

Д. Н. Скафарь, Д. В. Шумейко

Трилон-Б (ЭДТА-Na₂) – антикоагулянт для гемолимфы австралийского красноклешневого рака (*Cherax quadricarinatus*)

Аннотация.

Цель: подбор антикоагулянтов на основе Трилона-Б и методик их применения для работы с гемолимфой австралийского красноклешневого рака (*C. quadricarinatus*).

Материалы и методы. Для проведения исследования использованы разноразмерные самцы и самки австралийского красноклешневого рака (*Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868)). В качестве антикоагулянта использовался Трилон-Б (ЭДТА-Na₂), концентрация которого составляла 4 %. Шприц объемом 2 мл с иглой 23G для изъятия гемолимфы предварительно промывали с оставлением в игле и подыгольном конусе антикоагулянта (около 1/3 объема подыгольного конуса заполняли раствором). Эксперимент представлен следующими сериями: 1. различия между общим числом гемоцитов (ОЧГ) и долей гранулоцитов в нативной гемолимфе и обработанной небольшим количеством Трилона-Б; 2. различия в содержании общего белка гемолимфы в нативной и обработанной небольшим количеством Трилоном-Б гемолимфе; 3. изменение общего числа гемоцитов (ОЧГ) и доли гранулоцитов в гемолимфе, обработанной небольшим количеством Трилона-Б сразу после отбора пробы и через сутки. Для проведения работ использовали выборки по 20 особей, при этом для первых двух серий из каждой изымали по две пробы гемолимфы, из третьей – одну. Шприцы с гемолимфой обработанной антикоагулянтом хранили в холодильнике при температуре 8,5°C. Дополнительно проводили аналогичные исследования различия ОЧГ и доли гранулоцитов в гемолимфе сразу же после отбора пробы с обработкой многокомпонентным антикоагулянтом, состоящим из 4 г Трилона-Б, 3 г цитрата натрия, 2 г глюкозы и 1 г NaCl на 100 мл дистиллированной воды. Гемолимфу отбирали шприцом из вентрального синуса. Проводили определение трех показателей: общее число гемоцитов (ОЧГ), доля гранулоцитов и общее содержание белка. Подсчет гемоцитов и определение доли гранулоцитов производили в камере Горяева под световым микроскопом. Общий белок определяли рефрактометрическим методом.

Результаты. В результате исследования выявлены достоверные различия в доли гранулоцитов ($p < 0,05$), которых на 32 % больше в обработанной антикоагулянтом, чем в нативной гемолимфе что может объясняться равномерным распределением всех типов гемоцитов в образце. По остальным показателям всех серий достоверных различий выявлено не было. Исследования гемолимфы обработкой многокомпонентным антикоагулянтом показали низкий уровень сохранности гемоцитов ($p < 0,05$) и доли гранулоцитов по сравнению с показателями сразу после отбора, поэтому не отображены в работе.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что существует возможность использования Трилона-Б (4 %) при работе с гемолимфой. Антикоагулянт препятствует образованию геля и быстрому разрушению гемоцитов, способствует равномерному распределению клеток в камере Горяева и позволяет применять рефрактометр при определении общего белка крови. Использование антикоагулянта способствует сохранению гемоцитов в течение суток, на уровне, позволяющем применять Трилон-Б на практике.

Ключевые слова: австралийский красноклешневый рак; *Cherax quadricarinatus*; антикоагулянт; Трилон-Б; ЭДТА-Na₂; гемолимфа; гемоциты; общий белок.

Авторы:

Скафарь Денис Николаевич — студент; e-mail: skafden@mail.ru;

Шумейко Дмитрий Валентинович — преподаватель; e-mail: dima-shum-92@mail.ru.

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», факультет – биологический, кафедра – водные биоресурсы и аквакультура; 350040, Россия, г. Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149.

Введение. Австралийский красноклешневый рак (*Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868)) — перспективный вид в раководстве, рекомендовал себя как важный объект тепловодной аквакультуры ряда стран [1–3], физиолого-

биохимические показатели гемолимфы которого стали активно изучаться в последнее время [4–10]. Прижизненная диагностика физиологического состояния ракообразных на основании показателей гемолимфы является актуальной темой [11–15].

Для диагностики используют различные гематологические и биохимические показатели. Как правило к гематологическим показателям относят: цвет гемолимфы, присутствие в ней бактерий, общее число гемоцитов (ОЧГ) и долю каждого из 4-х типов клеток, в частности гранулоцитов, а также ряд других показателей — последние три определяются визуально с применением светового микроскопа (рис. 1а).

Однако, при работе с гемолимфой возникает ряд трудностей, преодоление которых требует от исследователя аккуратности, точности и скорости в работе из-за образования геля, скопления гемоцитов (рис. 1б) и их скорого разрушения. Эти обстоятельства заметно усложняют работу с кровью — делают пробы непригодными для анализа, не позволяют провести точный подсчет общего числа гемоцитов и долю гранулоцитов, что исключает возможность применения микроскопии или приводит к неверным выводам о физиологическом состоянии рака. Это является недопустимым при работе с ракообразными на производстве. Не всегда существует возможность моментального анализа пробы после ее изъятия, так как транспортировка проб в лабораторию и обработка большого количества материала может занимать длительное время.

