (рис. 5). Ранжирование выборочной совокупности с величиной классового промежутка 20 мкм³ позволило показать, что основная масса клеток (более 40 %) имели ядра объёмом менее 20 мкм³. Содержимое ядра компактное, с высоко концентрированным

хроматином, цвет резко базофильный, что отражает низкую функциональную активность данной структуры. Об этом же свидетельствуют пониженные значения ядерно-плазматического отношения (V_n/MCV) – 0.023±0.002.

Аноксия сопровождалась ростом линейных размеров клеток красной крови и их ядер. Продольное и поперечное сечение эритроцитов (C₁, C₂) относительно контрольной

группы животных увеличивалось соответственно на 5.5 и 8.0 % ($p < 0.05$) (табл. 1). Клетки становились более округлыми. Разница $C_1 - C_2$ уменьшалась на 18.3 % ($p < 0.05$). Зависимость между C_1 и C_2 становилась более выраженной. Об этом свидетельствовал рост значений коэффициента b в уравнении линейной

регрессии на 18.6 % ($p < 0.001$) и увеличение значений R^2 на 23.5 % ($p < 0.001$) (рис. 4, табл. 1). Существенно возрастало и число зернистых включений в цитоплазме на 36.7 % ($p < 0.001$) (табл. 1). Количество разрушенных клеток было в 4.2 раза выше, чем в гемолимфе моллюсков контрольной группы.

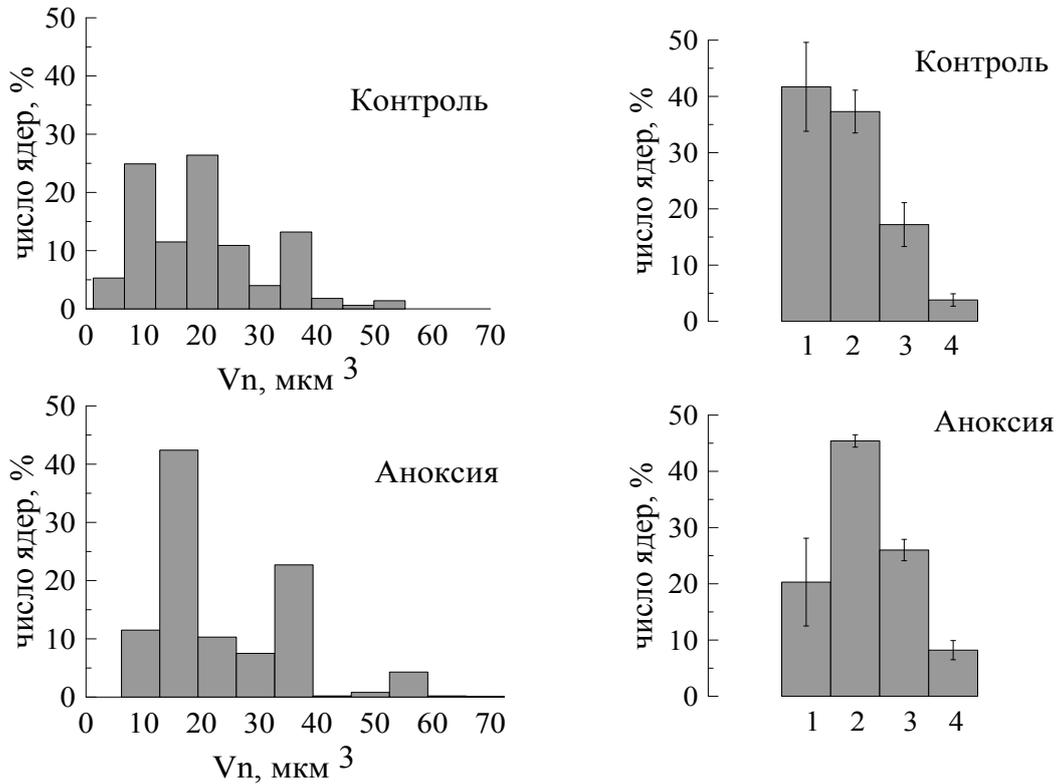


Рис. 5 Распределение эритроидных элементов гемолимфы анадары в соответствии с объёмом ядра в условиях нормоксии (объём выборки – 1000 клеток) и аноксии (объём выборки – 1300) (слева – фактическое распределение; справа – распределение после ранжирования; 1 – до 20 $\mu\text{м}^3$, 2 – 20 – 29 $\mu\text{м}^3$, 3 – 30 – 39 $\mu\text{м}^3$, 4 – более 40 $\mu\text{м}^3$)

