

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПАРАМЕТРОВ КОАГУЛОГРАММЫ ПРИ ОЦЕНКЕ СТРЕССОВЫХ СОСТОЯНИЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ СТРЕССА У КАРПА (*CYPRINUS CARPIO*) И ТИЛЯПИИ (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

Березина Дарья Игоревна, ассистент кафедры «Внутренние незаразные болезни, хирургия и акушерство»

Фомина Любовь Леонидовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Внутренние незаразные болезни, хирургия и акушерство»

Рыжаков Альберт Валерьевич, доктор ветеринарных наук, профессор кафедры «Внутренние незаразные болезни, хирургия и акушерство»

ФГБОУ ВО Вологодская ГМХА

160555, Вологодская область, городской округ город Вологда, с. Молочное, ул. Шмидта, д. 2, тел.: +7 (8172) 52-57-30,

e-mail: academy@molochnoe.ru

Ключевые слова: карпы, тилапия, кортикостероиды, гемостаз, стресс, диагностика

В работе представлены результаты исследования реакции некоторых параметров вторичного гемостаза промысловых рыб – карпа *Cyprinus carpio* и тилапии *Oreochromis niloticus* на стресс различной продолжительности, индуцированный кортикостероидами (дексаметазоном и бетаметазоном). Целью данной работы стало определение наиболее рано изменяющихся параметров коагулограммы у рыб в условиях экспериментальной модели стресса и оценка пригодности этих параметров для применения в ранней диагностике стрессовых реакций. Исследование проведено в Вологодской области, рыбы были подразделены на три группы: рыбы с хроническим стрессом, острым стрессом и контрольные животные, кровь у которых отбирали пункцией хвостовой вены до обработки гормонами, и далее через 7 и 21 сутки после. Исследовали изменение следующих параметров коагулограммы: тромбинового времени (ТВ), протромбинового времени (ПВ), активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), концентрацию фибриногена и растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК), антитромбина III. Установлено, что наиболее рано и явно реагирующим на влияние стрессовых воздействий у карпов является уровень фибриногена плазмы, концентрация которого прямо пропорциональна длительности стресса. У тилапий множество параметров гемостаза были наиболее чувствительны к воздействию длительного стресса по сравнению с контролем: сокращение АЧТВ, ПВ, концентрации фибриногена и увеличение РФМК. Указанные параметры можно определить в качестве маркеров (биоиндикаторов) развития стрессовых состояний у данных видов рыб.

Введение

Смертность пресноводных рыб в результате стресса при различных манипуляциях представляет серьезную проблему, что требует глубокого понимания основных задействованных механизмов. Изменения функционального состояния физиологических систем организма в

экстремальных условиях отражаются, в первую очередь, на гематологических показателях [1], в том числе на системе свертывания крови.

Система гемостаза у животных призвана обеспечить целостность внутренней среды организма и остановку кровотечения в случае повреждения сосудистой стенки, ее пронцае-

Характеристика групп рыб в эксперименте

Группа	Воздействие	Модель
Контрольная карпы n=8 тиляпии n=10	интактная	контроль
I экспериментальная карпы n=8 тиляпии n=10	инъекция раствора дексаметазон–фосфата (4 мг/мл) в дозе 0,2 мл/особь однократно	острый стресс
II экспериментальная карпы n=8 тиляпии n=10	инъекция суспензии бетаметазона (2,63 мг+6,43 мг/мл) в дозе 0,5 мл/особь однократно	хронический стресс

мость и резистентность, а также поддержание жидкого состояния крови в сосудистом русле. Любые нарушения свертывания крови имеют высокий риск летальных исходов. Важно, что у некоторых видов рыб фиксируется стресс-индуцированная коагулопатия (тромбоз) [2], и гибель после рыбоводческих манипуляций. В связи с этим потребность в новых методах, в том числе экспресс-методах, направленных на раннюю диагностику стрессовых условий, применимых в рыбоводстве, увеличивается.

Исследования, проведенные на костистых рыбах, указывают на то, что процесс коагуляции у них является схожим с другими позвоночными, в частности с млекопитающими [3].