В виду этого возникает необходимость в применении антикоагулянта. Для позвоночных жи-

вотных — человека, в частности, есть зарекомендовавшие себя в клинической и лабораторной диагностике препараты: калиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), гепарин и цитрат натрия [16–17]. Что касается ракообразных, то существует ряд рецептов антикоагулянтов как для морских [18–19], так и для пресноводных [11, 20–21] декапод, в том числе и австралийского красноклешневого рака [5–6, 8]. Однако, в виду различных биологических особенностей видов, а также из соображения удобства применения антикоагулянтов на практике, необходимо продолжать поиски новых возможных компонентов из уже известных, создание рецептур препаратов и методик их применения.

Одним из веществ, которое можно использовать в качестве антикоагулянта для ракообразных может выступать Трилон-Б (ЭДТА- Na_2). Существуют работы, в которых он применяется как при работе с кровью человека [22] и млекопитающих [23], так и при работе с гематологией пресноводных рыб [24] и гемолимфой австралийского красноклешневого рака [5–6, 8].

Помимо очевидных плюсов в сторону применения антикоагулянтов, есть минус — это невозможность применения такого простого и быстрого, но вполне точного метода как рефрактометрическое определение общего белка крови [25–26] ввиду разбавления анализируемой пробы. Данную трудность можно преодолеть применением крайне малых доз антикоагулянта или использованием другого метода определения общего содержания белка. При использовании антикоагулянта не представляется возможным определение времени свертываемости крови — одного из показателей, используемых при оценке физиологического состояния ракообразных [12–13, 26]. Эту проблему можно решить путем дополнительного изъятия гемолимфы шприцом без обработки.

Цель исследований — подбор антикоагулянтов на основе Трилона-Б и методик их применения для работы с гемолимфой австралийского красноклешневого рака (*C. quadricarinatus*).

Материалы и методы Опыт проводился в лаборатории перспективных технологий в аквакультуре на базе бизнес-инкубатора ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет». Для проведения исследования

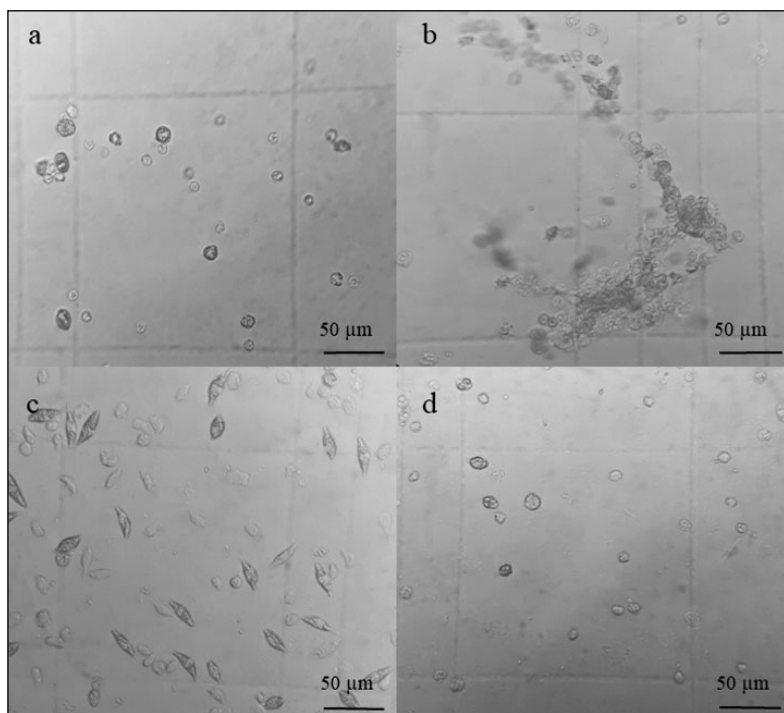


Рис. 1. Гемоциты *C. quadricarinatus* в камере Горяева. Увеличение 400х: А – нативная гемолимфа сразу после отбора; В – скопление гемоцитов в нативной гемолимфе; С – гемолимфа обработанная Трилоном-Б сразу после отбора; D – обработанная Трилоном-Б гемолимфа через сутки после изъятия

были использованы разноразмерные самцы и самки австралийского красноклешневого рака (*Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868)).

Построение экспериментов.

В качестве антикоагулянта выбран Трилон-Б (ЭДТА- Na_2), концентрация которого составляла 4 %. Шприц объемом 2 мл с иглой 23G для изъятия гемолимфы предварительно промывали с оставлением в игле и подыгольном конусе антикоагулянта (около 1/3 объема подыгольного конуса заполняли раствором).

Эксперимент представлен следующими сериями: 1. различия между общим числом гемоцитов (ОЧГ) и долей гранулоцитов в нативной гемолимфе ($n=20$) и обработанной небольшим количеством Трилона-Б ($n=20$); 2. различия в содержании общего белка гемолимфы в нативной ($n=20$) и обработанной небольшим количеством Трилоном-Б ($n=20$) гемолимфе; 3. изменение общего числа гемоцитов (ОЧГ) и доли гранулоцитов в гемолимфе, обработанной небольшим количеством Трилона-Б сразу после отбора пробы ($n=20$) и через сутки ($n=20$). Для проведения работ использовали выборки по 20 особей, при этом для первых двух серий из каждой изымали по две пробы гемолимфы, из третьей — одну. Шприцы с гемолимфой обработанной антикоагулянтом хранили в холодильнике при температуре 8,5°C.