Fig. 5 Erythroid elements distribution of *Anadara inaequalis* hemolymph according to nucleus volume under normoxic ($n - 1000$ cells) and anoxia conditions ($n - 1300$ cells) (left – fact distribution; right – distribution after ranking; 1 – below 20 μm^3 , 2 – 20 – 29 μm^3 , 3 – 30 – 39 μm^3 , 4 – over 40 μm^3)

Параллельно увеличивались и линейные размеры клеточных ядер (N_1, N_2) на 3 – 8 % (табл. 1). Особенно заметен был рост объёма ядра – 22.5 % ($p < 0.05$). Среди эритроидных клеток возрастало число эритроидных элементов с объёмом ядра 20 – 30 $\mu\text{м}^3$ (рис. 5). Увеличение же размеров данной структуры было пропорционально росту объёма клетки (табл. 1). Ядерно-плазматический индекс V_n/MCV не изменялся.

Обсуждение. Из представленных результатов следует, что аноксия вызывает ряд однозначных изменений в функциональном состоянии, морфологии и размерных характеристиках эритроидных элементов гемолимфы анадары:

- увеличение линейных и объёмных характеристик клеток и их ядер;
- лизис значительной части эритроидных элементов на фоне роста их стойкости к

- осмотическому шоку;
- повышение числа базофильных включений в цитоплазме.

Следует отметить, что рост среднечелочного объема (MCV) в условиях внешней аноксии происходил на фоне снижения среднечелочной концентрации гемоглобина ($MCHC$) при сохранении абсолютного содержания данного соединения в эритроците (MCH). Такое соотношение показателей возможно только при гидратации цитоплазмы клетки, которое приводит к её набуханию (свеллингу). Эта закономерность отмечена в работах многих авторов [13, 21] и описана нами ранее для ядерных эритроцитов скорпены [2].

Известно, что гипоксия у костистых рыб сопровождается выбросом катехоламинов (адреналина, норадреналина) в циркулирующую кровь [13, 20]. Связываясь в β -адренорецепторами эритроцитарных мембран эти соединения индуцируют трансмембранный Na^+/H^+ обмен [13, 18]. Натрий, как осмотически активный катион повышает содержание воды в цитоплазме, что и приводит к увеличению объема клетки в целом. Можно допустить, что данный механизм в условиях аноксии реализуется и в эритроидных элементах гемолимфы анадары.

Гидратация цитоплазмы и, как следствие, набухание клеток должны сопровождаться их частичным лизисом, что в действительности и имело место. Число эритроцитарных теней (разрушенные клетки) на мазках гемолимфы опытной группы моллюсков повышалось более чем в 4 раза. Лизису, по всей видимости, подвергались наиболее старые клетки, для которых характерна низкая эластичность мембранных структур и пониженная устойчивость к осмотическому шоку [15]. Это должно было приводить к относительному росту содержания в гемолимфе эритроидных элементов более ранних генераций. Действительно, клеточная масса гемолимфы анадары в ходе эксперимента приобретала ряд морфоло-

гических и функциональных свойств, присущих молодым клеткам: повышались среднечелочный объем и линейные характеристики ядер, увеличивалось число базофильных включений в цитоплазме, росла устойчивость эритроидных элементов к осмотическому шоку.

Омоложение циркулирующей эритроцитарной массы гемолимфы моллюска может быть также связано с повышенной продукционной активностью его кроветворной ткани. Известно, что гипоксия (аноксия) индуцирует выработку эритропоэтинов в почках гидробионтов и тем самым усиливает процессы пролиферации в эритроидном ряду клеток [14, 24]. Однако в нашем случае этого, по всей видимости, не было. Мы не отмечали появления в гемолимфе анадары в условиях аноксии малодифференцированных эритроидных элементов, имеющих базофильную цитоплазму и крупные ядра с низкоконденсированным хроматином. Значения индекса V_n/MCV не претерпевали статистически значимых изменений. Следует также принять во внимание и продолжительность эксперимента – 3 суток. Даже при активной генерации клеток кроветворной тканью этого времени будет недостаточно для существенного обновления клеточной массы молодыми клетками.

Таким образом, свеллинг и лизис части старой эритроцитарной массы являются основными процессами, которые влияют на морфологические и цитометрические характеристики эритрограммы гемолимфы анадары в условиях внешней аноксии.

