

СЛУЧАИ СПОНТАННОГО РОСТА КОНЦЕНТРАЦИИ МЕТГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ КОСТИСТЫХ РЫБ НА ПРОТЯЖЕНИИ ГОДОВОГО ЦИКЛА

© 2023 г. А. А. Солдатов*

^aИнститут биологии южных морей им. А.О. Ковалевского Российской академии наук, Севастополь, Россия

*e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.01.2023 г.

После доработки 26.02.2023 г.

Принята к публикации 10.03.2023 г.

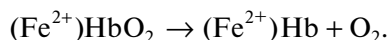
Изучена динамика содержания числа эритроцитов и концентрации метгемоглобина в крови теплолюбивой кефали-сингиля (*Chelon auratus* Risso, 1810) и холодолюбивой камбалы-глоссы (*Platichthys flesus* L., 1758) на протяжении годового цикла. О степени зрелости циркулирующей эритроцитарной массы судили на основе построения кислотных эритрограмм. Между числом эритроцитов и концентрацией метгемоглобина в крови обоих видов обнаружена выраженная отрицательная связь ($r = -0.681$; -0.778). Показано, что наиболее молодая генерация клеток красной крови появляется в периферической русле у обоих видов в постнерестовый период (1.5–2.0 мес), что отражает активную продукцию эритроцитов гемопоэтической тканью. В остальное время происходит постепенное старение циркулирующей эритроцитарной массы. Это приводит к уменьшению числа эритроцитов в крови и сопровождается ростом концентрации метгемоглобина. Последнее, по-видимому, определяет выработку эритропоэтинов в почках и активирует процессы эритропоэза в гемопоэтической ткани (преднерестовый период).

Ключевые слова: метгемоглобин, эритроциты, кислотные эритрограммы, годового цикл, кефаль-сингиль, камбала-глосса

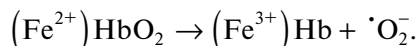
DOI: 10.31857/S032096522304023X, **EDN:** SFWXVX

ВВЕДЕНИЕ

В норме процесс деоксигенации молекулы оксигемоглобина сопровождается диссоциацией комплекса HbO_2 с отрывом кислорода (Schechter, 2008). Железо при этом сохраняется в двухвалентном ферро-состоянии:



Однако в некоторых случаях деоксигенация приводит к образованию супероксиданионрадикала (O_2^-) и окислению железа — гем переходит в ферри-состояние (Schechter, 2008):



Гемоглобин, имеющий гем с Fe^{3+} , не способен к ассоциации с кислородом и получил название метгемоглобина. Он восстанавливается при участии НАДН₂-диафоразы и цитохрома b_5 (Percy, Lappin, 2008). В этом также принимают участие и ряд восстановителей: глутатион (GSH), аскорбиновая кислота, токоферол (Krishna, Venkataramana, 2007). Если эффективность этого процесса понижается,

наблюдается повышение концентрации метгемоглобина.

Ядерные эритроциты рыб имеют тот же, что и эритроциты высших позвоночных, антиоксидантный комплекс (Zikic et al., 1991; Schoore et al., 1995; Woo et al., 2006). В них выявлена НАДН-диафораза (Schoore et al., 1995; Saleh, McConkey, 2012). Активность некоторых ферментов (пероксидазы, супероксиддисмутазы) и концентрация восстановителей (GSH) превышает таковую у человека (Wdzieczak et al., 1982; Woo et al., 2006).

Процесс перехода гемоглобина в мет-состояние может быть индуцирован рядом агентов: нитритом, нитратами, анилином, нитробензолом и рядом других соединений (Schoore et al., 1995; Tilak et al., 2007). Однако особый интерес представляет спонтанное естественное окисление пигмента в момент его дезоксигенации и причины его определяющие (Affonso et al., 2002; Chen et al., 2017; Soldatov et al., 2020; Солдатов, 2021). Респираторные пигменты рыб отличаются низкой устойчивостью к окислению в сравнении с высшими позвоночными (Sajiki et al., 1991; Powell, Perry, 1997; Maestre et al., 2009; Blair et al., 2020).

Они могут периодически переходить в ферри-форму без видимых признаков токсической метгемоглобинемии. Сравнительно высокая концентрация MtHb была выявлена у *Gadus morhua* – 27% (Graham, Fletcher, 1986). У серебряного карася гемоглобин почти на 100% переходил в ферри-форму (Andreeva, Ryabtseva, 2011).