Исследование стресса у некоторых млекопитающих: мышей [4], кроликов [5], человека [6] показывает, что под влиянием стресс-факторов происходит усиление коагуляционной активности крови. В крупном обзоре иностранных источников [7] была отмечена активация как сосудисто-тромбоцитарного (первичного), так и плазменно-коагуляционного (вторичного) гемостаза и у стрессированных рыб, включая сокращение времени свертывания, увеличение числа тромбоцитов, снижение уровня фибриногена, быстрое сокращение времени рекальцификации плазмы, протромбинового времени и активированного частичного тромбопластинового времени. Такие результаты, по мнению исследователей, подтверждают, что показатель времени свертывания очень полезен в качестве индикатора стресса, хотя и делают вывод о большей связи гиперкоагуляции с активацией первичного звена гемостаза, вызванной путем выработки катехоламинов и кортикостероидов при стрессе. Реакции вторичного звена гемостаза *C. carpio* посвящены наши исследования с использованием кратковременной и долговременной гипоксии в качестве стресс-стимула, в результате которых был отмечен сильный гиперкоагуляционный эффект [8, 9, 10].

Исследователи, для оценки стресса у рыб,

чаще всего предпочитают измерять плазменный кортизол из-за его отзывчивости на острые стрессоры и его функциональное значение в физиологических процессах, влияющих на здоровье рыб [11, 12, 13, 14]. Однако применение эндогенного кортизола может быть ограничено в различных хозяйствах, в связи с чем актуален вопрос поиска альтернативных биомаркеров, в число которых могут войти параметры коагулограммы.

Целью данной работы стало определение наиболее рано изменяющихся параметров коагулограммы у рыб в условиях экспериментальной модели стресса и оценка пригодности этих параметров для применения в ранней диагностике стрессовых реакций в рыбоводстве и аквакультуре.

Материалы и методы исследований

Работа выполнена в центре развития аквакультуры «АкваБиоЦентр» Вологодской ГМХА имени Н. В. Верещагина в рамках реализации гранта РФФИ №19-34-90109.

Эксперимент проводили на обыкновенном карпе *Cyprinus carpio* L (n=24), и нильской тиляпии *Oreochromis niloticus* L (n=30). Рыб каждого вида предварительно разделили на три группы (табл. 1). Для имитации острого стресса использовали дексаметазон-фосфат – рыб однократно обрабатывали Дексаметазоном (Эллара, Россия) путем парентеральных инъекций. В качестве глюкокортикоида, имитирующего хронический стресс, однократно применяли суспензию бетаметазона - рыбам инъецировали Дипроспан (Schering-Plough Labo N.V., Бельгия). Данные синтетические кортикостероиды обладают аналогичным кортизолу эффектом. Контрольная группа оставалась интактной.

Рыб содержали в экспериментальной установке с обеспечением непрерывной циркуляции воды между аквариумами и принудительной аэрацией: карпов при температуре воды 18-20°C, тиляпий 28-30°C. Отбор проб крови проводился сразу же после 24-х часовой

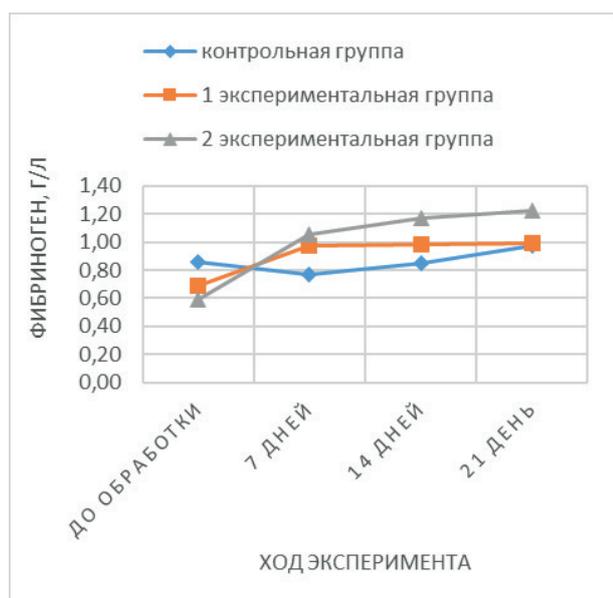


Рис. 1 – Динамика количества фибриногена у карпов в ходе эксперимента

акклиматизации, и далее через 7, и 21 сутки после инъекции препаратов. Перед отбором проб рыб анестезировали при помощи добавления в воду гвоздичного масла в дозе 0,033 мл/л [15] с последующей выдержкой в ней 15 минут. Отбор проб проводился пункцией хвостовой вены, после чего осуществляли индивидуальное мечение рыб.

