

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ  
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА И ОКЕАНОГРАФИИ» (ФГУП «ВНИРО»)

FEDERAL AGENCY FOR FISHERIES  
FEDERAL STATE UNITARY ENTERPRISE  
«RUSSIAN FEDERAL RESEARCH INSTITUTE OF FISHERIES  
AND OCEANOGRAPHY» (FSUE «VNIRO»)



N.P. KOVATCHEVA, E.N. ALEKSANDROVA

**HEMATOLOGICAL PARAMETERS  
AS AN INDICATORS OF PHYSIOLOGICAL STATUS  
OF THE DECAPODS: RED KING CRAB *PARALITHODES*  
*CAMTSCHATICUS* AND FRESHWATER CRAYFISH  
GENUS *ASTACUS* AND *PONTASTACUS***

MOSCOW VNIRO PUBLISHING 2010

Н.П. КОВАЧЕВА, Е.Н. АЛЕКСАНДРОВА

**ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ  
КАК ИНДИКАТОРЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ  
ДЕКАПОД: КАМЧАТСКОГО КРАБА *PARALITHODES*  
*SAMTSCHATICUS* И РЕЧНЫХ РАКОВ РОДОВ  
*ASTACUS* И *PONTASTACUS***

МОСКВА ИЗДАТЕЛЬСТВО ВНИРО 2010

УДК (639.518+639.517) 612.11

*Редакционный совет ФГУП «ВНИРО»:*

д-р биол. наук *А.Н. Макоедов*, д-р биол. наук *М.К. Глубоковский*,  
д-р биол. наук *О.Ф. Гриценко*

*Рецензенты:*

*Ю.П. Мамонтов*, д-р сель-хоз. наук, первый зам. председателя  
Ассоциации «Росрыбхоз», лауреат Премии Правительства РФ  
в области науки и техники; *Н.В. Кловач*, д-р биол. наук

**Ковачева Н.П., Александрова Е.Н.**

**К56** Гематологические показатели как индикаторы физиологического состояния декапод: камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* и речных раков родов *Astacus* и *Pontastacus*.— М.: Изд-во ВНИРО, 2010.— 92 с.

Монография содержит описание общих свойств гемолимфы декапод, ее клеточных элементов и их функций, а также методов определения гематологических показателей, позволяющих прижизненно оценивать физиологическое состояние камчатского краба и речных раков в природных и в искусственных условиях. Предназначается специалистам работающих в сфере прогнозирования состояния природных популяции промысловых декапод, культивирования ракообразных и подбором наиболее жизнеспособных экземпляров крабов и речных раков для транспортировки на далекие расстояния и для формирования маточных стад.

**Kovatcheva N.P., Aleksandrova E.N.**

Hematological parameters as an indicators of physiological status of the decapods: red king crab *Paralithodes camtschaticus* and freshwater crayfish genus *Astacus* and *Pontastacus*.— М.: VNIRO Publishing, 2010.— 92 p.

This monograph contains a description of the common properties of hemolymph of decapods, its cellular elements and their functions, as well as the techniques for finding out hematological indicators which make it possible to evaluate during the life time the physiological condition of the red king crab and freshwater crayfish in natural and artificial habitats. This monograph is designed for the experts working on prognostics of the condition status of natural populations of the fishing species of decapods, on crustaceans culturing and selecting the most viable crabs and freshwater crayfish for a long term transportation and for the formation of brood stock.

ISBN 978-5-85382-385-3

© Ковачева Н.П., Александрова Е.Н., 2010  
© Kovatcheva N.P., Aleksandrova E.N., 2010  
© Издательство ВНИРО, 2010  
© VNIRO Publishing, 2010

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение .....	9
Глава 1. Циркуляторная жидкостная система (гемолимфа) десятиногих ракообразных (Crustacea: Decapoda) и ее функции .....	11
1.1. Морфология гемолимфы декапод и особенности ее циркуляции .....	11
1.2. Продукты промежуточного обмена в гемолимфе .....	13
1.3. Клеточные элементы гемолимфы декапод и их функции .....	19
1.4. Гуморальные и клеточные функциональные взаимодействия .....	24
Глава 2. Прижизненное определение физиологического состояния камчатского краба по гематологическим показателям .....	30
2.1. Краткие сведения о камчатском крабе .....	30
2.2. Определение гематологических показателей при оценке физиологического состояния камчатского краба .....	35
2.2.1. Отбор гемолимфы .....	37
2.2.2. Цвет, прозрачность, свертываемость, рН гемолимфы .....	37
2.2.3. Буферность гемолимфы .....	39
2.2.4. Определение концентрации белка, гемоцианина (меди), кальция, глюкозы, лактатов в гемолимфе .....	40
2.2.5. Подсчет общего числа гемоцитов в гемолимфе .....	43
2.2.6. Гемоцитарная формула и дифференцированный подсчет гемоцитов камчатского краба .....	44
Глава 3. Прижизненное определение физиологического состояния речных раков по гематологическим показателям .....	48
3.1. Краткие сведения о речных раках из водоемов европейской части России .....	48
3.2. Определение гематологических показателей при оценке физиологического состояния речных раков .....	54
3.2.1. Отбор гемолимфы .....	54
3.2.2. Цвет, прозрачность, рН, свертываемость гемолимфы .....	55
3.2.3. Буферность гемолимфы .....	56
3.2.4. Определение концентрации белка в гемолимфе .....	56
3.2.5. Подсчет общего числа гемоцитов и визуальная оценка состояния защитной системы гемолимфы речных раков .....	58
3.2.6. Гемоцитарная формула и дифференцированный подсчет гемоцитов речных раков .....	62
Заключение .....	68
Литература .....	70
Приложения .....	77

Приложение . . . . .	78
<i>Таблица 1.</i> Показатели цельной гемолимфы декапод, определяемые в полевых условиях . . . . .	78
<i>Таблица 2.</i> Показатели гемолимфы, определяемые в лабораторных условиях . . . . .	79
<i>Таблица 3.</i> Содержание белка в сыворотке крови в зависимости от коэффициента рефракции . . . . .	80
<i>Таблица 4.</i> Антикоагулянты, применяемые при проведении гемоцитарных исследований у представителей Decapoda . . . . .	81
Приложение I . . . . .	82
Приложение II . . . . .	83
Приложение III . . . . .	85
Приложение IV . . . . .	87
Приложение V . . . . .	89
Приложение VI . . . . .	90

## CONTENTS

<b>Introduction</b> .....	9
<b>Chapter 1. The circulatory liquid system of decapods</b>	
<b>Crustacea: Decapoda and its functions</b> .....	11
1.1. Morphology of liquid system of decapods and features of circulation . . .	11
1.2. Products of intermediate exchange of the hemolymph .....	13
1.3. The cellular elements of liquid system of decapods and their functions .....	19
1.4. Humoral and cellular functional interaction .....	24
<b>Chapter 2. Hematological parameters as indicators of physiological status of the red king crab <i>Paralithodes camtschaticus</i></b> .....	30
2.1. Brief description of red king crab .....	30
2.2. Determination of hematological indicators which make it possible to evaluate physiological state of the red king crab .....	35
2.2.1. Taking samples of hemolymph .....	37
2.2.2. Color, transparency, pH, clotting of hemolymph .....	37
2.2.3. Buffer state of hemolymph .....	39
2.2.4. Determination of protein concentration, hemocyanin, calcium, glucose, lactates of hemolymph .....	40
2.2.5. Determination of total hemocyte counts in hemolymph .....	43
2.2.6. Hemocyte formula and differential hemocyte counts in red king crab .....	44
<b>Chapter 3. Determination of the physiological status of live freshwater crayfish by hematological indicators</b> .....	48
3.1. Brief description of freshwater crayfish from waters of the European part of Russia .....	48
3.2. Determination of hematological indicators which make it possible to evaluate physiological state of freshwater crayfish .....	54
3.2.1. Taking samples of hemolymph .....	54
3.2.2. Color, transparency, clotting, pH of hemolymph .....	55
3.2.3. Buffer state of hemolymph .....	56
3.2.4. Determination of protein concentration in hemolymph .....	56
3.2.5. Determination of total hemocyte counts and visual assessment of the protective system of hemolymph freshwater crayfish .....	58
3.2.6. Hemocyte formula and differential accounting of hemocyte counts in freshwater crayfish .....	62
<b>Conclusion</b> .....	68
<b>References</b> .....	70
<b>Appendixes</b> .....	77

<b>Appendix</b> .....	78
<i>Table 1.</i> Parameters of entire hemolymph of decapods determined in the field .....	78
<i>Table 2.</i> Parameters of hemolymph determined in laboratory .....	79
<i>Table 3.</i> Protein content in serum of blood depending on the coefficient of refraction .....	80
<i>Table 4.</i> Anticoagulants used for hemocyte research on representatives of Decapoda .....	81
<b>Appendix I</b> .....	82
<b>Appendix II</b> .....	83
<b>Appendix III</b> .....	85
<b>Appendix IV</b> .....	87
<b>Appendix V</b> .....	89
<b>Appendix VI</b> .....	90



---

## Введение

Природные популяции камчатского краба и обитающих в водах европейской части Российской Федерации речных раков, эксплуатируются промыслом в целях удовлетворения спроса населения на деликатесную пищевую продукцию. Снижение качества среды обитания вызывает сокращение численности и ухудшение физиологического состояния особей в популяциях этих десятиногих ракообразных, приводит к убыткам их аквакультуры.

На протяжении многих лет о состоянии здоровья декапод в природных популяциях судили по величине встречаемости в уловах больных особей, а в условиях культивирования — по отказу животных от пищи, по нарушению ритмов их суточной активности (повышенное беспокойство или апатия), т.е по показателям, сопровождающих органические нарушения и далеко зашедшие стадии заболевания. Например, такая ответственная технологическая операция как подбор наиболее жизнеспособных особей для разведения или для транспортировки с мест добычи на отдаленные рынки сбыта, до настоящего времени, проводится в основном по внешнему виду животных и по степени выраженности у них оборонительной реакции. Очевидно, что контроль состояния декапод в природных популяциях и отбор особей для разных практических целей должен быть основан на использовании более широкого спектра показателей, в т.ч. физиологической системы, доступной для прижизненного наблюдения.

В отношении наземных позвоночных животных известно, что состав их периферической крови постоянно меняется; изменения возникают под влиянием внутренних факторов, и как реакции на негативные внешние воздействия — стресс, кровопотерю, инфекцию, голодание и т.п. У водных позвоночных, таких как рыбы, анализ гуморальных и клеточных показателей крови также признан одним из объективных методов контроля их физиологического состояния [Иванова, 1983; Ковачева, 1984; Головина и др., 1989].

Изучение крови беспозвоночных, в частности декапод, начатое еще в XIX в., показало, что характеристики гемолимфы также могут быть индикаторами их физиологического состояния [Cuenot, 1895; Tait, 1911; Флоркэн, 1947; Levin, 1967; Bauchau, 1981, 1986; Soderhall et al., 1988; Evans, 1999; Cerenius, Soderhall, 2004]. Начиная с конца 1960-х гг., знания об изменчивости гематологических показателей декапод стали пополняться сведениями о реакциях этих гидробионтов на качество водной среды и условия содержания [Stewart, Comtek and Dingle, 1957; Riegel, 1960; Levin, 1967; Persson et al., 1987; Jones, 1999; Evans, 1999; Черкашина и др., 1989; Jussilla et al., 1999;]. Однако еще до настоящего времени внедрение гематологического анализа в практику культивирования декапод сдерживается немногочисленностью и разрозненностью по разным литературным источникам сведений о методах исследования их гемолимфы, и недостатком информации для определения диапазона нормальной изменчивости значений этих показателей, необходимых для интерпретации получаемых эмпирически данных.

Задача настоящей работы — дать представление о возможности прижизненного определения физиологического статуса морских и пресноводных декапод по материалам гематологических исследований камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* и российских речных раков подсемейства Astacinae (род *Astacus* и род *Pontastacus*) и стимулировать дальнейшие исследования в этих направлениях. В этой связи рассмотрены публикации об основных свойствах жидкостной системы морских и пресноводных декапод и о применении для оценки физиологического статуса этих гидробионтов гематологических показателей. Из числа последних подобраны индикаторные показатели для прижизненной оценки состояния камчатского краба и речных раков, данные по которым можно получать, применяя «щадящие» методы отбора гемолимфы в объемах, не нарушающих ее нормальное функционирование.

**Принятые сокращения:**

- ДК и ШК — длина и ширина клетки гемоцита;
- ДЯ и ШЯ — длина и ширина ядра гемоцита;
- ОЧГ — общее число гемоцитов;
- ШЭР — шероховатый эндоплазматический ретикулум;
- ЯПО — ядерно-плазматическое отношение.

**Циркуляторная жидкостная система (гемолимфа)  
десятиногих ракообразных (Crustacea: Decapoda)  
и ее функции**

**1.1. Морфология гемолимфы декапод  
и особенности ее циркуляции**

Декаподы, как и большинство членистоногих животных, имеют незамкнутую циркуляторную систему, жидкость которой, называемую «гемолимфой», перекачивает сердце. Гемолимфа лишь отчасти подходит под понятие крови, выработанное в физиологии позвоночных, поскольку при отсутствии лимфатической системы, жидкость аналогичная плазме крови позвоночных, смешивается с жидкостью межклеточных пространств, содержащей продукты жизнедеятельности клеток, т.е. с лимфой [Кузнецов, 1948; Проссер и Браун, 1967].

Морфологически гемолимфа декапод это богатая растворенными белками и другими химическими веществами жидкость, с погруженными в нее свободными клетками — гемоцитами, движущаяся по сосудам и по обширным лакунам (или синусам) — промежуткам между органами и мускульными тяжами. Циркуляция гемолимфы ракообразных осуществляется под воздействием сокращений трубкообразного сердца и соматической мускулатуры. Гемолимфа из сердца выбрасывается в артерии и, пройдя через органы по мелким артериолам, истекает в тканевые синусы. Под воздействием сокращений соматической мускулатуры (но не сердца), гемолимфа из лакун медленно перетекает к жабрам и, обогатившись кислородом, по жаберным венам попадает в перикард, затем через отверстия с клапанами (остии) — в сердце, которое снова выталкивает ее в артерии.

В сердце камчатского краба, которое имеет ромбическую форму, ведут три пары щелевидных отверстий (остии): две пары сверху и одна пара снизу [Левин, 2001]. Приносящие и выносящие жаберные

каналы могут быть отделены друг от друга перегородками, как, например, у речного рака и омара. Сердце такой системы еще не способно создать высокое давление и циркуляция совершается отчасти благодаря сокращениям соматической мускулатуры. Объем крови в незамкнутых системах велик, по существу соответствует объему внеклеточной жидкости животных с замкнутой системой, перенос кислорода от жабр к мышцам происходит относительно медленно.

У разных видов декапод объем гемолимфы колеблется от 17 % (омар) до 33 % массы тела (краб *Eriocheir*), в то время как у млекопитающих объем крови составляет обычно от 7 до 10 %, а объем внеклеточной жидкости — 18–25 % массы тела. Объем жидкости в теле декапод изменчивый показатель. Например, у краба *Maja* сразу после линьки объем гемолимфы (измерен методом кровопускания) достигает 29 %, а к моменту отвердения панциря уменьшается до 8 % массы тела. Большой объем циркулирующей жидкости имеет важное значение для ракообразных, гемолимфа которых, наряду с выполнением транспортной функции, является средой, несущей кровяные клетки, белки и прочие компоненты, необходимые для защиты организма и других важных функций.

Отличительная особенность незамкнутой циркуляторной системы — низкое и изменчивое давление, в несколько раз повышающееся при движении животного. Этот показатель не одинаково выражен в разных отделах системы: в активной конечности его значение выше чем в бездействующей, а давление в сосудах конечности может оказываться более высоким чем в сердце.

**Ритм сердечной деятельности.** Частота сердечных сокращений (ЧСС) у крупных ракообразных, как правило, ниже, чем у мелких. Так сердце у речного рака бьется с частотой 30–60 сокращений в 1 мин (при 20 °С), у небольшого водяного ослика — с частотой 180–200, у крошечной дафнии — 250–450 в 1 мин. В ряду крабов ЧСС с увеличением размеров тела уменьшается экспоненциально, но менее резко, чем интенсивность процессов обмена. У пойкилотермных ракообразных ЧСС увеличивается в 2–3 раза при повышении температуры на 10 °С по сравнению с нормальной температурой тела. У камчатского краба в покое при 5 °С отмечена ЧСС — 18–25 уд/мин. Повышение температуры воды до 8 °С и 12 °С приводит к повышению ЧСС, соответственно: 25–35 уд/мин и 35–45 уд/мин, соответственно [Ковачева, 2008; Ковачева и др., 2008].

**Кровообращение** у ракообразных менее эффективно, чем у костистых рыб, у которых одна и та же небольшая масса крови используется многократно. Время кругооборота гемолимфы у краба — 37–65 с, у насекомых оно измеряется минутами, у млекопитающих оборот

крови происходит за несколько секунд (8–16 с), у человека — за 23 с [Проссер и Браун, 1967].

## 1.2. Продукты промежуточного обмена в гемолимфе

**Белки.** Гемолимфа декапод насыщена белковыми веществами такими, как сложные гликопротеиды (альфа макроглобулин и др.), липопротеиды (комплексы белков и липидов), простые глобулярные белки (сывороточные альбумины), металлопротеид гемоцианин (Hcy), а также каталитические и регуляторные белки. Эти белки участвуют в регуляторной, дыхательной, гемостатической, защитной и экскреторной функциях; в постлиночном периоде вовлекаются в укрепление наружных покровов; в период вителлогенеза расходуются на синтез белков яйцеклеток; в латентный период жизни декапод на обеспечение энергозатрат организма [Мацквичене, 1979].

Одной из главных функций протеинов, помимо поддержания коллоидосмотического давления крови, становится их буферная функция, способствующая постоянству внутренней среды организма [Алякринская, 1972]. Как показали исследования Е.М. Крепса и А.А. Смирнова [1935], забуференность внутренней среды животных возрастает по мере усложнения их организации — от кишечнополостных к иглокожим, моллюскам, ракам, рыбам, и т.д. Увеличение буферных свойств гемолимфы и крови в ходе эволюции можно объяснить, прежде всего, нарастанием общего количества белка. Если в целомической жидкости практически нет белков, то циркулирующая по сосудам гемолимфа всегда содержит определенное их количество [Флоркэн, 1947]. У более высокостоящих групп животных возрастание забуференности происходит и за счет появления в крови высоко специализированных дыхательных пигментов — переносчиков кислорода; главные из них — гемоглобин и гемоцианин. Дыхательный пигмент становится наиболее важным и основным буферным веществом крови. Тем самым в ходе эволюции увеличиваются способность крови связывать большее количество кислорода и ее буферная емкость.

Общее содержание белка в гемолимфе речного рака и краба *Carcinus maenas* колеблется в пределах от 2,2 до 14,6 г-%, изменяясь в течение межлиночного цикла и в зависимости от физиологического состояния особей [Crowley, 1963; Алякринская и Коржуев, 1981; Черкашина и др., 1989; Paterson et al., 2005]. Изучение изменчивости концентрации растворенных белков широкопалого рака *Astacus astacus* показало, что в предлиночный период количество протеина в гемолимфе увеличивается, затем снижается и до прежнего уровня

восстанавливается лишь в конце послелиночного периода. Тенденция к повышению уровня белков гемолимфы непосредственно перед линькой [стадия D<sub>4</sub> — по Drach, 1939] обусловлена перемещением резорбированных протеинов из старого экзоскелета. Комплексное исследование особенностей метаболизма у половозрелых самок широкопалого рака показало, что на электрофореграмме уровень отдельных фракций белков гемолимфы связан с накоплением протеина в пищеварительной железе [Мацкявичене, 1979]. Одна из главных причин выявленной связи — синтезирование в пищеварительной железе самок специфических белков в период созревания яичников. Основная часть белковой фракции гемолимфы декапод принадлежит растворенному в ней дыхательному пигменту — гемоцианину, доля которого колеблется в процессе линочного цикла, составляя перед линькой и после нее 60–70 % массы суммарного белка, а на стадии C<sub>4</sub> (поздняя стадия межлиночного периода) даже около 90 % [Truchot, 1986], т.е. гемоцианин является основным протеином гемолимфы.

По уровню общего белка в гемолимфе можно оценивать физиологический статус декапод [Мацкявичене, 1979; Черкашина, 1989]. Однако интерпретация полученных значений должна проводиться путем сравнения с физиологическими нормами для этого показателя с учетом пола, линочного цикла, полового созревания, возраста и т.п., характерных для конкретных представителей этого отряда.

**Дыхательный пигмент гемоцианин: его свойства и функции.** Как уже упоминалось, преобладающая доля (до 90 % и более процентов) растворенных в гемолимфе декапод белков приходится на гемоцианин. Биологическая функция гемоцианинов связана с их способностью обратимо закреплять молекулярный кислород на активном участке этого металлопротеида, содержащем двухъядерный медный центр [Dolashki, 2005]. В то время как гемоглобины широко распространены в мире животных, медные белки представлены только у членистоногих и моллюсков. Гемоцианины всегда растворены в гемолимфе, которая перекачивается сердцем. У них наблюдается такое же взаимодействие между связывающими кислород центрами, как и у гемоглобина. Характер связи меди с белком в этом пигменте пока не установлен [Проссер и Браун, 1967].

В аспекте молекулярного строения Hcy — большие белки, которые могут собираться в комплексы. Константа седиментации (скорость осаждения) Hcy соответствует молекулярному весу в несколько сотен тысяч; для Hcy омара она равна 24,5, что соответствует молекулярному весу 825 000, для Hcy *Pandalus* и *Palinurus* — 16, Hcy *Nephrops* и *Homarus* — 23. Кислород обратимо связывается с Hcy в соотношении 1 молекула O<sub>2</sub> на 2 атома меди. Присоединение кислорода

в значительной степени стабилизирует молекулу Hсу. После насыщения кислородом точка коагуляции Hсу некоторых ракообразных и моллюсков повышается на 2–4 °С. Гемоцианины не окрашены, но интенсивно поглощают в ультрафиолетовой области спектра с максимумом при 280 мкм (обычная полоса белка). При насыщении кислородом они приобретают синюю окраску и имеют широкий, слабо выраженный максимум поглощения в видимой области спектра при 570 мкм и более выраженный максимум при 355 мкм.

У беспозвоночных, как и у позвоночных животных, кислородная емкость (количество кислорода, переносимое кровью при насыщении) соответствует количеству дыхательного пигмента. Чем выше содержание Hсу в крови тем больше кислородная емкость крови. Однако это изменчивый показатель и наблюдаются его значительные колебания даже у представителей одного и того же вида, что свидетельствует о большом значении для жизнедеятельности организма величины содержания Hсу в крови. Условия функционирования дыхательного пигмента определяет парциальное давление, при котором присоединяется или отщепляется кислород. Значения парциального давления ( $P_{50}$ ), при котором половина молекул дыхательного пигмента насыщена кислородом, у декапод лежат в обычных физиологических пределах, например, у *Homarus* — 6 мм, рт. ст. при низком напряжении  $CO_2$  (0,5 мм рт. ст.) и 25 мм рт. ст.— при высоком (9,9 мм рт. ст.). По измерениям Н.Я. Черкашиной с соавторами, [1989] у самцов речного рака для насыщения Hсу требуется более высокое парциальное давление кислорода, чем у самок. За период размножения (после завершения оогенеза и до выклева личинок) напряжение кислорода в гемолимфе самок может падать более чем в 2 раза, а парциальное давление углекислого газа увеличивается.

Как и у некоторых гемоглобинов, максимальное и минимальное сродство гемоцианина к кислороду наблюдается при определенном значении рН. У *Homarus*, *Panulirus*, *Maja* и *Cancer* минимальное сродство гемоцианина к кислороду наблюдается в кислой среде; добавление  $CO_2$  смещает положение точки, соответствующей  $P_{50}$ , вправо [Проссер и Браун, 1967].

Высокая доля гемоцианинов среди белков гемолимфы декапод, определяет их значение как амфотерного буфера в поддержании рН и щелочно-кислотного равновесия гемолимфы. Растворенные в гемолимфе дыхательные пигменты могут поддерживать устойчивость коллоидно-осмотического давления. У беспозвоночных животных с наружным скелетом, у которых имеется сердце, полостная жидкость находится под гидростатическим давлением. Такие животные, если бы не белки крови, теряли бы жидкость, даже находясь в осмотическом рав-

новесии с морской водой. Однако точная зависимость гидростатического давления от содержания белка в крови у водных беспозвоночных пока не установлена.

Содержание меди в морской воде составляет 1 мг на 100 л. У некоторых морских моллюсков и членистоногих медь входит в состав дыхательного пигмента гемоцианина, концентрация меди доходит до 1 мг на 100 мл крови. Медь необходима для фермента полифенолоксидазы, она играет важную роль и в уплотнении кутикулярных белков членистоногих. Высокая концентрация меди обнаружена у моллюсков и членистоногих. У краба *Maja* содержание гемоцианина в крови во время линьки понижается, и часть теряемой из крови меди накапливается в гепатопанкреасе и затем вновь используется для ресинтеза гемоцианина после линьки.

Соединения кальция в виде аморфного  $\text{CaCO}_3$  или кальцита с хитином образуют наружный скелет десятиногих ракообразных, у которых существуют различные способы ограничить потери этого жизненно важного элемента во время линьки. Перед линькой содержание кальция в карапаксе речного рака понижается, что вызвано резорбцией минеральных веществ и протеинов и перемещением их из старого экзоскелета в гемолимфу [Мацкявичене, 1979]. Крабы перед линькой депонируют много кальция (часто в виде  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) в гепатопанкреасе; речной рак запасает его в виде жерновков (гастролитов) на боковых стенках желудка. В период после линьки запасенный кальций расходуется, поступая в новый панцирь и вызывая его затвердевание. Ткани стареющих животных содержат больше кальция, чем ткани молодых животных. Регуляция кальция, по крайней мере, у речного рака, контролируется гормоном синусной железы. Метаболизм кальция в организме, например, речных раков и пенеидных креветок тесно связан с белковым обменом в гемолимфе. О важной роли отдельных белков гемолимфы в кальцификации экзоскелета креветок свидетельствует увеличение концентрации протеинов в гемолимфе этих декапод, наряду с 4-кратным увеличением кальция [Dall, 1965; Мацкявичене, 1979]. Отмечена сходная направленность изменения кальция в карапаксе и в быстро мигрирующей электрофоретической белковой фракции (БМБ) гемолимфы широкопалого рака, снижение уровня которой после линьки обусловлено использованием ее белков в период хитиногенеза и кальцификации новой кутикулы. Это свидетельствует о том, что БМБ кроме участия в дыхательном обмене, выполняют также роль резервных белков в организме речных раков [Ugllov, 1969]. В начале межлиночного периода, когда достигается баланс кальция в организме широкопалого рака [Greenaway, 1974], концентрация БМБ в гемолимфе восстанавливается до предлиночного



уровня [Мацкявичене, 1979]. Выявленная связь между изменением содержания отдельных групп белков в гемолимфе, кальция в карапаксе и сухих веществ в пищеварительной железе в зависимости от стадии межлиночного цикла отражает тесную взаимосвязь направленности белкового и водно-солевого обменов в организме речных раков.