Дополнительно проводили аналогичные исследования различия ОЧГ и доли гранулоцитов в гемолимфе сразу же после отбора пробы с обработкой антикоагулянтом, состоящего из 4 г Трилона-Б, 3 г цитрата натрия, 2 г глюкозы и 1 г NaCl на 100 мл дистиллированной воды.

Отбор гемолимфы, определение общего числа гемоцитов, доли гранулоцитов и общего содержания белка.

Гемолимфу отбирали шприцом из вентрального синуса в объеме 0,1-0,3 мл с учетом норм санитарии, такой способ позволяет прижизненно

отбирать гемолимфу, не нанося здоровью раков значительного ущерба [13].

Проводили определение трех показателей: общее число гемоцитов (ОЧГ), доля гранулоцитов и общее содержание белка. Подсчет гемоцитов и определение доли гранулоцитов производили в камере Горяева под световым микроскопом. Для подсчета ОЧГ применяли следующую формулу: ОЧГ в 1 мкл = $N \times 5$, где N — число всех гемоцитов в 50 больших квадратах на сетке камеры [28]. Долю гранулоцитов определяли по следующей формуле: доля гранулоцитов в 1 мкл = $GC \times 100/N$, где GC — количество гранулоцитов в 50 больших квадратах на сетке камеры. Подсчет гранулоцитов велся в тех же квадратах сетки камеры Горяева, что и подсчет числа гемоцитов.

Общий белок определяли рефрактометрическим методом в соответствии с рекомендациями, составленными Ковачевой [26] при работе с гемолимфой камчатского краба и речных раков.

Статистическая обработка.

Расчеты и графическое оформление полученных данных проводили с использованием программ Microsoft Excel и Statistica 14. Вычисляли следующие показатели: среднее значение (\bar{x}), среднее квадратическое отклонение (σ), коэффициент вариации (CV), медиана (50 %), 25-й (25 %) и 75-й процентиль (75 %). Для проверки статистической достоверности различий в группах использовали U-критерий Манна-Уитни. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. По нашим наблюдениям при сравнении 4-х % растворов Трилона-Б и цитрата натрия, только Трилон-Б предотвращает быстрый распад клеток и образование ими сгустков, что является необходимым критерием при подборе антикоагулянтов.

В результате исследования выявлены достоверные различия в доли гранулоцитов (табл. 1, рис. 2) ($p < 0,05$), которых на 32 % больше в об-

Таблица 1. Показатели ОЧГ и доли гранулоцитов в нативной гемолимфе и обработанной Трилоном-Б

Показатели	ОЧГ, шт./мкл		Доля гранулоцитов, %	
	Нативная гемолимфа	Обработанная Трилоном-Б	Нативная гемолимфа	Обработанная Трилоном-Б
$\bar{x} \pm \sigma$	2224,0 \pm 1651,9	2611,0 \pm 1553,6	016,5 \pm 8,57	21,80 \pm 8,46
CV	74,3	59,5	52,0	38,8
P*	$p > 0,05$		$p < 0,05$	

* Уровень достоверности различий между группами.

работанной антикоагулянт, чем в нативной гемолимфе, что может объясняться равномерным распределением всех типов гемоцитов в образце (рис. 1с). В нативной гемолимфе происходит быстрое образование геля и скопление клеток в разных частях камеры Горяева, что может давать неверное представление о доли гранулоцитов. Помимо этого, по наблюдениям Ковачевой, и Александровой [26] гемоциты речных раков на сделанных ими мазках распределены неравномерно, в особенности гранулоциты. Это может свидетельствовать о том, что гранулоциты интенсивнее других типов клеток оседают и прилипают к внутренней поверхности шприца и стеклу. В то же время различия по ОЧГ между нативной и обработанной гемолимфой статистически не достоверны ($p < 0,05$) и составляют 17,4 %.

Данные полученные при сравнении общего белка цельной и обработанной небольшим количеством Трилона-Б гемолимфой (табл. 2, рис. 3) говорят о том, что статистически значимых различий между группами нет ($p > 0,05$). Это дает

возможность применять метод рефракции к гемолимфе обработанной небольшим количеством Трилона-Б.

В третьей серии эксперимента через сутки после отбора уменьшается ОЧГ на 19,8 % по сравнению со сразу отобранной и обработанной гемолимфой, в то время как доля гранулоцитов увеличивается на 21,1 % (рис. 2с–2д; табл. 3), что может свидетельствовать о том, что различные типы клеток начинают разрушаться в разное время, что проявляется снижением ОЧГ и ввиду этого повышением доли гранулоцитов на общем фоне.