Параметры плазменно-коагуляционного гемостаза определяли на коагулометре «Thrombostat» (Behnk Elektronik, Германия). Для оценки состояния плазменно-коагуляционного гемостаза определяли следующие показатели: АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время), ПВ (протромбиновое время), ТВ (тромбиновое время) и количественный анализ фибриногена. Антикоагуляционные свойства крови оценивали по содержанию антитромбиноподобного фактора (Антитромбина III) в плазме. Фибринолитическую активность в плазме измеряли с помощью обнаружения растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК).

Значения полученных результатов в работе представлены в виде средней величины и стандартной ошибки средней ($M \pm m$). Достоверность различий показателей крови для множественных независимых выборок определяли с помощью непараметрического критерия Крускала–Уоллеса, для парных зависимых выборок использовали непараметрический критерий Вилкоксона.

Результаты исследований

При оценке изменений коагулограммы

карпов (табл. 2), можно отметить, что АЧТВ всех групп карпов достоверно изменялось: синхронно и однонаправленно в сторону достоверного сокращения на 63,6-70,4% по сравнению с исходным значением.

Следует отметить также и сильное достоверное сокращение ПВ к последнему дню эксперимента у всех групп карпов на 78,5-86,1% по сравнению с исходным, у рыб с имитированием острого стресса оно было более резким. Количественное содержание фибриногена в плазме крови в ходе эксперимента у карпов всех групп достоверно увеличилось (на 12,7%, 43,4% и в 2 раза соответственно), что также было показано в экспериментах по воздействию стресса на гемокоагуляцию с участием мышей [16] и было обнаружено нами ранее [8]. При этом кривая изменений у первой и второй экспериментальных групп животных, обработанных гормонами, имеет схожую форму, в отличие от контрольной группы (рис. 1). Необходимо отметить, что под влиянием бетаметазона повышение этого белка происходило наиболее явно.

Анализируя ТВ в динамике, можно увидеть, что у всех групп карпов это время, подобно ПВ, сильно достоверно сократилось к последнему дню эксперимента почти синхронно на 83,4-85 %, относительно исходного.

Уровень антитромбина III достоверно изменялся: у карпов контрольной группы - более резко (на 31,7 %), у первой экспериментальной группы - более плавно (на 22,8 %), у второй экспериментальной – на 15,3 % в сторону уменьшения к середине эксперимента, что может быть связано с забором крови, либо с повышенной потребностью в компенсаторных процессах гемостаза, связанных с гиперкоагуляцией. Содержание АТ III у карпов второй экспериментальной группы в итоге превысило значения исходного уровня (на 18,2 %). Можно увидеть общее превышение антитромбина в плазме у экспериментальных групп, по сравнению с контрольными животными в течение дней эксперимента.

В ходе исследования, у контрольной и экспериментальных групп карпов наблюдаются одинаковые достоверные колебания РФМК с тенденцией к их снижению на 6,6-13,3 %. Концентрация РФМК второй экспериментальной группы снижалась более плавно. Количественная характеристика РФМК в крови рыб и их роль в физиологии гидробионтов пока не была описана в литературе, в связи с чем, какие-либо выводы по этому поводу следует делать осторожно.

Таким образом, вторичный гемостаз кар-

пов реагировал на стресс-реакции сильным ускорением гемокоагуляции по основным путям у всех исследованных групп, о чем говорят снижение ТВ, ПВ, АЧТВ, увеличение уровня фибриногена. Хотя основной тренд изменений был одинаков, динамика несколько различалась у обработанных рыб – особенно уровень фибриногена под влиянием бетаметазона, который можно установить в качестве биомаркера. При этом уровень антитромбина у последних упал наименее сильно по сравнению с контролем, что также говорит о снижении активности антикоагуляционных процессов.

Количественная характеристика коагулограммы тилапий представлена в таблице 3. АЧТВ тилапий имело подобную карпам тенденцию изменений лишь во второй экспериментальной группе (рис. 2), выраженную в кратковременном сокращении к 7-м суткам эксперимента на 41,5 %, и к концу эксперимента оставалось на 20% короче относительно исходного. АЧТВ первой экспериментальной и контрольной групп, напротив, удлинилось к 7-м суткам на 66,5 % и 79,2 % и оставалось длиннее исходного на 34 % и 98 % соответственно.

Хронически стрессированные тилапии ощутили резкое достоверное сокращение ПВ до опасно низкого на 76,8 % от исходного (рис. 3). Контрольная и острострессированная группы реагировали одинаково: адаптивным удлинением времени в середине эксперимента (на 78,2-109,4 %) и укорочением его почти до первоначальных значений к концу.