Некоторые моллюски и ракообразные с известковой раковиной или панцирем используют кальций своих покровов для забуферивания кислот. Есть данные [Алякринская, Коржув, 1981;], что концентрация кальция в гемолимфе краба *Carcinus maenus* изменяется при ухудшении условий дыхания. Так, если в норме содержание кальция в гемолимфе составляло 42 мг-%, то через час после пребывания крабов в воде без кислорода при температуре 21 °С оно увеличилось в 1,5–2,0 раза. При транспортировке крабов в течение 2–3 ч, содержание кальция в гемолимфе возрастало в среднем до 90 мг-%, достигая в некоторых случаях 118 мг-%. Повышение уровня  $Ca^{++}$  в гемолимфе часто связывают с проявлением ацидоза [de Fur et al., 1980; Burnett 1988]. Перед линькой концентрация кальция в крови увеличивается с 11,8 до 15,0 мм/л [Greenaway, 1974]. Очевидно, что концентрация растворенного в гемолимфе кальция должна учитываться при оценке физиологического состояния декапод [Paterson et al., 2005].

Известно, что глюкоза входит в состав быстро мобилизуемого энергетического резервного вещества углевода гликогена, который у позвоночных накапливается в печени и мышцах. Значительная часть продукта расщепления гликогена (глюкозо-6-фосфатаза) гидролизуетсся глюкозо-6-фосфатазой с образованием свободной глюкозы, поступающей в кровь. Распад глюкозы до пирувата, по-видимому, универсальный путь высвобождения энергии, часть которой аккумулируется богатыми энергией соединениями типа АТФ. Понижение уровня глюкозы в плазме позвоночных указывает на истощение, повышение — на острый или хронический стресс [Смит, 1986].

У декапод выброс глюкозы в гемолимфу запускает механизмы, требующие энергию для основных метаболических процессов, и позволяет организму компенсировать стресс [Evans, 1999]. Уровень концентрации глюкозы в гемолимфе классический индикатор стресса, однако он не всегда показывает четкие результаты при определении. Например, у некоторых сильно стрессированных омаров, уровни глюкозы не превышали исходный. Эти и другие подобные результаты позволили предположить, что стресс у ракообразных не обязательно носит гипергликемический характер [Paterson et al., 2005]. Возможно также, что повышение уровня глюкозы в гемолимфе не может долго поддерживаться и снижается до исходного уровня при длительном

стрессе. Повышение уровня глюкозы в гемолимфе ракообразных можно измерять как дополнительный показатель ответа на стресс [Jussilla et al., 1999].

В предлиньке уровни глюкозы и липидов гемолимфы увеличиваются в сравнении с постлинькой, что может происходить из-за ее использования как предшественника в синтезе хитина [Chang, 1995].

Лактаты (соли молочной кислоты) — конечные продукты распада глюкозы, образуются при восстановлении перувата, катализируемого в анаэробных условиях ферментом лактатдегидрогеназа. В печени лактаты опять превращаются в глюкозу. Концентрация лактатов в крови повышается при интенсивной работе мышц. У ракообразных молочная кислота накапливается в мышцах и появляется в гемолимфе, когда потребление кислорода превышает норму его поглощения жабрами. Это происходит в результате повышенной двигательной активности, например, у помещенных в садки отловленных животных или при хранении их в безводных условиях, а также от гипоксии при недостатке кислорода в воде. Показано, что накопление молочной кислоты в процессе пребывания лангустов в воздушной среде (изъятие из воды) и связанные с этим эффекты в гемоцитах коррелируют с их смертностью [Paterson et al., 2005]. Очевидно, вред приносит высокое накопление лактатов в гемолимфе, приводящее к ацидозу. Лактатный ион увеличивает сродство гемоцианина к кислороду благодаря очень специфическому аллостерическому взаимодействию и предпочтительной связи с оксигемоцианином. Предполагается, что лактат, будучи продуктом анаэробного метаболизма у ракообразных, подключается к транспорту кислорода в условиях гипоксии [Truhot, 1986].

Ионная регуляция, в основе которой лежит избирательное поглощение и выделение специфических элементов, представляет собой более общее и более примитивное свойство, чем осмотическая регуляция. Многие животные, не способные регулировать осмотическое давление своих тканей, регулируют ионный состав организма, причем ионный состав цитоплазмы клеточные мембраны регулируют избирательно.

Следует отметить, что концентрации элементов в жидкостях тела необходимо рассматривать в связи с физиологическим состоянием животного.

В настоящем разделе были рассмотрены сведения о поступивших в гемолимфу основных продуктах промежуточного обмена. Не менее важной для оценки физиологического статуса декапод является картина клеточных элементов гемолимфы, взаимодействующих между собой и с другими компонентами и выполняющих специфические физиологические функции.

### 1.3. Клеточные элементы жидкостной системы декапод и их функции

Гемоциты и другие клетки гемолимфы. Клеточные элементы гемолимфы членистоногих представлены свободными (циркулирующими и осевших на стенки лакун и органов) амeboидными клетками — гемоцитами. Считают, что в функциональном отношении гемоциты являются аналогами лейкоцитов позвоночных. Десятиногие ракообразные обладают большими популяциями циркулирующих гемоцитов. Производство гемоцитов происходит в кроветворительном органе, расположенном у плавающих декапод *Natantia* в основе ростума, у ползающих декапод *Reptantia* — на спинных и боковых стенках желудка в виде тонких прозрачных пластин [Bauchau, 1986; Chaga et al., 1995; Johansson et al., 2000].

Первоначальная гипотеза о том, что у декапод существует единая линия развития гемоцитных клеток [Cuenot, 1895], и, что разные типы клеток — возрастные стадии созревания гемоцитов во второй половине XX в. была поддержана рядом исследователей [Bauchau, 1986; Soderhall K. et al., 1988; Johansson et al., 2000; LU Hong-da, 2002; Soderhall I. et al., 2003]. Согласно следующей схеме гемоцитопоза [Bazin, 1979], кровяные клетки исходно происходят от фибробластовых клеток, затем некоторые из них утрачивают специфические черты и становятся кроветворящими гемобластами. Последние проходят несколько митотических циклов, и, уже отличаясь в органе, производят три типа циркулирующих гемоцитов: гиалиноциты, полугранулированные (наиболее обильные из числа клеток, выпущенных в гемоцель) и гранулоциты. Допущение, что типы гемоцитов — возрастные этапы развития гранулоцитов, основано на увеличении числа гранул в гемоцитах, дифференциация которых, начатая в кроветворном органе, заканчивается в гемолимфе [Bauchau, 1986; LU Hong-da, 2002].

Существует и иная точка зрения, основанная на представлении о независимом развитии двух линий гемоцитов — гиалиновых клеток и гранулоцитов, причем последние рассматривают как континуум дифференцирования от менее зрелых клеток с маленькими гранулами к гемоцитам с большими гранулами [Hose et al., 1990]. Некоторые авторы считают, что морфологически различающиеся гемоциты принадлежат отдельным клеточным линиям [Gargioni, Barracco, 1998]. Высказывается и версия независимого происхождения полугранулоцитов и гранулоцитов от агранулярных гиалиноцитов [Van de Braak et al., 2002]. Проверка версии, являются ли гиалиноциты пролиферирующими клетками-предшественниками гранулярных гемоцитов, осу-

ществленная М.Г. Мартыновой и др., [2008] с применением  $^3\text{H}$ -тимидина, ставит под сомнение способность гиаиноцитов дифференцироваться в другие типы кровяных клеток. В настоящее время связь между клетками-предшественниками и циркулирующими гемоцитами у беспозвоночных считается все еще неясной, поскольку молекулярные маркерные гены различных предшественников гемоцита не доступны [Soderhall, I. et al., 2003].

Находясь в кровяном русле во взвешенном состоянии, гемоциты принимают вытянутую веретеновидную или яйцевидную (овальную) форму (Приложение I, Приложение IV), что заметно сокращает вязкость гемолимфы. Живые клетки выпускают небольшое число коротких псевдоподий (многочисленные псевдоподии являются признаком отмирания клетки). Форма гемоцитов, помещенных на предметное стекло, изменяется: клетки прикрепляются к субстрату, округляются и распластываются. В перестройку вовлекаются элементы цитоскелета — микрофиламенты и микротрубочки. Изменения формы гемоцитов, наблюдаемые *in vitro*, вероятно, реализуются *in vivo* при заживлении ран, коагуляции гемолимфы, фагоцитозе и инкапсулировании проникших в гемоцель чужеродных объектов [Bauchau, 1986; Soderhall et al., 1988].

Не все выпущенные в полость тела гемоциты членистоногих свободно циркулируют в плазме, часть их оседает на стенках лакун, спинного сосуда и может образовывать фагоцитные органы [Cuenot, 1897]. Известно описание особого типа гемоцитов у краба *Carcinus maenas*, подобных цианобластам мечехвоста *Limulus polyphemus* — Arthropoda: *Palaeostraca*, *Xiphosura*. Вопреки циркулирующим гемоцитам, цианобласты фиксируются в соединительной ткани, окружающей артерию *ophtalmique*, желудок и трубочки гепатопанкреаса, и приобретают необратимые отличия. От первоначального размера 10–15 мкм цианоцит увеличивается до 50–70 мкм. Его ядро становится пикнозным, а цитоплазматические органеллы, закончившие программу синтеза гемоцианина, постепенно исчезают. После разрушения плазматической мембраны гемоцианин передается в гемолимфу. Хотя медь в большом количестве хранится в некоторых клетках гепатопанкреаса, именно цианоциты, а не гепатопанкреас, считаются местом синтеза гемоцианина [Zuckerland, 1960; Bauchau, 1986].

Изучение циркулирующих гемоцитов декапод, начатое еще в XIX столетии, было направлено на их типизацию и классификацию, поскольку было установлено, что разные морфологические типы гемоцитов выполняют специфические функции [Cuenot, 1895; Cornick and Steward, 1978; Mix and Sparks, 1980; Bauchau, 1986; Soderhall et al., 1988; Nose et al., 1990; Manjula et al., 1997]. Используя морфо-функ-

циональные критерии, у декапод, традиционно выделяют три типа гемоцитов, некоторые цитологические характеристики которых систематизированы в табл. 1. При идентификации типов гемоцитов камчатского краба и речных раков, результаты которой приведены в настоящей работе, были использованы морфо-функциональные критерии, предложенные рядом авторов [Soderhall et al., 1988; Nose et al., 1990; Jussilla, 1997: p. 53]. По поводу типизации и классификации гемоцитов декапод следует заметить, что разработка этого не простого вопроса еще не окончена.

Таблица 1

Цитологические характеристики трех типов гемоцитов у разных видов декапод<sup>1</sup>

Показатели <sup>2</sup>	Типы гемоцитов		
	Гиалиноциты	Полугранулоциты	Гранулоциты
Форма клеток	Круглая, овальная	Овальная или веретенообразная	Овальная
Средние размеры гемоцитов <sup>3</sup> , мкм			
длина	14,1–14,5	17,9–20,9	20,4–23,4
ширина	9,1–11,2	10,6–13,9	12,3–13,7
ядерно-цитоплазматическое отношение	36,0–40,2	23,5–27,5	17,5–20,3
Ядро (расположение в клетке, форма)	В центре, круглое большое	В центре, эксцентричное, овальное	Эксцентричное, почкообразное
Гранулы	0 или мало	Умеренно развиты	Обильны
Эндоплазматическая сеть (ретикулум)	Гладкий, шероховатый редкий	Гладкий, шероховатый обильный	Гладкий, шероховатый умеренно развитый
Свободные рибосомы	Присутствуют	Обильны	Умеренно развиты
Аппарат Гольджи	0 или 1	1 или больше	0 или 1
Лизосомы	–	Присутствует	Присутствует
Митохондрии	Умеренно развиты	Обильны	Обильны

<sup>1</sup> Таблица составлена главным образом по данным J. Jussilla [1997] о пяти видах крабов *Callinectes sapidus*, *Carcinus maenas*, *Cancer pagurus*, *Macropipus depurator*, *Eupagurus bernhardus*; двух видов креветок *Sicyonia ingentis*, *Penaeus japonicus*; о лангусте *Panulirus japonicus*; об омаре *Homarus vulgaris* и о речном раке *Astacus astacus*.

<sup>2</sup> Первые четыре показателя определяют под световым микроскопом (200–500 кр. ув.), остальные пять — доступны при работе с электронным микроскопом.

<sup>3</sup> Дополнительно включенные данные [J.E. Nose et al., 1990] по размеру гемоцитов у омара *Homarus americanus*, лангуста *Panulirus interruptus*, краба *Loxorynchus grandis*.

Гиалиноциты декапод — агранулярные, просвечивающиеся под фазово-контрастной оптикой, небольшие по размерам клетки [Bau-chau, 1986; Soderhall et al., 1988; Hose et al., 1990; LU Hong-da, 2002; Мартынова и др., 1948]. В классификации гемоцитов насекомых [Ratcliffe, Rowley, 1979] похожие на гиалиноциты клетки называют коагулоцитами. Гиалиноциты декапод имеют высокое ядерно-цитоплазматическое отношение ( $>0,35$ ) и активно слипаются *in vitro*. На уровне электронной микроскопии у них видна структура ядра, окруженного узким ободком цитоплазмы с обильными малыми (~50 нм), круглыми, электронно-плотными отложениями — гранулами точечной структуры [Hose et al., 1990; LU Hong-da, 2002; Мартынова и др., 1948]. О других структурах цитоплазмы гиалиноцитов см. в табл. 1.

Гемоциты этого типа сильно варьируют в отношении размеров, а также по количеству отложений в цитоплазме, что затрудняет их идентификацию по основному критерию «размер и число гранул». Надежно идентифицировать, просчитать и проследить их морфологическую изменчивость, можно путем прижизненного окрашивания трипановым синим, который гиалиноциты накапливают в отличие от гемоцитов других типов [Hose et al., 1990]. Самые маленькие гиалиноциты могут представлять собой категорию незрелых гиалиновых клеток названных «прогиалиноцитами» [Cornick and Stewart, 1978; Manjula, et al., 1997]. В функциональном отношении гиалиноциты декапод инициируют свертывание гемолимфы [Hose et al. 1990, Aono and Mori 1996]; не содержат профенолоксидазу, выполняющую функцию защиты организма от инфекции [Sequiera et al., 1995; Soderhall et al., 1988], вносят вклад в формирование и укрепление кутикулы после линьки [Jusilla, 1997]. К. Содерхалл с соавторами [1988] допускают существование фагоцитарной способности у гиалиновых клеток краба *S. maenas* и считает, что фагоцитировать также могут гиалиноциты речного рака *A. astacus*. Это предположение вызвало критику со стороны исследователей, рассматривающих гиалиноциты как коагулирующие клетки, не способные к фагоцитозу [Hose et al., 1990].

**Гемоциты с гранулами (гранулоциты)** — следующая категория клеток. У членистоногих гранулоциты считаются эволюционно первичными защитными клетками. В частности, только этот тип клеток присущ гемолимфе мечехвоста *Limulus polyphemus* — реликтовому представителю древних первичноводных хелицерных [Levin, 1967].

В составе гранулоцитов некоторые исследователи выделяют две категории клеток: гранулоциты с малыми и с большими гранулами [Hose et al., 1990]. Гранулоциты с малыми гранулами обычно называют полугранулоцитами, промежуточными клетками, фагоцитами,

амебоцитами; гранулоциты с большими гранулами — гранулоцитами, эозинофильными гранулоцитами, гранулярными амебоцитами [Levin, 1967; Mix, Sparks, 1980; Bauchau 1986; Soderhall et al., 1983, 1988; Nose et al., 1990; Мартынова и др., 2008]. В классификации, разработанной для индийского колючего омара *Panulirus homarus*, наряду с эозинофильными выделяют хромофильные гранулоциты [Manjula et al., 1997]. В целом обе категории гранулированных клеток имеют ядерно-цитоплазматическое отношение  $<0,35$ ; они не накапливают трипановый синий (или быстро разрушают его *in vitro*), содержат многочисленные цитоплазматические гранулы, показывают положительную цветную реакцию на кислотную фосфатазу и профенолоксидазу, проявляют способности прилипать к грибным гифам, а также к фагоцитозу бактерий *in vitro* [Soderhall et al., 1983, 1988; Nose et al., 1990; Мартынова и др., 2008].

**Гранулоциты с малыми гранулами** (полугранулоциты, малые гранулоциты) — морфологически разнообразный тип гемоцитов, который некоторые исследователи рассматривают как промежуточный между гиалиновыми клетками и гранулоцитами (см. табл. 1). Размеры полугранулоцитов приближаются к таковым у гемоцитов с большими гранулами, от которых они отличаются центральным положением овального ядра [Soderhall et al., 1988]. Эти клетки содержат нерелактильные (под фазово-контрастным микроскопом), базофильные гранулы разных размеров (или смесь базофильных и ацидофильных гранул) и много лизосом [Nose et al., 1990]. На уровне электронной микроскопии видны: локализация гранул вокруг ядра, слой цитоплазмы, свободный от гранул, слой, расположенный непосредственно под клеточной оболочкой, небольшие выросты на поверхности наружной мембраны. Полугранулоциты вместе с гранулоцитами, участвуют в реакциях клеточной защиты, проявляя фагоцитарную активность (захватывают и поглощают бактерии и другие малые частицы), специализируются на капсулировании и проявляют активность ферментативной профенолоксидазной системы (proPO) [Persson et al., 1987; Soderhall et al., 1983, 1988; Jusilla, 1997]. Некоторые авторы считают полугранулоциты основными фагоцитирующими клетками декапод [Nose et al., 1990]. Их гранулы содержат бактерицидные вещества [Jussilla, 1997].

**Гранулоциты с большими гранулами** содержат: ядро, занимающее эксцентрическое положение, сравнительно гомогенную популяцию рефрактильных больших ацидофильных гранул (см. табл. 1). Гранулоциты способны инкапсулировать большие частицы (гифы грибов), показывают наиболее интенсивное окрашивание для proPO [Nose et al., 1989, 1990; Jussilla, 1997]. Их крупные гранулы также содержат

цистин-протеазу, обладающую антимикробным действием против грамотрицательных и грамположительных бактерий. Гранулы гранулоцитов участвуют в накоплении и выделении ферментов профеноксидазной системы и в цитотоксичности, в укреплении кутикулярной ткани, производя белки для соединения с дифенолами, выполняют важную роль в формировании и укреплении базальных мембран и в заживлении ран [Vacca и Fingerman 1983; Soderhall et al., 1988; Johansson et al., 2000].

В заключение раздела отметим, что общее число гемоцитов (ОЧГ) у декапод характеризует состояние их защитной системы [Persson et al., 1987; Jussilla, 1997]. Однако этот показатель проявляет изменчивость по стадиям личиночного цикла [Jussilla, 1997; Александрова и др., 2005; Lucić and Erben, 2005], что должно учитываться при его использовании в качестве индикатора физиологического состояния декапод. По результатам дифференцированного подсчета клеток разного типа и по гемоцитарной формуле судят о функциональной направленности популяций кровяных клеток у рыб [Иванова, 1982]. Применению подобного подхода при анализе состояния декапод в первую очередь препятствует наличие среди их гемоцитов клеток промежуточного типа, а также отсутствие полной ясности в отношении связи функций коагулирования и фагоцитирования с определенным типом клеток.

#### 1.4. Гуморальные и клеточные функциональные взаимодействия

**Предотвращение кровопотери и коагуляция гемолимфы.** При ранении у членистоногих быстро формируется сгусток из гемоцитов, закупоривающий рану и препятствующий истечению гемолимфы. Анализируя материалы исследований процесса коагуляции у насекомых *Arthropoda: Insecta*, которые также как и ракообразные относятся к типу членистоногих, Н.Я. Кузнецов [1948] высказал мнение о том, что свертывание у насекомых сводится к слипанию гемоцитов и не подобно таковому у позвоночных животных, поскольку образование волокнистой фибриноподобной массы в плазме не выражено, т.к. существование в ней «предгеля» типа фибриногена, и фермента свертывания типа тромбазы не доказано. Изучение процесса коагуляции у некоторых моллюсков и иглокожих показало, что у них свертывание гемолимфы действительно сводится только к агглютинации клеточных структур в области соприкосновения с раневой поверхностью [Soderhall, Cerenius, 1999]. И все же сущность процесса свертывания



гемолимфы у беспозвоночных еще долго оставалась предметом дискуссий, стимулирующих дальнейшие исследования.

У декапод гемоциты также участвуют в свертывании, в котором выделяют две фазы:

- 1) агглютинацию гемоцитов (появление скоплений гемоцитов);
- 2) образование геля в гемолимфе [Levin, 1967; Bauchau, 1986; Soderhall, K., 1988;].

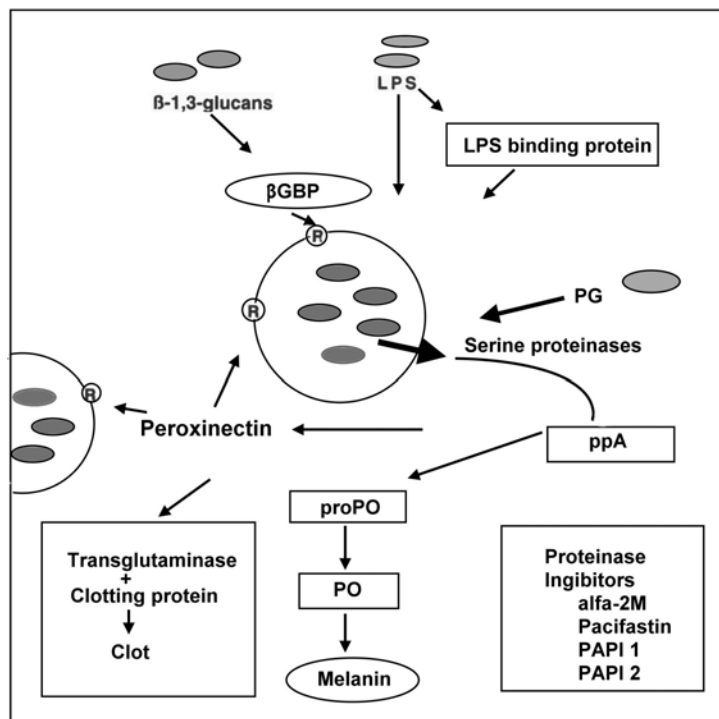
По поводу механизма свертывания у декапод было выдвинуто две гипотезы:

1) коагулоген (белок свертывания) находится в плазме и активизируется химическими веществами, выпущенными гемоцитами [Bauchau, 1981];

2) коагулоген вместе с ферментами-активаторами свертывания выпускаются в гемолимфу из гемоцитов [Hose et al., 1990].

Данные изучения свертывания гемолимфы у декапод (Arthropoda: Crustacea) и мечехвоста (Arthropoda: Xiphosura), свидетельствуют в пользу того, что появление «предгеля» в плазме связано с разрушением гемоцитов, и плазма без клеток не свертывается, но *in vitro* это свойство может быть возвращено ей добавлением гемоцитов [Levin, 1967]. В слабой концентрации и в мономерной форме коагулоген был обнаружен в гемоцитах речного рака *Astacus leptodactylus* [Durliat, Vranck, 1976; Bauchau, 1986]. Это позволило считать, что коагулоген синтезируется в гемоцитах, а затем быстро выпускается в гемолимфу, где подвергается более или менее выраженной полимеризации, все еще оставаясь растворимым. Вторым фактором свертывания — фибрин-фермент изначально также содержится в гемоцитах и принадлежит к сериновым протеазам. Согласно предварительной схеме коагуляции гемолимфы [Bauchau, 1986], серин-протеаза действует на коагулоген, продуцированный в гемоцитах и выделенный в гемолимфу, катализирует формирование пептидных связей и создание коагулина. Та же серин-протеаза активизирует трансглутаминазу, которая усиливает связи между волокнами коагулина. После выпуска из клеток трансглутаминазы быстро формируется сгусток (стабилизированный гель) (рис. 1), состоящий из гемоцитов и нерастворимого коагулина [Bauchau, 1986; Soderhall, Cerenius, 1999;].

Наиболее обильный, высвобождаемый в течение коагуляции цитоплазматический материал — это электронноплотные отложения, идентифицированные у гиалиноцитов всех декапод. Вид их под электронным микроскопом напоминает опубликованные микрофотографии коагулоцитов некоторых насекомых [Ratcliffe, Rowley, 1979]. Однако для проверки предположения об аналогии функции гиалиноцитов декапод и коагулоцитов насекомых необходимо применить спе-



**Рис. 1.** Схема активизации профенолоксидазной системы декапод эндотоксинами патогенных микроорганизмов [по Soderhall, Cerenius, 1999]: β-1,3 глюканы (β-1,3 glucans), липополисахариды (LPS) и пептидоглюканы (PG) — токсичные молекулы, выделенные стенками патогенных грибов, грамотрицательных и грамположительных бактерий, соответственно; глюкан-связующий плазмальный белок (βGBP), липопротеин-связующий белок (LPS binding protein); рецепторы на мембранах гемоцитов (R); выпуск из клетки (стрелка) профенолоксидазной системы (proPO), включая несколько серин-протеиназ (ppA) — активаторов proPO. Биологические факторы коагуляции и защиты, произведенные в плазме в результате активации proPO-системы: белки опсонизации и прилипания (пероксинектин и др.); компоненты реакции слипания (transglutaminase и др.) и формирования стабилизированного сгустка-геля; меланин (melanin) — конечный продукт этапов окисления профенолоксидазы (proPO); В плазме присутствуют ингибиторы протеаз (Proteinase inhibitors: α-2 макроглобулин и др.)

циальную маркировку цитоплазматических отложений и коагулогена декапод, по образцу применявшейся при иммунохимическом изучении коагулогена у насекомых [Hose et al., 1990]. Исследование процесса свертывания гемолимфы путем его провоцирования попаданием морской воды в разрыв экзоскелета у трех видов декапод, отличающихся по типу коагуляции [Tait, 1911], подтвердило, что запуск этого процесса происходит при распаде гемоцитов [Hose et al., 1990].

Был сделан вывод, что описанные ранее три типа коагуляции [Tait, 1911], это не три формы коагуляции, свойственные разным видам декапод, а скорее изменчивый функциональный континуум, зависящий от процента быстро разрушающихся гиалиновых клеток в гемолимфе. Колючий омар *P. interruptus* с самым высоким процентом гиалиновых клеток проявляет С-коагуляцию, при которой распад множества гиалиновых клеток формирует большие пространства коагулировавшей гемолимфы с включениями узелков из зернистых лейкоцитов. При снижении процента просвечивающих клеток, уменьшается и пространство коагулировавшей гемолимфы. У животных с типом А-коагуляции, подобных крабу *Loxorhynchus grandis*, рану закупоривает сгусток зернистых гранулоцитов, соединенных между собой нитями коагулина.