Некоторые авторы отмечают закономерные изменения концентрации метгемоглобина в крови рыб в течение годового цикла (Graham, Fletcher, 1986; Soldatov, Maslova, 1989). Уровень окисленного пигмента при этом может достигать 15%. Анализ причин роста уровня ферри-формы в крови рыб на протяжении года показал, что он может быть обусловлен особенностью течения эритропоэтических процессов в кроветворной ткани. Отмечено, что наиболее активная пролиферация и дифференцировка эритроидных элементов происходит в постнерестовый период и продолжается в течение 2–3 мес (Солдатов, 2005; Maslova et al., 1988; Andreeva et al., 2017). В остальное время кроветворная ткань выключена из активного функционирования. Это должно приводить к постепенному старению циркулирующей эритроцитарной массы, снижению активности НАДН-диафоразы и росту концентрации MtHb в крови.

О нерегулярности эритропоэтических процессов в гемопоэтической ткани свидетельствует и продолжительность жизни клеток красной крови рыб, определенная при помощи ^3H -тимидина и флуоресцентных зондов (Золотова, 1987; Fischer et al., 1998). Она достигает 270–310 сут. Это означает, что генерация клеток красной крови в кроветворной ткани у рыб происходит непостоянно, а осуществляется разово в течение ограниченного промежутка времени. По-видимому, она приурочена к нерестовому периоду, когда происходит значительное перераспределение пластических ресурсов в организме (Сорвачев, 1982). Проверке данного положения и посвящена настоящая работа. В ней намеренно взяты виды костистых рыб, нерест которых приурочен к различным периодам годового цикла.

Цель настоящего исследования – оценить возраст циркулирующей эритроцитарной массы и соотнести его с числом эритроцитов и концентрацией MtHb в крови у тепло- и холодолюбивых рыб на протяжении годового цикла.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на двух видах костистых рыб: теплолюбивой кефали-сингиль (*Chelon auratus* Risso, 1810) и холодолюбивой камбале-глоссе (*Platichthys flesus* L., 1758), нерест которых происходит в августе–сентябре и феврале–марте соответственно. Рыбу отлавливали на протяжении года в районе

Керченского пролива (Крым) и бухте Казачья (г. Севастополь, Крым). Использовали взрослых особей сингиль (183–275 г, 21–28 см) и глосса (67–133 г, 17–27 см).

Рыбу перевозили в аквариальную в пластиковых баках с воздушной аэрацией емкостью 100 л. При транспортировке материала на значительные расстояния использовали полиэтиленовые мешки, атмосферу в которых заполняли кислородом. После транспортировки животных рассаживали в аквариумы и бассейны объемом 200–1500 л (с естественным протоком и освещением) и выдерживали в данных условиях в течение 5–7 сут для снятия состояния манипуляционного стресса. В течение этого времени особей кормили фаршем из малоценных видов рыб. Суточный пищевой рацион достигал 6–7% массы тела. В работе использовали активно питающихся подвижных особей.

За 60–70 мин до отбора проб рыб наркотизировали. В качестве анестезирующего препарата применяли уретан. Его растворяли в воде аквариума, где находились особи. Величины эффективных доз препарата были определены ранее (Soldatov, 2005). Кровь получали пункцией хвостовой артерии. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (Рихтер, Венгрия).

Концентрацию метгемоглобина в крови определяли по методу Н. Evelyn, Н. Malloy в модификации М.С. Кушаковского (вместо KCN использовали ацетонциангидрин) (Кушаковский, 1970). Число эритроцитов в крови подсчитывали в камере Горяева (Стенко, 1975). Кислотные эритрограммы строили в соответствии с методом Гительсона, Терскова в модификации Воробьева (Стенко, 1975).

При проведении сравнительного анализа применен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) PAST v. 4.09 software (Hammer, Harper, 2006). Графически цифровой материал обработан с использованием стандартного пакета Grapher (версия 11). Результаты представлены как $M \pm m$. В ряде случаев применяли ранжирование выборочных совокупностей с учетом функционального состояния организма рыб. Минимальный уровень значимости был $p < 0.05$. В работе использованы 25 особей камбалы и 31 особь кефали.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кефаль-сингиль. Получены полигоны распределения значений концентрации MtHb (рис. 1а) и числа эритроцитов (рис. 1б) в течение годового цикла. Зависимости хорошо описываются уравнениями параболической функции. Максимальные концентрации MtHb отмечали в летние месяцы – июне и июле (10–16%), минимальные – в январе, феврале (2–6%). Картина, по числу эрит-