Исследования различия ОЧГ и доли гранулоцитов в гемолимфе сразу же после отбора пробы с обработкой многокомпонентным антикоагулянт (Трилона-Б, цитрата натрия, глюкоза, NaCl, дистиллированная вода) показали низкий уровень сохранности гемоцитов ($p < 0,05$, $n=5$) и доли гранулоцитов по сравнению с показателями сразу после отбора, поэтому не отображены в работе. Следует отметить, что это не мешает его

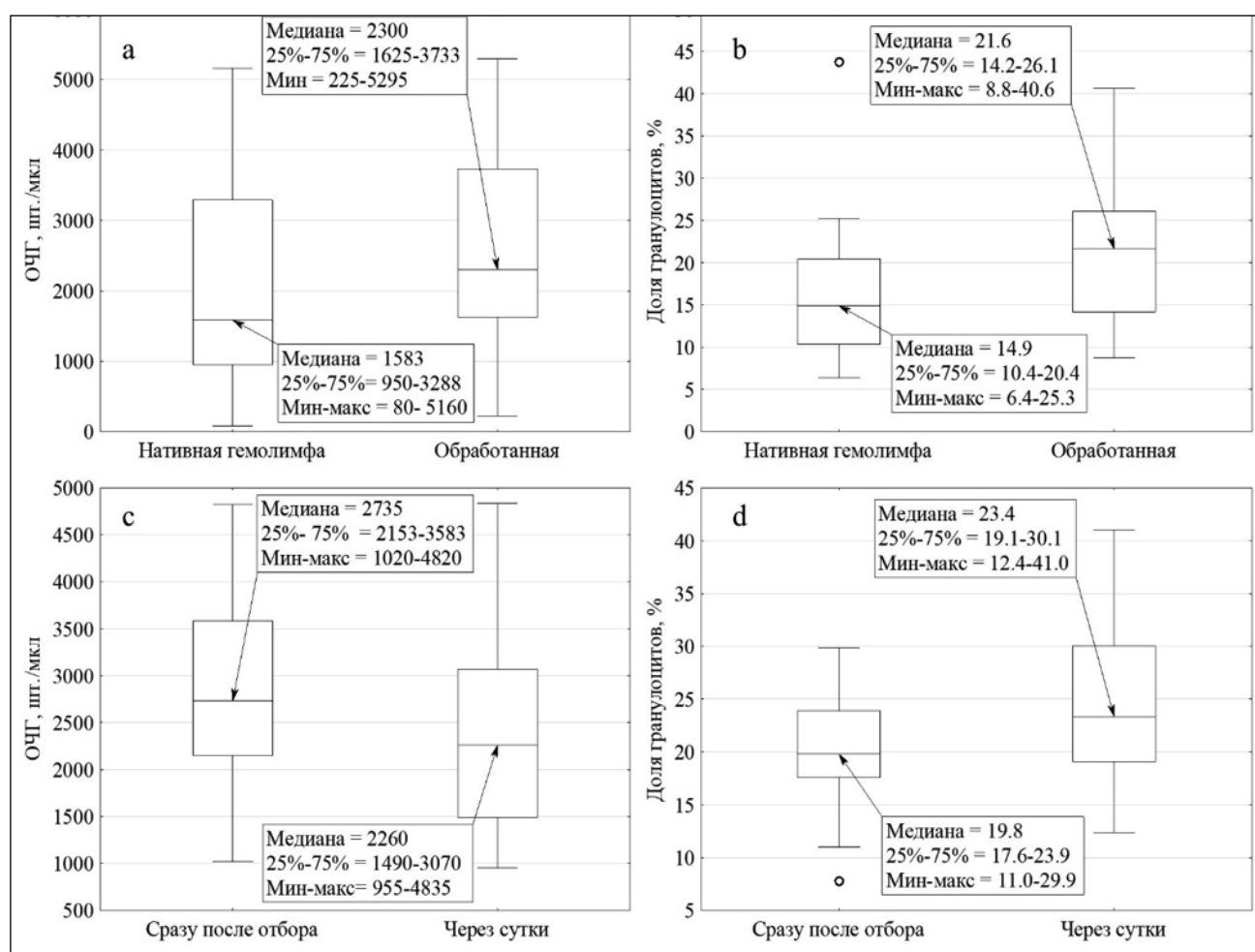


Рис. 2. Гематологические показатели: А – показатели ОЧГ в обработанной Трилоном-Б гемолимфе сразу после отбора и через сутки; В – показатели доли гранулоцитов в обработанной Трилоном-Б гемолимфе сразу после отбора и через сутки; С – показатели ОЧГ в нативной гемолимфе и обработанной Трилоном-Б; D – показатели доли гранулоцитов в нативной гемолимфе и обработанной Трилоном-Б

применению в работе с гемолимфой в течение непродолжительного времени с момента изъятия, а также применению его в больших соотношениях с гемолимфой.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что существует возможность использования четырехпроцентного Трилона-Б при работе с гемолимфой. Антикоагулянт препятствует образованию геля и быстрому разрушению гемоцитов, способствует равномерному распределению клеток в камере Горяева и позволяет применять рефрактометр при определении общего белка крови. Использование антикоагулянта способствует сохранению гемоцитов в течение суток, на уровне, позволяющем применять Трилон-Б на