Используемый при диагностировании состояния декапод показатель — «время свертывания гемолимфы» отвечает на воздействие факторов стресса, и реагирует на эндотоксины микроорганизмов. Измерение этого показателя гемолимфы позволяет оценивать состояние животного, в частности, степень его стрессированности [Evans, 1999]. Установлено, что на второй ранней стадии стресса (стадия тревожного состояния) физиологический ответ у лангуста проявляется в усилении свертываемости (сокращение времени свертывания) гемолимфы. При длительном воздействии факторов стресса на второй поздней стадии (фаза сопротивления) наблюдается патофизиологическая реакция в виде ослабления (в увеличении времени) свертываемости [Evans, 1999; Fotedar et al., 2001]. Ослабление свертываемости гемолимфы также может быть связано с понижением иммунитета и с инфекцией. Например, омары *Homarus americanus*, зараженные грамм-положительной бактерией *Gaffkya homari*, кровоточат после ранения до самой смерти [Levin, 1967]. Имеются данные об увеличении времени свертываемости в результате плохого содержания лангустов [Fotedar et al., 2001; Paterson et al., 2005].

Очевидно, что коагуляция у декапод явление более сложное, чем раньше предполагалось. Существование каскада ферментативных реакций в гемолимфе приближает коагуляцию декапод к реакциям реликтового представителя первичноводных хелицероных — мечехвоста *Limulus polyphemus*, а трансформация коагулогена в нерастворимый коагулин — к реакциям позвоночных, прежде считавшихся принципиально различными [Кузнецов, 1948; Bauchau, 1986, с. 283; Soderhall et al., 1988, 2004].

**Защита от чужеродных агентов.** Помимо гемостатической функции коагуляция гемолимфы способствует очищению организма от вторгшихся в гемоцель микробов и их выделений (эндотоксинов), за-

щите организма от гемоцитопении, потери способности гемолимфы к свертыванию, снижения функциональной активности гемоцианина, выражающегося в утрате синего цвета плазмы, характерного для гемолимфы с окисленным гемоцианином [Levin, 1967]. Коагуляция и антибактериальные механизмы защиты внутренней среды у членистоногих тесно связаны и практически неотделимы [Levin, 1967]. Однако, основная защита внутренней среды у декапод осуществляется специфическими иммунными системами [Soderhall et al., 1988; Durliat, 1986]. Беспозвоночные испытывают недостаток в антителах и, следовательно, в иммунной памяти. Их защита основана на реакциях врожденного иммунитета. Основная система врожденного иммунитета у беспозвоночных — меланизация болезнетворных микроорганизмов и поврежденных тканей. Этим важным процессом управляет фермент фенолоксидаза (phenoloxidase-PO), который, в свою очередь, регулирован очень сложным способом, чтобы избежать избыточного производства ядовитых и реактивных составов [Cerenius, Soderhall, 2004]. Запускают эту систему эндотоксины — вещества микробного происхождения. Конечным продуктом сложной защитной реакции является пленка меланина, выполняющая роль механического барьера и подавляющая рост паразитов путем их обволакивания. Общая схема активизации защитной реакции членистоногих, включая декапод, конечными продуктами которой являются меланин и сгусток из геля и гемоцитов, представлена на рис 1.

Проникнув в полость тела рака, потенциально болезнетворные микроорганизмы выпускают вещества, вызывающие реакцию сопротивления, такие как  $\beta$ -1,3-глюканы, липополисахариды, и пептидоглюканы, которые через посредство плазменных белков связываются с рецепторами на мембранах клеток крови. В результате гемоциты выпускают в плазму профенолоксидазную систему (proPO-систему) и несколько серин протеиназ; происходит активизация proPO-системы и продуцирование биологических факторов, участвующих в устранении патогенов (см. рис. 1).

Судить о состоянии иммунной системы, а, следовательно, и о состоянии здоровья декапод можно по уровню общего числа гемоцитов (ОЧГ), по времени свертывания гемолимфы, по характеристикам антибактериальной активности и другим микробиологическим показателям. Гемоциты поставляют субстрат и активаторов профенолоксидазной системы, и резкое снижение их численности делает декапод чрезвычайно уязвимыми для любой инфекции [Persson et al., 1987; Cerenius et al., 2003]. С другой стороны, есть данные, что при митогенетическом возбуждении или в присутствии бактерий гемоциты колючего омара *Panulirus japonicus* могут быстро размножаться *in vivo*.

Их количество может увеличиваться в 6 раз по сравнению с нормой [Jussilla, 1997; Sequeira et al., 1996]. В настоящее время превышение нормы ОЧГ у декапод рассматривают как указание на сопротивление организма распространению инфекции, понижение — как признак его предлетального состояния [Soderhall, Cerenius, 1999]. Снижение свертываемости гемолимфы может указывать на понижение иммунитета [Fotedar et al., 2001; Jussilla et al., 2001]. Для оценки состояния иммунной системы декапод изучается возможность применения микробиологических показателей таких, как антибактериальная активность гемолимфы [Chisholm, Smith, 1995; Tsvetnenko et al., 2001; Paterson et al., 2005], степень ее обсемененности [Котлярчук, Чернова, 2007], ранжированное бактериальное число. Считается, что длительно активизированная иммунная система декапод теряет возможность справиться с дополнительным стрессом и любая сублетальная инфекция способна вызвать смерть животного [Persson et al., 1997; Soderhall, Cerenius, 1999]. Непосредственно отличить активированные к защите гемоциты от неактивированных клеток позволяет флуоресцентное исследование [Soderhall, Cerenius, 1999].

Некоторые признаки бактериальной зараженности у декапод могут быть выявлены при микроскопировании их гемолимфы. У жизнеспособных, здоровых особей в гемолимфе не должно быть бактерий, однако после содержания декапод в неблагоприятных условиях у них снижается иммунитет и может возникать бактеремия [Jussilla, 1997]. На бактериальную инфекцию гемолимфы также может указывать изменение ее цвета [Котлярчук, Чернова, 2007].

Выявление показателей антибактериальной активности связано с применением оборудования и соответствующих анализов, которые проводят в специализированных лабораториях.

Прижизненное определение  
физиологического состояния камчатского краба  
по гематологическим показателям

2.1. Краткие сведения о камчатском крабе

Камчатский краб *Paralithodes camtschaticus* (Tilesius, 1815) относится к отряду Decapoda, подотряду Anomura, семейству Lithodidae (крабоиды). Таксономическое название «крабоиды» подчеркивает отличие этой группы от настоящих крабов. Последние используют для передвижения все пять пар грудных конечностей, тогда как крабоиды передвигаются при помощи четырех пар ног, а ноги пятой пары малы, скрыты под панцирем и служат для очистки жабр [Виноградов, 1941]. Карапакс крабоидов как и у настоящих крабов расширен и уплощен в спиннобрюшном направлении, abdomen подвернут под головогрудной отдел, но сохраняет следы ассиметрии, что свидетельствует об их происхождении от раков-отшельников [Абрикосов, Беккер, Бирштейн и др., 1966].

Обширный ареал камчатского краба расположен в северной части Тихого океана и тянется вдоль Азиатского побережья от восточной части Олюторского залива (Берингово море) и южной части Пенжинского залива (Охотское море) до восточного побережья Кореи и о-ва Хонсю, и вдоль американского побережья от залива Нортон-Саунд до островов Королевы Шарлоты. Известны указания на нахождение этого вида в Чукотском море [Виноградов, 1946; Иванов, 2001].

В период с 1961 по 1969 гг. сотрудниками ФГУП ВНИРО и ТИНРО-центра была осуществлена интродукция камчатского краба в моря Северного бассейна [Орлов, 1996]. К настоящему времени в Баренцевом и Норвежском морях сформировалась самовоспроизводящаяся популяция камчатского краба, ареал которой простирается: на западе — от Лофотенских островов Норвежского моря, и на востоке — до

Гусиной банки о-ва Колгуева и воронки Белого моря [Orlov, Ivanov, 1978; Беренбойм, 2001, Кузьмин, Гудимова, 2002].

**Камчатский краб издавна был ценным промысловым объектом России, Японии и США. Его мясо — высокопитательный деликатесный пищевой продукт, пользующийся спросом на мировых рынках. Широко практикуется изготовление крабовых консервов, массовые отходы которого (покровы тела крабов) также представляют собой ценное сырье для изготовления медицинской и технической продукции [Немцев, 2006].**

В пределах исключительной экономической зоны (ИЭЗ) России (СССР) основным районом добычи камчатского краба был и остается шельф Западной Камчатки. Здесь до конца 1990-х гг. добывали 70–95 % от суммарного вылова по всем дальневосточным морям, который в отдельные годы достигал 58–60 тыс. т. В настоящее время официальный вылов камчатского краба у побережья Сахалина и Курильских о-вов не превышает 600 т и имеет тенденцию к дальнейшему снижению. Причины снижения численности камчатского краба — интенсивная браконьерская добыча коммерческих самцов у южных Курильских о-вов, гибель значительного количества молоди и половозрелых особей камчатского краба, попадающих в тралы при лове донных рыб и других гидробионтов, а также гибель и травмирование самок и молоди при ловушечном лове. Эти обстоятельства приводят к падению численности промысловых самцов и увеличению доли яловых самок, к массовому появлению некондиционных крабов со слабым наполнением конечностей и мягкими наружными покровами, к сокращению площадей скоплений крабов. Подобные же причины отрицательно воздействуют и на популяцию камчатского краба в Баренцевом море. Все это отрицательно сказывается на добывающей промышленности России.

Депрессивное состояние запасов камчатского краба заставило искать способы восстановления его численности и рационализации лова. Решить эту проблему возможно путем комплексного подхода с одновременным применением, во-первых ограничительных и контрольных мероприятий, во-вторых искусственного разведения камчатского краба с целью выпуска его молоди на акватории с не полностью реализованным биопродукционным потенциалом экосистем, и доразведения в искусственных условиях некондиционных особей, отловленных в море, до товарного качества. В настоящее время разрабатываются методы экстенсивной аквакультуры камчатского краба в сооружениях садкового типа, размещенных непосредственно в море, а также интенсивной аквакультуры в контролируемых условиях крабовых береговых комплексов [Альтов и др., 2005; Ковачева, 2008].

**Биотопы камчатского краба** располагаются в пределах шельфовой зоны и свала глубин. Наибольшие скопления крабов отмечены на глубинах 120–200 м при температуре выше +1 °С. Летом краб держится на глубинах менее 100 м. Оптимальная среда обитания камчатского краба характеризуется соленостью не менее 32 ‰ и температурой от +2 до +7 °С. В период сезонных и нерестовых миграций крабы переживают температуры от –2 °С до +18 °С [Павлов, 2003]. Косяки самцов и самок встречаются друг с другом в более прогретых прибрежных водах плюс 2–4 °С в связи с чем в период спаривания краб подходит близко к берегу. В окраинных морях Северного бассейна камчатский краб отмечен на глубинах до 320 м [Кузьмин, 2000]. Пространственное распределение этого вида в Баренцевом море связано с зонами проникновения теплых атлантических вод [Герасимова, Кузьмин, 1997].

**Минимальная длина карапакса** половозрелой самки камчатского краба в пределах нативного ареала изменяется от 55 мм (северо-запад Охотского моря) до 112 мм (Южные Курилы). В Баренцевом море 50 % самок камчатского краба созревают при достижении ширины карапакса — 130,6 мм или длины карапакса — 121 мм. Средние размеры самцов превышают размеры самок. Половая зрелость самцов отмечена при достижении ширины карапакса 80 мм, массовое созревание происходит при ширине карапакса свыше 130 мм.

**Самки камчатского краба** нерестятся один раз в год; абсолютная плодовитость их варьирует в широком диапазоне от 32 до 564 тыс. овоцитов, при средней величине в 206 тыс. В последнее время как в нативном ареале, так и в районе акклиматизации отмечено снижение индивидуальной абсолютной плодовитости камчатского краба [Клигин, 2003; Сенников, Шацкий, 2002].

**Оплодотворение у камчатского краба** внешнее. Перед спариванием самец удерживает самку за клешни в течение 3–7 дней (положение «рукопожатия») до тех пор, пока самка не перелиняет. Затем самец опутывает сперматофорной нитью плеоподы и коксоподиты ее ходильных ног. Через несколько часов самка выпускает из половых отверстий икру и фермент, при соприкосновении с которым сперматофоры распадаются, освобождая сперматозоиды [Федосеев, Родин, 1986; Nakanishi, 1987]. Икринки камчатского краба прикрепляются под абдоменом самки к волоскам плеоподов, повисая на оболочке, которая вытягивается, образуя полый стебелек. Физиологической связи с организмом самки икринки не имеют, эмбрионы питаются исключительно за счет желтка. Отмечена зависимость сроков и продолжительности нереста камчатского краба от гидрологического режима прибрежных вод [Сенников, Шацкий, 2002].



**Эмбриональное развитие** камчатского краба начинается спустя четверо суток после оплодотворения. Продолжительность эмбрионального периода составляет около 10–11 мес и, в первую очередь, зависит от температуры воды [Макаров, 1966; Nakanishi, 1987]. Эмбриональное развитие, в основном, завершается к зиме, но до весны — начала лета (время выклева личинок) сформировавшийся эмбрион остается в латентном состоянии [Виноградов, 1941]. Таким образом, самки вынашивают икру практически в течение года. Основным фактором, влияющим на скорость развития и выживаемость личинок, является температура воды.

**Метаморфоз у камчатского краба** (как у других крабоидов и родственных им раков-отшельников) протекает через ряд планктонных личиночных стадий — презоэа, зоэа (I–IV стадия), затем следует постличиночная (глаукотоэ) стадия, которая вначале ведет планктонный образ жизни, а затем оседает на подходящем субстрате [Stevens, Kittaka, 1998]. Примерно через 20 дней глаукотоэ превращается в ювенильного краба, называемого в промысловой практике мальком [Ковачева, 2008]. У камчатского краба в естественной среде личиночный период длится 3–4 мес, в зависимости от условий обитания [Макаров, 1966; Матюшкин, Ушакова, 2002; Клитин, 2002]; мальковой период (I–VI стадия) — 5–6 мес [Казаев, 1995], а общая продолжительность жизни этого вида декапод в среднем равна 20-ти годам.

**Наличие жесткого наружного скелета** (экзоскелета), характерного для членистоногих, обуславливает скачкообразный рост ракообразных, который происходит в постличиночный период. Во время линьки разрушается и сбрасывается старый, образуется новый вначале еще мягкий экзоскелет. Ткани животного быстро набухают в результате абсорбции воды через наружные покровы и жабры. В послеличночный период происходит активное образование тканевых белков и снижается содержание воды в тканях. Весовой рост камчатского краба в периоды между линьками практически равен нулю или даже может быть отрицательным. Следует подчеркнуть, что жизнь краба протекает на фоне сменяющихся циклов линек, в составе которых выделяют ряд стадий предлиньки, постлиньки и межличиночного периода, собственно линьки [Drach, 1939; Passano et al., 1960].

**Осмотические свойства и электролитный состав гемолимфы камчатского краба.** Культивировать и содержать в искусственных условиях камчатского краба стали сравнительно недавно [Дамсгорд, 2000; Альтов и др., 2005; Ковачева и др., 2005; Ковачева, 2006; 2008] в связи с чем такие важные аспекты его физиологии как осмотическая и ионная регуляция еще не достаточно отражены в литературе. Поэтому в настоящей работе приводятся данные о других видах кра-

бов и других морских ракообразных. Это вполне правомерно, тем более, что при объединении животных в группы по их способностями к осмотической регуляции выявляется некоторая связь последней с распространением и таксономическим положением рассматриваемых объектов [Проссер, Браун, 1967]. Об ограничениях распространения той или иной группы ракообразных, связанных с их осмотическими свойствами, свидетельствует ответная реакция животных на осмотический стресс. Осмотически лабильными считаются те животные, у которых концентрация жидкостей тела зависит от осмотической концентрации среды. По величине осмотического давления жидкостей внутренней среды организма (крови, гемолимфы) в сравнении с таковым окружающей среды гидробионтов делят на гипер-, гипо- и изоосмотические. У изоосмотических животных осмотическое давление внутренней среды равно осмотическому давлению внешней среды. Этот тип гидробионтов часто называют пойкилоосмотическими животными. Морские ракообразные такие как лангусты рода *Palinurus*, представители родов *Portunus*, *Lophopanopeus*, *Speocarcinus*, *Hyas* и *Pagurus*, крабы рода *Maja*, а также *Cancer antennarius* способны регулировать свой объем и ионный состав. При помещении в разведенную морскую воду такие организмы вначале набухают и набирают вес, затем вес их тела уменьшается из-за потери солей и сопутствующей им воды. При возвращении веса тела изоосмотических животных к норме, осмотическая концентрация их крови становится соответствующей концентрации разведенной среды. И наоборот, оказавшись в более концентрированной среде, такой организм поглощает соли, и концентрация его гемолимфы изменяется до наружной концентрации. Жабры и панцирь этих ракообразных проницаемы для воды и солей в обоих направлениях [Проссер и Браун, 1967]. По-видимому, к этой группе также можно отнести и обитающего на значительных глубинах при высокой солености камчатского краба.

Следует отметить, что животные, с ограниченной осморегуляцией, терпимы к изменениям осмотической концентрации внутренней среды, но плохо переносят ее колебания во внешней среде, в то время как отличающиеся низкой проницаемостью поверхности тела речные раки могут переживать в безводных условиях несколько суток.

У большинства морских беспозвоночных концентрация гемолимфы в целом близка к концентрации морской воды и меняется по мере изменения последней. Однако уровень кальция в крови ракообразных в сравнении с морской водой бывает повышен и изменяется во время транспортировки и линьки [Алякринская, Коржуев, 1981; Павлов, Тальберг, 2005]. В отношении содержания хлоридов в гемолимфе отмечено, что их регуляция обычно происходит параллельно с осмо-

тической регуляцией. В табл. 2 приведены данные об ионном составе морской воды и гемолимфы некоторых морских ракообразных.

Таблица 2

Электролитный состав жидкостей тела у морских декапод  
[по Проссер, Браун, 1967]

Показатели	Содержание элементов, ммоль на 1 л крови						Белок, мг/л
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	
Морская вода*	459	9,78	10,05	52,5	538	26,55	–
<i>Lithodes</i> *	479	12,4	12,3	52,2	536	24,7	–
<i>Homarus</i>	472	10	15,6	6,8	470	–	–
Морские ракообразные	–	–	–	–	–	–	35–53

\*Концентрация выражена в ммоль элемента на 1 л воды

В ионной регуляции морских ракообразных принимают участие почки, способные удерживать калий и кальций и выводить избыток магния и особенно сульфатов. Вероятными внепочечными путями выделения могут служить жабры и кишечник, а также желудок. У ракообразных, имеющих высокие концентрации белка в гемолимфе, с белком связано только 10–20 % кальция, это позволяет сделать заключение, что связывание неорганических ионов белками в качестве регуляторного механизма не имеет большого значения. Как почечный, так и внепочечный активный перенос ионов происходят с затратой энергии, высвобождающейся в результате процессов окисления.

## 2.2. Определение гематологических показателей при оценке физиологического состояния камчатского краба

Установлено, что показатели гемолимфы декапод специфически реагируют на такие стрессорные факторы, как технологические манипуляции, гидрохимические параметры среды и др. Изменения гематологических показателей наблюдаются также и по стадиям личиночных циклов, при созревании половых продуктов и старении организма. Для камчатского краба, например, отмечено, что концентрация и субъединичный состав гемоцианина взрослых особей зависит от

линочной стадии организма [Моисеев, Моисеева, 2006]. Установлено, что существует значительная положительная корреляция между концентрацией гемоцианина в гемолимфе камчатского краба и наполненностью конечностей мышечной тканью [Моисеева, Моисеев, 2008].

В настоящей работе для оценки физиологического состояния камчатского краба использованы индикаторные показатели, удовлетворяющие следующим требованиям [Смит, 1986]:

- применяемый метод отбора гемолимфы не должен снижать жизнеспособности животного;
- подбор индикаторных признаков должен проводиться с учетом имеющихся сведений об их значении как показателей физиологических функций, т.е. быть теоретически обоснованным;
- желательно чтобы определение значений применяемых показателей могло бы осуществляться в нестационарных (полевых) условиях или в лаборатории с обычным оборудованием.

Возможность соблюдения перечисленных условий и то, что отбор небольших объемов гемолимфы не подрывало жизнеспособности обследованных животных, и не вызывало особых затруднений, делают возможным прижизненно определять физиологическое состояние камчатского краба по гематологическим показателям.

По составу необходимого для анализа материального обеспечения подобранные нами [Александрова, Ковачева, 2010] гематологические показатели для тестирования декапод можно условно разделить на две группы. К первой группе отнесены показатели, значения которых возможно получить по визуальным оценкам, имея в распоряжении 1–3 капли (из небольшого шприца) гемолимфы, и применяя элементарное оборудование. Определяют такие показатели сразу после отбора гемолимфы, используя камеру для счета форменных элементов крови, индикаторные рН-полоски, портативные модели микроскопа, рефрактометра и т.п.

Методы определения второй группы гематологических показателей основаны на возможности получить от одного животного гемолимфу в объеме не менее 1 мл (на один анализ), использовать такие приборы как ФЭК, холодильник, электроды для замеров рН в небольших объемах вязкой жидкости, располагать соответствующим набором химреактивов, растворителей и т.п. Методы анализа второй группы показателей пригодны для тестирования крупных ракообразных, к числу которых принадлежит и камчатский краб.

Перечень гематологических показателей первой и второй групп и их значения у жизнестойких и нежизнестойких особей разных видов декапод приведены в Приложении, табл. 1 и 2. Сведения о гематоло-

гических показателях, которые можно использовать при оценке физиологическом состоянии камчатского краба, а также о методах их определения приведены разд. 2.2.

### 2.2.1. *Отбор гемолимфы*

Отбор гемолимфы для тестирования физиологического статуса камчатского краба осуществляют из артерий ходильных ног (*chelipeda I, pereopoda IV–V*) (рис. 2) или из кардиального синуса, применяя стерильный шприц и дезинфицируя место укола 96° спиртом до и после отбора пробы [Soderhall, Smith, 1983]. При щадящем отборе (не более 6,0 % от всей гемолимфы взрослого краба) объем единовременной пробы не должен превышать 10 мл.



Рис. 2. Отбор гемолимфы у камчатского краба (ВНИРО)

### 2.2.2. *Цвет, прозрачность, свертываемость, рН гемолимфы*

Цвет, прозрачность, свертываемость, рН гемолимфы определяют визуально сразу после отбора гемолимфы. При определении цвета гемолимфы следует иметь в виду, что гемоцианин — дыхательный пигмент декапод в окисленном состоянии окрашен в синий цвет, в восстановленном — бесцветен. Только что извлеченная из полости тела камчатского краба гемолимфа обычно слабо мутная, с голубоватым до розоватого оттенком.

Помутнение гемолимфы может быть связано с повышением концентрации кальция и быть указанием на подготовку животного к линьке. Следует учитывать, что в отобранной гемолимфе в норме происходит некоторое помутнение, связанное с полимеризацией субъединиц коагулина при формировании стабилизированного геля. Слишком быстрое помутнение гемолимфы может свидетельствовать о высокой концентрации в ней эндотоксинов. Необычный цветовой оттенок гемолимфы (например, зеленоватый у широкопалого рака) может указывать на вероятность бактериемии (см. Приложение, табл. 1).

**Время свертывания гемолимфы** декапод относится к числу лабильных показателей; его увеличение (т.е. снижение или утрата свертываемости) может свидетельствовать о сублетальном состоянии обследуемого животного, которое находится на последней стадии стресса [Evans, 1999], или поражено патогенными организмами [Levin, 1967; Persson et al., 1997]. Сокращение времени свертывания может быть указанием на начальные стадии стресса [Evans, 1999] (см. Приложение, табл. 1).

И.О. Алякринская и П.А. Коржуев [1972, 1981] при определении времени свертывания гемолимфы моллюсков и песчаного краба использовали метод Моравица, применяемый для аналогичного анализа в педиатрии. По этому методу [изложено по Тодорову, 1968], время свертывания определяют по появления первой фибриновой нити при вытягивании каждые полминуты стеклянного капилляра из капли крови диаметром в 4–6 мм, нанесенной на предметное стекло. Время начала измерения засекают сразу же после отбора пробы. На время свертывания крови влияют температура окружающей среды, возможное попадание пузырьков воздуха при отборе проб, концентрация растворенного белка и т.д. Данные И.О. Алякринской и П.А. Коржуева [1981] по определению времени свертывания гемолимфы у краба *Carcinus maenus* при температуре 23–24 °С, концентрации общего белка 3,8–7,6 г-% и гемоцианина 0,9–2,9 г-% приведены в Приложении, табл. 1. Комментарии по применению этого метода для определения времени начала свертывания гемолимфы у песчаного краба — одного из представителей десятиногих ракообразных — названные авторы, к сожалению, не привели.

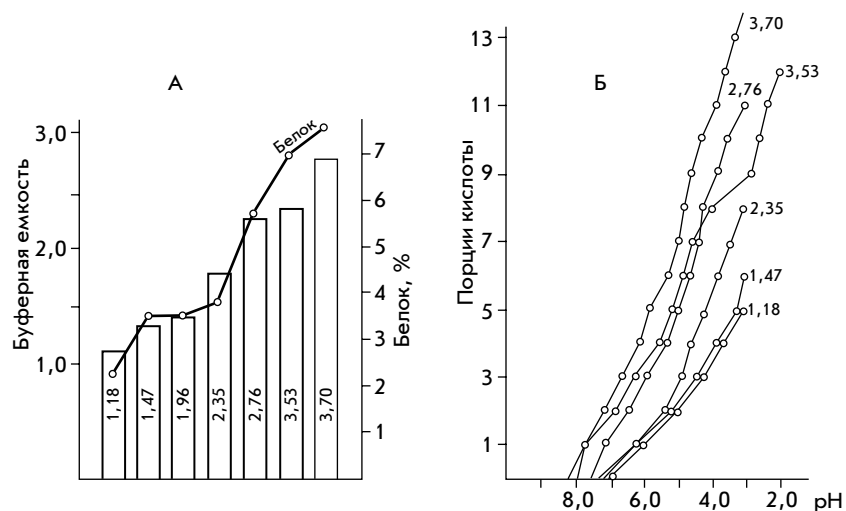
Поскольку механизм свертывания членистоногих отличается от такового у позвоночных животных (см. разд. 1.4), критерии начала свертывания гемолимфы требуют детальной отработки и универсализации с учетом результатов последних исследований по декаподам [Fotedar et al., 2001; Jussilla et al., 2001]. Условия, при которых ведется определение начала свертывания гемолимфы, должны фиксироваться.

