

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ *RANA RIDIBUNDA* (PALLAS, 1771) ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗОНЫ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НЕФТИ

А.П. Кармазин, Т.Ю. Пескова

Кубанский государственный университет
Россия, 350040, Краснодар, Ставропольская, 149
E-mail: peskova@kubannet.ru

Поступила в редакцию 03.05.2010 г.

При действии нефти в пределах 0.2 – 10 ПДК в течение 5 суток наблюдается эритроцитоз и увеличение количества гемоглобина в крови озерной лягушки одновременно с лейкопенией. Кроме того, обнаружены разнообразные морфологические и генетические изменения клеток крови. Исследованные нами концентрации нефти оказывают однотипное воздействие на динамику изученных показателей как красной, так и белой крови озерной лягушки, изменяя их в зависимости от градиента концентрации нефти. Следовательно, гематологические показатели озерной лягушки и их динамика могут быть использованы для достоверного и достаточно просто проводимого определения концентраций, входящих в зону токсического действия нефти.

Ключевые слова: озерная лягушка, гематологические показатели, нефть.

ВВЕДЕНИЕ

Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами оказывает постоянное влияние на живые организмы. Исследование характера этого влияния в основном проводится на рыбах и других гидробионтах, главным образом морских. Однако пресноводные организмы также испытывают воздействие этих загрязнителей. Хозяйственно-бытовые стоки, нефтехранилища на берегах, большой и малый флот – все это постоянные поставщики нефти и ее производных для многих акваторий (Житенева и др., 2004). Нефть и нефтепродукты являются опасными поллютантами водных экосистем с широким спектром токсического действия на гидробионтов всех трофических уровней (Горбатюк и др., 2008).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для работы служили половозрелые озерные лягушки *Rana ridibunda*, отловленные в окрестностях г. Краснодара, в относительно чистом водоеме за пос. Яблоновский в августе 2009 г. Исследование лягушек проводило при аномально высокой температуре воды и воздуха лета 2009 г.

Лягушек поместили в растворы нефти концентраций 0.01, 0.05 и 0.5 мг/л, контролем служила чистая водопроводная вода, отстоянная

в течение 2 – 3 дней. ПДК для нефти в воде водоемов различного назначения составляет 0.05 мг/л в воде (Перечень..., 1995). Зона токсического действия нефти, т.е. диапазон эффективных концентраций, вызывающих у различных видов земноводных регистрируемые отклонения, судя по литературе, составляет 0.0005 – 0.05 мг/л (Данилова, 1990). Таким образом, в опытах использованы концентрации нефти в пределах 0.2 – 10 ПДК, входящие в зону токсического действия ближе к ее верхнему пределу и выходящие за него. В трехлитровых емкостях находились по пять лягушек; контроль и каждый опыт были заложены в двух повторностях. Через пять суток после начала эксперимента лягушки были усыплены, кровь для анализа брали при разрезании сердца. При проведении эксперимента соблюдались правила проведения работ с использованием экспериментальных животных, включая правила содержания животных в эксперименте, а также правила умерщвления животных (Правила..., 2009). Определяли следующие гематологические показатели: количество гемоглобина (г/л), эритроцитов (10^{10} /л), лейкоцитов (10^9 /л); а также рассчитывали цветовой показатель. Основные гематологические показатели определяли с помощью автомата Micros – анализатора крови немецкой фирмы Carmaу. Были использованы стандартные методы фиксации и окраски мазков крови, а также микроскопического исследования

мазков (Кост, 1973). Препараты для подсчета микроядер эритроцитов готовили стандартным способом (Давыдов и др., 2006). Для исследования на микроядерный тест были просмотрены по два препарата от каждой особи; анализировали по 1000 клеток на препарат. На каждом препарате подсчитывали число клеток, содержащих микроядра и ядерный материал, не оформленный в четкое микроядро; число таких эритроцитов относили к общему количеству просмотренных клеток.

Полученный цифровой материал обработан стандартными статистическими методами. Достоверность различий показателей определяли с помощью критерия Стьюдента. Различия считали достоверными, если $t_{\text{факт.}} \geq t_{\text{ст.}}$ при 5%-ном уровне значимости (Лакин, 1980). Все перечисленные гематологические показатели определены нами для 77 половозрелых особей озерной лягушки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основные гематологические показатели озерной лягушки при обитании в чистой воде (контроль) и в растворах нефти различной концентрации приведены на рис. 1.