Противоположный характер изменений можно проследить в концентрации фибриногена у всех групп тилапий (рис. 4). Снижение количества фибриногена на 29,5-70 % произошло к 7-м суткам, особенно сильно - у второй группы, далее уровень этого белка повысился у всех рыб близко к первоначальному. ТВ тилапий имело схожую с уровнем фибриногена динамику: адаптивное сокращение времени в середине эксперимента на 9 %-22,5 % и восстановление показателя к концу у всех групп (кроме контрольной), наиболее сильное и достоверное у рыб первой экспериментальной группы.

Уровень Антитромбина III у всех тилапий колебался незначительно. Концентрация РФМК у рыб второй экспериментальной группы вдвое (в 2,3 раза) увеличилась к концу эксперимента, тогда как у других групп она снизилась (рис. 5), аналогично карпам, составив на 33,5-44,4 % меньше исходного.

При описании результатов, можно подве-

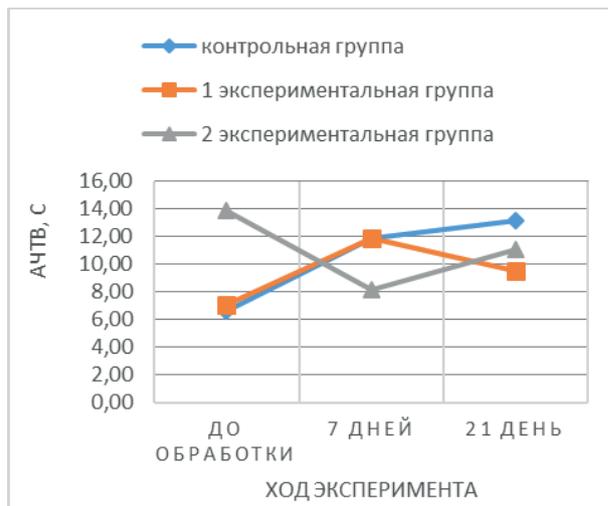


Рис. 2 – Динамика АЧТВ у тилапий в ходе эксперимента

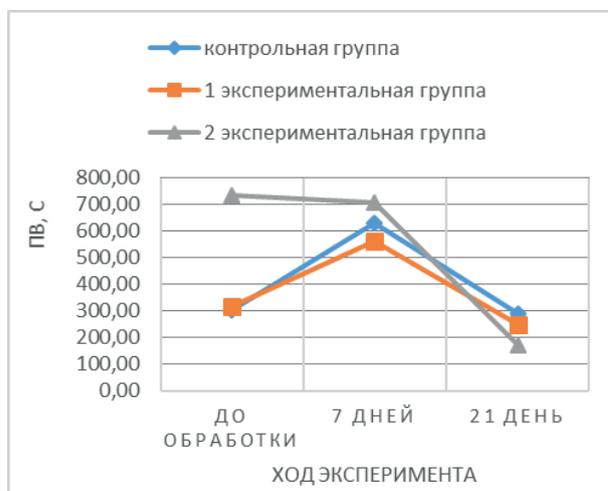


Рис. 3 – Динамика ПВ у тилапий в ходе эксперимента



Рис. 4 – Динамика количества фибриногена у тилапий в ходе эксперимента

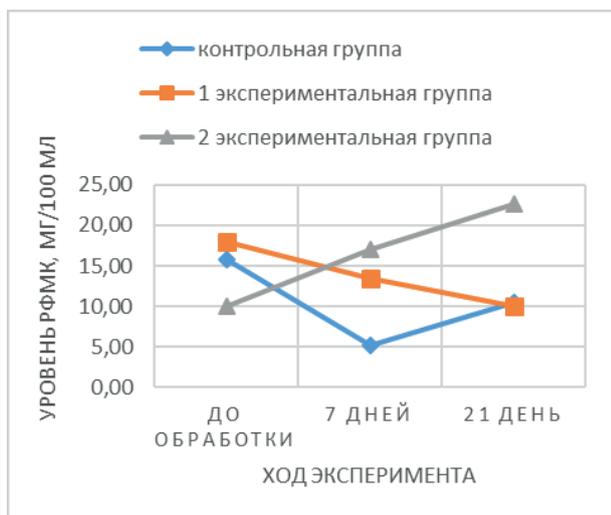


Рис. 5 – Динамика РФМК у тилапий в ходе эксперимента

сти итог, что у тилапий ускорение свертывания крови по внутреннему и внешнему путям к концу эксперимента было зафиксировано только у рыб с имитацией хронического стресса (сокращение ПВ, АЧТВ, увеличение РФМК). У других групп коагуляция по общему пути (сокращение ТВ, фибриногена) сначала усилилась, по внешнему и внутреннему путям замедлилась, а позже все показатели стали близкими к исходным значениям.