**Определение рН.** Клетки большинства животных приспособлены к жизнедеятельности в узком диапазоне рН, постоянство которого обеспечивается, прежде всего, буферными системами крови (белковой, включающей дыхательный пигмент, гидрокарбонатной, фосфатной), а также в результате выведения из организма ненужных щелочных и кислых продуктов обмена веществ. Даже у испытывавших сильный стресс декапод зафиксированы незначительные изменения рН [McMahon, Stuart, 1999; Черкашина и др., 1989] (см. Приложение, табл. 2). Для фиксации незначительных сдвигов рН в гемолимфе требуется точная измерительная техника, например, специальный электрод электронного анализатора серии «Эксперт», предназначенный для измерения рН в небольших объемах жидкости, или инструменты анализаторов типа «Radiometer». Поэтому в качестве индикатора физиологического состояния декапод этот показатель используют редко, но при оценке буферных свойств гемолимфы его определение необходимо.

### 2.2.3. Буферность гемолимфы

Буферная емкость гемолимфы — характеризует устойчивость внутреннего гомеостаза. Повышение буферности гемолимфы связано, прежде всего, с увеличением количества общего белка. Буферная функция, способствующая постоянству внутренней среды организма, является одной из главных функций протеинов гемолимфы. Основное буферное вещество гемолимфы — дыхательный пигмент гемоцианин, количество которого зависит от растворенного в ней белка (рис. 3А).

Цифровую оценку буферной емкости (см. Приложение, табл. 2) рассчитывают как отношение порций прибавленной к гемолимфе кислоты ( $dA$ ) к изменению значений рН ( $dpH$ ) [Алякринская, Коржуев, 1981]. Для потенциометрического титрования требуется 1 мл гемолимфы, к которой последовательно (по каплям) добавляют 0,1 мл 0,1 N раствора соляной кислоты до тех пор, пока не доведут реакцию среды гемолимфы до рН = 3. При этом концентрацию водородных ионов измеряют после прибавления каждой порции кислоты. Реакцию гемолимфы определяют электродом или ориентировочно — с помощью индикаторной бумагой. Откладывая по вертикали количество порций прибавленной кислоты, а по горизонтали — значения рН, вычерчивают титрационную кривую (рис. 3Б). Буферную емкость гемолимфы ( $dA/dpH$ ) рассчитывают как отношение порций прибавленной к гемолимфе кислоты ( $dA$ ) к изменению значения рН ( $dpH$ ). При средней концентрации гемоцианина и общего белка 2,4 г-% и 3,8 г-%, и



**Рис. 3.** А — зависимость буферной емкости гемолимфы краба *S. taenas* от количества общего белка и концентрации гемоцианина (г-%, цифры внутри столбцов); Б — титрационные кривые гемолимфы краба *S. taenas* в зависимости от концентрации гемоцианина (г-%)  
[по Алякринской, Коржуеву, 1981]

в соответствии с данными рис. 3Б, величина буферной емкости краба *Carcinus taenas* примерно равна 1,8.

Быстрый сдвиг рН в кислую сторону при титровании гемолимфы небольшим количеством соляной кислоты свидетельствует о понижении жизнестойкости особи, о риске нарушения гомеостаза и возможном развитии ацидоза. У впервые обследуемых декапод оценку показателей буферности проводят, сравнивая полученные показатели с аналогичными данными от особей, живущих в благоприятных условиях [Paterson et al., 2005]. В случае, когда анализируется проба объемом менее 1 мл необходимо подобрать концентрацию кислоты, используемую для титрования.

#### 2.2.4. Определение концентрации белка, гемоцианина (меди), кальция, глюкозы, лактатов в гемолимфе

**Концентрация общего белка.** Белки гемолимфы участвуют во многих жизненно важных для организма процессах (подробнее этот вопрос изложен в разд. 1.4). Содержание общего белка может быть определено фотоэлектроколориметрическим методом по результатам биуретовой реакции, основанной на способности белков гемолимфы образовывать с сернокислой медью в щелочной среде соединения



фиолетового цвета. Концентрацию белка при этом рассчитывают по калибровочному графику, построенному по серии разведений стандартного раствора альбумина [Справочник: ..., 1991].

В последнее время распространение получило определение белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом, который основан на зависимости показателя преломления сыворотки крови или спинномозговой жидкости от содержания в них белковых веществ. Этот метод определения концентрации белка в жидкостях тела получил признание в работе с гемолимфой декапод в связи с быстротой и точностью проводимых измерений, для которых достаточно минимального количества (1–3 капель) гемолимфы, и с возможностью применять его в полевых условиях [Paterson et al., 1999; Paterson et al., 2005; Загорская, 2009]. Коэффициент преломления определяется настолько быстро, что цельная гемолимфа не успевает свернуться. В случае ее свертывания показатели шкалы не меняются, только линия демаркации на призме становится менее четкой.

Определение коэффициента преломления гемолимфы проводят на рефрактометре ИРФ-454Б 2М или на иной его модели. Перед измерением рефрактометр необходимо настроить и проверить. Для этого на поверхность нижней (измерительной) призмы в центр наносят каплю дистиллированной воды и осторожно закрывают верхней (откидной) призмой. Вращая ручку измерительной головки, совмещают границу света и тени с перекрестием поля зрения. Если при этом наблюдается радужная окраска, ее устраняют вращением дисперсионного компенсатора. Затем отсчитывают показатель преломления по шкале. Для воды он должен быть равен 1,3330. Затем, откинув верхнюю призму, удаляют остатки воды фильтровальной бумагой с верхней и нижней призм до получения чистой зеркальной поверхности нижней призмы. После подготовки рефрактометра к измерениям на нижнюю поверхность (в центре) измерительной призмы наносят каплю гемолимфы и закрывают верхнюю призму, отсчитывают показатель преломления по шкале и по специальной таблице находят содержание общего белка (%) без каких-либо дополнительных расчетов (данные о содержании белка в сыворотке крови по значениям коэффициентов рефракции приведены в Приложении табл. 3). После измерения обе призмы очищают от остатков гемолимфы и протирают смесью спирта с эфиром. При работе с рефрактометром необходимо следить за температурой в помещении, оптимальное значение которой  $\pm 20$  °С. Если температура во время отсчета не соответствует оптимальной, то вводят поправку 0,0001 на каждый градус, которую вычитают при понижении температуры или прибавляют при ее повышении по сравнению с  $\pm 20$  °С.

Понижение содержания белка может свидетельствовать: о неправильном питании и истощении, о хронической инфекции, о сублетальном состоянии животных. Повышение этого показателя при сгущении гемолимфы после продолжительной воздушной экспозиции — о нарушении водного баланса [Смит, 1986]. Интерпретация результатов аналогичных анализов у декапод должна проводиться путем сравнения с нормой по концентрации белка в гемолимфе с учетом динамики этого показателя в связи с личными циклами и стадией зрелости половых продуктов.

**Медь, гемоцианин и общий белок** (см. Приложение, табл. 2) — связанные показатели, поскольку белок гемолимфы может включать до 90 % медьсодержащего белка гемоцианина, о концентрации которого судят по концентрации меди [Алякринская, Коржуев, 1981].

**Определение гемоцианина** может характеризовать интенсивность дыхательной функции при содержании декапод в искусственных условиях или изменение этого показателя под влиянием стресса. О концентрации гемоцианина можно судить по концентрации меди, которую можно определить диэтилдитиокарбаматовым методом [С. Балаховский, И. Балаховский, 1953] с использованием спектрофотометра. Модификация этого метода по Шмидту [Тодоров, 1960] заключается в добавлении к гемолимфе 6 N HCl для перевода всей меди в ионную форму. Зная концентрацию меди, можно рассчитать концентрацию гемоцианина. Для анализа нужно располагать 4 мл сыворотки (гемолимфы), которую смешивают с 2 мл соляной кислоты. Через 10 мин к смеси прибавляют 2 мл трихлоруксусной кислоты и фильтруют. К 1 мл фильтрата (содержащему 0,5 мл сыворотки) прибавляют 1,3 мл спирта, 0,2 мл аммиака, а после охлаждения — одну каплю диэтилтиокарбамата. Через несколько минут смесь фотометрируют на фильтре S 13 и вычисляют концентрацию меди по стандартной кривой. Расчет гемоцианина проводят, исходя из данных, что у декапод 1 г гемоцианина в среднем содержит 0,17 % меди [Проссер и Браун, 1967; Алякринская, Коржуев, 1981]. Интерпретация значения этого показателя у декапод также должна осуществляться путем сопоставления с нормами по этому показателю и с учетом стадий личного цикла.

**Концентрация глюкозы и лактатов** в сыворотке — показатели, позволяющие оценивать степень стрессированности организма. У животных, подвергшихся сильным воздействиям стрессогенных факторов (транспортировка, длительное пребывание на воздухе, хендлинг и др.), эти показатели следует сравнивать с нормой. Пониженное содержание глюкозы в сыворотке свидетельствует об истощении орга-

низма, повышенное — характерно на первых стадиях стресса [Evans, 1999]. Концентрация лактатов в гемолимфе является индикатором жизнеспособности животного. Повышенное содержание этого показателя указывает на риск возникновения серьезных нарушений внутренней среды декапод, вызванных недостатком кислорода. Концентрация глюкозы в гемолимфе определяется на ФЭКе по цветной реакции с ортотолуидином, концентрация лактатов — колориметрическим методом [Справочник: ..., 1991].

**Концентрация кальция.** Динамика кальция у декапод связана с белковым и водно-солевым обменом, и находится в зависимости от стадий линьки. Определенные ткани могут накапливать кальций, которой используется организмом по мере надобности. Уровень кальция в гемолимфе, по всей вероятности, регулируется гормонально. Состояние организма при разной концентрации кальция в гемолимфе [Мацквичене, 1979] необходимо оценивать, учитывая нормы по этому весьма изменчивому показателю для разных стадий онтогенеза камчатского краба, и другие особенности его обмена. Концентрация кальция в гемолимфе определяется комплексометрическим методом [Справочник..., 1991; Paterson et al., 2005].

#### *2.2.5. Подсчет общего числа гемоцитов в гемолимфе*

Общее число гемоцитов (ОЧГ) и долю в нем гранулоцитов в гемолимфе камчатского краба можно определить, применяя элементарное оборудование, например, камеры для ручного счета кровяных клеток Неубауэра, Бюркера, Горяева и др., и световой микроскоп [Алякринская, 1970; Persson et al., 1987; Jussilla, 1997]. На поверхности таких камер выгравированы сетки (см. Приложение IV, рис. 1б) из больших и малых квадратов; сторона малого квадрата равна 50 мкм. При подсчете ОЧГ, когда их численность велика, следует руководствоваться методическими рекомендациями Н.Т. Ивановой [1983] по подсчету эритроцитов у рыб. Счет гемоцитов в этом случае ведут по 50-ти большим квадратам на разных участках сетки. Работа с цельной гемолимфой сопряжена с необходимостью делать это быстро — в первые минуты после отбора пробы. Во избежание трудностей для подсчета ОЧГ, которые создает способность гемоцитов к склеиванию, для морских декапод составлен антикоагулянт [Soderhall, Smith, 1983], состав которого под третьим номером приведен в Приложении, табл. 4. Другие подробности процедуры подсчета ОЧГ изложены в гл. 3, подразд. 3.2.5.

#### 2.2.6. Гемоцитарная формула и дифференцированный подсчет гемоцитов камчатского краба

Помимо рекомендуемых для практического применения гематологических показателей, в состав индикаторных показателей физиологического состояния камчатского краба также должна быть включена гемоцитарная формула, для разработки которой проводят дифференцированный подсчет гемоцитов разного типа.

**Дифференцированный подсчет** клеток крови, различные типы и стадии развития которых функционально не равнозначны, признан объективным методом контроля физиологического состояния таких гидробионтов как рыбы [Иванова, 1983; Головина, Тромбицкий, 1989]. Данные по соотношению разных типов гемоцитов в последнее время также используют при оценке физиологического статуса декапод [Mix, Sparks, 1980; Persson et al, 1987; Soderhall et al., 1988; Nose et al., 1990; Jussilla, 1997; Paterson et al., 2005]. Однако разработка гемоцитарной формулы у декапод осложнена не завершенностью процессов типизации и классификации гемоцитов декапод. Обстоятельства, касающиеся этого вопроса, подробно изложены в разд. 1.3.

При идентификации типов гемоцитов у камчатского краба, были использованы морфо-функциональные цитологические критерии, предложенные рядом авторов [Soderhall et al., 1988; Nose et al., 1990; Jussilla, 1997: p. 53]. Несмотря на трудности, возникающие при распознавании типовой принадлежности гемоцитов, из отобранной гемолимфы следует всегда делать мазки для дифференциального подсчета гемоцитов. Хорошие результаты по окраске мазков гемолимфы камчатского краба были получены при использовании паноптического метода Паппенгейма по Г.И. Роскину [1946]. Гемоциты камчатского краба распределяются сравнительно равномерно по мазку гемолимфы, что облегчает их дифференцированный подсчет. Подготовку мазков для типизации гемоцитов и их дифференцированного подсчета нужно осуществлять сразу же после отбора пробы гемолимфы.

Определение типологической принадлежности кровяных клеток камчатского краба в настоящей работе было проведено с учетом литературных сведений о цитологических характеристиках гемоцитов разных видов декапод (см. табл. 1), с использованием компьютерных технологий и фотографий макросъемки гемоцитов, сделанных под световым микроскопом Jenaval при 500-кратном увеличении. Размеры гемоцитов камчатского краба, которые считаются важным типовым индикатором клетки [Nose et al., 1990], определяли по микрофотографиям, сделанным с окрашенных мазков, с помощью измерительных инструментов программы Photoshop, масштаб в микрометрах

определяли по мерной сетке камеры Горяева, контрольные измерения проводили окуляр-микрометром.

В гемолимфе камчатского краба были идентифицированы прогиалиноциты и гиалиноциты, полугранулоциты и гранулоциты, встречались также гемоциты, которые по ключевым характеристикам табл. 1 не удалось отнести к одному из этих типов. Результаты измерений выше названных типов гемоцитов камчатского краба приведены в табл. 3.

**Описание гемоцитов камчатского краба. Гиалиноциты и прогиалиноциты** — часто встречающиеся типы клеток. На окрашенных мазках клетки веретенообразной формы у гемоцитов этих типов встречаются реже, чем округлые. Общий размер клеток прогиалиноцитов меньше такового у гиалиноцитов. Под световым микроскопом ядра у прогиалиноцитов и гиалиноцитов (фиолетово-коричневатые — у первых и фиолетово-бордовые — у вторых) выделяются четко, и видно, что они занимают большую часть клетки. В отличие от прогиалиноцитов у гиалиноцитов между ядром и оболочкой клетки появляется цитоплазма нежного розового цвета, которая располагается локально или окружает не широким слоем ядро. В ней заметны шаровидные уплотнения. Другие включения или не видны (Приложение III, рис. 1а, 1б, 1в) или незначительны (см. Приложение III, рис. 1г). Отношение ядра к цитоплазме (%) у прогиалиноцитов и гиалиноцитов превышает 50 % площади всей клетки (табл. 3).

Таблица 3

Размеры гемоцитов камчатского краба *Paralithodes camtschaticus*  
в мазках, окрашенных по Паппенгейму

Тип гемоцита	Размер гемоцитов, мкм		Размер ядра, мкм		Ядерно-цитоплазматическое отношение, %	Число измеренных клеток, шт.
	длина (max)	ширина (min)	длина (max)	ширина (min)		
Прогиалиноциты	8,33±0,33	6,30±0,25	6,94±0,30	4,59±0,24	55,81±1,69	10
Гиалиноциты	12,71±0,67	10,44±0,74	10,82±0,40	8,74±0,51	66,26±2,70	10
Полугранулоциты	19,35±0,62	13,55±0,87	11,83±0,86	7,69±0,52	34,32±2,39	10
Гранулоциты	19,70±0,66	14,77±0,45	8,04±0,24	10,18±0,46	28,18±1,06	10

Для сравнения: под электронным микроскопом у гиалиноцитов [Hose et al., 1990] трех видов исследованных морских декапод просматриваются: лопастная форма ядер, а в узком ободке цитоплазмы — мелкие гранулы и небольшое количество других включений (Приложение II).

Полугранулоциты морских декапод [Hose et al., 1990] сразу после отбора гемолимфы (фазово-контрастная оптика) имели утолщенную веретенообразную форму (см. Приложение I: рис. 1В; 2В; 3В). На окрашенных мазках гемолимфы камчатского краба форма этих клеток овальная, довольно крупное ядро также овальное, расположено в центре или бывает сдвинуто к какому-либо краю клетки, имеет темную окраску фиолетового или фиолетово-бордового цвета, цитоплазма содержит разреженные включения фиолетового цвета и отличается большей прозрачностью (по сравнению с гранулоцитами) (см. Приложение III: рис. 2а, 2б, 2в, 2г).

Ядерно-цитоплазматическое отношение по сравнению с гиалиноцитами смещается в пользу цитоплазмы (см. табл. 3). На уровне электронной микроскопии [Hose et al., 1990] полугранулоциты (см. Приложение II: рис. 4В, 5В, 6В) имеют овальную форму, содержат большое количество мелких гранул, локализованных вокруг лопастного ядра, в то время как непосредственно под клеточной оболочкой расположен слой цитоплазмы, свободный от гранул. Помимо гранул в цитоплазме полугранулоцитов имеются расширенные каналцы ШЭР и вакуоли. Иногда можно наблюдать картины экзоцитоза их содержимого в гемолимфу. Цитоплазма включает также небольшие митохондрии и комплексы Гольджи [Hose et al., 1990; Jussilla, 1997].

Гранулоциты в только что отобранной гемолимфе морских декапод [Hose et al., 1990] имели бобовидную форму и крупные размеры (см. Приложение I: 1С, 2С, 3С). На окрашенных по Паппенгейму мазках камчатского краба длина веретенообразного гранулоцита может достигать до 33 мкм, ширина — до 12,45 мкм (см. Приложение III: рис. 3а). Ядерно-цитоплазматическое отношение у гранулоцитов по сравнению с клетками других типов в наибольшей степени сдвинуто в пользу цитоплазмы (см. табл. 3). Форма гранулоцитов на мазках овальная (см. Приложение III, рис. 3а) или округлая (см. Приложение III, рис. 3г). Небольшое округлое ядро таких гемоцитов занимает эксцентричное положение. Цитоплазма содержит обильные включения (гранулы), окрашивается в малиново-сиреневато-серые тона, ядро — фиолетовое с включениями бордового цвета. Оболочка гранулоцитов более мощная, чем у клеток других типов (см. Приложение III; рис. 3б, 3г). На уровне электронной микроскопии у морских декапод [Hose et al., 1990] видна лопастная структура ядра и крупные гранулы, заполняющие цитоплазму гранулоцита (Приложение II: рис. 4С, 5С, 6С); содержимое гранул по электронной плотности неоднородно.

**Не идентифицированные гемоциты.** В эту группу нами были включены клетки с признаками, не соответствующие характери-

кам трех известных типов гемоцитов (см. табл. 1). Их отличают следующие признаки: слабая выраженность (см. Приложение III, рис. 4а) или не выраженность (см. Приложение III, рис. 4б) обычных структур клетки (ядра, цитоплазмы) и груботяжистая структура ее поверхности. Клетки, имеющие четко выраженную цитоплазму (см. Приложение III, рис. 4в, 4г), отличаются от известных типов (см. табл. 1) по ее окраске (светлая, но не розовая), по складчатой структуре, практически лишенной включений, груботяжистым и ярко окрашенным ядром. Клетки, изображенные на рис. 4а, 4в Приложения III, в популяции гемоцитов камчатского краба присутствуют в большом количестве, их можно увидеть на разных участках мазка, в котором также содержатся много подобных клеток на разных стадиях распада.

**Разработка формулы крови.** Для определения гемоцитарной формулы проводят дифференцированный подсчет гемоцитов, относящихся к разным типам (группам), в том числе не идентифицируемые клетки. На мазках гемолимфы подсчитывают подряд все встречающиеся в поле зрения микроскопа клетки, отмечая их численность с учетом принадлежности к тем или иным группам, руководствуясь при этом рекомендациями Т.И. Ивановой [1982] по разработке формулы крови рыб. Подсчет клеток гемолимфы для гемоцитарной формулы нужно вести по удачно окрашенным мазкам на разных участках препарата, поскольку из-за различной клейкости и удельного веса гемоциты по мазку размещаются не равномерно. Всего считают не менее двухсот гемоцитов. Затем вычисляют процентное содержание разных групп. Дифференцированный подсчет клеток можно производить не только на сухих фиксированных и окрашенных препаратах, но и на свежих мазках, для чего конденсорное устройство микроскопа заменяют фазовоконтрастным. При составлении гемоцитарной формулы наряду с гемоцитами, тип которых удалось установить, следует указывать число не идентифицированных клеток, делая, по возможности, их описание.

Прижизненное определение  
физиологического состояния речных раков  
по гематологическим показателям

3.1. Краткие сведения о речных раках  
из водоемов европейской части России

В водоемах европейской части России обитают речные раки относящиеся к подсемейству *Astacinae*, семейства *Astacidae* Latreille, 1802, к роду *Astacus* Fabricius, 1775 и роду *Pontastacus* Bott, 1950 [Бродский, 1983]. (Здесь и далее по тексту таксономические названия раков приведены по классификации Я.И. Старобогатова [Starobogatov, 1995]). Речные раки подсемейства *Astacinae* населяют преимущественно пресные водоемы бассейна Атлантики в пределах всей Европы. Таксономический состав раков этого подсемейства в водоемах западной и восточной частей Европы различен. В Западной Европе астацины представлены родами *Atlantastacus*, *Austropotamobius*, *Astacus*. Речные раки России объединены в три рода — *Astacus*, *Pontastacus*, *Caspiastacus* [последний из них — новый род по Starobogatov, 1995]. Представитель р. *Caspiastacus* — *C. pachypus* (Rathke, 1837) обитает в солоноватых водах Каспия и Таганрогского залива Азовского моря. Типичный широкопалый рак *Astacus a. astacus* (Linnaeus, 1758) населяет водоемы бассейна Финского залива на Северо-Западе России, в которых встречаются также и понтические раки р. *Pontastacus*. Типичный длинопалый рак *P. l. leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) обитает в водоемах бассейна р. Волги, охватывающего территории лесной, степной и полупустынной ландшафтно-климатических зон. В пределах водосбора р. Кубань и в нижнем притоке Дона — р. Сал распространен кубанский рак — *P. cubanicus* (Birstein, Winogradow, 1934). В результате создания новых водных путей и проведения акклиматизационных мероприятий в настоящее



время представители подсемейства Astacinae, обитают в водоемах Урала, Алтайского Края, юга Западной Сибири.

Ухудшение экологического состояния водоемов на территориях с развитой промышленностью и сельским хозяйством привело к сокращению ареала широкопалого рака *Astacus astacus*, и к разрыву ранее сплошного ареала понтичных раков. Современная российская часть ареала широкопалого рака сосредоточена в Северо-Западном регионе, главным образом, в водоемах Псковской и Ленинградской областей. Ареал понтичных раков представлен отдельными участками в пределах бассейнов крупных рек — Волги, Днепра, Дона, Урала, впадающих в Каспийское, Черное и Азовское моря. Выпадение астацин из состава автохтонных биоценозов экологами рассматривается как событие, за которым могут последовать нарушения в функционировании водных экосистем, чреватые снижением качества воды и ухудшением состояния окружающей среды. Этот вопрос обсуждался на 12-м Международном симпозиуме во Флоренции (1999 г.) и 12-м симпозиуме Международной Ассоциации астакологов (1998 г.), где были приняты решения о необходимости сохранять и восстанавливать популяции автохтонных видов речных раков там, где они были утрачены [Holdich, 1998].

Природные запасы астацин издавна эксплуатируются промыслом. Изготавливаемая из речных раков деликатесная продукция пользуется устойчивым потребительским спросом в Западной Европе и в России. В конце XIX и в начале XX века Российская Империя (затем СССР) ежегодно поставляла на европейские рынки до половины мировой добычи раков, уровень которой в те годы не превышал 2 тыс. т. В конце XIX — начале XX века только из Псковской губернии ежегодно вывозили до 435 т широкопалого рака. Современные ракопромысловые районы сосредоточены в водоемах Юга России — в Волго-Каспийском, Азово-Донском и Азово-Кубанском бассейнах. Северо-Запад и Центральная Россия как ракопромысловые районы практически утратили свое значение. В Псковской области ведется только лицензионный лов широкопалого рака населением, в Ленинградской области этот вид речного рака внесен в Красную книгу [Горбатовский, 2004].

В целом современный (учтенный) вылов речных раков по водоемам европейской части России не превышает 80 т. К причинам резкого сокращения в России запасов этих гидробионтов относятся: во-первых, ухудшение водного питания рек и озер из-за снижения уровня грунтовых вод, происшедшего в результате мелиоративных работ по осушению болот 1960–1970 гг. Падение уровня и ускорившаяся эвтрофикация озер привели к разрушению среды обитания раков и гибели многих популяций. Во-вторых — это интенсивный лов речных

раков не только промысловиками, но и населением, которое вылавливает раков всех возрастов в масштабах сравнимых с промыслом, что быстро приводит к уничтожению популяции [Штейнфельд, 1957]. В-третьих — перенос с орудиями лова патогенных микроорганизмов *Aphanomyces astaci*, *Saprolegnia parasitica* и др., вызывающих эпизоотию называемую «чума раков». Меры по восстановлению запасов речных раков должны быть направлены на регулирование лова, на мониторинг состояния популяций раков и среды их обитания, на охрану водоемов, и на воспроизводство рачных запасов путем выпуска в водоемы заводского посадочного материала. В этой связи необходимо создавать опорные Астакологические центры (станции) в районах, перспективных для ведения рачного хозяйства [Александрова, Новоженин, Серветник, 2008].

Речные раки обитают на дне водоема преимущественно в литоральной зоне, избегают участков, покрытых большим слоем жидкого ила. Во время линек, вынашивания икры (самки), и в зимний период раки укрываются среди камней и коряг или в норах, которые выкапывают в береговых склонах и донных откосах. Оптимальный для роста и линек *A. astacus* диапазон летних температур в водоемах Северо-Запада и Центральной России — 15–21 °С, *P. leptodactylus* — до 24 °С [Справочник по раколовству..., 2006]. Широкопалый рак активен в темное время суток, длиннопалый — и в светлое время суток. В питании раки проявляют эврифагию, выполняя при этом роль санитаров водоема. Астацины весьма требовательны к хорошему качеству водной среды, состоянию грунта и подвержены многим заболеваниям. В хороших рачных водоемах рН воды слабо щелочная ( $\geq 7,2$ ), концентрация растворенного кислорода  $>6-7$  мг/л, кальция  $\geq 40$  мг/л, величина перманганатной окисляемости — около 10 мг О/л. К загрязнению и недостатку кислорода более чувствителен широкопалый рак, в несколько меньшей степени — длиннопалый рак.