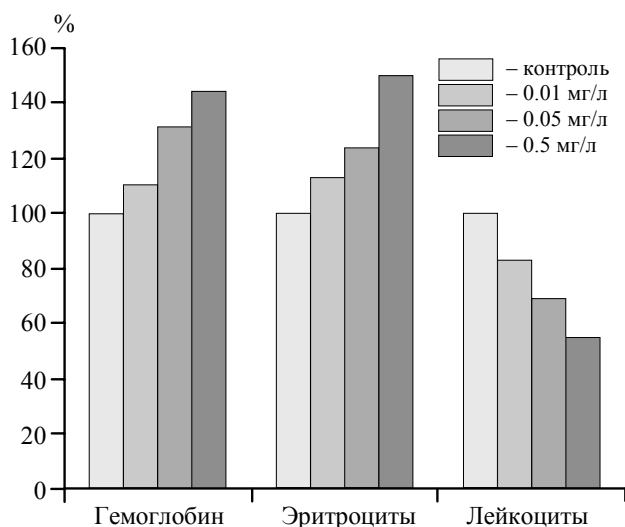


Рис. 1. Количество гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов в крови озерной лягушки при экспозиции в растворах нефти (по отношению к контролю)

По нашим данным, количество гемоглобина в крови озерной лягушки в растворах нефти всех использованных концентраций достоверно выше, чем в контроле – в 1.1, 1.3 и 1.45 раз (в растворах трех исследованных концентраций со-

ответственно). При сравнении количества гемоглобина у лягушек в растворах нефти разных концентраций между собой также отмечены статистически достоверные различия. Следовательно, возрастание количества гемоглобина в крови озерной лягушки происходит дозозависимым образом. Аналогичная картина отмечена и для числа эритроцитов. Их количество статистически достоверно возрастает в 1.1, 1.2 и 1.5 раз. Известно, что наиболее частой причиной эритроцитоза является гипоксия (Козловская, Николаев, 1985). Коэффициенты вариации всех основных гематологических показателей озерной лягушки невелики (от 1.2 до 9.8%) и не имеют достоверных различий в опытах и контроле.

Уровень насыщения эритроцитов гемоглобином, судя по цветовому показателю, у лягушек не меняется по сравнению с контролем только после пребывания в самой низкой из исследованных концентраций нефти (0.01 мг/л), а в более концентрированных растворах нефти происходит увеличение этого показателя.

Увеличение как числа эритроцитов, так и количества гемоглобина в них (т. е. увеличение кислородной емкости крови) у амфибий при постоянном обитании в водоемах, загрязненных поллютантами, можно считать адаптивным, это долговременная адаптация (Пескова, 2001).

В литературе есть сведения об изменении гематологических показателей озерной лягушки при трехсуточной экспозиции в растворах нефти концентраций от 0.0005 до 0.02 мг/л, то есть в пределах 0.01 – 4 ПДК, входящих в зону токсического действия нефти (Пескова, Шарпан, 2007). Авторами установлено, что количество эритроцитов в крови озерной лягушки во всех вариантах эксперимента достоверно превышает их количество у контрольных животных, содержащихся в чистой воде, в 1.8 – 3.4 раза. Количество гемоглобина, наоборот, параллельно (практически дозозависимо) уменьшается в 1.2 – 2.2 раза. Известно, что гипохромия (уменьшение среднего содержания гемоглобина в одном эритроците) может быть следствием либо уменьшения объема эритроцитов (микроцитоз), либо ненасыщенности нормальных по объему эритроцитов гемоглобином. Микроцитоза у озерной лягушки авторы не наблюдали, следовательно, к гипохромии приводила относительная ненасыщенность эритроцитов гемоглобином.

Сравнение наших (пятисуточная экспозиция) и литературных (трехсуточная экспозиция) данных по влиянию двух одинаковых концен-

траций нефти (0.01 и 0.05 мг/л) на кровь озерной лягушки свидетельствует об однонаправленном изменении количества эритроцитов (в обоих случаях отмечен эритроцитоз), но разнонаправленных изменениях количества гемоглобина: при трехсуточном пребывании лягушек в растворах нефти его количество достоверно снижается, а при пятисуточном – достоверно увеличивается.

Разноплановые изменения количества гемоглобина можно попытаться объяснить разными реакциями отдельных особей при воздействии эффективных концентраций токсикантов. Из водной токсикологии известно, что зона токсического действия любого поллютанта условно подразделяется на три ступени – при низких и при высоких концентрациях вещества все организмы реагируют приблизительно одинаково (либо выживают, либо в большинстве случаев гибнут), а наибольшее разнообразие наблюдается при средних значениях доз токсикантов в пределах зоны токсического действия, когда происходят адаптации гидробионтов к загрязнителю (Лукьяненко, 1984).