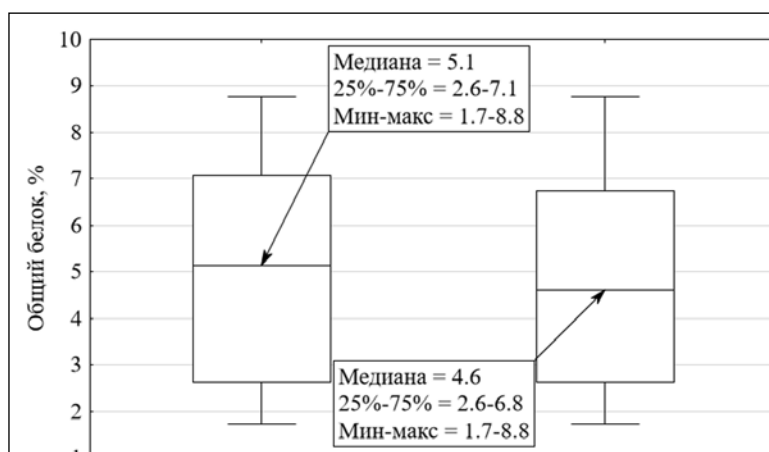


Рис. 3. Показатели общего белка в гемолимфе

практике. При этом следует продолжать работы по разработке методик хранения и транспортировки, обработанной антикоагулянтом крови.

Таблица 2. Общий белок в нативной гемолимфе и обработанной Трилоном-Б, %

Показатели	Нативная гемолимфа	Гемолимфа обработанная Трилоном-Б
$\bar{x} \pm \sigma$	5,00 \pm 2,30	4,80 \pm 2,18
CV	45,7	45,6
P*	p>0,05	

* Уровень достоверности различий между группами.

Таблица 3. Показатели ОЧГ и доли гранулоцитов сразу после отбора и через сутки

Показатели	ОЧГ, шт./мкл		Доля гранулоцитов, %	
	После отбора	Через сутки	После отбора	Через сутки
$\bar{x} \pm \sigma$	2929,0 \pm 1045,1	2445,0 \pm 1148,9	20,50 \pm 5,41	24,80 \pm 7,60
CV	35,7	47,0	26,5	30,7
P*	p>0,05		p>0,05	

* Уровень достоверности различий между группами.

Литература

- Лагуткина Л. Ю. Новый объект тепловодной аквакультуры – австралийский красноклешневый рак (*Cherax quadricarinatus*) / Л. Ю. Лагуткина, С. В. Пономарев // Вестник АГТУ. – 2008. – № 6. – С. 220-223.
- Арыстангалиева В. А., Жигин А. В. Австралийский красноклешневый рак (*Cherax quadricarinatus*) – перспективный объект аквакультуры России // Состояние и пути развития аквакультуры в Российской Федерации в свете импортозамещения и обеспечения продовольственной безопасности страны: материалы национальной научно-практической конференции, Саратов, 4-5 октября 2016 г. Саратов, 2016. С. 5-9.
- Лагуткина Л. Ю. Фактологическое обеспечение практик повышения эффективности выращивания тропических пресноводных видов / Л. Ю. Лагуткина, Е. Г. Кузьмина и др. // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. – 2020. – №2. – С. 94–105. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2020-2-94-105>.
- Bone J. W. Using biochemical markers to assess the effects of imposed temperature stress on freshwater decapod crustaceans: *Cherax quadricarinatus* as a test case / J. W. Bone, G. M. Renshaw, J. M. Furse, C. H. Wild // J Comp Physiol B. – 2014. – V. 185. – P. 291–301. <https://doi.org/10.1007/s00360-014-0883-3>.