Как и у других декапод, рост тела у речных раков происходит неравномерно (рывками) в первые две недели в период после линьки до затвердения нового панциря. В первый год жизни (водоемы лесной зоны) рачок может линять до 8 раз, во второй год — до 5 раз, на третий год — 2 раза. Отложившие икру и выносившие личинок самки линяют после схода с них личинок один раз в год; участвовавшие в спаривании самцы линяют на следующий год 2 раза. В южных водоемах (степная и полупустынная зоны) за вегетационный сезон взрослые самцы могут линять три раза, самки — два. После шестилетнего возраста число линек сокращается; старые раки перестают линять. Размножаются раки один раз в год при достижении полной (зоологической) длины тела в 9–10 см. В водоемах степной и полупустынной

зон Европейской части России это может произойти на 2-й или 3-й год жизни, в водоемах лесной зоны — на 3-й или 4-й год. Окончательное созревание половых продуктов у раков происходит после линьки в конце лета или в начале осени. Абсолютная плодовитость одной самки широкопалого рака может несколько превышать 200 икринок, у самок длиннопалого рака в зависимости от длины тела и условий существования в среднем бывает от 194–481 икринок. Раки могут жить до 15 лет, но в промысловых водоемах продолжительность их жизни не превышает 5–6 лет [Цукерзис, 1989].

В водоемах лесной зоны речные раки спариваются обычно в октябре при снижении температуры воды ниже 10 °С. Через 10–20 дней после оплодотворения самки рака откладывают икру, затем происходят первые стадии дробления оплодотворенной икринки, но зимой этот процесс приостанавливается. Основное развитие эмбриона у широкопалого и длиннопалого раков происходит весной, личинки I-й возрастной стадии вылупляются из икры в июне. Постэмбриональное развитие речных раков прямое, без промежуточных планктонных личиночных стадий, как, например, у камчатского краба. Личинки I-й стадии отличаются от взрослых раков недоразвитым абдоминальным отделом, формой карапакса, строением первой пары клешней и другими признаками. Подобными по строению тела взрослому раку они становятся после первой линьки на II-й стадии. Еще находясь на самке, личинки постепенно переходят к самостоятельному питанию и покидают ее только в конце II стадии. Вторая и последующие четыре линьки происходят у личинок, приступивших к самостоятельному образу жизни. Личиночный период заканчивается после 6-й линьки, когда рачок достигает примерно 2 см длиной и веса около 1 г [Мажилис, 1979; Борисов, 1999].

В водоемах степной и полупустынной зон раки спариваются весной — в апреле; эмбрион без латентного периода быстро развивается; вылупление личинки происходит в начале июня. Период, благоприятный для роста личинок и сеголеток в этих зонах более продолжителен.

**Осмотические свойства и электролитный состав гемолимфы речного рака.** Обитание в пресной воде требует от животного такой осмотической регуляции, при которой могла бы поддерживаться высокая концентрация жидкостей тела. Живя в пресной воде, рак может поддерживать высокую внутреннюю концентрацию (табл. 4) благодаря низкой проницаемости для воды, а также двух физиологических процессов, протекающих с затратой энергии — активному поглощению солей жабрами и реабсорбции солей (или выделению воды) в почках. Жидкость из целомического мешка и из лабиринта почки

Таблица 4

**Показатели, характеризующие осморегуляторные свойства  
речных раков [по Проссер и Браун, 1967]**

Анализируемые жидкости	Осмотическая концентрация жидкости		Содержание Cl <sup>-</sup> , ммоль/л	Объем/выделение мочи	
	в осмолях, осмоль/л	в понижении точки замерзания, Δ, °С		мл/ч · 60 г	за 1 ч, % от веса тела
Среда	0,0065	-0,018	0,271*	—	
Кровь	0,42	-0,81	195	—	
Моча	0,124	-0,09	10	0,095	0,158–0,217

\* Содержание Cl<sup>-</sup> (9,6 мг/л) в пресной воде с общей минерализацией 204 мг/л рассчитано по таблице Rodhe (1949) [по Китаеву, 1984]

представляет собой фильтрат, практически изоосмотичный по отношению к гемолимфе. В нефридиальном канале, повидимому, происходит реабсорбция хлоридов и других растворенных веществ, после чего разведенная моча поступает в мочево́й пузырь. На текущий момент различие между содержанием хлоридов в моче и в крови объясняется либо тем, что происходит реабсорбция солей в кровь, либо тем, что почки секретируют воду. Когда к среде, в которой находится рак, добавляют соли, концентрация мочи увеличивается; в изоосмотических растворах образование мочи снижается до нуля. В каких бы условиях ни находился речной рак, в его моче всегда содержатся соли. У речного рака, живущего в воде, содержание натрия в которой составляет 0,4–2,0 ммоль/л, уровень натрия в крови может достигать 146 и более — до 200 ммоль/л, и даже при повышении концентрации натрия в среде до 100 ммоль/л этот уровень меняется лишь в небольших пределах (табл. 5).

Таблица 5

**Электролитный состав жидкостей тела [по Проссер, Браун, 1967]**

Показатели	Содержание элементов, ммоль на 1 л крови						Белок, мг/л
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	
Пресноводная среда*	0,48	0,059	2,7	0,375	—	—	—
Речной рак <i>Cambarus</i>	146	3,9	8,1	4,3	139	—	—

\* Концентрация выражена в ммоль элемента на 1 л воды

При этом если экспериментальным путем повысить в крови рака концентрацию  $\text{Na}^+$ , а затем перенести животное в обычную воду, то содержание  $\text{Na}^+$  быстро снизится до обычного уровня. Процессы регуляции содержания  $\text{Na}^+$  зависят от его концентрации в крови: при концентрации  $\text{Na}^+$  выше 200 ммоль/л выделение этого иона увеличивается, поглощение уменьшается; при концентрации  $\text{Na}^+$  в крови ниже 200 ммоль/л уменьшается выведение  $\text{Na}^+$  с мочой и увеличивается приток  $\text{Na}^+$ . После некоторого уменьшения содержания  $\text{Na}^+$  в крови речного рака (выдерживание в дистиллированной воде) активное поглощение этого иона может увеличиться почти в 7 раз. Механизмы осмотической регуляции позволяют пресноводным речным ракам поддерживать высокую концентрацию жидкостей тела и осуществлять гиперосмотический контроль, благодаря чему их удается сохранять живыми в течение одного и более месяцев в солоноватой воде, хотя обычно в ней эти виды раков не встречаются [Проссере и Браун, 1967]. Возможно, именно благодаря способности удерживать уровень концентрации жидкостей тела речные раки могут довольно долго переживать в безводных условиях. Эта физиологическая особенность речных раков используется при доставке их с места вылова до места их культивирования или реализации.

Физиологические процессы речных раков, связанные с водным обменом, проходимость ионов и осморегуляцией, изменяются во время линочного цикла. Чтобы расширить новый мягкий экзоскелет раки активно поглощают воду в постлиньке. Из-за притока воды во время линьки, осмотическое давление в гемолимфе на начальных стадиях постлиньки снижается. Самой низкой осморегуляторная способность рака бывает до и после линьки.

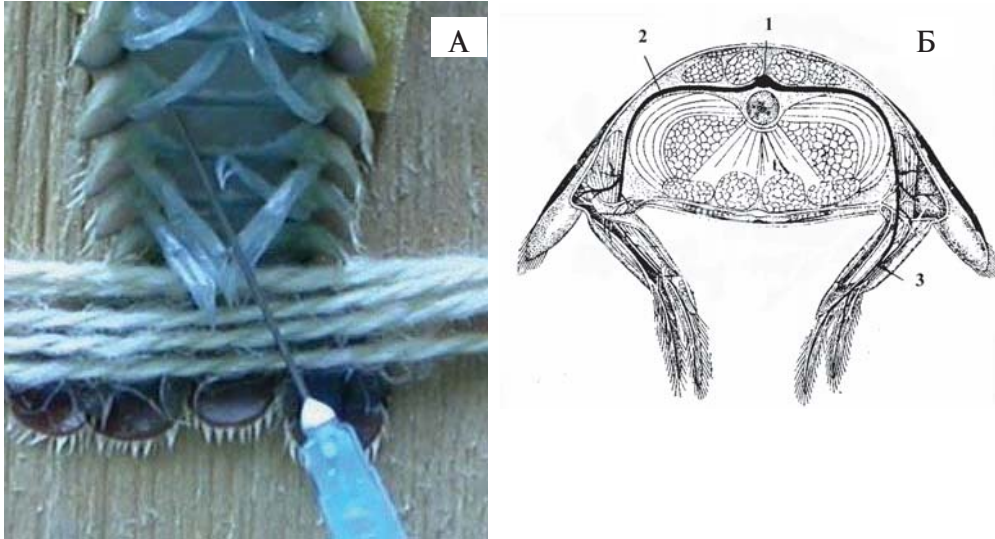
Состав экзоскелета широкопалого рака, концентрация в нем органических (хитин, протеин) и неорганических (в основном фосфаты и карбонаты кальция) веществ изменяется в ходе линочного цикла, что вызывает изменения ионного состава гемолимфы, которая входит в систему промежуточного обмена. Так при подготовке к линьке на стадии предлиньки в процессе переноса кальция из экзоскелета и депонирования его в гастролитах, прилегающих к стенкам желудка, концентрация этого элемента в гемолимфе увеличивается с 11,8 до 15,0 ммоль/л [Greenaway, 1974]. Процесс отвердения кутикулы после линьки осуществляется за счет переноса кальция из гастролитов и синтеза специфических белков кутикулы — ортроподина и склеротина, образующих с солями кальция комплексные структуры. Кальций попадает в панцирь через гемолимфу и внутренние покровы кутикулы [Мацкявичене, 1979].

### 3.2. Определение гематологических показателей при оценке физиологического состояния речных раков

Гематологические показатели, пригодные для прижизненного определения физиологического статуса речных раков, были отобраны в соответствии с общими требованиями, сформулированными Л.С. Смит [1986] к аналогичным показателям. У речных раков, наиболее массовый вес которых 40–60 г, при щадящем (не снижающем жизнестойкости животного) отборе гемолимфы не следует извлекать более 0,5 мл гемолимфы. В этой связи при прижизненном определении физиологического состояния *каждой* особи используют гематологические показатели первой группы, значения которых определяют по 1–3-м каплям гемолимфы, применяя элементарное оборудование (см. разд. 2.2; Приложение, табл. 1). Определение буферной емкости гемолимфы также возможно выполнить путем капельного анализа, метод которого следует отработать. Показатели второй группы, для определения которых требуются значительные объемы гемолимфы, применительно к речным ракам могут быть получены групповым способом при смешивании гемолимфы от сходных по физиологическому состоянию особей методами, описанными в разд. 2.2.

#### 3.2.1. Отбор гемолимфы

Отбор гемолимфы речных раков по методу, разработанному К. Содерхаллом с соавторами [Soderhall, Johansson, Smith, 1988], не связан с особыми трудностями, и его можно осуществлять, не нарушая жизнеспособность исследуемого животного. Это обстоятельство делает возможным внедрить в практику астацикультуры прижизненный контроль физиологического состояния речных раков по гематологическим показателям. При щадящем отборе гемолимфы иглой (0,8 мм) стерильного шприца объемом 2–2,5 мл прокалывают тонкую кутикулу с вентральной стороны абдомена под плавательной ножкой (рис. 4), и осторожно (без воздушных пузырьков) извлекают не более 0,4–0,5 мл гемолимфы с соблюдением норм санитарии [Soderhall et al., 1988]. Если отбор гемолимфы производят не часто, раки способны переносить эту процедуру. Интенсивный отбор гемолимфы приводит к задержке линек, а иногда и к гибели раков (наши наблюдения в 2008 г.). Последнее не допустимо в работе с производителями.



**Рис. 4.** Щадящий отбор гемолимфы речного рака из кровеносного сосуда плавательных ножек (плеопод): *А* — отбор гемолимфы стерильным шприцом из-под правой плеоподы второй пары; *Б* — схема ответвления сосуда, снабжающего гемолимфой плеоподы речного рака (*Astacus astacus*):

*1* — arteria dorsalis pleica; *2* — arteria lateralis abdominalis;  
*3* — arteria pedis spurii [по Иванову, Мончадскому и др., 1946]

### 3.2.2. Цвет, прозрачность, рН, свертываемость гемолимфы

Цвет, прозрачность, рН, свертываемость гемолимфы определяют визуально. У длиннопалого рака гемолимфа имеет слабо кремоватой цветовой оттенок, у широкопалого рака *Astacus astacus* при половом созревании гемолимфа приобретает розоватый оттенок. Зеленоватый цвет гемолимфы широкопалого рака может указывать на вероятность бактериемии [Котлярчук и др., 2007].

Степень прозрачности гемолимфы также представляет интерес для прижизненного тестирования состояния декапод. Помутнение гемолимфы может быть связано с повышением концентрации кальция и указывать на подготовку животного к линьке.

Время свертывания гемолимфы речных раков — изменчивый показатель, увеличение которого может свидетельствовать о сублетальном состоянии животного, а сокращение — о начальных стадиях стресса [Evans, 1999]. Следует отметить, что критерии, по которым определяют время свертывания гемолимфы декапод, требуют уточнения и универсализации, поскольку приведенные в литературе сведения

получены разными методами [Алякринская, Коржуев, 1981; Fotedar et al., 2001; Jussilla et al., 2001].

При ориентировочном определении рН гемолимфы речных раков (в связи с малым объемом пробы от каждой особи «щадающим» методом) можно использовать индикаторные полоски, на которые наносят каплю гемолимфы и в первые же секунды после этого определяют изменение цвета по универсальной шкале, изображенной на пенале с индикаторными полосками.

Измерение этого показателя на точном анализаторе «Radiometer» после 24-х часовой экспозиции на воздухе (вынутых из воды) речных раков *Procambarus clarkii* [McMahon, Stuart, 1999] позволило зафиксировать небольшие, но достоверные сдвиги рН в кислую сторону (7,48 по артериальной и 7,45 по венозной крови). Значение этого показателя у интактных раков из обычных условий равнялось 7,64. Небольшие сдвиги этого показателя у испытывавших сильный стресс раков подтверждают вывод о том, что клетки большинства животных приспособлены к жизнедеятельности в узком диапазоне рН, а также, что при определении рН гемолимфы необходимо пользоваться средствами точного измерения (рН электродами электронного анализатора серии «Эксперт» или анализатора «Radiometer»).

### 3.2.3. Буферность гемолимфы

Способ определения этого показателя по И.О. Алякринской и П.А. Коржуеву [1981] изложен в подраз. 2.2.3. Быстрый сдвиг рН в кислую сторону при титровании гемолимфы 0,1 N соляной кислотой свидетельствует о понижении жизнестойкости тестируемой особи, о риске нарушения гомеостаза и возможном развитии ацидоза.

Для определения значений буферной емкости гемолимфы у речных раков, учитывая ограничения по объемам отбираемой у них гемолимфы при прижизненном тестировании, следует отработать метод капельного анализа, применяя при титровании микропипетки и подобрав соответствующую концентрацию соляной кислоты для титрования. Оценка результатов проведенных анализов должна проводиться путем сравнения с аналогичными данными по подобным в физиологическом статусе ракам, содержащимся в благоприятных условиях.

### 3.2.4. Определение концентрации белка в гемолимфе

Определение концентрации белка в гемолимфе речных раков удобно проводить на рефрактометре (подробнее о применении для определения белка рефрактометрического метода см. в подраз. 2.2.4).



Общее содержание белка в гемолимфе речного рака *Astacus astacus* в течение межлиночного цикла колеблется от 2,2 до 6,3 г-%, изменяясь в зависимости от физиологического состояния особей [Crowley, 1963]. В предлиночный период количество протеина в гемолимфе увеличивается, затем снижается и до прежнего уровня восстанавливается лишь в конце послелиночного периода. Тенденция к повышению уровня белков гемолимфы непосредственно перед линькой обусловлена перемещением резорбированных протеинов из старого экзоскелета.

По данным Н.Я. Черкашиной и др. [1989] в период нереста содержание белка в гемолимфе половозрелых особей кубанского рака *P. sibanicus* было минимальным — 6,31 и 6,87 г-% у самок и самцов длиной тела 12–13 см (максимальная концентрация белка у раков обоего пола этой размерной группы ~10 г-%). Снижение уровня белка в гемолимфе половозрелых самок и самцов может указывать на их участие в размножении. Критическое содержание белка в гемолимфе кубанского рака определено в 2 г-%.

Нами была определена зависимость данных по концентрации общего белка в гемолимфе речных раков *A. astacus*, *Pontastacus leptodactylus* от характера анализируемых проб (гемолимфа цельная только что отобранная или замороженная; гемолимфа после центрифугирования). Эксперименты осуществлялись в период с 05.06.2008 по 05.11.2008 г., исследуемые раки находились на разных стадиях линочного цикла, концентрация белка измерялась на рефрактометре ИРФ-454Б2М.

Первую серию опытов по рефракции проводили по пробам цельной гемолимфы не позднее 1–2 мин после их отбора, затем через 20 мин по центрифугатам; повторную серию — по тем же пробам цельной гемолимфы спустя 1–2 ч или через несколько суток их хранения в холодильнике. Определение общего белка показало близкие результаты замеров по цельной гемолимфе сразу после ее отбора и через некоторое время независимо от его продолжительности. Также мало отличались результаты измерений проб по только что отобранной и затем охлажденной до 4–5 °С цельной гемолимфы, после хранения в холодильнике на протяжении от 3-х до 6 сут. Наибольшие отличия в величинах белка были выявлены между свежееотобранной цельной гемолимфой и ее центрифугатом, что объясняется распадом гемоцитов при центрифугировании и излиянием их содержимого в плазму. Известно, что гемолиз искажает показатели, увеличивая значение общего белка при рефрактометрии [Яржомбек, Лиманский, Щербина, 1986].

Полученные результаты согласуются с мнением [Paterson et al., 1999] о том, что корректные данные о концентрации белка могут

быть получены по цельной гемолимфе, а не только по ее сыворотке, которую принято использовать для этих целей при обследовании позвоночных животных.

Физиологический статус речных раков можно оценивать по уровню общего белка в гемолимфе, однако интерпретация полученных значений должна проводиться путем сравнения с нормами для этого показателя и с учетом линочного цикла и пола, стадии зрелости, возраста и т.п.

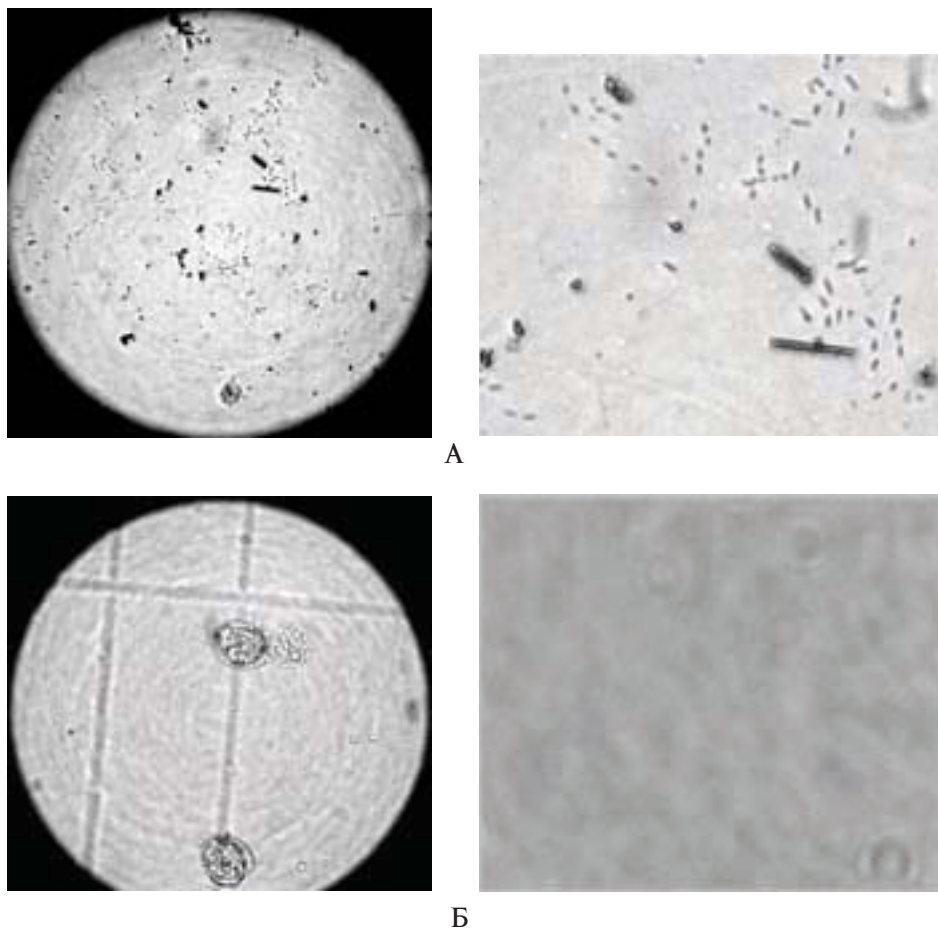
**Концентрация гемоцианина, кальция, глюкозы и лактатов в гемолимфе речных раков** биохимическими методами в традиционном исполнении [Справочник ..., 1991] у речных раков может определяться только по групповым пробам, отобраным от нескольких особей, находящихся в сходном физиологическом состоянии. При разведении речных раков такой подход может быть применен при определении состояния речных раков в природных популяциях, например, при выборе источников диких производителей для формирования маточных стад [Александрова, 2005].

### *3.2.5. Подсчет общего числа гемоцитов и визуальная оценка состояния защитной системы речных раков*

Подсчет общего числа гемоцитов связан с определением трех показателей — общее число гемоцитов, доля в нем гранулоцитов, а также присутствие бактерий в гемолимфе. Для подсчета можно использовать камеру для ручного счета кровяных клеток и световой микроскоп.

Во время счета гемоцитов речных раков на сетке камеры Горяева в гемолимфе могут быть обнаружены бактерии и обломки гемоцитов (см. рис. 5А). Такой вид гемолимфы свидетельствует о снижении иммунитета речного рака и наблюдался нами у переживших транспортировку животных, испытавших продолжительное воздействие стрессогенных факторов — длительного содержания в ящиках без воды при переуплотнении. Наблюдение за раками с такими показателями показало, что патогенные микроорганизмы в их гемолимфе размножаются и вызывают его гибель. У здорового рака (см. рис. 5Б) бактерии уничтожаются в результате активизации защитной системы (см. рис. 1), а разрушенные гемоциты подвергаются лизису.

**Общее число гемоцитов (ОЧГ)** в гемолимфе речных раков можно определять (см. Приложение, табл. 1–4), используя камеру Горяева для счета форменных элементов крови и световой микроскоп [Persson et al., 1987; Jussilla, 1997]. При подсчете числа гемоцитов следует руководствоваться методическими рекомендациями Н.Т. Ивановой



**Рис. 5.** Вид гемолимфы и гемоцитов широкопалого рака в камере Горяева (световой микроскоп, ув.500х): *А* — бактерии и обломки распавшихся гемоцитов в гемолимфе еще живого, но вскоре погибшего рака; *Б* — гемоциты (справа) и гемолимфа (слева) жизнеспособного рака; в поле микроскопа виден фрагмент выгравированной сетки

[1983] по подсчету лейкоцитов у рыб. Счет гемоцитов, когда их больше 1000 шт., ведут по 50-ти большим квадратам на разных участках сетки. Если гемоцитов мало (<300), особенно при работе с разбавленной антикоагулянт гемолимфой, просчитывают все гемоциты на сетке.

При работе с цельной гемолимфой улучшить результаты подсчета ОЧГ и частично преодолеть такое обстоятельство, как оседание и приклеивание гемоцитов к стенкам шприца, можно, если заполнить камеру первыми двумя каплями гемолимфы сразу же после отбора

пробы. С этой целью также используют антикоагулянт, предварительно заполняя им шприц в соотношении 1:1 к планируемому объему гемолимфы [Soderhall, Smith, 1993; Jussilla, 1997; Lucić, Erben, 2005]. Для работы с гемолимфой речных раков К. Содерхаллом с соавторами [Soderhall et al., 1988] рекомендуется антикоагулянт, подобный антикоагулянту для морских декапод [Soderhall, Smith, 1983], но с пониженной концентрацией NaCl (составы наиболее часто используемых антикоагулянтов, как они представлены в литературе (см. Приложение, табл. 4).

Проведенное нами сравнение результатов подсчета ОЧГ у речных раков *P. l. leptodactylus* и *A. astacus* при использовании первых двух капель цельной гемолимфы и гемолимфы, разведенной антикоагулянтом, достоверных отличий не выявило. Средняя и статистическая ошибка ОЧГ в пробах без антикоагулянта —  $274 \pm 70$  ( $n = 5$ ); в пробах с антикоагулянтом —  $318,0 \pm 131,5$  ( $n = 5$ ), разность между ними не достоверна ( $t_{st} = 0,30$ ;  $P < 0,05$ ). Применение антикоагулянтов при работе с отобранной гемолимфой показало, что для получения полностью разведенной смеси химических ингредиентов, среди которых есть трудно растворимые вещества, необходимо опытным путем определить оптимальную последовательность их разведения, измеряя рН раствора после добавления каждого ингредиента.

Использование антикоагулянта в известной степени предотвращает распад и образование сгустков клеток, что облегчает и делает более точным подсчет общего числа гемоцитов, хотя равномерного распределения гемоцитов в разведенной гемолимфе добиться нелегко. Подготовка антикоагулянта непосредственно перед отбором гемолимфы в полевых условиях создает дополнительные трудности. Для получения более равномерного распределения гемоцитов на мазке, что важно при дифференцированном подсчете гемоцитов, разработан метод для работы с кровяными клетками у *Cancer magister* [Mix and Sparks, 1980], изложенный в подраз. 3.2.6.

Общее число гемоцитов у речных раков увеличивается по мере приближения линьки и снижается к межлиночному периоду [Jussilla, 1997]. При длительном содержании в аквариумах и возможности отслеживать каждого рака индивидуально были получены данные, подтверждающие существование динамики ОЧГ в связи с линочными циклами. Приблизительно за 20–25 сут перед линькой ОЧГ начинает увеличиваться, а к межлиночному периоду постепенно снижается (табл. 6). У жизнеспособных речных раков (*A. astacus*, *P. leptodactylus*, *P. salinus*) общее число гемоцитов изменялось в широких пределах (см. табл. 6).

Таблица 6

Общее число гемоцитов в разные периоды  
линочного цикла у здоровых самцов *Pontastacus salinus*  
[Александрова, Пронина, Корягина, 2005]

Статистические показатели	Этапы линочного цикла		
	Межлиночный	Предлиночный	Постлиночный
Среднее число гемоцитов (М) в мм <sup>3</sup> гемлимфы	733,6	1140,3	1195,3
σ	453,3	440,5	557,2
m	171,3	166,5	185,7
n	7	7	9
Критерий t <sub>st</sub> достоверности М	4,28**	6,85***	6,44***

Примечание. Вероятность ошибочного суждения при оценке достоверности выборочной средней: \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001

С другой стороны повышение уровня ОЧГ является характерным физиологическим ответом на стресс в ранней стадии тревожного состояния, или результатом спровоцированного митогенетического возбуждения, когда в сравнении с физиологической нормой увеличение ОЧГ может быть значительным [Persson et al., 1987; Sequiera et al., 1996]. Снижение ОЧГ ниже физиологических норм может свидетельствовать об ухудшении состояния здоровья и ослаблении иммунитета у зараженных или угнетенных воздействием загрязняющих веществ животных. Резкое снижение числа кровяных клеток и их разрушение — это патофизиологический ответ на поздней стадии стресса в фазе сопротивления [Evans, 1999].