Обсуждение

Принимая во внимание усиление коагуляции у интактных рыб, вероятно воздействие так называемого хэндлинг-стресса, связанного с различными манипуляциями (сортировкой, отбором проб крови, взвешиванием и др.) Если принять этот факт, окажется, что даже такой стресс, который присутствует при многих рыбободческих манипуляциях, может привести к дестабилизации свертывающих механизмов у карпов в сторону гиперкоагуляции достаточно долгое время. У тилапий также активизировались эти процессы по некоторым путям, но не продолжительное время.

Мы обнаружили несколько потенциальных показателей гемостаза в качестве биомаркеров длительного (хронического) стресса, тогда как изменения коагулограммы в контроле и при остром стрессе в целом были схожи. Вероятно, причиной этому является слишком короткое дестабилизирующее действие дексаметазон-фосфата, а также воздействие хэндлинг-стресса в обоих случаях. Для более полного и точного изучения воздействия острого стресса и поиска биомаркеров необходимы дополнительные почасовые или посуточные исследования крови.

Авторы советуют соблюдать осторожность при анализе полученных выводов и помнить, что

Таблица 2

Динамика параметров коагулограммы карпов в ходе эксперимента (n=8)

Наименование показателя	До обработки			7-е сутки			21-е сутки		
	контрольная группа	первая экспериментальная группа	вторая экспериментальная группа	контрольная группа	первая экспериментальная группа	вторая экспериментальная группа	контрольная группа	первая экспериментальная группа	вторая экспериментальная группа
ТВ, с	>800 ^{bc}	>800 ^{bc}	>800,00 ^{bc}	144,9±20,4 ^c	128,75±19,98	184,58±39,30	119,70±25,50	132,23±30,92	130,33±14,39
ПВ, с	>800 ^{bc}	>800 ^{bc}	626,93±108,12 ^{bc}	160,75±16,45 ^c	157,18±18,5*	257,10±69,11 ^c	110,90±14,81	137,90±26,45	134,88±10,24
АЧТВ, с	27,05±1,06 ^{bc}	20,85±2,63 ^{bc}	25,35±4,93 ^{bc}	8,90±0,23 ^c	8,13±0,38*	10,30±0,53 ^c	7,98±0,35	7,58±0,33	8,28±0,52
Фибриноген, г/л	0,86±0,03 ^{bc}	0,69±0,20 ^{bc}	0,60±0,17 ^{bc}	0,77±0,05* ^c	0,97±0,01	1,06±0,01 ^c	0,97±0,05*	0,99±0,02*	1,22±0,03
РФМК, мг/100 мл	29,00±0,41 ^c	28,00±0,71* ^c	30,00±0,71 ^{bc}	28,50±0,29 ^c	29,00±0,58 ^c	27,75±1,31	25,50±1,26*	24,25±1,18*	28,00±0,00
АТ III, %	95,54±1,99 ^{bcd}	101,38±4,63 ^{bcd}	90,57±13,52	65,17±3,91 ^{bc}	78,21±2,91 ^{cd}	76,69±9,08 ^d	75,64±10,41*	95,15±2,83	107,04±3,67

Примечание: # - Различия с показателем первой экспериментальной группы в тот же день эксперимента достоверны ($p \leq 0,05$); * - Различия с показателем второй экспериментальной группы в тот же день эксперимента достоверны ($p \leq 0,05$); ^b - Различия с аналогичным показателем аналогичной группы на 7-е сутки эксперимента достоверны ($p \leq 0,05$); ^c - Различия с аналогичным показателем аналогичной группы на 21-е сутки эксперимента достоверны ($p \leq 0,05$)

Динамика параметров коагулограммы тилапий в ходе эксперимента (n=10)