5. Wu D.-L. Effects of cold acclimation on the survival, feeding rate, and non-specific immune responses of the freshwater red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) / D.-L. Wu, Z.-Q. Liu et al. // *Aquaculture International*. — 2018. — V. 26. — P. 557–567. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0236-4>.
6. Sanchez-Salgado J. L. In vivo administration of LPS and β -glucan generates the expression of a serum lectin and its cellular receptor in *Cherax quadricarinatus* / J. L. Sanchez-Salgado, M. A. Pereyra et al. // *Fish & Shellfish Immunology*. — 2019. — V. 94. — P. 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.061>
7. Лагуткина Л. Ю., Ахмеджанова А. Б., Шейхгасанов К. Г. Оценка гемоцитарной формулы австралийских раков // 64-я Международная научная конференция Астраханского государственного технического университета, посвященная 90-летию со дня образования Астраханского государственного технического университета: материалы конференции, Астрахань, 20–25 мая 2020 года. Астрахань: Астраханский государственный технический университет, 2020. С. 239.
8. Li F. Crayfish hemocytes develop along the granular cell lineage / F. Li, Z. Zheng, H. Li, R. Fu, L. Xu, F. Yang // *Scientific Reports*. — 2021. — № 11. — P. 13099. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92473-9>.
9. Лагуткина Л. Ю. Гематологические и биохимические показатели гемолимфы австралийского красноклещевого рака / Л. Ю. Лагуткина, Е. М. Евграфова, Е. Г. Кузьмина, А. М. Мазлов // *Вестник Астраханского государственного технического университета*. — 2021. Серия: Рыбное хозяйство — № 2. — С. 134–143. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2021-2-134-143>.
10. Лагуткина Л. Ю. Биоиндикаторы констант гомеостаза внутренней среды ракообразных, культивируемых в различных условиях среды с целью получения товарной продукции / Л. Ю. Лагуткина, А. Б. Ахмеджанова, С. В. Пономарев, А. С. Мартыанов // *Рыбоводство и рыбное хозяйство*. — 2021. — Т. 189. — С. 57–69. <https://doi.org/10.33920/sel-09-2110-05>.
11. Jussilla J. Physiological responses of Astacid and Parastacid crayfishes (*Crustacea: Decapoda*) to conditions of intensive culture: doctoral dissertation. Kuopio. 1997. 136 p.
12. Paterson B. D. Prediction survival of western rock lobster *Panulirus cygnus*, using discriminant analysis of hemolymph parameters taken immediately following simulated handling treatments / B. D. Paterson, P. T. Spanogle et al. // *New Zealand Journ. of Marine and Freshwater Research*. — 2005. — V. 39. — P. 1129–1143.
13. Александрова Е. Н. Прижизненное определение физиологического статуса десятиногих ракообразных (*Crustacea: Decapoda*) по гематологическим показателям / Е. Н. Александрова, Н. П. Кочева // *Успехи физиологических наук*. — 2010. — Т. 41. — № 2. — С. 51–67.
14. Корягина Н. Ю. Физиолого-биохимическая характеристика речных раков при выращивании в искусственных условиях: дис. ... канд. биол. наук. М., 2010. 151 с.
15. Пронина Г. И. Комплексная прижизненная физиологическая оценка речных раков в аквакультуре / Г. И. Пронина, Н. Ю. Корягина // *Теоретические и прикладные проблемы агропромышленного комплекса*. — 2014. — Т. 21. — С. 46–49.
16. Новикова И. А., Ходулева С. А. Клиническая и лабораторная гематология: учеб. пособие. Минск, 2013, Высш. шк. 446 с.
17. Некрасова И. И., Квочко А. Н., Цыганский Р. А., Шулунова А. Н., Сидельников А. И. Гематология: учебное пособие для вузов СПб, 2021. Лань. 208 с.
18. Soderhall K. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine Decapods, and prophenoloxidase distribution / K. Soderhall, V. J. Smith // *J. Developmental and Comparative Immunology*. — 1983. — V. 7. — P. 229–239.
19. Hose J. E. A Decapod Hemocyte Classification Scheme, Integrating Morphology, Cytochemistry, and Function / J. E. Hose, G. G. Martin, A. S. Gerard // *Biol. Bull.* — 1990. — V. 178. — P. 33–45.
20. Jussilla J. On physiological responses, hemolymph glucose, total hemocyte count and dehydration of marron (*Cherax tenuimanus*) to handling and transportation under simulated conditions / J. Jussilla, M. Paganini, S. Mansefield, L. H. Evans // *Freshwater Crayfish*. — 1999. — V. 12. — P. 154–167.
21. Lucic A. Seasonal changes of the condition indices and haemocyte counts of the *Austropotamobius torrentium* population in Kraljevec stream, Croatia / A. Lucic, R. Erben // *Bull. Fr. Peche Piscic.* 2005. V. 376–377. — P. 687–697.
22. Huang S. Association of the Genetic Polymorphisms in Pre-MicroRNAs with Risk of Ischemic Stroke in a Chinese Population / S. Huang, S. Zhou et al. // *PLoS ONE*. — 2015. — V. 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117007>
23. Дегтяревская Т. Ю. Реакция эозинофилов в крови молодняка овец при экспериментальном диктиокаулезе и после комплексного лечения / Т. Ю. Дегтяревская // *Российский паразитологический журнал*. — 2016. — Т. 37. — С. 370–373. <https://doi.org/10.12737/21660>.

24. Пищенко Е. В. Гематология пресноводной рыбы: учеб. пособие. Новосибирск, 2002. Новосиб. гос. аграр. ун-т. 48 с.
25. Paterson B. D. Measuring total protein concentration in blood of the western rock lobster *Panulirus cygnus* by refractometry / B. D. Paterson, G. W. Davidson, P. T. Spanoghe // International Symposium on Lobster Health Management. 1999. Proceeding 19–21 September, Adelaide. P. 110–115.
26. Ковачева Н. П., Александрова Е. Н. Гематологические показатели как индикаторы физиологического состояния декапод: камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* и речных раков родов *Astacus* и *Pontastacus* // Изд. ВНИРО. М., 2010, 91 с.
27. Jussila, J. Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Panulirus cygnus* George) / J. Jussila, S. McBride, J. Jago, L. Evans // Aquaculture. – 2001. – V. 199. – P. 185–193. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00599-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00599-8).
28. Иванов А. А., Пронина Г. И., Корягина Н. Ю. Физиология гидробионтов. СПб, 2021. 480 с.

Skafor D., Shumeyko D.

EDTA-Na₂ – anticoagulant for hemolymph of australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*)

Abstract.