Доля гранулоцитов в популяции гемоцитов широкопалого и длиннопалого раков (Приложение, табл. 1–4) может быть определена уже при подсчете ОЧГ, т.к. этот тип клеток хорошо идентифицируется под микроскопом даже без окраски (см. рис. 5). Как индикатор жизнеспособности этот показатель был использован при работе с *Panuluris cygnis* [Paterson et al., 2005]. Уменьшение доли гранулоцитов может свидетельствовать о приостановке гемоцитопоэза, носить сублетальный или возрастной характер, а также свидетельствовать о состоянии иммунитета, поскольку гранулоциты являются носителями бактерицидных факторов, и уменьшение их доли в популяции гемоцитов может указывать на ослабление защитной функции организма.

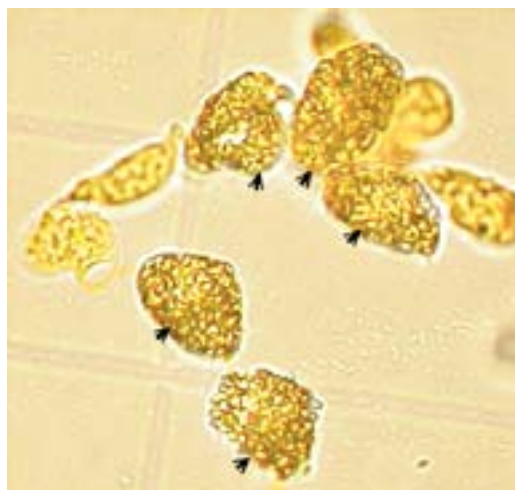
### 3.2.6. Гемоцитарная формула и дифференцированный подсчет гемоцитов речных раков

Соотношение разных типов гемоцитов в гемолимфе речных раков, характеризует их физиологический и иммунологический статус [Persson et al, 1987; Soderhall et al., 1988]. Таким способом можно контролировать состояние этих пресноводных ракообразных в условиях культивирования и в природных популяциях [Jussilla, 1997; Hijran et al., 2002; Lucić, Erben, 2005]. Для распознавания типовой принадлежности гемоцитов речных раков и их дифференцированного подсчета на предметных стеклах делают мазки гемолимфы сразу же после ее отбора. Красивые и четкие картины клеток крови речных раков получают при фиксации и окрашивании подсушенных мазков по методу Паппенгейма, применяемому в гематологии при изучении морфологии кроветворения, а также нормальной и патологической крови [Роскин, 1946]. Интенсивность окраски по этому методу зависит от рН дистиллированной воды, используемой для обработки мазков; оптимальная реакция которой должна находиться в границах 6,8–7,0.

Гемоциты речных раков на сделанных нами мазках были распределены не равномерно, особенно гранулоциты, которые находились преимущественно в начале мазка. Это свидетельствует о свойстве клеток этого типа интенсивнее других оседать и прилипать к предметному стеклу во время сушки препарата. Более равномерное распределение гемоцитов по мазку можно получить при отборе гемолимфы шприцом, заполненным 10 % формалином, который затем на 2–3 ч помещают в холодильник. Каплю обработанной таким образом гемолимфы наносят на предметное стекло, вращая шприц для поддержания гемоцитов во взвешенном состоянии [Mix, Sparks, 1980]. Подсушенный мазок фиксируют метиловым спиртом и окрашивают по Райт (модификация метода Романовского-Гимзы). По мнению работавших с гемолимфой *Cancer magister* выше названных авторов, этот метод позволяет получать единообразные мазки, что важно при сравнениях с материалами других исследователей.

Распознавание гемоцитов по типовой принадлежности у речных раков ведется с использованием возможностей световой [Черкашина и др., 1989; Jussilla, 1997; Александрова и др., 2007] и электронной микроскопии [Мартынова и др., 2008]. В прижизненном состоянии гранулоциты и многие полугранулоциты могут быть распознаны в темном поле под фазово-контрастной оптикой [Soderhall et al., 1983; 1988]. Поскольку гранулоциты у речных раков хорошо отличимы под микроскопом, их долю в популяции гемоцитов можно определить во

время счета ОЧГ в камере Горяева (рис. 6), но идентификация других типов клеток — гиалиноцитов и полугранулоцитов в цельной гемолимфе без витального окрашивания не надежна. Измерение гемоцитов в нашем исследовании проводилось компьютерными средствами по микрофотографиям гемоцитов, лежащих на сетке камеры Горяева, длина стороны малого квадрата которой равна 50 мкм (см. рис. 6).



*Рис. 6.* Гемоциты самца речного рака *Pontastacus salinus* на сетке камеры Горяева — пять гранулоцитов (отмечены стрелками) несколько секунд спустя после отбора гемолимфы

Более надежную идентификацию гемоцитов позволяет провести их прижизненное окрашивание кристалл- или генцианвиолетом [Jussilla, 1997] (см. Приложение IV, рис. 1ж, 1з, 2б, 3д). На окрашенных мазках в популяции гемоцитов речных раков можно распознать три типа клеток — гиалиноциты, полугранулоциты и гранулоциты, соответствующие в основных чертах описаниям табл. 1 и выделить прогиалиноциты. Данные по размерам прогиалиноцитов в табл. 7 не представлены, поскольку эти клетки на окрашенных мазках половозрелых самцов и самок речных раков были редки сравнительно с мазками гемолимфы, отобранной у пререкрутов камчатского краба (см. табл. 3). Результаты измерений трех типов гемоцитов речных раков приведены в табл. 7. Наряду с гемоцитами известных типов у речных раков часто встречаются клетки с иными признаками (Приложение VI, рис. 4а–4г).

*Таблица 7*

Размеры гемоцитов речных раков в мазках, окрашенных по Паппенгейму

Тип гемоцита	Размер гемоцитов, мкм		Размер ядра, мкм		Ядерно-цитоплазматическое отношение, %	Число измеренных гемоцитов, экз.
	длина (max)	ширина (min)	длина (max)	ширина (min)		
Гиалиноциты	14,45±0,85	12,92±0,77	11,88±0,90	9,42±0,35	60,0±1,34	10
Полугранулоциты	27,18±1,58	21,36±1,76	15,0±0,48	10,15±0,46	28,08±2,44	10
Гранулоциты	26,00±0,82	24,26±1,04	13,61±0,52	7,74±0,32	17,17±1,28	10

**Описание типов гемоцитов речных раков.** Прижизненная морфология гемоцитов речных раков изучалась одновременно с подсчетом ОЧГ в камере Горяева, а также по фиксированным и окрашенным мазкам с использованием возможностей световой микроскопии и фотографирования.

Определение морфологических особенностей и типологической принадлежности гемоцитов речных раков проводили по индикаторным цитологическим характеристикам (см. табл. 1), на основании наблюдений за клетками в камере Горяева, в т.ч. с использованием антикоагулянта и прижизненного окрашивания клеток кристаллвиолетом, а также по мазкам, фиксированным и окрашенным по Паппенгейму. Были использованы возможности световой микроскопии (Jenaval), макросъемки и компьютерных технологий (см. подразд. 2.2.6).

**Гиалиноциты и прогиалиноциты** в камере Горяева, заполненной только что отобранной гемолимфой, имели веретенообразную форму (см. Приложение IV, рис. 1а, 1в) и в течение первой же минуты округлялись (см. Приложение IV, рис. 1б, 1д). При смешивании гемолимфы с антикоагулянтом многие гиалиноциты довольно долго остаются веретенообразными. Самые маленькие из них, вероятно, прогиалиноциты были бесцветны и прозрачны. У такой веретенообразной клетки длина может достигать 28 мкм; та же округлившаяся клетка имеет размеры —  $10,6 \times 8,96$  мкм (см. Приложение IV, рис. 1г, 1д, соответственно). Окрашивание кристаллвиолетом выделяет у прогиалиноцита узкий слой более светлой, чем ядро цитоплазмы с шарообразными уплотнениями. Ядро большое и темноокрашенное. Ядерно-цитоплазматическое отношение прижизненно окрашенных прогиалиноцитов (см. Приложение IV, рис. 1ж, 1з) составляло 46,2–55,3 %, т.е. ядро занимало больше половины всей площади клетки. На фиксированных и окрашенных по Паппенгейму мазках у этих клеток четко выделяется ядро фиолетово-бордового цвета и небольшой ободок цитоплазмы фиолетового цвета с коричневатым оттенком (см. Приложение VI, рис. 1а). У гиалиноцитов появляется светло-розовая цитоплазма с шарообразными уплотнениями и без включений (см. Приложение VI, рис. 1б, 1г); если же включения имеются (см. Приложение VI, рис. 1в), то они необильны. Ядерно-цитоплазматическое отношение — 60,0 % (см. табл. 7). Под электронным микроскопом [Мартынова и др., 2008] у гиалиноцитов хорошо просматривается занимающее большую часть площади клетки лопастное ядро, окруженное узким ободком цитоплазмы, содержащей мелкие гранулы, небольшое количество митохондрий, расширенные каналцы ШЭР, вакуоли и ламеллярные тельца (Приложение V, рис. а).

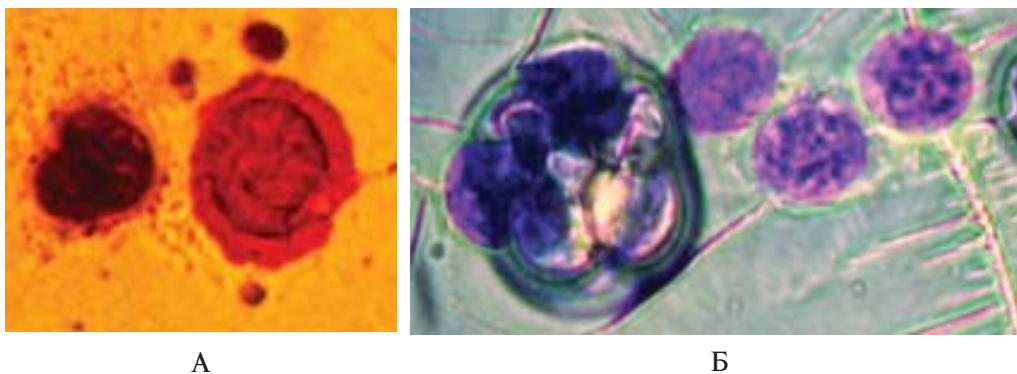


Полугранулоциты в только что отобранной гемолимфе (инкубация в камере Горяева) имели утолщенную веретенообразную форму и становились округлыми по прошествии одной минуты (см. Приложение IV, рис. 2а, 2в). В среде гемолимфы, разбавленной антикоагулянтом, многие полугранулоциты остаются веретенообразными на протяжении нескольких минут (см. Приложение IV, рис. 2г, 2д). Окрашивание кристаллвиолетом выделило у полугранулоцита крупное овальной формы ядро и обильную светлую розово-фиолетовую цитоплазму с плазматическими включениями (см. Приложение IV, рис. 2ж). В среднем ядерно-цитоплазматическое отношение у полугранулоцитов — 28,1 % (см. табл. 7), т.е. ядро их уменьшается и это отношение сдвигается в пользу цитоплазмы. На окрашенных мазках полугранулоциты отличаются по четко выделяющемуся ядру густого бордового или фиолетового цвета и развитой бледно розовой цитоплазмой с обильными включениями (см. Приложение VI, рис. 2в, 2г). На уровне электронной микроскопии [Мартынова и др., 2008] полугранулоциты — овальные клетки средним размером около  $12,5 \times 7,5$  мкм; цитоплазма их содержит большое количество мелких гранул (см. Приложение V, рис. б). Гранулы локализуются вокруг лопастного ядра, а непосредственно под клеточной оболочкой расположен слой цитоплазмы, свободный от гранул. Клетки несут на поверхности небольшие выросты. Помимо гранул в цитоплазме полугранулоцитов имеются расширенные канальцы ШЭР и вакуоли. Цитоплазма содержит также небольшие митохондрии и комплексы Гольджи (см. табл. 1).

Гранулоциты при инкубации в среде гемолимфы (камера Горяева) отличались от других типов клеток крупными размерами по длине и ширине клетки и значительной оптической плотностью (не прозрачностью). После трех минут инкубации они изменяли веретенообразную форму на округлую (см. Приложение IV, рис. 3а, 3б). Длина веретенообразного гранулоцита (см. Приложение IV, рис. 3а) достигала 28,81 мкм, ширина — 13,36 мкм; в округлом состоянии его размеры стали —  $17,5 \times 17,6$  мкм (см. Приложение IV, рис. 3б). Распад гранулоцита и проявление его ядра (см. Приложение IV, рис. 3в) произошло на 9-й мин инкубации. При использовании антикоагулянта многие гранулоциты долго сохраняли веретенообразную форму (см. Приложение IV, рис. 3г). При окрашивании кристаллвиолетом у гранулоцита проявились обширная зона фиолетово-розовой цитоплазмы, включающей эндоплазматический ретикулум, гранулы, сравнительно небольшое фиолетовое ядро. Ядерно-цитоплазматическое отношение прижизненно окрашенного гранулоцита (см. Приложение IV, рис. 3д) составило 22,4 %, т.е. было сдвинуто в пользу цитоплазмы. На фиксированных и окрашенных по Паппенгейму мазках

целые округлые гранулоциты чаще встречаются (см. Приложение VI, рис. 3б, 3в, 3г), чем клетки вытянутой (см. Приложение IV, рис. 3а) формы. Ядро гранулоцита сравнительно небольшое, темно-бордового цвета, часто имеет округлую форму и занимает эксцентричное положение в клетке; цитоплазма содержит обильные включения (гранулы, эндоплазматическую сеть) и окрашивается в розово-коричневые тона, ядерно-цитоплазматическое отношение (среднее) — 17,7 % (см. табл. 7). Размеры гранулоцита вытянутой формы (см. Приложение IV, рис. 3а) — 35 × 22 мкм, округлого гранулоцита (см. Приложение IV, рис. 3в) — 31 × 28 мкм. Вид распадающихся при разрушении оболочки гранулоцитов бывает самым различным (см. Приложение IV, рис. 3в). На препаратах, подготовленных для электронной микроскопии [Мартынова и др., 2008], средний размер гранулоцитов — 24,5 × 10,5 мкм, форма ядра неглубоко лопастная, цитоплазма заполнена крупными гранулами, содержимое которых неоднородно по электронной плотности. В цитоплазме было отмечено несколько комплексов Гольджи, около которых расположены мелкие гранулы (см. Приложение V, рис. г).

**Не идентифицированные гемоциты.** В эту группу попадали клетки со смешанными морфологическими характеристиками или с признаками, не совпадающими с характеристиками трех известных типов гемоцитов. Такие клетки, как рис. 4б и 4в (см. Приложение VI) присутствуют в популяции гемоцитов речных раков в большом числе, особенно в постлиночный период (рис. 7). Они не отличаются особой клейкостью и при подготовке мазка (растягивание гемолимфы по предметному стеклу) распределяются как в начале, так и в конце



**Рис. 7.** Клетки гемолимфы речных раков, отклоняющиеся по своим признакам от описаний известных трех типов гемоцитов декапод: *А* — гемоцит типа клетки 4б (см. Приложение VI) и предполагаемая продукция его активности (стрелки); *Б* — гемоцит типа клетки 4г (см. Приложение VI); в левой части видна капсула из гемоцитов

препарата. Эти клетки распадаются в ответ на стресс; возможно, их основная задача — наработка веществ для укрепления нового покрова тела рака после линьки (см. рис. 7А). Также в популяции гемоцитов речных раков постоянно встречаются клетки без гранул со слабо красящейся цитоплазмой (см. Приложение VI, рис. 4г).

**Гемоцитарная формула** для речных раков разрабатывается аналогично описанию, составленному для камчатского краба в подразделе 2.2.6.

---

## Заключение

Исследования в области гематологии декапод показали, что анализ биохимических свойств гемолимфы и морфологической структуры гемоцитов позволяет определять физиологическое состояние этих ценных объектов промысла и культивирования. Гематологическое тестирование делает возможным, не нарушая жизнеспособности, и не причиняя экономического ущерба при обследовании выращиваемого в хозяйстве материала, получать информацию о его физиологическом состоянии в условиях культивирования, прогнозировать состояние природных популяций промысловых видов крабов, подбирать физиологически наиболее устойчивых особей в группы для транспортировки на далекие расстояния, в состав производителей при формировании маточных стад и т.п.

Основываясь на типологических характеристиках гемоцитов, разработанных в процессе изучения гематологии морских и пресноводных декапод, нами были идентифицированы три типа кровяных клеток в популяции гемоцитов камчатского краба и речных раков. Эти клетки преобладают в популяции гемоцитов исследованных объектов в межлиночный период, для которого характерна пониженная интенсивность обменных процессов. В наиболее напряженный для организма декапод постлиночный период, когда происходит формирование новых покровов тела, в популяции гемоцитов речных раков происходят значительные изменения. Гемоциты приобретают более яркую окраску, меняются их форма и структурные элементы, а также численность и соотношение в клеточной популяции.

Очевидно, что объективная оценка физиологического состояния декапод невозможна без знания изменчивости индикаторных гематологических показателей при нормальном течении физиологических процессов. Характер изменчивости индикаторных показателей должен быть определен и учитываться при интерпретации результатов гематологического тестирования.

В составе проблем филогенетического органогенеза подобные гематологические исследования, включая особенности формирования и функционирования в гемолимфе гемоцианина, гемоцитов, гуморально-клеточных взаимодействий и др. аспектов, позволят более точно определить место жидкостной системы десятиногих ракообразных в цепи эволюционного морфогенетического развития кровеносной системы мира животных.

Авторы выражают искреннюю благодарность за помощь в работе сотрудникам лаборатории воспроизводства ракообразных (ВНИРО) и лаборатории разведения речных раков ВНИИР: Р.Р. Борисову и А.В. Паршину-Чудину, содействовавшим в подборе иностранной литературы по гематологии декапод и в подготовке рисунков, а также В.И. Беляковой, оказавшей существенную помощь при постановке и проведении экспериментов с речными раками на базе ВНИИР.

---

## Литература

Абрикосов Г.Г., Беккер Э.Г., Бириштейн Я.А., Ланге А.Б., Левинсон Л.Б., Матвеев Б.С., Матекин П.В., Махотин А.А., Парамонов А.А. 1966. Курс зоологии. Том I. Зоология беспозвоночных (изд. 7, под ред. Б.С. Матвеева, П.В. Матекина).— М.: Изд-во «Высшая школа».— 552 с.

Александрова Е.Н. 2005. Методические указания по получению и использованию природного материала для разведения и воспроизводства речных раков. Россельхозакадемия.— М.: ООО «11-й ФОРМАТ».— 47 с.

Александрова Е.Н., Пронина Г.И., Корягина Н.Ю. 2005. О числе гемоцитов и некоторых свойствах гемолимфы речных раков *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) и *Pontastacus salinus* (Nordmann, 1842) (Decapoda, subfam. Astacinae): Мат. междунар. научно-практич. конф. «Аквакультура и интегрированные технологии: проблемы и возможности», 11–13 апреля 2005 г.— М.: ГНУ ВНИИР. Т. 1. С. 362–371.

Александрова Е.Н., Пронина Г.И., Корягина Н.Ю. 2008. О типах гемоцитов российских речных раков (Decapoda, Astacinae): Сб. научн. тр. «Вопросы рыбного хозяйства Беларуси». Вып. 24.— Минск: РУП «Институт рыбного хозяйства».— С. 237–240.

Александрова Е.Н., Новоженин Н.П., Серветник Г.И. 2008. О направлениях работ по восстановлению запасов автохтонных речных раков и развитию раководства в лесной зоне европейской части России // Современное состояние и перспективы развития аквакультуры в России.— М.: Минсельхоз РФ. С. 3–15.

Александрова Е.Н., Ковачева Н.П. 2010. Прижизненное определение физиологического статуса десятиногих ракообразных (Crustacea: Decapoda) по гематологическим показателям // Успехи физиологических наук. Т. 41. № 2.— С. 51–67.

Алякринская И.О. 1970. Количественная характеристика гемолимфы и гемоглобина роговой катушки *Planorbis corneus* (Gastropoda, Pulmonata) // Зоол. журн. Т. XLIX. Вып. 3.— С. 349–353.

Алякринская И.О., Коржув П.А. 1981. Биохимическая характеристика гемолимфы черноморских ракообразных // Доклады Академии Наук СССР. Т. 260. № 2.— С. 502–505.

Альтов А.В., Воробьева Н.К., Мухина И.Н. 2005. Результаты опытных работ по культивированию камчатского краба *Paralithodes camtchaticus* в прибрежных водах Баренцева моря // Мат. 7-й Всерос. конф. по промысловым беспозвоночным.— М.: ВНИРО.— С. 256.

Борисов Р.Р. 1999. Определение стадий развития и пола у личинок длиннопалого рака в первое лето жизни // Рыбн. хоз-во. Сер. Аквакультура: Информационный пакет.— М.: ВНИЭРХ. Вып. 1.— С. 18–31.

- Балаховский С.Д., Балаховский И.С. 1953. Методы химического анализа крови.— М.: Медгиз. 746 с.
- Бродський С.Я. 1981. Фауна України. Вищі раки. Річкові раки.— Київ: Наукова думка. Т. 26. Вип. 3.— 210 с. (In Ukrainian).
- Виноградов Л.Г. 1941. Камчатский краб. Владивосток: ТИНРО.— 94 с.
- Виноградов Л.Г. 1946. О географическом распространении камчатского краба // Изв. ТИНРО. Т. 22.— С. 195–232.
- Беренбойм Б.И. 2001. Состояние запасов и перспективы рационального использования промысловых беспозвоночных Баренцева моря // Мат. отчет. сесс. уч. сов. ПИНРО, посвященной 80-летию института. Мурманск: ПИНРО.— С. 69–72.
- Герасимова О.В., Кузмин С.А. 1997. Предложения к управлению запасом камчатского краба в Баренцевом море // Сб. научн. тр.: Исследования промысловых беспозвоночных в Баренцевом море.— Мурманск: ПИНРО.— С. 59–64.
- Головина Н.А., Тромбицкий И.Д. 1989. Гематология прудовых рыб.— Кишинев: «Штиинца».— 156 с.
- Горбатовский В.В. 2003. Красные книги субъектов Российской Федерации (справочное издание).— М.: НИИ-Природа.— 494 с.
- Дамсгорд Б. 2000. Поведение и рост искусственно выращенного в Норвегии камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* // Сб. научн. тр.: Марикультура в прибрежной зоне северных морей.— Мурманск: ПИНРО.— С. 19–26.
- Загорская Д.С. 2009. Биотехнологические и биохимические аспекты культивирования камчатского краба. Автореф. канд. дисс.— М.: Изд-во ВНИРО.— 24 с.
- Иванов А.В., Мончадский А.С., Полянский Ю.И., Стрелков А.А. 1946. Большой практикум по зоологии беспозвоночных. Часть II (под ред. проф. Ю.И. Полянского).— М.: изд. «Советская Наука».— 631 с.
- Иванов Б.Г. 2001. Десятиногие ракообразные (Crustacea, Decapoda) Северной Пацифики как фонд для интродукции в Атлантику: интродукция возможна, но целесообразна ли? // Сб. научн. тр.: Исследования биологии промысловых ракообразных и водорослей морей России.— М.: Изд-во ВНИРО.— С. 32–74.
- Иванова Н.Т. 1982. Атлас клеток крови рыб (сравнительная морфология и классификация форменных элементов крови рыб).— М.: Легкая промышленность.— 184 с.
- Казаев А.П. 1995. Влияние температуры воды и солености на развитие камчатского краба // Рыбн. хоз-во. Сер. Аквакультура: информ. пакет «Аквакультура: проблемы и достижения».— М.: ВНИЭРХ. Вып. 3.— С. 3–22.
- Китаев С.П. 1984. Экологические основы биопродуктивности озер разных природных зон.— М.: «Наука».— 206 с.
- Климин А.К. 2003. Камчатский краб *Paralithodes camtschaticus* у берегов Сахалина и Курильских островов: биология, распределение и функциональная структура ареала // Бюлл. журн. «Вопросы рыболовства».— М.: ФГУП «Нацрыбресурсы». Вып. 2.— 253 с.
- Ковачева Н.П. 1984. Сезонные и возрастные изменения крови карпа *Cyprinus carpio* L. // Тр. Пловдивского Университета «П. Хилендаски». Биология. Т. 22. Кн. 2.— С. 279–289.
- Ковачева Н.П. 2005. Камчатский краб как новый объект марикультуры. Сер. Марикультура.— М.: ЭИ ВНИЭРХ.— 40 с.
- Ковачева Н.П., Калинин А.В., Ткаченко В.П., Паршин-Чудин А.В. 2005. Содержание и дорастивание камчатского краба в бассейнах с проточной системой водоснабжения // Мат. II Междунар. конф. «Морские прибрежные экосистемы: водорос-

ли, беспозвоночные и продукты их переработки».— М.: Изд-во ВНИРО.— С. 151–153.

Ковачева Н.П. 2008. Аквакультура ракообразных отряда Decapoda: камчатский краб *Paralithodes camtschaticus* и гигантская пресноводная креветка *Macrobrachium rosenbergii*.— М.: Изд-во ВНИРО.— 239 с.

Котлярчук М.Ю., Чернова Е.С. 2007. Некоторые результаты изучения микробного пейзажа широкопалого рака *Astacus astacus* L. в водоемах Калининградской области // Расширен. матер. Междунар. научн.-практич. конфер. «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов-2». Борок-Москва, 2007.— С. 366–368.

Крепс Е.М. Смирнова А.А. 1935. К эволюции буферных свойств крови в животном мире. // Физиол. ж., 18, 3.— С. 345–349.

Кузьмин С.А. 2000. Биология, распределение и динамика численности камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* (Tilesius, 1815) в Баренцевом море: Автореф. Дисс. ... канд. биол. наук.— М.— 24 с.

Кузьмин С.А., Гудимова Е.Н. 2002. Вселение камчатского краба в Баренцево море. Особенности биологии, перспективы промысла.— Апатиты: КНЦ РАН.— 236 с.

Лебедев П.Т., Усович А.Т. 1976. Методы исследования кормов, органов и тканей животных.— М.: Россельхозиздат.— 359 с.

Левин В.С. 2001. Камчатский краб *Paralithodes camtschaticus*: биология, промысел, воспроизводство.— С-Пб.: Ижица.— 198 с.