Наименование показателя	До обработки			7-е сутки			21-е сутки		
	контрольная группа	первая экспериментальная группа	вторая экспериментальная группа	контрольная группа	первая экспериментальная группа	вторая экспериментальная группа	контрольная группа	первая экспериментальная группа	вторая экспериментальная группа
ТВ, с	773,46± 134,21	>1000 ^b	>1000	703,00± 170,32	774,86± 84,53 ^c	863,28± 136,73	950,00± 50,00	>1000	>1000
ПВ, с	301,94± 133,31 ^b	315,70± 122,56 ^b	736,08± 202,81	632,30± 173,65	562,60 ±147,26 ^c	707,25± 166,24 ^c	291,35± 171,12	248,56± 140,69	170,40± 26,97
АЧТВ, с	6,64± 1,86 ^{*bc}	7,12± 1,33 ^{*bc}	13,88± 3,82	11,90± 1,58	11,86± 1,70	8,15± 3,07	13,15± 3,01	9,54± 0,46	11,10± 1,56
Фибриноген, г/л	0,65± 0,004 ^{bc}	0,61± 0,03 ^b	0,60± 0,04 ^b	0,39± 0,10 ^c	0,43± 0,09 ^{*c}	0,18± 0,08 ^c	0,61± 0,02	0,59± 0,02	0,64± 0,10
Антитромбин III, %	126,60± 31,83	175,00± 42,42	165,25± 53,67	119,50± 33,05	167,60± 44,23	178,00± 108,03	122,00± 34,35	187,20± 12,80	167,33± 141,35
РФМК, мг/100 мл	15,80± 2,18 ^{bc}	18,00± 2,98	10,00± 6,04	5,13± 0,92 [*]	13,40± 4,30	17,00± 3,24	10,50± 4,97	10,00± 3,49 [*]	22,67± 0,67

Примечание: [#] - Различия с показателем первой экспериментальной группы в тот же день эксперимента достоверны ($p \leq 0,05$); ^{*} - Различия с показателем второй экспериментальной группы в тот же день эксперимента достоверны ($p \leq 0,05$); ^b - Различия с аналогичным показателем аналогичной группы на 7-е сутки эксперимента достоверны ($p \leq 0,05$); ^c - Различия с аналогичным показателем аналогичной группы на 21-е сутки эксперимента достоверны ($p \leq 0,05$)

не существует стандартных методик исследования гемостаза у животных с температурой тела, отличающейся от человеческой, и есть острая необходимость в корректировке или разработке новых методик, адаптированных для рыб.

Заключение

1. Наиболее рано и явно реагирующим на влияние гормониндуцированных стрессовых воздействий у карпов является уровень фибриногена плазмы, концентрация которого прямо пропорциональна длительности стресса.

2. У тилапий множество параметров гемостаза были наиболее чувствительны к воздействию длительного стресса по сравнению с контролем: сокращение АЧТВ, ПВ, концентрации фибриногена и увеличение РФМК. Указанные параметры можно определить в качестве маркеров (биоиндикаторов) развития стрессовых состояний, приводящих к дестабилизации гомеостаза продуктивных стад и декоративных особей карпов и тилапий.

Библиографический список

1. Wendelaar Bonga, S. E. The stress response in fish / S. E. Wendelaar Bonga // Physiological reviews. – 1997. – Vol. 77, № 3. – P. 591–625.
2. Smith, A. C. Formation of lethal blood clots in fishes / A. C. Smith // Journal of Fish Biology. –

1980. – Vol. 16, № 1. – P. 1–4.

3. Физиология рыб. Книга 1. Физиология крови и кровообращения рыб. Иммунная система рыб : учебное пособие / Л. В. Жичкина, Л. Ю. Карпенко, М. К. Касумов, В. Г. Скопичев. – Санкт-Петербург : Квадро, 2017. – 200 с. – ISBN 978-5-906371-05-5.

4. Toukh, M. Construction noise induces hypercoagulability and elevated plasma corticosteroids in rats / M. Toukh, S. P. Gordon, M. Othman // Clinical and applied thrombosis/hemostasis. – 2014. – Vol. 20, № 7. – P. 710–715.

5. Induction of hypercoagulability condition by chronic localized cold stress in rabbits / S. Khatun, N. Kanayama, H. M. Belayet, N. Tokunaga, K. Sumimoto, T. Kobayashi, T. Terao // Thrombosis and haemostasis. – 1999. – Vol. 81, № 03. – P. 449–455.

6. Experimentally induced stress in man: effects on blood coagulation and fibrinolysis / J. Palmblad, M. Blombäck, N. Egberg, J. Fröberg, C. G. Karlsson, L. Levi // Journal of psychosomatic research. – 1977. – Vol. 21, № 1. – P. 87–92.