Purpose: selection of anticoagulants based on EDTA-Na₂ and methods of their use for working with the hemolymph of the Australian red claw crayfish (*C. quadricarinatus*)

Materials and methods. For the study, different-sized males and females of the australian red-clawed crayfish (*Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868)) were used. EDTA-Na₂ was used as an anticoagulant, the concentration of which was 4%. A 2 ml syringe with a 23G needle for hemolymph removal was pre-washed with anticoagulant remaining in the needle and the needle cone (about 1/3 of the volume of the needle cone was filled with a solution). The experiment is presented in the following series: 1. differences between the total hemocytes number (THC) and the proportion of granulocytes in native hemolymph and treated with a small amount of EDTA-Na₂; 2. differences in the content of total hemolymph protein (THP) in native and treated with a small amount of EDTA-Na₂ hemolymph; 3. changes in THC and the proportion of granulocytes in hemolymph treated with a small amount the amount of EDTA-Na₂ immediately after sampling and a day later. To carry out the work, samples of 20 individuals were used, while for the first two series, two samples of hemolymph were taken from each, and one from the third. Syringes with hemolymph treated with anticoagulant were stored in the refrigerator at a temperature of 8.5 °C. Additionally, similar studies were carried out on differences in the THC and proportion of granulocytes in the hemolymph immediately after sampling with treatment with a multicomponent anticoagulant consisting of 4 g of EDTA-Na₂, 3 g of sodium citrate, 2 g of glucose and 1 g of NaCl per 100 ml of distilled water. Hemolymph was taken with a syringe from the ventral sinus. Three indicators were determined: the total number of hemocytes (THC), the proportion of granulocytes and the total protein content (THP). THC and proportion of granulocytes was determined in the Goryaev chamber under a light microscope. THP was determined by the refractometric method.

Results. The study revealed significant differences in the proportion of granulocytes ($p < 0.05$), which are 32% more in the anticoagulant treated than in the native hemolymph, which can be explained by the uniform distribution of all types of hemocytes in the sample. There were no significant differences in the remaining indicators of all series. Studies of hemolymph treated with a multicomponent anticoagulant showed a low level of hemocyte preservation ($p < 0.05$) and the proportion of granulocytes compared to the indicators immediately after selection, therefore, they are not reflected in the work.

Conclusion. The data obtained indicate that there is a possibility of using four percent EDTA-Na₂ when working with hemolymph. The anticoagulant prevents the formation of gel and the rapid destruction of hemocytes, promotes the uniform distribution of cells in the Goryaev chamber and allows the use of a refractometer in determining the total blood protein. The use of an anticoagulant contributes to the preservation of hemocytes during the day, at a level that allows the use of EDTA-Na₂ in practice. At the same time, work should continue on the development of methods for storing and transporting blood treated with an anticoagulant.

Key words: australian red claw crayfish; *Cherax quadricarinatus*; anticoagulant; EDTA-Na₂; hemolymph; hemocytes; total protein.

Authors:

Skafar D. – student; e-mail: skafden@mail.ru;

Shumeiko D. –lecturer; e-mail: dima-shum-92@mail.ru.

FSBEI HPO «Kuban State University»; 350040, Russia, Krasnodar, st. Stavropolskaya, 149

References

1. Lagutkina L. Yu. A new object of warm-water aquaculture - Australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) / L. Yu. Lagutkina, S. V. Ponomarev // Vestnik ASTU. – 2008. – №. 6. – P. 220-223.
2. Arystangaliyeva V. A., Zhigin A. V. Australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) - a promising object of aquaculture in Russia // State and ways of development of aquaculture in the Russian Federation in the light of import substitution and ensuring food security of the country: materials of the national scientific and practical conference, Saratov, October 4-5, 2016. Saratov, 2016. P. 5-9.
3. Lagutkina L. Yu. Factual support of practices for increasing the efficiency of growing tropical freshwater species / L. Yu. Lagutkina, E. G. Kuzmina et al. Bulletin of the Astrakhan State Technical University. Series: Fisheries. – 2020. – №. 2. – P. 94–105. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2020-2-94-105>.
4. Bone J. W. Using biochemical markers to assess the effects of imposed temperature stress on freshwater decapod crustaceans: *Cherax quadricarinatus* as a test case / J. W. Bone, G. M. Renshaw, J. M. Furse, C. H. Wild // J Comp Physiol B. – 2014. – V. 185. – P. 291–301. <https://doi.org/10.1007/s00360-014-0883-3>.
5. Wu D.-L. Effects of cold acclimation on the survival, feeding rate, and non-specific immune responses of the freshwater red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) / D.-L. Wu, Z.-Q. Liu et al. // Aquaculture International. – 2018. – V. 26. – P. 557–567. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0236-4>.
6. Sanchez-Salgado J. L. In vivo administration of LPS and β -glucan generates the expression of a serum lectin and its cellular receptor in *Cherax quadricarinatus* / J. L. Sanchez-Salgado, M. A. Pereyra et al. // Fish & Shellfish Immunology. – 2019. – V. 94. – P. 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.061>
7. Lagutkina L. Yu., Akhmedzhanova A. B., Sheikhasanov K. G. Evaluation of the hemocytic formula of Australian crayfish // 64th International Scientific Conference of the Astrakhan State Technical University dedicated to the 90th anniversary of the founding of the Astrakhan State Technical University: conference materials, Astrakhan, May 20–25, 2020. Astrakhan: Astrakhan State Technical University, 2020. P. 239.
8. Li F. Crayfish hemocytes develop along the granular cell lineage / F. Li, Z. Zheng, H. Li, R. Fu, L. Xu, F. Yang // Scientific Reports. – 2021. – № 11. – P. 13099. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92473-9>.
9. Lagutkina L. Yu. Hematological and biochemical parameters of the hemolymph of the Australian red claw crayfish / L. Yu. Lagutkina, E. M. Evgrafova, E. G. Kuzmina, A. M. Mazlov // Bulletin of the Astrakhan State Technical University. – 2021. Series: Fisheries – №. 2. – P. 134–143. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2021-2-134-143>.
10. Lagutkina L. Yu. Bioindicators of homeostasis constants of the internal environment of crustaceans cultivated under various environmental conditions in order to obtain marketable products / L. Yu. Lagutkina, A. B. Akhmedzhanova, S. V. Ponomarev, A. S. Martyanov // Fish farming and fisheries. – 2021. – V. 189. – P. 57–69. <https://doi.org/10.33920/sel-09-2110-05>.
11. Jussilla J. Physiological responses of Astacid and Parastacid crayfishes (*Crustacea: Decapoda*) to conditions of intensive culture: doctoral dissertation. Kuopio. 1997. 136 p.
12. Paterson B. D. Prediction survival of western rock lobster *Panulirus cygnus*, using discriminant analysis of hemolymph parameters taken immediately following simulated handling treatments / B. D. Paterson, P. T. Spanogle et al. // New Zealand Journ. of Marine and Freshwater Research. – 2005. – V. 39. –P. 1129–1143.