Мажилис А.А. 1973. Химический состав и калорийность съедобных частей тела широкопалого рака // Тр. АН Литовской ССР. Сер. В. Т. 4 (64).— С. 147–152.

Мажилис А.А. 1979. Эмбриональное развитие широкопалого рака // В кн. Биология речных раков водоемов Литвы.— Вильнюс.— С. 28–40.

Макаров Р.Р. 1966. Личинки креветок, раков-отшельников и крабов западно-камчатского шельфа и их распределение.— М.: Наука.— 164 с.

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. 243–248.

Матюшкин В.Б., Ушакова М.В. 2002. Особенности личиночного цикла камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* и рака-отшельника *Pagurus pubescens* в фьордовых водах Западного Мурмана // Сб. научн. тр. ПИНРО: Биоресурсы и аквакультура в прибрежных районах Баренцева и Белого морей.— Мурманск: ПИНРО.— 206 с.

Мацкявичене Г.И. 1979. Некоторые особенности обмена веществ у широкопалого рака // В кн. Биология речных раков водоемов Литвы.— Вильнюс.— С. 85–120.

Мусеев С.И., Мусеева С.А. 2006. Изменения уровня гемоцинина в гемолимфе камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* баренцевоморской популяции в течение личиночного цикла // VII Всерос. конф. по промысловым беспозвоночным (памяти Б.Г. Иванова): Тез. Докл. Мурманск, 9–13 октября 2006 г.— М.: Изд-во ВНИРО.— С. 105–108.

Мусеева С.А., Мусеев С.И. 2008. Зависимость между наполнением конечностей мышечной тканью и концентрацией гемоцинина в гемолимфе у камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* баренцевоморской популяции // Вопросы рыболовства. Т. 9. № 1.— С. 200–217.

Немцев С.В. 2006. Комплексная технология хитина и хитозана из панциря ракообразных.— М.: Изд-во ВНИРО.— 134 с.

Орлов Ю.И. 1996. К биологии камчатского краба и акклиматизации его в водах Баренцева моря // Рыбн. хоз-во. Сер. Аквакультура: Информ. пакет. «Аквакультура: проблемы и достижения».— М.: ВНИЭРХ. Вып. 1–2.— С. 3–19.



- Павлов В.Я. 2003. Жизнеописание краба камчатского *Paralithodes camtschaticus* (Tilesius, 1815).— М.— 110 с.
- Павлов В.Я., Тальберг Н.Б. 2005. Оценка физиологических изменений в популяциях промысловых крабов под воздействием промысла // Труды ВНИРО. Т. 144.—М.: Изд-во ВНИРО.— С. 78–90.
- Проссер Л., Браун Ф. 1967. Сравнительная физиология животных (Перевод со второго английского издания: Prosser C.L., Brown F.A., Jr. Comparative animal physiology. Philadelphia, London, 1962 second edition, illustrated).— М.: Изд-во «Мир».— 766 с.
- Родин В.Е. 1985. Пространственная и функциональная структура популяций камчатского краба // Изв. ТИНРО. Т. 110.— С. 86–97.
- Роскин Г.И. 1946. Микроскопическая техника.— М.: Изд. «Советская Наука».— 328 с.
- Сенников А.М., Шацкий А.В. 2002. Промыслово-биологическая характеристика урагубской группировки камчатского краба // Сб. научн. тр.: Биоресурсы и аквакультура в прибрежных районах Баренцева и Белого морей.— М.— С. 98–109.
- Смит Л.С. 1986. Введение в физиологию рыб.—М.: Агропроиздат.— 166 с.
- Справочник: Лабораторные исследования в ветеринарии. Биохимические и микологические (под ред. Б.И. Антонова). 1991.— М.: ВО «Агропромиздат».— 287 с.
- Справочник: Раколовство и раководство на водоемах европейской части России (под ред. О.И. Мицкевич). 2006.— Санкт-Петербург: Изд. ГосНИОРХ.— 207 с.
- Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии (6-е русское изд. под ред. Г.Г. Газенко).— София: Гос. Издат. «Медицина и физкультура».— 1064 с.
- Федосеев В.Я., Родин В.Е. 1986. Воспроизводство и формирование популяционной структуры камчатского краба // Сб. научн. тр.: Динамика численности промысловых животных дальневосточных морей.— Владивосток: ТИНРО.— С. 35–46.
- Флоркэн М.Ф. 1947. Биохимическая эволюция.— М.: Изд-во Иностран. лит.— 176 с.
- Черкашина Н.Я., Коломейцева Е.Н., Карпенко В.Н. 1989. К качеству самок и самцов длиннопалого кубанского рака *Astacus leptodactylus cubanicus* Bir. et Win.: Сб. научн. тр.— ГосНИОРХ. Вып. 300.— С. 49–55.
- Штейнфельд А.Л. 1957. Биология и промысел речных раков в БССР // Тр. Белорусского отделения ВНИОРХ.— Изд. БелГУ. Т. 1.— С. 118–137.
- Цукерзис Я.М. 1989. Речные раки.— Вильнюс: Мокслас.— 140 с.
- Штейнфельд А.Л. 1957. Биология и промысел речных раков в БССР // Тр. Белорусского отделения ВНИОРХ.— Изд. БелГУ. Т. 1.— С. 118–137.
- Яржомбек Ф.Ф., Лиманский В.В., Щербина Т.В. и др. 1986. Справочник по физиологии рыб.— М.: Агропромиздат.— 192 с.
- Aono H., Mori K. 1996. Interaction between hemocytes and plasma is necessary for hemolymph coagulation in the spiny lobster, *Panulirus japonicus* // Comp. Biochem. and Physiol. 113A (3). P. 301–305 (цит. по Jussilla, 1997).
- Bauchau, A.G. Crustaceans. In Racliffe, N.A. and Rowley, A.F. (eds.). 1981. Academic Press. New York. Invertebrate Blood Cells. V. 2.— P. 385–420.
- Bauchau, A.G. 1986. Donneés resentes sur les hemocytes des crustaces // Cahers de biologie marine. T. XXVII. Cahier 3.— P. 279–287.
- Bazin F. 1979. Ultrastructure de l'organe hematopoiétique chez le crabe *Carcinus maenas* L. (Crustacea Decapoda) // Arch. Anal. Microsc. Morphol. Exp. 68.— P. 141–158 (цит. по Bauchau, 1986).

Chang, E. 1995. Physiological and biochemical changes during the molt cycle in decapod crustaceans: an overview // Journ. of Experimental Marine Biology and Ecology. 193.— P. 1–14.

Chisholm June R.S., Smith V.J. 1995. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species // Comp. Biochem. Physiol. V. 110A. № 1.— P. 39–45.

Cerenius L., Bangyeekhun E., Keyser P., Soderhall I., Soderhall K. 2003. Host prophenoloxidase expression in freshwater crayfish is linked to increased resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* // Cellular Microbiology, 5 (5), P. 353–357.

Cerenius L., Soderhall K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates // Immunol. Rev. 198. apr.: 116–126.

Cornick, J.W., Stewart J.E. 1978. Lobster *Homarus americanus* hemocytes counts, and associated agglutinin activity. J. Invertebr. Pathol., 31, 194–203 (цит. по Mix, Sparks, 1980).

Crowley, G.J. 1963. Studies in arthropod serology. Part I. Changes in hemolymph composition as related to the ecdysal cycle // Wassmann S. Biol. V. 21, N. 2.— P. 177–191.

Cuenot, I. 1895. Etudes physiologiques sur les crustacés décapodes. Arch. Biol., 13, 245–303 (цит. по Mix, Sparks, 1980).

Dall W., 1978. Studies on the physiology of a Shrimp *Metapenaeus* sp. (Crustacea Decapoda, Penaeidae) V. Calcium metabolism // Austral. J. Marine and Freshwater, 1965. V. 16. N. 2.— P. 181–203.

de Fur P.L., Wilkes P.R.H., McMahon B.R. 1980. Non-equilibrium acid-base status in *C. productus*: role of exoskeletal carbonate buffers // Respiration Physiology. 42.— P. 247–261 (цит. по Paterson et al., 2005).

Drach M. 1939. Mue et cycle d'intemue chez les Crustacés Décapodes // Ann.Int. Oceanogr.Paris. T. 19. N. 3.— P. 103–291.

Dolashki A. 2005. Structure Function and Properties of Copper-containing Proteins: Hemocyanins and Superoxide Dismutase. The dissertation on doctor's degree.— 189 p.

Durliat M. 1986. Interactions des protéines hémo-lymphatiques impliquées dans les mécanismes de défense chez les Crustacés Décapodes // Cahiers de biologie marine. T. XXVII. Cahier 3.— P. 279–287.

Durliat, M., Vranckx, R. 1976. Coagulation in the crayfish, *Astacus leptodactylus*: Attempts to Identify a Fibrinogen-like Factor in the Hemolymph // Biol. Bull. (Woods Hole), 151.— P. 467–477.

Evans L.H. 1999. Lobster health and disease: basic concepts: International Symposium on Lobster Health Management. Proceeding 19–21 September, Adelaide.— P. 3–8.

Fotedars, S., Tsvetnenko, E., Evans L. 2001. Effect of air exposure on the immune system of the rock lobster *Panulirus cygnus*. Marine and Freshwater Research 52 (8).— P. 1351–1355.

Greenaway P. 1974. Total body calcium and hemolymph calcium concentrations in the Crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). J. Exp. Biol., V. 61.— P. 19–26. (цит. по Фомичев, 1986).

Holdich, D.V. 1998. Native European crayfish — do they have a future? // 12-th International Symposium International Association of Astacology (abstracts), August 3–9, Haus St. Ulrich Augsburg. Germany.— P. 46.

Hose J.E., Martin G.G., Gerard A.S. 1990. A Decapod Hemocyte Classification Scheme, Integrating Morphology, Cytochemistry, and Function // Biol. Bull. 178: 33–45. (February, 1990).

Hijran Y.Y., Hasan H.A. 2002. Haemocyte Classification and Differential Counts in the Freshwater Crab, *Potamon fluviatilis* // Turk. J. Vet. Anim. Sci. 26.— P. 403–406.

- Johansson M.W, Keyser P, Sritunyalucksana K, Soderhall K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis // J. Aquaculture, 199 (1-3).— P. 45-52.
- Jones B. 1999. Cellular response to injury in spiny: International Symposium on Lobster Health Management. Proceeding 19-21 September, Adelaide.— P. 9-18.
- Jussilla, J. 1997. Physiological responses of Astacid and Parastacid Crayfishes (Crustacea: Decapoda) to conditions of intensive culture). Doctoral dissertation. University of Kuopio.— P. 1-138.
- Jussilla, J., Paganini, M., Mansefield, S., Evans, L.H. 1999. On physiological responses, hemolymph glucose, total hemocyte count and dehydration of marron (*Cherax tenuimanus*) to handling and transportation under simulated conditions / Freshwater Crayfish 12, 1999.— P. 154-167.
- Jussilla J, McBride S., Jago J., Evans L.H. 2001. Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Panulirus cygnus* George). Aquaculture, V. 199.— P. 185-193.
- Levin, J. 1967. Blood coagulation and endotoxin in invertebrates // Federation Proceedings. V. 26. N. 6 (November-December).— P. 1707-1712.
- LU Hong-da. 2002. Classification and morphological observations of hemocytes in *Eriocheir sinensis* by light and electron microscopies // Acte Hydrobiologia sinica. V. 26. N. 5, sept.— P. 494-500.
- Lucić A., Erben R. 2005. Seasonal changes of the condition indices and haemocyte counts of the *Austropotamobius torrentium* population in Kraljevec stream, Croatia // Bull. Fr. Pêche Piscic. 376-377: 687-697.
- Manjula P.L., Rahman K., Abraham T.J. 1997. Haemocyte classification and differential counts in the Indian spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus) // J. of Aquacult. in the Tropics. 12 (2).— P. 113-121 (цит. по Hijran, Hasan, 2001).
- McMahon, B.R., Stuart, S.A. 1999. Haemolymph gas exchange and ionic and acid-base regulation during long-term air exposure and aquatic recovery in *Procambarus clarkii* // Freshwater Crayfish 12.— P. 134-153.
- Mix M., Sparks A.K. 1980. Hemocyte Classification and Differential Counts in the Dungeness Crab, *Cancer magister* // J. of Invertebrate Pathology 35.— P. 134-143.
- Nakanishi T. 1987. Rearing conditions of eggs, larvae and postlarvae of king crab *Paralithodes camtschatica* // Bull. Jpn. Sea Nat. Fish. Res. Inst. V. 37.— P. 57-161.
- Orlov Yu.I., Ivanov B.G. 1978. On the introduction of the Kamchatka king crab *Paralithodes camtschatica* (Decapoda, Anomura: Lithodidae) into the Barents Sea // Mar. Biol., N. 48: 373-375.
- Persson, M., Cerenius, L., Soderhall, K. 1987. The influence of haemocyte number on the resistance of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci* // Jurnal of Fish Dis., 10.— P. 471-477.
- Paterson B.D., Davidson G.W., Spanoghe P.T. 1999. Measuring total protein concentration in blood of the western rock lobster *Panulirus cygnus* by refractometry: International Symposium on Lobster Health Management. Proceeding 19-21 September, Adelaide.— P. 110-115.
- Paterson B.D., Spanoghe P.T., Davidson G.W., Hosking W., Nottingham S., Jussilla J., Ewans L.H. 2005. Prediction survival of western rock lobster *Panuluris cygnus*, using discriminant analysis of hemolymph parameters taken immediately following simulated handling treatments // New Zealand Journ. of Marine and Freshwater Research, V. 39.— P. 1129-1143.
- Persson, M., Cerenius, L., Soderhall, K. 1987. The influence of haemocyte number on the resistance of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci*. Jurnal of Fish Dis., 10, 471-477.

- Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. 1979. Role of hemocytes in defense against biological agents. P. 332–414 in *Insect Hemocytes: Development, Form, Functions and Techniques*. A.P. Gupta, ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Riegel, J.A., Parker, R.A. 1960. A comparative study of crayfish blood volumes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1.— P. 302–304.
- Sequiera, T., Tavares, D., Aralachaves, M. 1996. Evidence for circulation hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*. // *J. Developmental and Comparative Immunology*, 20.— P. 97–104.
- Soderhall, K., Smith, V.J. 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine Decapods, and prophenoloxidase distribution // *J. Developmental and Comparative Immunology*. V. 7.— P. 229–239.
- Soderhall K., Johansson V.W., Smith V.J. 1988. Internal defence mechanisms // In *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation* / ed. Holdich D.M. and Lowery R.S.— P. 213–238.
- Soderhall K., Cerenius L. 1999. The crayfish *Plague Fungus*: History and Recent Advances // *Freshwater Crayfish* 12.— P. 11–35.
- Stewart J.E., Cornick J.W., Dingle J.R. 1967. An electronic method for counting lobster (*Homarus americanus* Milne Edwards) hemocytes and the influence of diet on hemocyte numbers and hemolymph proteins. // *Canadian J Zool* 45: P. 291–304.
- Starobogatov, Ya.I. 1995. Taxonomy and geographical distribution of crayfishes of Asia and East Europe (*Crustacea Decapoda Astacoidei*). *Russian Journ. of Arthropoda Research. Arthropoda Selecta*. V. 4. nos. 3–4.— P. 3–25. (Moscow, RMR Scientific Press LTD).
- Stevens B.G., Kittaka J. 1998. Postlarval setting behavior, substrate preference, and time to metamorphosis for red king crab *Paralithodes camtschaticus* // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* V. 167.— P. 197–206.
- Stewart J.E., Cornick J.W., Dingle J.R. 1967. An electronic method for counting lobster (*Homarus americanus* Milne Edwards) hemocytes and the influence of diet on hemocyte numbers and hemolymph proteins. // *Canadian J Zool*. 45.— P. 291–304.
- Tait, J. 1911. Types of crustacean blood coagulation. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 9.— P. 191–198.
- Truchot J.P. 1986. Adaptabilite de la liaison oxygene-hemocyanine chez les Crustaces Decapodes: Cas de l'hypoxie / *Cahiers de biologie marine*. T. XXVII. Cahier 3.— P. 290.
- Tsvetnenko E., Fotedar S., Evans L. 2001. Antibacterial activity in the haemolymph of western rock lobster *Panulirus cygnus* // *Marine and Freshwater Research*. 52 (8).— P. 1407–1412.
- Uglov R.F. 1969. Haemolymph protein concentrations in portunid crabs. I. Studies on adult *Carcinus maenas* // *Comp.Biochem. and Physiol.* N 30.— P. 1083–1090.
- Vacca L.L., Fingerman M. 1983. The roles of hemocytes in tanning during the molting cycle: a histochemical study of fiddler crab, *Uga pugilator*. // *J. Biol. Bull.* 165.— P. 777 (цит. по Jussilla, 1997).
- Van de Braak, C.B., Botterblom, M.H., Liu W., Taverne N., van der Knaap W.P., Rombout J.H. 2002. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) // *Fish Shellfish Immunol.* 12.— P. 253–272 (цит. по Мартыновой и др., 2008).
- Zuckerland, E. 1960. Немосциане и цувре chez un crustace decapode dans leurs rapports avec le cycle d'intennue // *Ann. Inst. Ocean.* 38. Fasc. 1.— P. 1–22 (цит. по Bauchau, 1986).

---

## Приложения

## Приложение

Таблица 1. Характеристики цельной гемолимфы декапод, определяемые в полевых условиях

П/п	Показатели	Виды декапод	Оцениваемые животные		Литературный источник
			Здоровые, жизнестойкие	Не жизнестойкие	
1.	Цвет гемолимфы (сразу после отбора из лакун)	<i>Astacus astacus</i>	Сероватая (самцы, не половозрелые самки)	–	Александрова и др., 2005
			Кремовато-розовая (половозрелые самки, самцы)	Зеленоватая	Мажилис, 1979; с. 30. Коглярчук, Чернова, 2007
	(гемолимфа отобрана из кардиального синуса)	<i>Pontastacus i. leptodactylus</i>	Бесцветная с сероватым оттенком	Зеленоватая	Александрова и др., 2005
			Голубоватая	–	Алякринская, Коржуев, 1981: стр.502
			46,4±13,0 (m±SD)*	55,2±15,2 (m±SD)*	Paterson et al., 2005
2.	Время свертывания, с	То же	Повышение на 1-й стадии стресса	Утрата свертываемости в стресс-фазе истощения	Evans, 1999, p. 5, fig. 1
3.	Присутствие бактерий в гемолимфе (визуальный учет в камере Горяева)	<i>Carcinus maenas</i>	26 (m**)	–	Алякринская, Коржуев, 1981
			10–50 (lim)***	–	Jusilla, 1997
4.	Общее число гемоцитов, млн/мл	<i>A. astacus</i>	–	+	
			0,76 (m**)	–	Lucic, Erben, 2005
5.	Доля гранулоцитов в ОЧГ, %	<i>Panulirus cygnus</i>	6,4±4,1 (m±SD)*	5,8±3,4 (m±SD)*	Paterson et al., 2005
			10,2±4,1 (m±SD)*	8,7±4,3 (m±SD)*	То же
6.	Гемоцитарная формула	<i>Cancer magister</i>			Mix, Spark, 1980

\* m±SD — средняя ± стандартное отклонение (сигма); \*\* m — средняя; \*\*\* lim — колебания значений показателей.

Таблица 2. Показатели гемолитфы, определяемые в лабораторных условиях

П/п	Показатели	Виды декапод (Decapoda)	Оцениваемые животные		Литературный источник		
			Здоровые, жизнестойкие	Нежизнестойкие или стрессированные			
1.	Концентрация общего белка, %;	<i>Scarcinus maenas</i>	Самцы: 2,3–8,2 (lim)*	–	Алякринская, Коржуев, 1981		
			Самки: 3,4–14,6 (lim)	–			
			2,2–6,3 (lim)	–			
	г/л	<i>P. subanicus</i>	4,7–5,9	≤2	Черкашина и др., 1989		
			<i>Ranulirus cugnus</i>	83,6±22,0 (m±SD)**		82,9±15,7 (m±SD)	Paterson et al., 2005
				<i>Procambarus clarkii</i>		7,64±0,04 (m±SD) 7,5–7,8 (lim)	
2.	рН (приборные измерения)	<i>P. subanicus</i>	7,6–7,78 (lim)	–	Черкашина и др., 1989;		
			<i>Scarcinus maenas</i>	8,3–7,2 (lim)		–	Алякринская, Коржуев, 1981
				То же		1,8 (m±SD)	
3.	Буферная емкость	–“–	Самцы: 1,0–9,6	–	–“–		
			Самки: 1,8–10,0	–			
4.	Cu <sup>++</sup> , мг-%	–“–	Самцы: 0,6–5,7	–	–“–		
			Самки: 1,1–5,9	–			
5.	Гемоцианин, г-%***	<i>Ranulirus cugnus</i>	0,3±0,1 (m±SD)	0,3±0,1 (m±SD)	Paterson et al., 2005		
			То же	14,1±2,0 (m±SD)		15,6±1,9 (m±SD)	
			–“–	1,2±1,2 (m±SD)		2,3±1,9 (m±SD)	
6.	Са <sup>++</sup> , мМ/л	–“–	2,7±1,9 (m±SD)	4,8±0,4 (3 ч вне воды) 10,9±4,6 (6 ч вне воды)	Jusilla, 1999: с. 159, т. II		
			То же	2,8±2,9 (m±SD)		8,1±4,7 (m±SD)	
7.	Глюкоза, мМ/л	–“–	2,8±2,9 (m±SD)	8,1±4,7 (m±SD)	Paterson et al., 2005		
			То же	2,8±2,9 (m±SD)		8,1±4,7 (m±SD)	
8.	Лактаты, мМ/л	–“–	2,8±2,9 (m±SD)	8,1±4,7 (m±SD)	Paterson et al., 2005		
			То же	2,8±2,9 (m±SD)		8,1±4,7 (m±SD)	

\* lim — колебания значений показателей; \*\* m±SD — средняя ± стандартное отклонение (сигма).

\*\*\* Единицы измерения: г-% х 10, когда надо сделать пересчет на к-во г в 1 л); мМ/л — миллимолей на 1 л.

Таблица 3\*. Содержание белка в сыворотке крови в зависимости от коэффициента рефракции

Показатель преломления	Белок, %	Показатель преломления	Белок, %	Показатель преломления	Белок, %
1,3370	0,63	1,3482	7,15	1,3527	9,73
1,3374	0,86	1,3483	7,20	1,3528	9,78
1,3378	1,08	1,3484	7,25	1,3529	9,84
1,3382	1,30	1,3485	7,31	1,3530	9,89
1,3386	1,52	1,3486	7,36	1,3531	9,94
1,3390	1,74	1,3487	7,42	1,3532	9,99
1,3393	1,96	1,3488	7,48	1,3533	10,05
1,3397	2,18	1,3489	7,54	1,3534	10,10
1,3401	2,40	1,3490	7,59	1,3535	10,17
1,3405	2,62	1,3491	7,63	1,3536	10,23
1,3412	2,84	1,3492	7,68	1,3537	10,28
1,3416	3,06	1,3493	7,73	1,3538	10,33
1,3420	3,50	1,3494	7,79	1,3539	10,39
1,3424	3,72	1,3495	7,83	1,3540	10,44
1,3427	3,94	1,3496	7,91	1,3541	10,49
1,3431	4,16	1,3497	7,96	1,3542	10,54
1,3435	4,38	1,3498	8,06	1,3543	10,60
1,3439	4,60	1,3499	8,12	1,3544	10,64
1,3443	4,81	1,3500	8,17	1,3545	10,70
1,3446	5,03	1,3501	8,23	1,3546	10,75
1,3450	5,25	1,3502	8,28	1,3547	10,80
1,3454	5,47	1,3503	8,33	1,3548	10,88
1,3458	5,68	1,3504	8,38	1,3549	10,90
1,3460	5,92	1,3505	8,44	1,3550	10,98
1,3461	5,97	1,3506	8,49	1,3551	11,04
1,3462	6,02	1,3507	8,55	1,3552	11,09
1,3463	6,07	1,3508	8,61	1,3553	11,15
1,3464	6,12	1,3509	8,71	1,3554	11,21
1,3465	6,18	1,3510	8,76	1,3555	11,26
1,3466	6,23	1,3511	8,82	1,3556	11,30
1,3467	6,29	1,3512	8,87	1,3557	11,37
1,3468	6,34	1,3513	8,92	1,3558	11,42
1,3469	6,40	1,3514	8,97	1,3559	11,47
1,3470	6,45	1,3515	9,03	1,3560	11,52
1,3471	6,50	1,3516	9,08	1,3561	11,57
1,3472	6,55	1,3517	9,14	1,3562	11,62
1,3473	6,60	1,3518	9,20	1,3563	11,67
1,3474	6,65	1,3519	9,26	1,3564	11,71
1,3475	6,71	1,3520	9,35	1,3565	11,77
1,3476	6,77	1,3521	9,41	1,3566	11,82
1,3477	6,82	1,3522	9,46	1,3567	11,87
1,3478	6,88	1,3523	9,51	1,3568	11,93
1,3479	6,93	1,3524	9,57	1,3569	11,98
1,3480	7,04	1,3525	9,63	1,3570	12,04
1,3481	7,10	1,3526	9,68	1,3571	12,10

\* Приведена по Лебедеву, Усович, 1976.