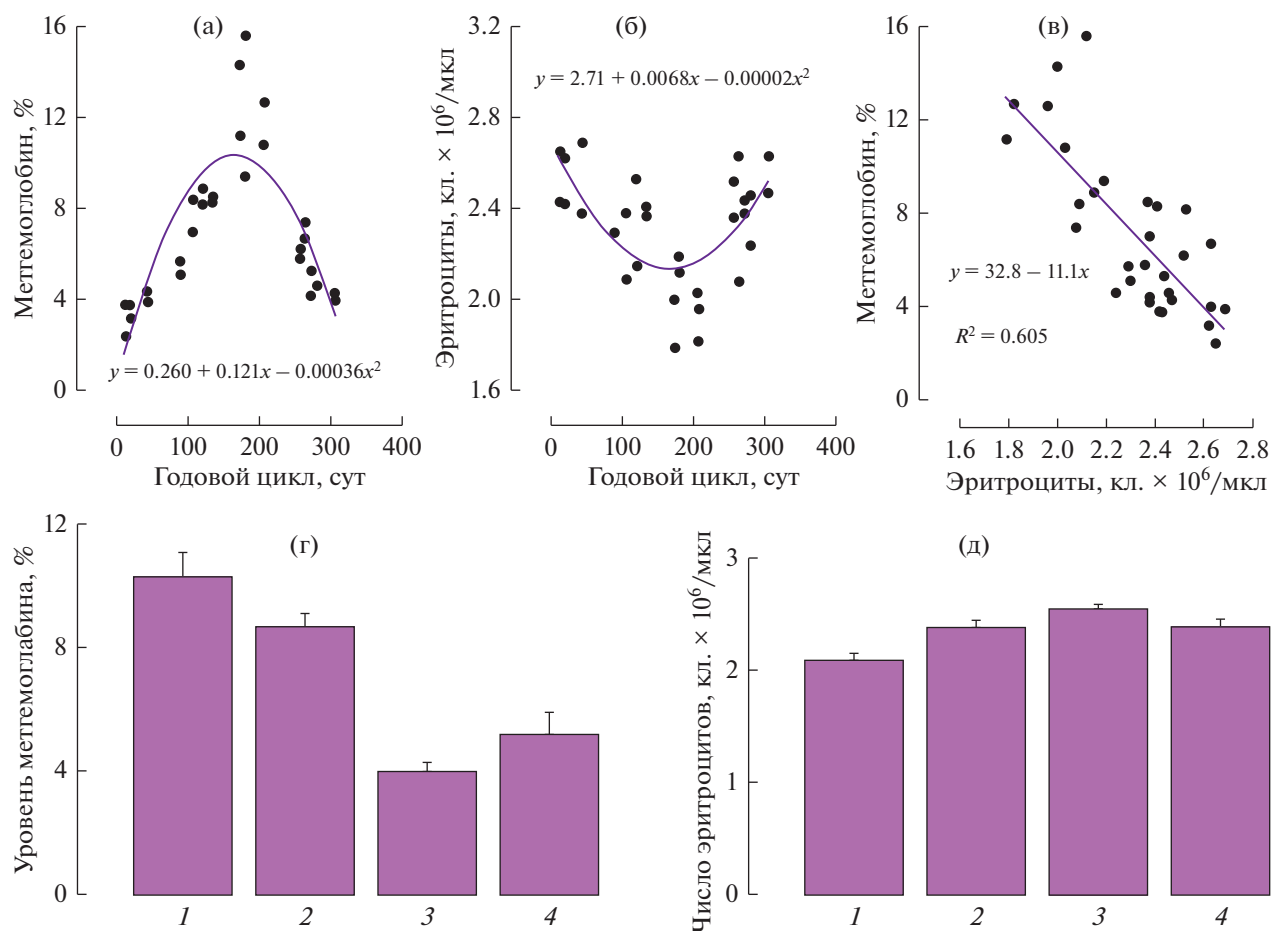


Рис. 1. Изменение уровня метгемоглобина (а) и числа эритроцитов (б) в крови кефали-сингиля на протяжении годового цикла, взаимосвязь этих показателей (в) и их ранжированные выборочные совокупности с учетом функционального состояния рыб (г, д). Здесь и на рис. 2а и 2б по оси абсцисс нулевая точка соответствует началу календарного года. 1 – преднерестовый период; 2 – нерестовый период; 3 – постнерестовый период; 4 – период относительного функционального покоя.

роцитов в крови, была обратной. Между указанными величинами обнаружена отрицательная связь (рис. 1в), которую можно описать уравнением линейной регрессии при коэффициенте детерминации (R^2), равном 0.605, что соответствует коэффициенту корреляции (r) -0.778 .

Для оценки статистической значимости выявленных различий выборочные совокупности ранжировали с шагом в три месяца: май–июль (преднерестовый период), август–октябрь (нерестовый период), ноябрь–январь (постнерестовый период), февраль–апрель (относительный функциональный покой) (рис. 1г, 1д). Видно, что различия между максимальными и минимальными величинами были статистически выражены. В отношении концентрации MtHb они достигали 7.6% ($p < 0.001$), относительно числа эритроцитов в крови -0.46 кл. (10^6)/мкл ($p < 0.01$).