7. Tavares-Dias, M. A review of the blood coagulation system of fish / M. Tavares-Dias, S. R. Oliveira // Revista Brasileira de Biociências. – 2009. – Vol. 7, № 2. – P. 205–224.

8. Березина, Д. И. Динамика уровня фи-

бриногена в крови рыб под влиянием стресса / Д. И. Березина, Л. Л. Фомина // Молокохозяйственный вестник. – 2018. – № 3(31). – С. 8–15.

9. Пересторонина, Е. А. Влияние кортизола на коагуляционные и иммунологические показатели крови рыб / Е. А. Пересторонина, Д. И. Березина, Л. Л. Фомина // Молодые исследователи агропромышленного и лесного комплексов – регионам : материалы IV Международной молодежной научно–практической конференции. – Вологда : ФГБОУ ВО ВГМХА им. Н.В. Верещагина, 2019. – Т. 3, ч. 2. – С. 84–89.

10. Berezina, D. I. Effect of Stress Factors on the Coagulogram of Common Carp, *Cyprinus carpio* / D. I. Berezina, L. L. Fomina, A. D. Goreva // Biosciences Biotechnology Research Asia. – 2020. – Vol. 17, No 3. – P. 629–635.

11. Причепя, М. В. Вміст кортизолу в тканинах йоржа та судака за різних умов зимівлі / М. В. Причепя // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені В. Гнатюка. Серія Біологія. – 2015. – № 3-4. – С. 547-550.

12. Романенко, В. Д. Гормональный механизм энергообеспечения адаптации рыб к воз-

действию минерального азота / В. Д. Романенко, А. С. Потрохов, О. Г. Зиньковский // Гидробиологический журнал. – 2010. – Т. 46, № 6. – С. 58–66.

13. Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism / B. Costas, L. E. Conceição, C. Aragão, J. A. Martos, I. Ruiz-Jarabo, J. M. Mancera, A. Afonso // Aquaculture. – 2011. – Vol. 316, № 1–4. – P. 68–76.

14. Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio* / J. M. Ramsay, G. W. Feist, Z. M. Varga, M. Westerfield, M. L. Kent, C. B. Schreck // Aquaculture. – 2006. – Vol. 258, № 1–4. – P. 565–574.

15. Clove oil as an anaesthetic for different freshwater fish species / J. Hamackova, J. Kouril, P. Kozak, Z. Stupka // Bulgarian Journal of Agricultural Science. – 2006. – Vol. 12, № 2. – P. 185-194.

16. Полиданов, М. А. Реактивность и стресс: гемостатическая реактивность организма при стрессе. Исследование влияние стресса на гемокоагуляцию / М. А. Полиданов, А. А. Скороход, Н. Е. Бабиченко // Modern Science. – 2020. – № 3(1). – С. 308–312.

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF COAGULOGRAM PARAMETERS FOR ASSESSMENT OF STRESS CONDITIONS IN EXPERIMENTAL STRESS MODEL CONDITIONS OF CARP (*CYPRINUS CARPIO*) AND TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

Berezina D.I., Fomina L.L., Ryzhakov A.V.
FSBEI HE Vologda State Dairy Academy
160555, Vologda region, Vologda, Molochnoe v., Shmidt st., 2,
tel.: +7 (8172) 52-57-30, e-mail: academy@molochnoe.ru

Keywords: carps, tilapia, corticosteroids, hemostasis, stress, diagnostics

*The paper presents research results of reaction of some parameters of secondary hemostasis of commercial fish - carp *Cyprinus carpio* and tilapia *Oreochromis niloticus* to stress of various durations induced by corticosteroids (dexamethasone and betamethasone). The purpose of the work was to determine the earliest changing coagulogram parameters of fish under conditions of experimental stress model and to assess the suitability of these parameters for early diagnosis of stress reactions. The study was carried out in Vologda region, the fish were divided into three groups: fish with chronic stress, with acute stress and control animals, their blood was taken by puncture of the tail vein before hormone treatment, and then 7 and 21 days after. The following changes in coagulogram parameters were studied: thrombin time (TT), prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), concentration of fibrinogen and soluble fibrin-monomer complexes (SFMC), antithrombin III. It was found that the level of plasma fibrinogen, the concentration of which is directly proportional to stress duration is the earliest and the most explicitly reacting to stress influence for carps. As far as tilapia is concerned, many parameters of hemostasis were more sensitive to the effects of prolonged stress compared to controls: a decrease of APTT, PT, fibrinogen concentration, and an increase of SFMC. These parameters can be determined as markers (bioindicators) of development of stress conditions in these fish species.*