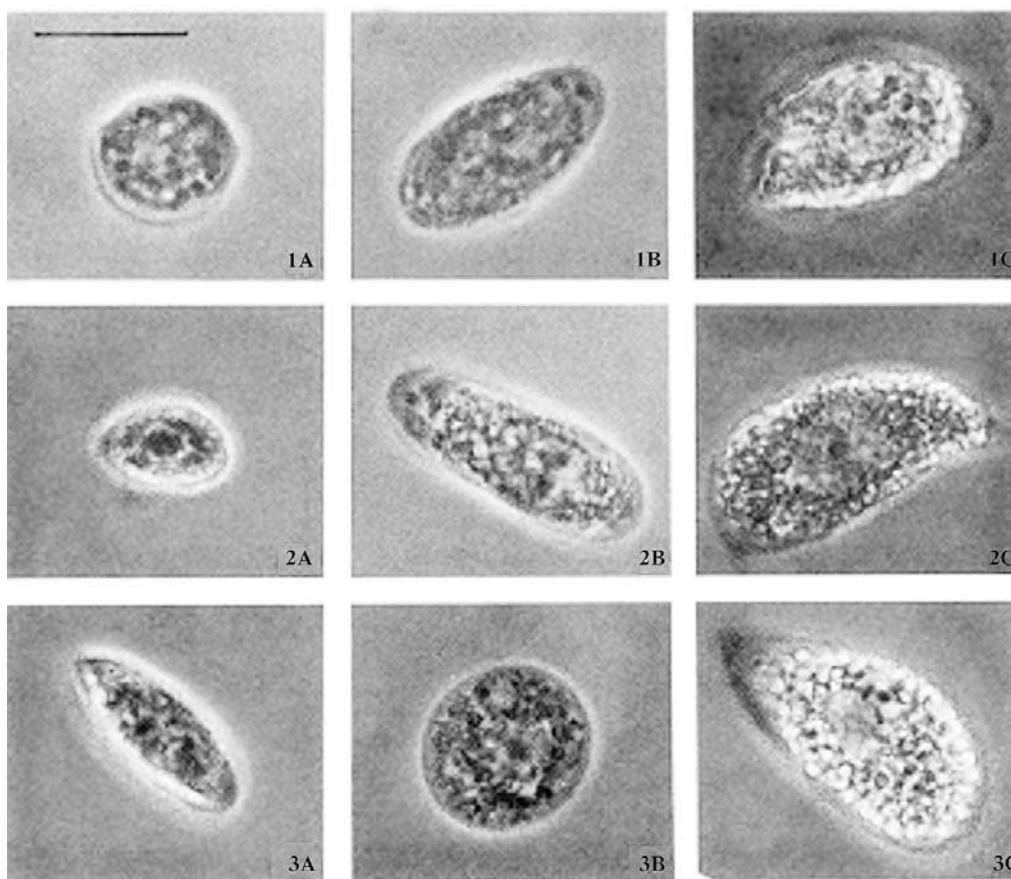


Таблица 4. Антикоагулянты, применяемые при проведении гемодитарных исследований у представителей *Desaroda*

Названия ингредиентов	Авторы-составители антикоагулянтов, номера (№№) антикоагулянтов; виды декапод						
	Hose et al., 1990: p. 35	Ghidalia et al., 1981; Omori et al., 1989	Soderhall, Smith, 1983: p. 231	Soderhall et al., 1988: p. 222	Lucic, Erben, 2005: p. 689	Jussila, 1997: p. 69	Jussila, 1999: p. 157-158
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7
	Омары	Креветки	Крабы	Речные раки	Речные раки	Речные раки	Речные раки
Концентрация, %		Концентрация в М (мМ) на 1 л					Масса ингредиентов на 100 мл H <sub>2</sub> O, г
1. Хлористый натрий	-	0,45 М	0,14 М	0,49 М	2,63	2,63	2,63
Этилендиннитрилтетрауксусной кислоты динатриевая соль 2-водная (трилон-Б)	-	-	-	-	1,12	1,12	1,12
2. Глюкоза	-	-	0,1 М	-	-	-	-
3. Лимоннокислый натрий трехзамещенный	12,5 %	10 %	30 мМ	30 мМ	30 мМ	-	-
4. Лимонная кислота моногидрат	-	-	26 мМ	26 мМ	-	0,55	0,55
5. Этилендиннитрилтетрауксусная кислота (ЭДТУ)	-	-	10 мМ	10 мМ	10 мМ	0,29	0,29
6. Дистиллированная вода	87,5 мл	90 мл	1 л	1 л	1 л	100 рН 6-7	100 рН 6-7
рН готовых антикоагулянтов	Нет данных	Нет данных	4,6	4,6	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Соотношение: гемолимфа: антикоагулянт	1:1	1:9	1:1	1:1	1:1	Нет данных	1:1:8**

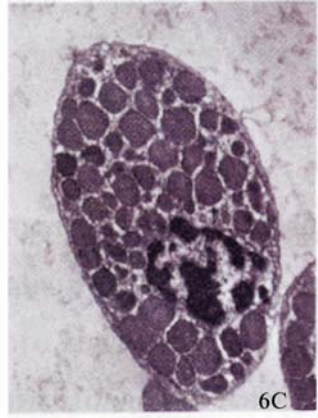
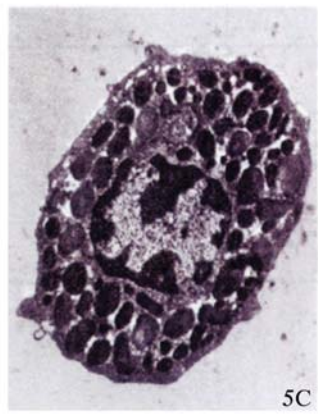
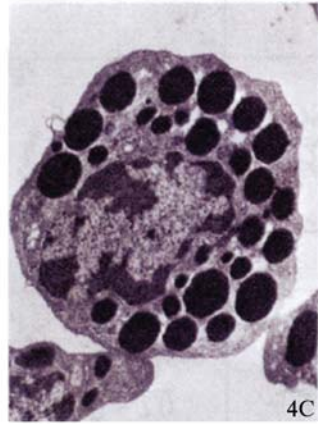
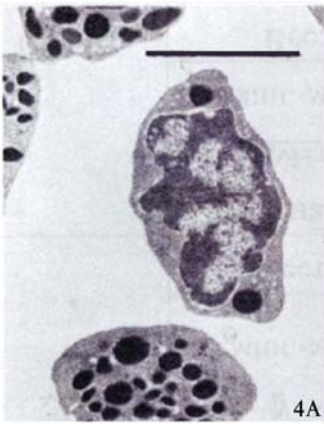
\* Трилон-Б использован только в модификации J. Jussila (37); \*\* для прижизненного окрашивания гемоцитов готовых антикоагулянт добавлен к 1,6 мл 0,2 % раствора генцианвиолета.

## Приложение I



Прижизненные микрофотографии гемоцитов морских декапод: *Panulirus interruptus* (рис. 1А, 1В, 1С), *Homarus americanus* (рис. 2А, 2В, 2С) и *Loxorhynchus grandis* (рис. 3А, 3В, 3С) в фазово-контрастном поле. Показаны типичные просвечивающие клетки (гиалиноциты) (колонка А), малые гранулоциты (колонка В), и большие гранулоциты (колонка С). Ув. 2600х; масштабная линейка = 10 мкм [по Nose, Martin, Gerard, 1990].

Приложение II



Электронная микрография гемоцитов *Panulirus interruptus* (рис. 4А, 4В, 4С), *Homarus americanus* (рис. 5А, 5В, 5С) и *Loxorhynchus grandis* (рис. 6А, 6В, 6С). Показаны типичные гиалиновые клетки (колонка А), гранулоциты с малыми гранулами (колонка В) и гранулоциты с большими гранулами (колонка С). Гранулы присутствуют в гиалиновых клетках, хотя их не много. Гранулоциты с маленькими гранулами в цитоплазме имеют маленькие гранулы в относительно большом количестве, в больших гранулоцитах гранулы заполняют большую часть цитоплазмы.

Все данные ув. В 5500х; масштабная линейка = 5 мкм.

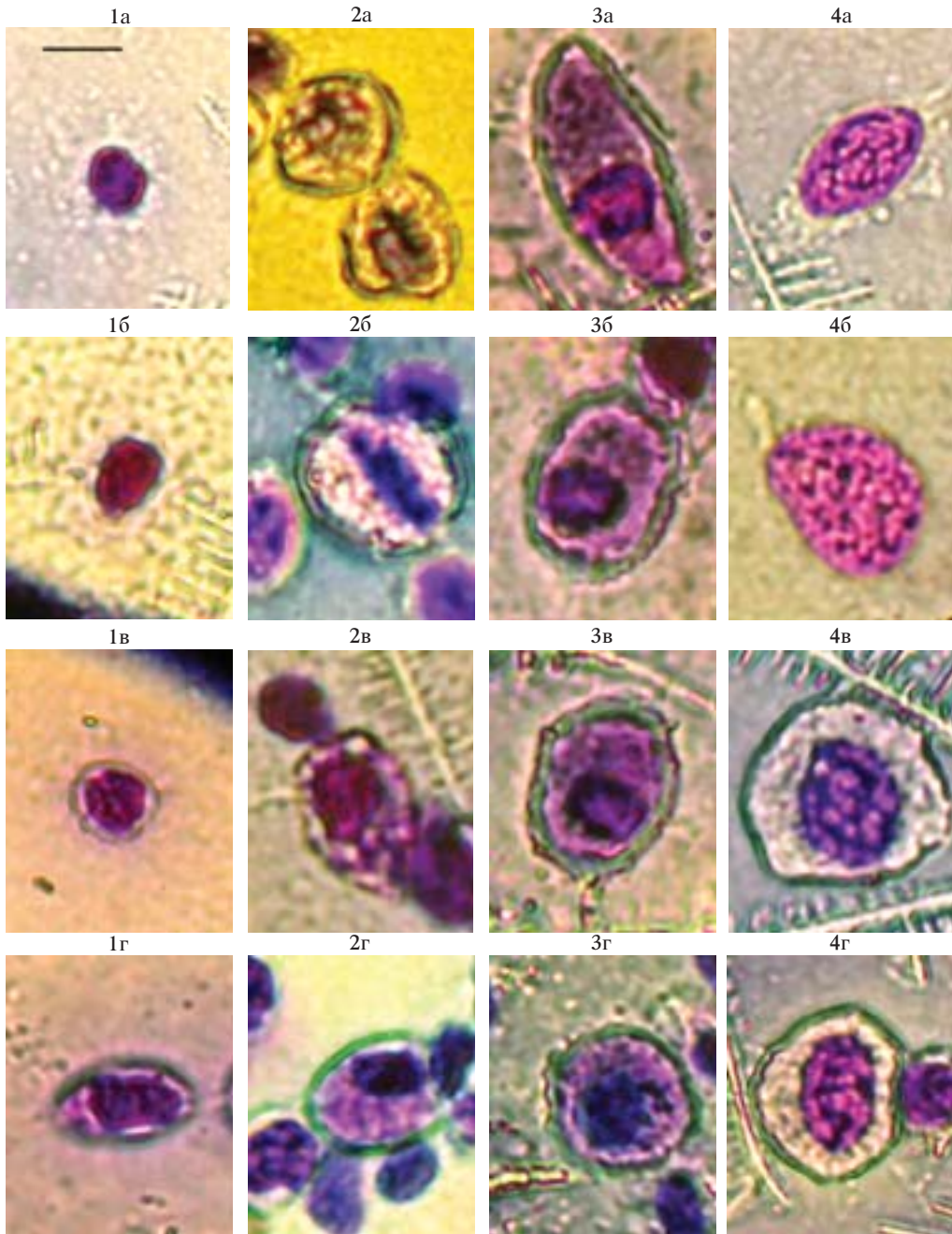
### Приложение III

*Прогиалиноциты  
и гиалиноциты*

*Полугранулоциты*

*Гранулоциты*

*Не идентифици-  
рованные клетки*



Световые микрофотографии гемоцитов камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* по мазкам, окрашенным по Паппенгейму. Показаны типичные прогиалиноциты и гиалиноциты (рис. 1а–1г), полугранулоциты (рис. 2а–2г), гранулоциты (рис. 3а–3г) и не идентифицированные клетки (рис. 4а–4г). Масштабная линейка = 10 мкм, ув. 500х.

Размеры гемоцитов самцов камчатского краба с шириной карапакса 120–130 мм, находящихся на межлиночной стадии. Измерены: длина (ДК) и ширина (ШК) клетки; длина (ДЯ) и ширина (ШЯ) ядра. Рассчитано ЯПО — ядерно-плазматическое отношение в %.

***Прогиалиноциты:***

1а — ДК × ШК = 8,62 × 6,54 мкм; ДЯ × ШЯ = 6,56 × 5,14 мкм; ЯПО = 59,9 %;

1б — ДК × ШК = 9,56 × 6,39 мкм; ДЯ × ШЯ = 7,09 × 4,52 мкм; ЯПО = 52,7 %;

***Гиалиноциты:***

1в — ДК × ШК = 9,49 × 9,09 мкм; ДЯ × ШЯ = 8,21 × 7,82 мкм; ЯПО = 74,3 %;

1г — ДК × ШК = 13,03 × 10,08 мкм; ДЯ × ШЯ = 10,76 × 8,58 мкм; ЯПО = 70,3 %;

***Полугранулоциты:***

2а — ДК × ШК = 15,92 × 12,94 мкм; ДЯ × ШЯ = 11,30 × 7,15 мкм; ЯПО = 39,2 %;

2б — ДК × ШК = 18,62 × 16,21 мкм; ДЯ × ШЯ = 15,48 × 5,45 мкм; ЯПО = 27,9 %;

2в — ДК × ШК = 20,82 × 13,60 мкм; ДЯ × ШЯ = 10,93 × 9,13 мкм; ЯПО = 35,2 %;

2г — ДК × ШК = 18,36 × 14,23 мкм; ДЯ × ШЯ = 13,09 × 8,01 мкм; ЯПО = 40,1 %;

***Гранулоциты:***

3а — ДК × ШК = 33,21 × 12,45 мкм; ДЯ × ШЯ = 11,00 × 8,41 мкм; ЯПО = 22,4 %;

3б — ДК × ШК = 19,95 × 14,62 мкм; ДЯ × ШЯ = 8,33 × 9,78 мкм; ЯПО = 30,0 %;

3в — ДК × ШК = 18,43 × 14,40 мкм; ДЯ × ШЯ = 9,50 × 7,03 мкм; ЯПО = 25,2 %;

3г — ДК × ШК = 17,32 × 15,81 мкм; ДЯ × ШЯ = 8,39 × 7,91 мкм; ЯПО = 23,4 %;

***Не идентифицированные клетки:***



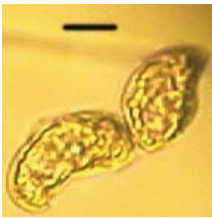



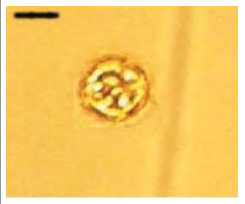
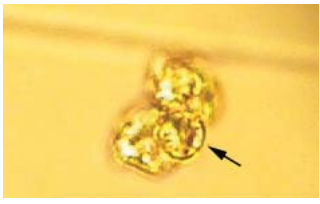
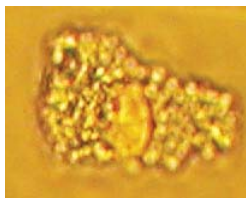
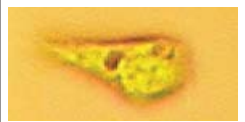


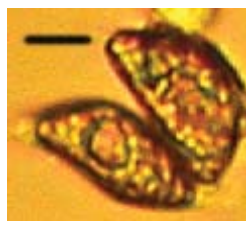




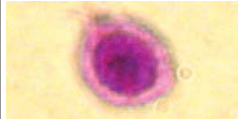
4а — ДЯ × ШЯ = 18,35 × 11,13 мкм;

4б — ДЯ × ШЯ = 22,47 × 16,95 мкм;

4в — ДК × ШК = 24,18 × 23,59 мкм; ДЯ × ШЯ = 17,0 × 12,84 мкм; ЯПО = 38,3 %;

4г — ДК × ШК = 19,80 × 16,86 мкм; ДЯ × ШЯ = 15,01 × 9,53 мкм; ЯПО = 42,8 %;

## Приложение IV

Среда для клеток	<i>Гиалиноцит</i>		<i>Полугранулоцит</i>		<i>Гранулоцит</i>	
I гемолимфа с антикоагулянтом и кристаллвиолетом	1а 	1б 	2а 	2б 	3а 	3б 
	1в 		2в 		3в 	
II гемолимфа с антикоагулянтом	1г 	2г 	2д 	3г 		
	1д 					
III гемолимфа с антикоагулянтом и кристаллвиолетом	1ж 	2ж 		3д 		
	1з 					

Световые микрофотографии живых гемоцитов речных раков в камере Горяева. На фотографиях показаны: не окрашенные гемоциты в среде цельной гемолимфы (I), не окрашенные (II) и окрашенные кристалливиолетом (III) гемоциты в среде гемолимфы, разведенной антикоагулянтом. Масштабная линейка = 10 мкм.

Размеры гемоцитов (ДК × ШК, ЯПО) половозрелых особей двух видов понтичных речных раков (род *Pontastacus* Bott, 1950):

I — не окрашенные гемоциты в среде цельной гемолимфы (пробы отобраны у половозрелых самцов *Pontastacus salinus*, длиной тела = 91–108 мм, весом — 24–34 г):

- 1а — *гиалиноцит*, имеющий веретенообразную форму, ДК × ШК = 32,09 × 8,40 мкм в первые секунды после отбора пробы;
- 1б, 1в — тот же гемоцит, округлившийся в течении 1-й мин, ДК × ШК = 16,16 × 11,16 мкм (1б) и 14,0 × 13,32 мкм (1в)
- 2а — *два полугранулоцита* — ДК × ШК = 26,17 × 12,69 мкм (2а, нижний);
- 2б — те же полугранулоциты, уплотняющиеся (2б) и распадающиеся;
- 2в — распавшаяся клеточная масса, на фоне которой просматривается ядро (отмечено стрелкой) одного из полугранулоцитов;
- 3а — *гранулоцит* веретенообразный, ДК × ШК = 28,81 × 13,36 мкм;
- 3б — *гранулоцит* округлившийся спустя 3 мин инкубации, ДК × ШК = 17,52 × 17,58 мкм;
- 3в — распадающийся гранулоцит ДК × ШК = 42,83 × 18,43 мкм.

II — не окрашенные гемоциты в среде гемолимфы, смешанной с антикоагулянтом (гемолимфа самца *P. leptodactylus*, длиной тела 114 мм, весом 42 г):

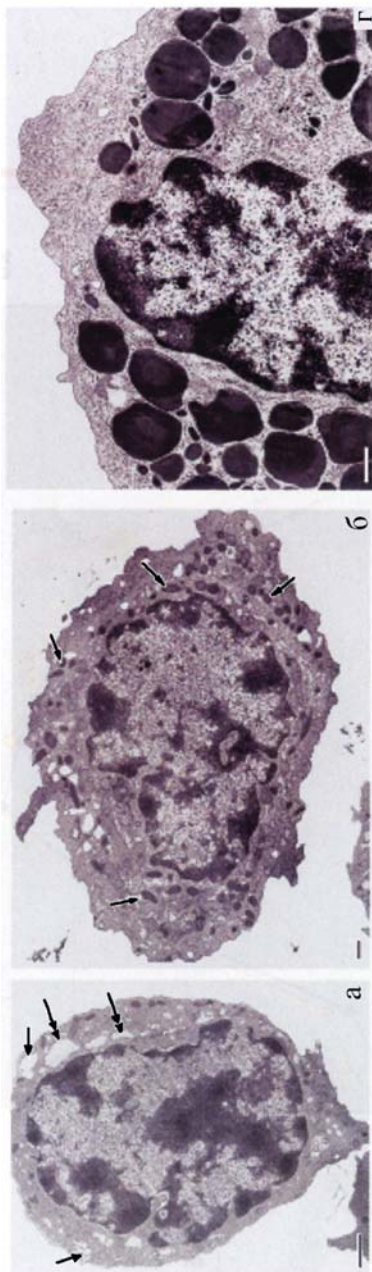
- 1г — *гиалиноцит* веретенообразный, ДК × ШК(max) = 27,79 × 12,49 мкм, ув. 125х;
- 1д — *гиалиноцит* округлившийся, ДК × ШК = 10,58 × 8,95 мкм, ув. 125х;
- 2г — *полугранулоцит*, видно овальное ядро, ДК × ШК = 45,04 × 11,35 мкм, ув. 125х;
- 2д — *полугранулоцит*, ДК × ШК = 28,03 × 12,81 мкм (верхний), ув. 125х;
- 3г — *два гранулоцита*, ДК × ШК = 26,71 × 10,29 мкм (нижний), ув. 125х.

III — гемоциты, окрашенные кристалливиолетом в среде гемолимфы, смешанной с антикоагулянтом (гемолимфа самки *P. leptodactylus*, длиной тела 128 мм, весом 57 г): *гиалиноциты*, ув. 500х:

- 1ж — ДК × ШК = 13,48 × 11,31 мкм; ЯПО = 46,20 %;
- 1з — ДК × ШК = 10,60 × 10,93 мкм; ЯПО = 55,31 %;
- 2ж — *полугранулоцит*, ДК × ШК = 21,86 × 13,24 мкм; ЯПО = 39,42 %, ув. 500х;
- 3д — *гранулоцит* веретенообразный, ДК × ШК = 33,23 × 14,88 мкм, ЯПО = 22,4 %, ув. 500х.



## Приложение V



Ультраструктура гемоцитов речного рака (*Astacus astacus*) [по Мартыновой и др., 2008]:  
*a* — агранулярный гемоцит с высоким ядерно-плазматическим отношением, содержит расширенные канальца ШЭР (двойные стрелки) и маленькие вакуоли (стрелки);  
*б* — гемоцит содержит наряду с расширенными канальцами ШЭР и вакуолями большое количество мелких электронно-плотных гранул (стрелки);  
*г* — гемоцит содержит множество крупных гранул.  
Масштабные отрезки (внизу слева) — 1 мкм.

## Приложение VI

*Прогиалиноциты  
и гиалиноциты*

*Полугранулоциты*

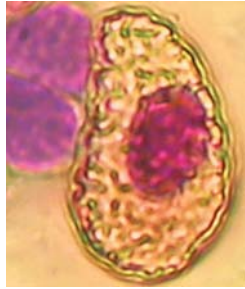
*Гранулоциты*

*Не идентифици-  
рованные клетки*

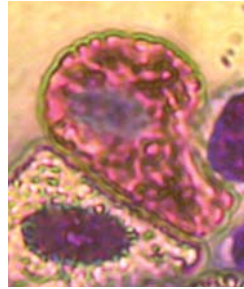
1a



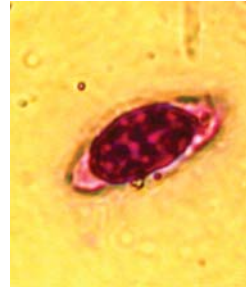
2a



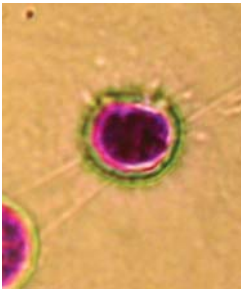
3a



4a



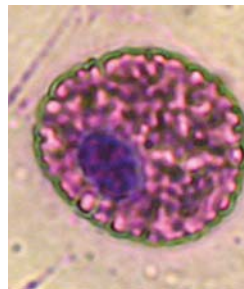
1б



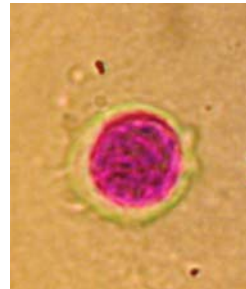
2б



3б



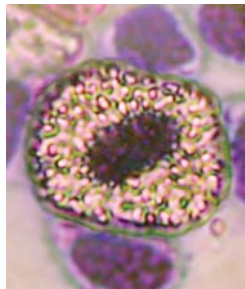
4б



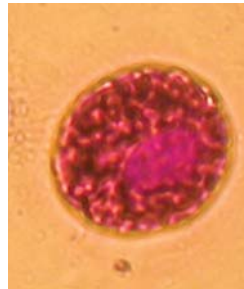
1в



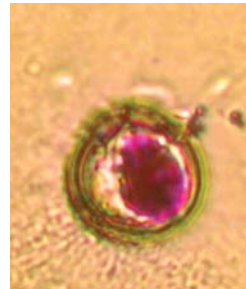
2в



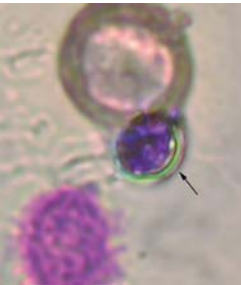
3в



4в



1г



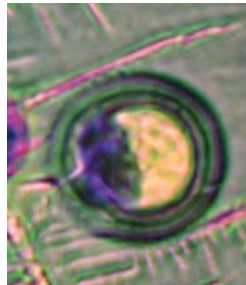
2г



3г



4г



Световые микрофотографии гемоцитов речных раков (род *Astacus*, род *Pontastacus*) по мазкам, окрашенным по Паппенгейму. Показаны типичные гиалиноциты и прогиалиноцит (колонка 1), полугранулоциты (колонка 2), гранулоциты (колонка 3) и не идентифицированные клетки (колонка 4). Масштабная линейка = 10 мкм, ув. 500х.

Размеры гемоцитов (ДК × ШК, ЯПО) половозрелых самцов и самок понтичных речных раков (род *Pontastacus* Bott, 1950) и широкопалого рака (род *Astacus* Fabricius, 1775).

Гемоциты длиннопалого *Pontastacus l. leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) и сухопалого *P. salinus* (Nordmann, 1842) речных раков:

**Прогиалиноцит:**

1а — ДК × ШК = 11,77 × 10,82 мкм; ЯПО = 77,4 %.

**Гиалиноциты:**

1б — ДК × ШК = 11,97 × 11,65 мкм; ЯПО = 63,7 %;

1в — ДК × ШК = 17,80 × 13,30 мкм; ЯПО = 57,4 %.

**Полугранулоциты:**

2а — ДК × ШК = 42,11 × 22,73 мкм; ЯПО = 23,8 %;

2б — ДК × ШК = 29,53 × 13,99 мкм; ЯПО = 37,2 %;

2в — ДК × ШК = 30,36 × 30,31 мкм; ЯПО = 14,6 %.

**Гранулоциты**

3а — ДК × ШК = 36,50 × 22,55 мкм; ЯПО = 5,7 %;

3б — ДК × ШК = 32,02 × 29,61 мкм; ЯПО = 8,7 %;

3в — ДК × ШК = 29,62 × 27,04 мкм; ЯПО = 13,1 %.

**Нераспознанные гемоциты:**

4а — ДК × ШК = 25,34 × 12,66 мкм;

4б — ДК × ШК = 17,32 × 15,86 мкм;

4в — ДК × ШК = 17,55 × 16,11 мкм.

Гемоциты широкопалого рака *A. astacus* (Linnaeus, 1758):

**Гиалиноцит:**

1г — ДК × ШК = 10,24 × 9,24 мкм; ЯПО = 61,9 % (отмечен стрелкой).

**Полугранулоцит:**

2г — ДК × ШК = 28,15 × 21,04 мкм; ЯПО = 27,1 %.

**Гранулоцит:**

3г — ДК × ШК = 26,23 × 26,08 мкм; ЯПО = 14 %.

**Нераспознанный гемоцит:**

4г — ДК × ШК = 17,79 × 17,28 мкм.

Ковачева *Николина Петкова*, Александрова *Елена Николаевна*

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ  
КАК ИНДИКАТОРЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ  
ДЕКАПОД: КАМЧАТСКОГО КРАБА *PARALITHODES*  
*SAMTSCHATICUS* И РЕЧНЫХ РАКОВ РОДОВ  
*ASTACUS* И *PONTASTACUS*

Заведующая редакцией *Н.Э. Боровик*  
Художественный редактор *Н.И. Лизунов*  
Технический редактор *Л.И. Филатова*  
Корректор *Е.Н. Гаврилова*  
Компьютерная верстка *Л.И. Филатовой*

Подписано в печать 25.03.2010 г. Формат 70 × 100<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Печ. л. 5,75. Тираж 200 экз. Заказ №

Издательство ВНИРО  
107140, Москва, ул. Верхняя Красносельская, 17

Тел.: (499) 264-65-33  
Факс: (499) 264-91-87