Анализ кислотных эритрограмм показал значительный рост числа низкостойких клеток

в крови кефалей (лизис в течение 2.5 мин) в преднерестовый период (табл. 1). На них приходилось $>20\%$ общего числа эритроцитов. Доля среднестойких клеток (лизис в течение 2.5–5.5 мин) не превышала 78% соответственно. В нерестовый и постнерестовый периоды картина существенно изменялась. Доля низкостойких к кислотному фактору эритроцитов не превышала 7% клеточной массы ($p < 0.001$), среднестойких эритроцитов достигала 90% и более ($p < 0.01$).

Камбала-глосса. Аналогичные исследования были выполнены и на особях глоссы. Характер распределения значений концентрации MtHb и числа эритроцитов в крови на протяжении годового цикла у нее также хорошо описывался уравнением параболической функции. Однако динамика была иной (рис. 2). Доля окисленного пигмента достигала максимальных значений в зимний период времени (10–14%), минимальных – в летний (2–5%). Как и в случае с сингилом, динамика изменений числа эритроцитов в крови глоссы

Таблица 1. Кислотные эритрограммы циркулирующей эритроцитарной массы кефали-сингиля и камбалы-глоссы (доля клеток, %) на протяжении годового цикла

Период функционального состояния организма	Время лизиса, мин		
	0 < 2.5	2.5 < 5.5	5.5 < 7.0
Кефаль-сингиль			
Преднерестовый (май–июль), $n = 7$	21.1 ± 2.5	77.5 ± 2.4	1.4 ± 0.4
Нерестовый (август–октябрь), $n = 7$	3.6 ± 0.9	91.3 ± 1.2	5.1 ± 1.0
Постнерестовый (ноябрь–январь), $n = 6$	6.0 ± 1.1	90.9 ± 0.7	3.1 ± 0.7
Функциональный покой (февраль–апрель), $n = 6$	15.4 ± 0.8	81.8 ± 1.1	2.8 ± 0.5
Уровень значимости, p	$p < 0.001$	$p < 0.01$	$p < 0.05$
Камбала-глосса			
Преднерестовый (ноябрь–январь), $n = 6$	32.4 ± 1.8	66.8 ± 2.6	0.7 ± 0.2
Нерестовый (февраль–апрель), $n = 6$	5.4 ± 0.7	91.3 ± 2.4	3.2 ± 0.8
Постнерестовый (май–июль), $n = 7$	7.1 ± 1.2	90.1 ± 3.7	2.8 ± 0.6
Функциональный покой (август–октябрь), $n = 6$	20.5 ± 1.7	76.2 ± 3.0	3.2 ± 0.6
Уровень значимости, p	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p > 0.05$

Примечание. Даны средние значения и их ошибки, n – число особей.

была обратной по отношению к MtHb. Между данными величинами существовала обратная связь, которая может быть описана уравнением экспоненты, коэффициент детерминации R^2 не превышал 0.5.

Ранжирование выборочных совокупностей для глоссы также проводили с периодичностью в три месяца, учитывая особенности биологии данного вида: ноябрь–январь (преднерестовый период), февраль–апрель (нерестовый период), май–июль (постнерестовый период), август–октябрь (функциональный покой) (рис. 2). Различия между максимальными и минимальными значениями концентрации MtHb и числом эритроцитов в крови также были статистически выражены: 6.3% ($p < 0.001$) и 0.59 кл. (10^6)/мкл ($p < 0.001$) соответственно.

Характер изменения параметров кислотных эритрограмм у глоссы на протяжении года был близок к таковому для сингиля (табл. 1). Доля низкостойких клеток (лизис в течение 2.5 мин) в преднерестовый период была на 25.3% выше ($p < 0.001$), чем в постнерестовый период. Содержание же среднестойких клеток (лизис в течение 2.5–5.5 мин) имело противоположную динамику.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из полученных данных видно, что циркулирующая эритроцитарная масса на протяжении годового цикла у обоих видов претерпевает ряд последовательных состояний, согласующихся с особенностями течения их репродуктивного цикла: постнерестовый период, период функционального покоя, преднерестовый и нерестовый периоды.

Постнерестовый период (1.5–2.0 мес). Эритроциты отличаются высокой устойчивостью к кислотной нагрузке. Число клеток красной крови в периферическом русле достигает максимума, содержание метгемоглобина, напротив, – минимально. Все это свидетельствует об активной продукции эритроцитарной массы гемопоэтической тканью. В этот период годового цикла у других видов отмечено значительное увеличение эритроидной популяции клеток в головной почке (пронефросе), рост индекса импульсного мечения клеток ^3H -тимидином (S-период клеточного цикла), появление в периферическом русле пролиферирующих базофильных нормобластов (Золотова, 1987; Маслова, Тавровская, 1991). Об этом же свидетельствуют результаты, полученные при помощи метода проточной цитометрии (Andreeva et al., 2017).