По нашим данным, после пятисуточного пребывания лягушек в самой высокой из исследованных концентраций нефти (10 ПДК) у них происходит дальнейшее увеличение количества гемоглобина и эритроцитов в крови – на 45 и 50% соответственно, тогда как у двухлеток рыб красноперок *Scardinius erythrophthalmus* L., достоверно повышается количество эритроцитов на 12.5%, но снижается количество гемоглобина на 28.3% (Абдуллаева, 2007). По данным Н.Т. Сергеевой и Н.Ф. Зубиной (1976), нефтепродукты угнетают эритропоэз, а количество гемоглобина резко колеблется в течение опыта. В хроническом опыте с карпом гематологические показатели (концентрация гемоглобина, эритропоэз и др.) практически не отличались от контроля.

Относительно реакции крови мешкожаберного сома *Heteropneustes fossilis* на действие неочищенной нефти есть следующие сведения. По одним данным, при летальных и сублетальных концентрациях неочищенной нефти с возрастанием концентраций наблюдали повышение количества эритроцитов и площади поверхности эритроцитов, но снижение концентрации гемоглобина. Симптомы воздействия неочищенной нефти на гематологические показатели были частично сходны с таковыми при гипоксии и отравлении тяжелыми металлами (Prasad et al., 1987). По другим данным, при действии на про-

тяжении 30 дней сублетальных концентраций (1.0 мл/л) сырой нефти в крови мешкожаберного сома отмечено не только значительное снижение уровня гемоглобина (на 22 – 48%), но и числа эритроцитов – на 21 – 40% (Borah, 2006).

Сходство реакции крови рыб и земноводных на воздействие нефти, таким образом, заключается в увеличении количества эритроцитов у подопытных животных, а различия сводятся к тому, что количество гемоглобина при этом у амфибий чаще всего возрастает, а у рыб снижается, то есть имеет место гипохромия. Некоторые авторы считают, что у рыб уровень гемоглобина не является характерным показателем токсикоза (Житенева и др., 2004).

На просмотренных мазках крови лягушек из раствора нефти концентрации 0.2 ПДК обнаружена вакуолизация почти во всех эритроцитах (до 90%); относительно слабая (25%) токсическая зернистость проявляется с пенетрантностью 40%. В растворах нефти концентрации 1 и 10 ПДК отмечено усиление токсической зернистости (до 50 – 75%), эритроциты часто имеют фестончатые контуры (45 – 50%), что свидетельствует о нарушении их осмотической резистентности, наблюдается пойкилоцитоз у 20 – 25% клеток и единично – анизоцитоз эритроцитов. Усиление вакуолизации цитоплазмы происходит под влиянием изменения проницаемости клеточной оболочки при действии токсикантов (Житенева и др., 2004). Наличие в периферической крови, наряду с нормоцитами, микроцитов и макроцитов говорит о нарушении механизмов, обеспечивающих выход нормальных клеток из кровеносных органов; это было отмечено ранее для рыб (Житенева и др., 2004), а сейчас мы отмечаем для озерной лягушки.

При просмотре мазков крови выявлено несколько видов микроядер и неоформленного ядерного материала (Жулева, Дубинин, 1994). Мы обнаруживали в мазках микроядра эритроцитов, соединенные с основным ядром тонкой или достаточно толстой нитью. В некоторых случаях в клетках наблюдались округлые образования разрыхленного ядерного материала размером 0.5 – 0.8 размера основного ядра.

В контроле и концентрации нефти 0.01 мг/л (0.2 ПДК) у озерной лягушки количество эритроцитов с микроядрами одинаковое – 0.17 ± 0.029 и $0.23 \pm 0.034\%$; $t_{\text{факт}} = 1.34$ при $t_{\text{ст}} = 1.96$ (рис. 2). При повышении концентрации нефти до величины 1 ПДК – 0.05 мг/л – процент клеток с микроядрами достоверно возрастает до $0.28 \pm 0.037\%$

($t_{\text{факт}} = 2.34$ при $t_{\text{ст}} = 1.96$). При содержании лягушек в растворе самой высокой из исследованных концентраций нефти – 0.5 мг/л (10 ПДК) доля эритроцитов с микроядрами втрое превосходит их долю у контрольных лягушек, т. е. число эритроцитов с микроядрами возрастает с 1.7/1000 клеток в контроле до 5.3/1000 в растворе нефти ($t_{\text{факт}} = 5.63$ при $t_{\text{ст}} = 1.96$). Увеличение числа клеток с микроядрами, отмеченное под действием концентраций нефти, входящих в ее токсический диапазон, происходит в 1.22 – 1.90 раза. По литературным данным, доля клеток, содержащих микроядра, у озерных лягушек, обитающих в местах, загрязненных полициклическими ароматическими углеводородами и ртутью, а также хлорорганическими пестицидами, в окрестностях г. Сумгаит (Азербайджан) была повышена по сравнению с контролем с 1 до 4/1000 (Matson et al., 2005).