Bibliography:

1. Wendelaar Bonga, S. E. The stress response in fish / S. E. Wendelaar Bonga // *Physiological reviews*. - 1997. - Vol. 77, № 3. - P. 591-625.
2. Smith, A. C. Formation of lethal blood clots in fishes / A. C. Smith // *Journal of Fish Biology*. - 1980. - Vol. 16, № 1. – P. 1–4.
3. *Physiology of fish. Book -1. Physiology of blood and blood circulation of fish. The immune system of fish: a textbook* / L. V. Zhichkina, L. Yu. Karpenko, M. K. Kasumov, V. G. Skopichev. - St. Petersburg: Kladro, 2017. - 200 p. – ISBN 978-5-906371-05-5.
4. Toukh, M. Construction noise induces hypercoagulability and elevated plasma corticosteroids in rats / M. Toukh, S. P. Gordon, M. Othman // *Clinical and applied thrombosis/hemostasis*. - 2014. - Vol. 20, № 7. - P. 710-715.
5. Induction of hypercoagulability condition by chronic localized cold stress in rabbits / S. Khatun, N. Kanayama, H. M. Belayet, N. Tokunaga, K. Sumimoto, T. Kobayashi, T. Terao // *Thrombosis and haemostasis*. - 1999. - Vol. 81, № 03. - P. 449–455.
6. Experimentally induced stress in man: effects on blood coagulation and fibrinolysis / J. Palmblad, M. Blombäck, N. Egberg, J. Fröberg, C. G. Karlsson, L. Levi // *Journal of psychosomatic research*. - 1977. - Vol. 21, № 1. – P. 87–92.
7. Tavares-Dias, M. A review of the blood coagulation system of fish / M. Tavares-Dias, S. R. Oliveira // *Revista Brasileira de Biociências*. - 2009. - Vol. 7, № 2. - P. 205-224.
8. Berezina, D. I. Dynamics of fibrinogen level in fish blood under stress influence / D. I. Berezina, L. L. Fomina // *Dairy Vestnik*. - 2018. - № 3 (31). – P. 8–15.
9. Perestoronina, E. A. Influence of cortisol on coagulation and immunological parameters of fish blood / E. A. Perestoronina, D. I. Berezina, L. L. Fomina

// Young researchers of the agro-industrial and forestry complexes - for regions: materials of the IV International Youth scientific and practical conference. - Vologda: FSBEI HE Vologda State Dairy Academy named after N.V. Vereshchagin, 2019. - Vol. 3, part 2. - P. 84–89.

10. Berezina, D. I. Effect of Stress Factors on the Coagulogram of Common Carp, *Cyprinus carpio* / D. I. Berezina, L. L. Fomina, A. D. Goreva // Biosciences Biotechnology Research Asia. - 2020. - Vol. 17, No 3. - P. 629-635.

11. Prychepa, M. V. Incorporating cortisol in tissues of George and pike perch for different winter conditions / M. V. Prychepa // Scientific Notes of Ternopil National Pedagogical University named after V. Gnatyuk. Series Biology. - 2015. - № 3-4. - P. 547-550.

12. Romanenko, V. D. Hormonal mechanism of energy supply of fish adaptation to the effects of mineral nitrogen / V. D. Romanenko, A.S. Potrokhov, O. G. Zinkovskiy // Hydrobiological Journal. - 2010. - V. 46, № 6. - P. 58–66.

13. Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism / B. Costas, LE Conceição, C. Aragão, JA Martos, I. Ruiz-Jarabo, JM Mancera, A. Afonso // Aquaculture. - 2011. - Vol. 316, nos. 1–4. – P. 68–76.

14. Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio* / J. M. Ramsay, G. W. Feist, Z. M. Varga, M. Westerfield, M. L. Kent, C. B. Schreck // Aquaculture. - 2006. - Vol. 258, nos. 1–4. – P. 565–574.

15. Clove oil as an anaesthetic for different freshwater fish species / J. Hamackova, J. Kouril, P. Kozak, Z. Stupka // Bulgarian Journal of Agricultural Science. - 2006. - Vol. 12, № 2. - P. 185-194.

16. Polidanov, M. A. Reactivity and stress: hemostatic reactivity of the organism under stress. Study of the effect of stress on hemocoagulation / M. A. Polidanov, A. A. Skorokhod, N. E. Babichenko // Modern Science. - 2020. - № 3(1). – P. 308–312.