Период относительного функционального покоя (до 6 мес). В этот промежуток времени устойчи-

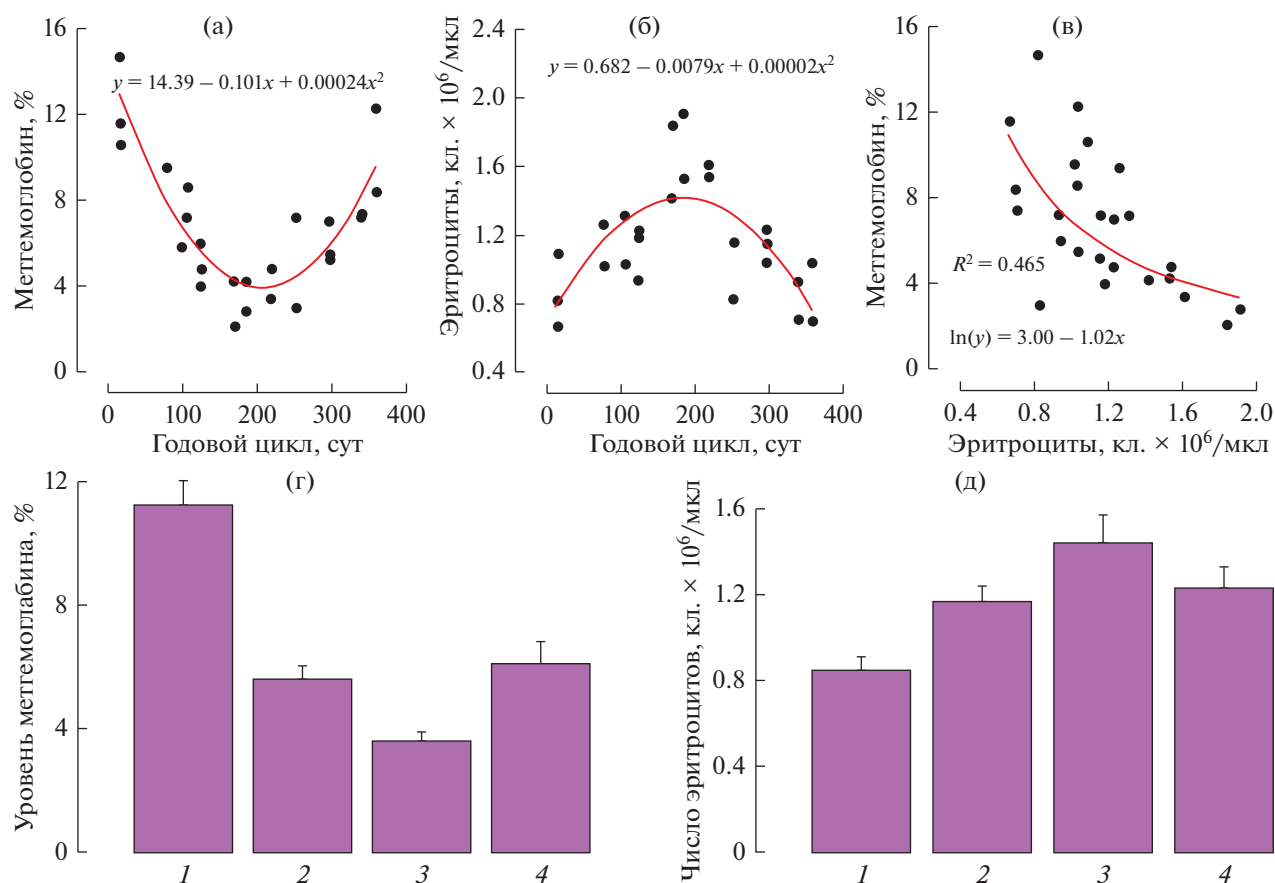


Рис. 2. Изменение уровня метгемоглобина (а) и числа эритроцитов (б) в крови камбалы-гlossы на протяжении годового цикла, взаимосвязь этих показателей (в) и их ранжированные выборочные совокупности с учетом функционального состояния рыб (г, д). Обозначения, как на рис. 1.

вость клеток красной крови к кислотному фактору снижается. Существенно растет доля низкостойких клеток (лизис в течение 2.5 мин). Число эритроцитов в системе циркуляции постепенно уменьшается, а доля метгемоглобина растет. Такое соотношение процессов отражает старение эритроцитарной массы в целом, о котором свидетельствуют данные, полученные при помощи ^3H -тимидина и флуоресцентных зондов (270–310 сут), о продолжительности жизни эритроцитов костистых рыб (Золотова, 1987; Fischer et al., 1998). Это должно приводить к снижению окислительновосстановительного статуса клеток красной крови (Phillips et al., 2000) и сопровождаться ростом содержания окисленных компонентов: окисленного глутатиона, NAD, NADP (Hardig, Hoglund, 1983). Переход гемоглобина в ферри-форму (MtHb) в связи с этим — закономерное следствие данных процессов, что в действительности и имело место. Ранее подобные изменения у возрастных эритроцитов показаны для радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) и балтийского лосося (*Salmo salar*) (Hardig, Hoglund, 1983; Phillips et al., 2000).