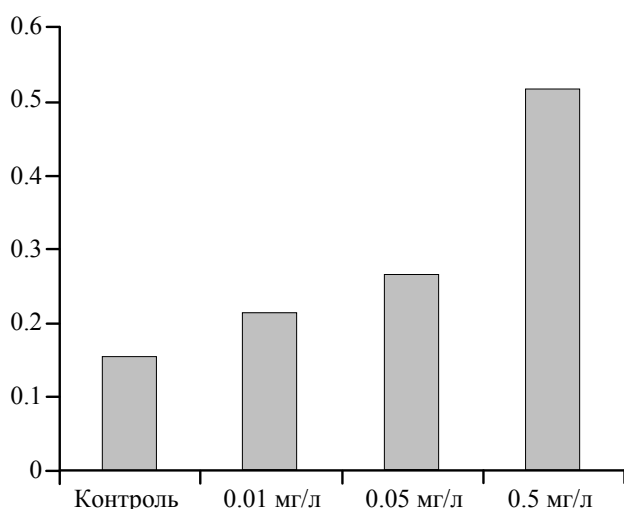


Рис. 2. Количество эритроцитов с микроядрами в крови озерной лягушки в контроле и вариантах опыта

Общее количество лейкоцитов, по нашим данным, максимально у лягушек в контроле (см. рис. 1). Во всех вариантах опыта (концентрации нефти от 0.01 до 0.5 мг/л) у озерных лягушек после пяти суток статистически достоверно уменьшается число лейкоцитов по сравнению с контролем, то есть имеет место лейкопения. Степень этой лейкопении разная: в самой низкой концентрации нефти число лейкоцитов в 1.2 раза ниже, чем в контроле, а в самой высокой концентрации нефти – ниже почти вдвое (в 1.85 раза).

Судя по литературе, при действии токсиантов у бесхвостых земноводных, как правило, наблюдается лейкоцитоз (Пескова, 2001). Одна-

ко отмечено и снижение числа лейкоцитов по сравнению с контролем у амфибий, обитающих в озерах с высоким значением индекса загрязнения (Романова, 2005; Романова, Егорихина, 2006). Авторы предполагают, что уменьшение числа лейкоцитов могло быть связано как с угнетением лейкопоэза, так и с усиленным удалением этих клеток из крови.

М.Н. Данилова (1990) отмечала, что диапазон эффективных концентраций нефти является видоспецифичным для различных земноводных. Так, для остромордой лягушки *Rana arvalis* Nilss. он находится в пределах 0.0005 – 0.05 мг/л, а для дальневосточной жерлянки *Bombina orientalis* Boul. – 0.01 – 0.05 мг/л. Судя по полученным нами сейчас и ранее (Пескова, Шарпан, 2007) данным, для озерной лягушки диапазон токсического действия нефти составляет 0.0005 – 0.5 мг/л.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При действии нефти в пределах 0.2 – 10 ПДК в течение 5 суток наблюдается эритроцитоз и увеличение количества гемоглобина в крови озерной лягушки одновременно с лейкопенией. Кроме того, обнаружены разнообразные морфологические и генетические изменения клеток крови. Исследованные нами концентрации нефти оказывают однотипное воздействие на динамику изученных показателей как красной, так и белой крови озерной лягушки, изменяя их в зависимости от градиента концентрации нефти. Следовательно, гематологические показатели озерной лягушки и их динамика могут быть использованы для достоверного и достаточно просто проводимого определения концентраций, входящих в зону токсического действия нефти.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абдуллаева Н.М. 2007. Цитогематологическое исследование рыб при воздействии тяжелых металлов и сырой нефти: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Махачкала. 22 с.
- Горбатюк Л.О., Шаповал Т.Н., Миронюк М.А., Арсан О.М. 2008. Некоторые аспекты нефтяного загрязнения водоемов (обзор) // Гидробиол. журн. Т. 44, № 6. С. 88 – 101.
- Давыдов О.Н., Темниханов Ю.Д., Куровская Л.Я. 2006. Патология крови рыб. Киев: Инкос. 206 с.
- Данилова М.Н. 1990. Воздействие нефти на амфибий в эксперименте // Животные в условиях антропогенного ландшафта / УрО АН СССР. Свердловск. С. 19 – 29.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