Выводы. 1. Аноксия вызывает гидратацию цитоплазмы и набухание (свеллинг) эритроидных элементов в гемолимфе анадары. Это сопровождается лизисом преимущественно старых клеточных форм, имеющих более низкую осмотическую резистентность. **2.** Разрушение старой эритроцитарной массы приводит к относительному росту содержания в гемолимфе клеток более ранних генераций. Последнее определяет увеличение среднечелоч-

ного объёма ядра, содержания базофильных зернистых включений в цитоплазме и повыше-

ние устойчивости эритроидных элементов моллюска к осмотическому шоку.

1. *Золотницкая Р. П.* Методы гематологических исследований / Лабораторные методы исследования в клинике (справочник). – М.: Медицина, 1987. – С. 106 – 148.
2. *Парфенова И. А., Солдатов А. А.* Эритрограмма циркулирующей крови скорпены в условиях экспериментальной гипоксии // Морск. экол. ж. – 2005. – **4**, N2. – С. 59 - 67.
3. *Савина М. В.* Механизмы адаптации тканевого дыхания в эволюции позвоночных. – С.-Петербург: Наука, 1992. – 200 с.
4. *Солдатов А. А.* Цитохромная система и напряжение кислорода в мышечной ткани морских рыб различной естественной активности // Ж. эволюц. биохим. физиол. – 1996. – **32**, N2. – С.142 - 146.
5. *Солдатов А. А., Русинова О. С., Трусевич В. В., Звездина Т. Ф.* Влияние гипоксии на биохимические показатели эритроцитов скорпены // Укр. биохим. журн. – 1994. – **66**, 5. – С.115 - 118.
6. *Таишэ К.* Введение в количественную цитогистологическую морфологию. – Бухарест: Изд-во Академии Респ. Румынии, 1980. – 291 с.
7. *Шульман Г. Е., Аболмасова Г. И., Столбов А. Я.* Использование белка в энергетическом обмене гидробионтов // Усп. совр. биол. – 1993. – **113**. – С. 576 – 586.
8. *Arndt-Sullivan C., Lechaire J-P., Felbeck H.* Extreme tolerance to anoxia in the *Lucinoma aequizonata* symbiosis // J. Shellfish Research. – 2008. – **27**, N 1. – P. 119 – 127.
9. *Boutillier R. G., Ferguson R. A.* Nucleated red cell function: metabolism and pH regulation // Can. J. Zool. – 1989. – 67, N 12. – P. 2986 – 2993.
10. *Chew S. F., Gan J., Ip Y. K.* Nitrogen metabolism and excretion in the swamp eel, *Monopterus albus*, during 6 or 40 days of estivation in mud // Physiol. Biochem. Zool. – 2005. – **78**. – P. 620 - 629.
11. *Holden J. A., Pipe R. K., Quaglia A., Ciani G.* Blood cells of the arcid clam, *Scapharca inaequalis* // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. – 1994. – **74**, N 2. – P. 287 - 299.
12. *Hughes G. M., Johnston I. A.* Some responses of the electric ray (*Torpedo marmorata*) to low ambient oxygen tensions // J. Exp. Biol. – 1978. – **73**. – P. 107 – 117.
13. *Jensen F. B.* Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport (review) // Acta Physiol. Scand. – 2004. – **182**, N 3. – P. 215 – 227.
14. *Lai J. C. C., Kakuta I., Mok H. O. L., Rummer J. L., Randall D.* Effects of moderate and substantial hypoxia on erythropoietin level in rainbow trout kidney and spleen // J. Exp. Biol. – 2006. – **209**. – P. 2734 – 2738.
15. *Lane H. C., Tianang D.* Effect of hypoxia and hyperoxia on rainbow trout red cells // Amer. Zool. – 1992. – **32**, N 5. – P. 170 A.
16. *Lee A-C., Lee M-C., Lee Y-H.* Candidates for a hypoxia-stress indicator in the hard clam, *Meretrix lusoria* // Aquaculture. – 2008. – **278**, N 1-4. – P. 150 – 155.
17. *Mommsen Th. P., French C. J., Hochachka P. W.* Sites and patterns of protein and amino acid utilization during spawning migration of salmon // Can. J. Zool. – 1980. – **58**. – P. 1785 – 1799.
18. *Nikinmaa M.* Adrenergic control of oxygen transport in salmonids // Fischerei-Forschung. – 1991. – **29**, N 3. – P. 64 – 65.
19. *Owen T.G., Hochachka P. W.* Purification and properties of dolphin muscle aspartate and alanine transaminases and their possible roles in the energy metabolism of diving mammals // Biochem. J. – 1974. – **143**. – P. 541 – 553.
20. *Perry S. F., Montpetit C. J., Julio A. E., Moore K.* The influence of chronic anaemia on catecholamine secretion in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // J. Comp. Physiol. – 1999. – **169**, N 4/5. – P. 335 – 343.
21. *Perry S. F., Reid S. G.* The effects of acclimation temperature on the dynamics of catecholamine release during acute hypoxia in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* // J. Exp. Biol. – 1994. – **186**. – P. 289 – 307.
22. *Phillips M. C. L., Moyes C. D., Tufts B. L.* The effects of cell ageing on metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells // J. Exp. Biol. – 2000. – **203**, N 6. – P. 1039 – 1045.
23. *Waarde A.* Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production // Comp. Biochem. Physiol. – 1988. – **91B**. – P. 207 - 228.
24. *Wickramasinghe S. N.* Erythropoietin and the human kidney: evidence for an evolutionary link from studies of *Salmo gairdneri* // Comp. Biochem. Physiol. – 1993. – **104A**. – P. 63 - 65.
25. *Wootton E. C., Dyrinda E. A., Ratcliffe N. A.* Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*) // Fish & Shellfish Immunology. – 2003. – **15**, N 3. – P. 195 – 210.