Преднерестовый и нерестовый периоды (3–4 мес.)
 Имеют решающее значение для гемопоэтической ткани. В преднерестовый период число эритроцитов в крови достигает минимальных значений. Устойчивость клеток красной крови к кислотному фактору находится на самом низком уровне, что отражает их значительный возраст. Концентрация метгемоглобина в крови достигает максимальных значений. Низкое содержание эритроцитов в крови, по-видимому, определяется не только процессом их старения, но и перераспределением пластических (белковых) ресурсов в организме рыб в пользу генеративной ткани, что должно сопровождаться разрушением части эритроцитарной массы. Известно, что белковая недостаточность всегда сопряжена с более или менее выраженной анемией у рыб (Kokkidis et al., 2000). Анемия и гипоксия, в свою очередь, служат мощным фактором выработки эритропоэтинов и активизации эритропоэза (Houston et al., 1996; Rothmann et al., 2000). Данные соединения были идентифицированы в крови рыб при помощи методов иммунохимического анализа (Wickramasinghe, 1993). Наиболее высокая их концентрация обна-

ружена в почках (Moritz et al., 1997; Lai et al., 2006). Полная структура гена эритропоэтина в настоящее время аннотирована для бурого фугу (*Taki-fugu rubripes*) (Chou et al., 2004). Установлено, что выработка эритропоэтина в почках рыб коррелирует с уровнем тестостерона в крови (Pottinger, Pickering, 1987), а также активностью щитовидной и пинеальной желез (Shedpure, Pati, 1996). Насколько эти процессы функционально взаимосвязаны, сказать сложно.

Выводы. Между числом эритроцитов и концентрацией метгемоглобина в крови кефали-сингиля и камбалы-гlossы обнаружена выраженная отрицательная связь. Наиболее молодая генерация клеток красной крови появляется в периферическом русле у обоих видов в постнерестовый период, что отражает активную продукцию эритроцитов гемопоэтической тканью. В остальной период годового цикла происходит постепенное старение циркулирующей эритроцитарной массы. Это сопровождается уменьшением числа эритроцитов и ростом концентрации метгемоглобина, что понижает кислородную емкость крови в целом. Последнее, по-видимому, определяет выработку эритропоэтинов в почках и активирует процессы эритропоэза в гемопоэтической ткани.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках проекта РНФ 23-24-00061.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Золотова Т.Е. 1987. Экспериментальное изучение гемопоэза у рыб: Автореф. канд. дисс. М.: МГУ. 24 с.
- Кушаковский М.С. 1970. Метгемоглобинемии // Справочник по функциональной диагностике. М.: Медицина. С. 423.
- Маслова М.Н., Тавровская Т.В. 1991. Динамика сезонных изменений в системе красной крови низших позвоночных: сезонная динамика эритропоэза у форели *Salmo gairdneri* // Журн. эвол. биохим. физиол. Т. 27. С. 796.
- Солдатов А.А. 2005. Особенности организации и функционирования системы красной крови рыб (обзор) // Журн. эволюц. биохим. физиол. Т. 41. № 3. С. 217.
- Солдатов А.А. 2021. Содержание метгемоглобина в крови костистых рыб: влияние факторов среды и естественных процессов в организме (обзор) // Биология внутр. вод. № 6. С. 607.
<https://doi.org/10.31857/S0320965221060176>
- Сорвачев К.Ф. 1982. Основы биохимии питания рыб. Москва: Легк. и пищ. пром-сть.
- Стенко М.И. 1975. Кровь // Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. Москва: Медицина. С. 5.
- Affonso E.G., Polez V.L., Corrêa C.F. et al. 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia // Comp. Biochem. Physiol. Part C. V. 133. Iss. 3. P. 375.
[https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(02\)00127-8](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(02)00127-8)
- Andreeva A.M., Ryabtseva I. 2011. Adaptation mechanisms of respiratory blood function in Teleostei // J. Ichthyol. V. 51. № 9. P. 799.
<https://doi.org/10.1134/S0032945211050018>
- Andreeva A.Y., Soldatov A.A., Kukhareva T.A. 2017. Black Scorpionfish (*Scorpaena porcus*) Hemopoiesis: Analysis by Flow Cytometry and Light Microscopy // The Anatom. Rec. V. 300. Iss. 11. P. 1993.
<https://doi.org/10.1002/ar.23631>
- Blair B., Barlow C., Martin E. et al. 2020. Methemoglobin determination by multi-component analysis in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) possessing unstable hemoglobin // Methods. V. 7. № 100836.
<https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100836>
- Chen N., Wu M., Tang G.-P. et al. 2017. Effects of Acute Hypoxia and Reoxygenation on Physiological and Immune Responses and Redox Balance of Wuchang Bream (*Megalobrama amblycephala* Yih, 1955) // Frontiers in Physiol. V. 8. P. 1.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00375>
- Chou C.-F., Tohari S., Brenner S., Venkatesh B. 2004. Erythropoietin gene from a teleost fish, *Fugu rubripes* // Blood. V. 104. P. 1498.
<https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3404>
- Fischer U., Ototake M., Nakanishi T. 1998. Life span of circulating blood cells in gibel carp (*Carassius auratus langsdorffii*) // Fish Shellfish Immunol. V. 8. P. 339.
<https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0144>
- Graham M.S., Fletcher G.L. 1986. High concentrations of methemoglobin in five species of temperate marine teleosts // J. Exp. Zool. V. 239. P. 139.
<https://doi.org/10.1002/jez.1402390117>
- Hammer Ø., Harper D.A.T. 2006. Paleontological Data Analysis. Blackwell.
<https://doi.org/10.1002/jqs.1107>
- Hardig J., Hoglund L.B. 1983. Seasonal and ontogenetic effects on methaemoglobin and reduced glutathione contents in the blood of reared baltic salmon // Comp. Biochem. Physiol. V. 76A. Iss. 1. P. 27.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(83\)90039-7](https://doi.org/10.1016/0300-9629(83)90039-7)
- Houston A.H., Roberts W.C., Kennington J.A. 1996. Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish // Fish Physiol. Biochem. V. 15. № 6. P. 481.
<https://doi.org/10.1007/BF01874922>