- Житенева Л.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. 2004. Основы ихтиогематологии (в сравнительном аспекте). Ростов н/Д: Эверест. 311 с.
- Жулева Л.Ю., Дубинин Н.П. 1994. Использование микроядерного теста для оценки экологической обстановки в районах Астраханской области // Генетика. Т. 30, № 7. С. 999 – 1004.
- Козловская Д.В., Николаев А.Ю. 1985. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования. М.: Медицина. 288 с.
- Кост С.А. 1973. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования М.: Медицина. 383 с.
- Лакин Г.Ф. 1980. Биометрия. М.: Высш. шк. 293 с.
- Лукьяненко В.И. 1984. Общая ихтиотоксикология. М.: Легкая и пищевая промышленность. 190 с.
- Перечень предельно допустимых концентраций наиболее распространенных химических веществ в воде рыбохозяйственных водоемов // Перечень ПДК и ОБУВ вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоемов / Комитет РФ по рыболовству. М., 1995. 48 с.
- Пескова Т.Ю. 2001. Влияние антропогенных загрязнений среды на земноводных. Волгоград: Изд-во Волгогр. гос. пед. ин-та. 156 с.
- Пескова Т.Ю., Шарпан Я.В. 2007. Влияние нефти на гематологические показатели озерной лягушки // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. Біологія. Вип. 21. С. 96 – 99.
- Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных // Медицинский портал [Электрон. ресурс]. URL: <http://gene-on-gene.narod.ru/Rules/animals.htm> (дата обращения: 15.07.2009).
- Романова Е.Б. 2005. Гематологические аспекты механизмов адаптации природных популяций зеленых лягушек в условиях антропогенного средового стресса // Актуальные проблемы герпетологии и токсикологии / Ин-т экологии Волжского бассейна РАН. Тольятти. Вып. 8. С. 169 – 176.
- Романова Е.Б., Егорихина М.Н. 2006. Динамика гематологических показателей периферической крови лягушек рода *Rana* трансформированной городской среды // Экология. №3. С. 208 – 213.
- Сергеева Н.Т., Зубина Н.Ф. 1976. Некоторые физиолого-биохимические изменения в организме карпа под влиянием нефтяного загрязнения // Экологическая физиология рыб: Тез. докл. III Всесоюз. конф. Киев: Наук. думка. Ч. 1. С. 28 – 69.
- Borah S. 2006. Haematological and respiratory anomalies in the freshwater fish *Heteropneustes fossilis* exposed to crude oil // J. Ecotoxicology and Environment Monitoring. Vol. 16, № 3. P. 285 – 289.
- Matson C.W., Palatnikov G.M., McDonald T.J., Autenrieth R.L., Donnelly K.C., Anderson T.A., Canas J.E., Islamzadeh A., Bickham J.W. 2005. Patterns of genotoxicity and contaminant exposure: Evidence of genomic instability in the marsh frogs (*Rana ridibunda*) of Sumgayit, Azerbaijan // Environment Toxicology and Chemistry. Vol. 24, № 8. P. 2055 – 2064.
- Prasad M.S., Prasad P., Singh D. 1987. Some haematological effects of crude oil on freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) // Acta Hydrochimica et Hydrobiologica. Vol. 15, № 2. P. 199 – 204.

USAGE OF HEMATOLOGICAL INDICATORS OF MARSH FROG *RANA RIDIBUNDA* (PALLAS, 1771) FOR OIL TOXIC ZONE ESTIMATION

A.P. Karmazin and T.Yu. Peskova

Kuban State University
149 Stavropolskaya, Krasnodar 350040, Russia
E-mail: peskova@kubannet.ru

On 5-day oil action within 0.2 – 10 MPC, erythrocytosis and a hemoglobin increase in marsh frog blood are observed, simultaneously with leukopenia. Besides, various morphological and genetic changes of blood cells are found out. The oil concentrations studied have the same influence on the dynamics of the examined indicators of both red and white blood of marsh frog, changing them depending on the oil concentration gradient. Hence, the hematological indicators of marsh frog and their dynamics can be used for reliable and simple estimation of concentrations within the toxic zone of oil.

Key words: marsh frog, hematological indicators, oil.