26. Zwaan A., Cortesi P., Thillart G., Storey K. B. Differential sensitivities to hypoxia by two anoxia-tolerant marine molluscs: A biochemical analysis // Mar. Biol. – 1991. – **111**, N 3. – P. 343 – 351.
27. Zwaan. A., Schaub B. E. M., Babarro J. M. F. Anoxic survival of *Macoma balthica*: the effect of an-

tibiotics, molybdate and sulphide // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. – 2001. – **256**. – P. 241 – 251.

Поступила 23 юня 2010 г.
После доработки 26 августа 2010 г.

Еритроїдні елементи гемолімфи *Anadara inaequalis* (Mollusca: Arcidae) в умовах експериментальної аноксії: функціональні і морфометричні характеристики. В. М. Новицька, О. О. Солдатов. В експериментальних умовах на протязі 3 діб досліджено вплив аноксії на морфо-функціональні і цитометричні характеристики еритроїдних елементів гемолімфи двостулкового молюска *Anadara inaequalis* (Brugiere, 1789). Аноксія викликає гідратацію цитоплазми і набрякання (свеллинг) еритроїдних елементів. Про це свідчить характер зміни еритроцитарних індексів (MCV, MCH, MCHC) і лінійних характеристик клітин. Це супроводжувалося лізисом переважно старих клітинних форм, які мають нижчу осмотичну стійкість. Руйнування старої еритроцитарної маси приводило до відносного росту вмісту в гемолімфі клітин більш ранніх генерацій. Останнє обумовлювало збільшення середньоклітинного об'єму ядра, вмісту базофільних зернистих включень у цитоплазмі і підвищення стійкості еритроїдних елементів молюска до осмотичного шоку.

Ключові слова: аноксія, *Anadara inaequalis*, гемолімфа, еритроцити, морфологія, цитометрія, осмотична резистентність

Erythroid elements of hemolymph in *Anadara inaequalis* (Mollusca: Arcidae) under conditions of experimental anoxia: functional and morphometric characteristics. V. N. Novitskaja, A. A. Soldatov. Influence of anoxia (exposure – 3 days) on functional, morphologic and cytometrical characteristics of hemolymph erythroid elements of bivalve mollusc *Anadara inaequalis* (Brugiere, 1789) was investigated in experimental conditions. Anoxia caused the hydration of cytoplasm and swelling of erythroid elements. The pattern of changes in erythrocyte indices (MCV, MCH, MCHC) and geometric parameters of cells confirmed that phenomenon. It was accompanied by a lysis of predominantly old cellular forms with lower osmotic resistance. Destruction of old erythroid forms resulted in relative increase in content of cells of earlier generation in the hemolymph which led to an increase in mean cell volume of a nucleus, content of basophilic granular inclusions in cytoplasm and stability of erythroid elements of the mollusc to osmotic shock.

Key words: anoxia, *Anadara inaequalis*, hemolymph, erythrocyte morphology, cytometry, osmotic resistance