- Kokkidis M.J., Goubier V., Martin M. et al. 2000. Haematological changes in the blood of cultured black-bass (*Micropterus salmoides*) during an annual sexual reproductive cycle // *Ichthyologie*. V. 24. № 3S. P. 113.
- Krishna M.S., Venkataramana G. 2007. Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with pregnancy-induced hypertension // *Indian J. Physiol. Pharmacol.* V. 51. P. 284.
- Lai J.C.C., Kakuta I., Mok H.O.L. et al. 2006. Effects of moderate and substantial hypoxia on erythropoietin levels in rainbow trout kidney and spleen // *J. Exp. Biol.* V. 209. P. 2734.
<https://doi.org/10.1242/jeb.02279>
- Maestre R., Pazos M., Medina I. 2009. Involvement of methemoglobin (MetHb) formation and hemin loss in the pro-oxidant activity of fish hemoglobins // *J. Agric. Food Chem.* V. 57. Iss. 15. P. 7013.
<https://doi.org/10.1021/jf9006664>
- Maslova M.N., Soldatov A.A., Tavrovskaya T.V. 1988. Seasonal dynamics in the state of the red blood system of several Black Sea fish // *J. Evolutionary Biochem. Physiol.* V. 24. № 4. P. 398.
- Moritz K.M., Lim G.B., Wintour E.M. 1997. Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis // *Am. J. Physiol.* V. 273. P. R1829. 1997.273.6.R1829
<https://doi.org/10.1152/ajpregu>
- Percy M.J., Lappin T.R. 2008. Recessive congenital methaemoglobinaemia: cytochrome b(5) reductase deficiency // *Br. J. Haematol.* V. 141. Iss. 3. P. 298.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07017.x>
- Phillips M.C.L., Moyes C.D., Tufts B.L. 2000. The effects of cell ageing on metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells // *J. Exp. Biol.* V. 203. № 6. P. 1039.
<https://doi.org/10.1242/jeb.203.6.1039>
- Pottinger T.G., Pickering A.D. 1987. Androgen levels and erythrocytosis in maturing brown trout, *Salmo trutta* L. // *Fish Physiol. Biochem.* V. 3. № 3. P. 121.
<https://doi.org/10.1007/BF02180413>
- Powell M.D., Perry S.F. 1997. Respiratory and acid-base pathophysiology of hydrogen peroxide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Aquat. Toxicol.* V. 37. P. 99.
[https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(96\)00826-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(96)00826-0)
- Rothmann C., Levinshal T., Timan B. et al. 2000. Spectral imaging of red blood cells in experimental anemia of *Cyprinus carpio* // *Comp. Biochem. Physiol.* V. 125A. P. 75.
[https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(99\)00157-9](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(99)00157-9)
- Sajiki J., Takahashi K. 1991. In Vitro Formation of Methemoglobin by Lipophilic Fractions in Fishes and the Causative Substance // *Eisei-Kagaku*. V. 37. № 6. P. 467.
<https://doi.org/10.1248/JHS1956.37.467>
- Saleh M.C., McConkey S. 2012. NADH-dependent cytochrome b5 reductase and NADPH methemoglobin reductase activity in the erythrocytes of *Oncorhynchus mykiss* // *Fish Physiol. Biochem.* V. 38. P. 1807.
<https://doi.org/10.1007/s10695-012-9677-2>
- Schechter A.N. 2008. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine // *Blood*. V. 112. Iss. 10. P. 3927.
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-078188>
- Schoore E.J., Simco B.A., Davis K.B. 1995. Responses of blue catfish and channel catfish to environmental nitrite // *J. Aquat. Anim. Health*. V. 7. P. 304.
[https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1995\)007<0304:RO-BCAC>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1995)007<0304:RO-BCAC>2.3.CO;2)
- Shedpure M., Pati A.K. 1996. Do thyroid and testis modulate the effects of pineal and melatonin on haemopoietic variables in *Clarias batrachus*? // *J. Biosci.* V. 21. № 6. P. 797.
<https://doi.org/10.1007/BF02704721>
- Soldatov A.A. 2005. Physiological Aspects of Effects of Urethane Anesthesia on the Organism of Marine Fishes // *Hydrobiol. J.* V. 41. № 1. P. 113.
<https://doi.org/10.1615/Hydrobiol.v41.i1.130>
- Soldatov A.A., Maslova M.N. 1989. Concentration of methemoglobin in blood of fish in the course of the annual cycle // *J. Evolutionary Biochem. Physiol.* V. 25. № 4. P. 317.
- Soldatov A.A., Andreeva A.Y., Kukhareva T.A., Andreenko T.I. 2020. Methemoglobin and the Activities of Catalase and Superoxide Dismutase in Nucleated Erythrocytes of *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) under Experimental Hypoxia (*in vitro*) // *Biophysics (Russian Federation)*. V. 65. Iss. 3. P. 452.
<https://doi.org/10.1134/S0006350920030197>
- Tilak K.S., Veeraiah K., Milton J. 2007. Effects of ammonia, nitrite and nitrate on hemoglobin content and oxygen consumption of freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) // *J. Environ. Biol.* V. 28. Iss. 1. P. 45.
- Wdzieczak J., Zalesna G., Bartkowiak A. et al. 1982. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase level in erythrocytes and livers of different fresh water and marine fish species // *Comp. Biochem. Physiol.* V. 73B. Iss. 2. P. 361.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90298-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90298-X)
- Wickramasinghe S.N. 1993. Erythropoietin and the human kidney: evidence for an evolutionary link from studies of *Salmo gairdneri* // *Comp. Biochem. Physiol. Part A*. V. 104A. P. 63.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90009-s](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90009-s)
- Woo S.P.S., Liu W., Au D.W.T. et al. 2006. Antioxidant responses and lipid peroxidation in gills and erythrocytes of fish (*Rhabdosargus sarba*) upon exposure to *Chattonella marina* and hydrogen peroxide: Implications on the cause of fish kills // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* V. 336. P. 230.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.05.013>
- Zikic R.V., Stajin A., Petrovic V.M. 1991. Effect of dexamethasone on the activity of superoxide dismutase and catalase in the tissue and erythrocytes of goldfish // *Acta Biol. Jugosl. C.* V. 27. Iss. 1. P. 45.