13. Aleksandrova E. H. In vivo determination of the physiological status of decapods (Crustacea: Decapoda) by hematological parameters / E. N. Aleksandrova, N. P. Kocheva // *Advances in Physiological Sciences*. – 2010. – V. 41. – №. 2. – P. 51–67.
14. Koryagina N. Yu. Physiological and biochemical characteristics of crayfish when grown under artificial conditions: dis. ... cand. biol. Sciences. M., 2010. 151 p.
15. Pronina G. I. Comprehensive in vivo physiological assessment of crayfish in aquaculture / G. I. Pronina, N. Yu. Koryagina // *Theoretical and applied problems of the agro-industrial complex*. – 2014. – V. 21. – P. 46–49.
16. Novikova I. A., Khoduleva S. A. *Clinical and laboratory hematology: textbook. allowance*. Minsk, 2013, Higher. school 446 p.
17. Nekrasova I. I., Kvochko A. N., Tsygansky R. A., Shulunova A. N., Sidelnikov A. I. *Hematology: a textbook for universities in St. Petersburg*, 2021. Lan. 208 p.18. Soderhall K. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine Decapods, and prophenoloxidase distribution / K. Soderhall, V. J. Smith // *J. Developmental and Comparative Immunology*. – 1983. – V. 7. – P. 229–239.
19. Hose J. E. A Decapod Hemocyte Classification Scheme, Integrating Morphology, Cytochemistry, and Function / J. E. Hose, G. G. Martin, A. S. Gerard // *Biol. Bull.* – 1990. – V. 178. – P. 33–45.
20. Jussilla J. On physiological responses, hemolymph glucose, total hemocyte count and dehydration of marron (*Cherax tenuimanus*) to handling and transportation under simulated conditions / J. Jussilla, M. Paganini, S. Mansefield, L. H. Evans // *Freshwater Crayfish*. – 1999. – V.12. – P. 154–167.
21. Lucic A. Seasonal changes of the condition indices and haemocyte counts of the *Austropotamobius torrentium* population in Kraljevec stream, Croatia / A. Lucic, R. Erben // *Bull. Fr. Peche Piscic.* 2005. V. 376–377. – P. 687–697.
22. Huang S. Association of the Genetic Polymorphisms in Pre-MicroRNAs with Risk of Ischemic Stroke in a Chinese Population / S. Huang, S. Zhou et al. // *PLoS ONE*. – 2015. – V. 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117007>
23. Degtyarevskaya T. Yu. Reaction of eosinophils in the blood of young sheep with experimental dicty-oaulosis and after complex treatment / T. Yu. Degtyarevskaya // *Russian Journal of Parasitology*. – 2016. – V. 37. – P. 370–373. <https://doi.org/10.12737/21660>.
24. Pishchenko E. V. *Hematology of freshwater fish: textbook. allowance*. Novosibirsk, 2002. Novosibirsk. state agrarian un-t. 48 p.
25. Paterson B. D. Measuring total protein concentration in blood of the western rock lobster *Panulirus cygnus* by refractometry / B. D. Paterson, G. W. Davidson, P. T. Spanoghe // *International Symposium on Lobster Health Management*. 1999. Proceeding 19–21 September, Adelaide. P. 110–115.
26. Kovacheva N. P., Alexandrova E. N. Hematological parameters as indicators of the physiological state of decapods: the king crab *Paralithodes camtschaticus* and crayfish of the genera *Astacus* and *Pontastacus* // *Izd. VNIRO*. M., 2010, 91 p.
27. Jussila, J. Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Panulirus cygnus George*) / J. Jussila, S. McBride, J. Jago, L. Evans // *Aquaculture*. – 2001. – V. 199. – P. 185–193. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(00\)00599-8](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(00)00599-8).
28. Ivanov A. A., Pronina G. I., Koryagina N. Yu. *Physiology of hydrobionts*. St. Petersburg, 2021. 480 p.