Cases of Spontaneous Increase of Methemoglobin Concentration in Fish Blood during the Annual Cycle

A. A. Soldatov*

Kovalevsky Institute of Biology of the South Seas of the Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russian Federation
*e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

The dynamics of the content of erythrocytes number and concentration of methemoglobin in the blood of the thermophilic mullet (*Chelon auratus* Risso, 1810) and the cold-loving flounder (*Platichthys flesus* L., 1758) during the annual cycle was studied. The degree of maturity of the circulating erythrocyte mass was judged on the basis of acid erythrograms construction. A pronounced negative relationship was found between the number of red blood cells and the concentration of methemoglobin in the blood of both types ($r = -0.681$; -0.778). It has been shown that the youngest generation of red blood cells appears in the peripheral bed of both species in the post-spawning period (1.5–2.0 months), which reflects the active production of erythrocytes by hematopoietic tissue. The rest of the time, there is a gradual aging of the circulating erythrocyte mass. This leads to a decrease in the number of red blood cells in the blood and is accompanied by an increase in the concentration of methemoglobin. The latter, apparently, determines the production of erythropoietins in the kidneys and activates the processes of erythropoiesis in hematopoietic tissue (pre-spawning period).

Keywords: methemoglobin, erythrocytes, acid erythrograms, annual cycle, *Chelon auratus*, *Platichthys flesus*