

ВПЛИВ ІОНІВ КАДМІЮ НА ЛЕЙКОЦИТИ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ТА КРОВОТВОРНИХ ОРГАНІВ КОРОПА (*Cyprinus carpio* L.)

І.З. Дрогомирецька, М.А. Мазепа

Прикарпатський національний університет ім. В. Стефаника

Досліджено вплив іонів кадмію на клітини крові та кровотворних органів коропа. Встановлено, що його іони у концентраціях 0,025 та 0,05 мг/л упродовж 96-годинної експозиції у воді акваріуму спричиняють низку негативних чинників.

Промислові води, забруднені різними токсикантами, потрапляють у природні водойми і поширюються на значні території. Одним із таких токсикантів є кадмій. Імунна система риб виявилась особливо чутливою до дії важких металів, у тому числі кадмію, тому деякі показники імунного статусу риб використовують як біомаркери для визначення забруднення водойм [1]. На думку деяких авторів, дослідження стану гематологічних параметрів риб дають змогу отримати найбільш достовірну інформацію про початкові етапи антропогенного впливу на екосистему [2].

За даними деяких дослідників [3, 4], кадмій спричиняє порушення структурно-функціонального стану імунокомпетентних органів і клітин риб. Найбільш токсичним кадмій виявився для нирок, які у риб є органом кровотворення [5]. При надходженні у воду забруднювальних речовин спостерігається відповідь лейкоцитів периферичної крові, а саме перерозподіл різних груп лейкоцитів [2]. Наукові праці з дослідження впливу іонів кадмію на кровотворні органи та кров риб нечисленні [6].

Метою роботи був порівняльний аналіз змін лейкоцитарної формули крові та кровотворних органів коропа під впливом двох концентрацій іонів кадмію, що перевищували гранично допустимі норми.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У роботі використали дволіток коропа в осінній період. Як токсикант застосовували розчин солі $3\text{CdSO}_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$, який вносили у воду акваріумів у концентраціях 0,025 мг/л, що відповідала 5-ти

гранично допустимим концентраціям (ГДК) іонів кадмію (Cd^{2+}) та 0,05 мг/л (10 ГДК Cd^{2+}). Риб витримували 96 год у токсичному середовищі. Контрольну групу риб тримали в звичайних умовах акваріуму аналогічний термін. В акваріумах підтримували постійний режим води: величина рН — 7,5, вміст кисню 5,6 мг/л, температура води — 18–19°C.

Кров забирали із хвостової вени коропа за допомогою шприца. Готували мазки крові та мазки-відбитки селезінки та нирки за загальноприйнятими методами [7]. Фіксацію і фарбування препаратів проводили, використовуючи спиртовий розчин еозин-метиленового за Май-Грюнвальдом, та водний розчин азур-еозину за Романовським. Мікроскопіювання пофарбованих препаратів здійснювали під світловим мікроскопом "Leitz" із застосуванням імерсійного об'єктива зі збільшенням $\times 1600$. Формені елементи крові та кровотворних органів риб диференціювали залежно від їхньої приналежності до тих або інших груп клітин (за допомогою "Атласа кліток крові риб" Н.Т. Ивановой). Після цього обчислювали відсотковий вміст клітин.

Статистичну обробку досліджуваних параметрів проводили за допомогою програми "MYNOVA". Дані представлені як середнє \pm похибка середнього. Для знаходження достовірної відмінності між досліджуваними групами використовували t-test Student. [8].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати експериментального дослідження лейкоцитарної формули крові

коропа в осінній період під впливом іонів кадмію показали істотний вплив токсиканта на цей показник імунного статусу (табл. 1). Під дією іонів кадмію в периферичній крові риб з'являються бластні форми лейкоцитів, які були відсутні у контрольних особин: мієлобласти, промієлоцити та мієлоцити. Гемоцитобластів у периферичній крові риб нами знайдено не було ні в контрольній, ні в дослідних групах риб. Під впливом 0,05 мг/л Cd^{2+} спостерігалось незначне збільшення кількості метамієлоцитів (у 1,4 раза). Іншими авторами також відзначено збільшення кількості метамієлоцитів та мієлоцитів під дією високих (сублетальних — 10 мг/л) концентрацій іонів кадмію [9]. Наші результати свідчать про те, що лейкоцити периферичної крові коропа чутливі до значно нижчих концентрацій кадмію.

Стосовно нейтрофілів нами виявлене достовірне зниження кількості паличкоядерних і сегментоядерних лейкоцитів: 5 ГДК Cd^{2+} зменшували відсоток паличкоядерних нейтрофілів в 2,3 раза, сегментоядерних — у 3,7 раза; за дії 10 ГДК кількість паличкоядерних клітин зменшилась в 1,7 раза, сегментоядерних — у 2,2 раза. На зменшення кількості нейтрофілів у крові коропа під дією іонів кадмію вказують також інші автори [6, 10]. Цікавим, на нашу думку, є факт, що під дією іонів кадмію в крові риб з'являлися псевдоеозинофіли, які були відсутні у осо-

бин контрольної групи. У роботах інших дослідників також описано зростання кількості псевдоеозинофілів під дією іонів кадмію [3, 6]. Відсоток псевдобоазофілів у дослідних особин достовірно знижувався, при чому концентрація 0,025 мг/л Cd^{2+} зумовлювала більше зниження, ніж 0,05 мг/л Cd^{2+} .

Щодо агранулоцитів нами отримано такі результати впливу Cd^{2+} : кількість моноцитів за 5 ГДК достовірно знижувалась до 0,8% проти 5,5% у контролі, що збігається із результатами роботи інших дослідників [10]; за 10 ГДК Cd^{2+} моноцити взагалі були відсутні. Кількість пролімфоцитів та лімфоцитів збільшувалась за дії обох досліджуваних концентрацій іонів кадмію: пролімфоцитів — у 2,2 раза, лімфоцитів — у 1,2 раза. Іншими дослідними також було відзначено збільшення кількості лімфоцитів, але тільки в перші дні впливу іонів кадмію. Уже через 11 днів спостерігалось зниження кількості цих клітин [11]. Дослідники вважають, що зростання кількості лейкоцитів здебільшого спостерігається протягом перших днів дії токсиканта, коли риби намагаються відновити гомеостаз, однак пізніше, коли слабшає імунна система, кількість клітин зменшується [11].

Під впливом іонів кадмію в крові риб ми відзначили появу лейкоцитів із вакуолізованою цитоплазмою. На таку особливість дії кадмію вказують й інші дослідники [6, 12].

Таблиця 1. Лейкоцитарна формула крові коропа під впливом кадмію (%), $M \pm m$

Концентрація Cd^{2+}	Бластні форми					Нейтрофіли		Псевдоеозинофіли	Псевдобоазофіли	Агранулоцити		
	Гемоцитобласти	Мієлобласти	Промієлоцити	Мієлоцити	Метамієлоцити	Паличкоядерні	Сегментоядерні			Моноцити	Пролімфоцити	Лімфоцити
Контроль	–	–	–	–	2,3± 0,3	12,3± 1,2	12,0± 0,8	–	4,5± 0,4	5,5± 0,3	3,1± 0,2	60,1± 1,2
0,025 мг/л (5 ГДК)	–	0,8± 0,2	1,6± 0,5	0,8± 0,4	2,6± 1,0	5,2± 0,3*	3,2± 0,9*	2,4± 0,9	0,8± 0,5*	0,8± 0,3*	7,0± 2,4	74,8± 2,1*
0,05 мг/л (10 ГДК)	–	–	0,6± 0,2	1,2± 0,3	3,2± 0,3	7,2± 0,5*	5,4± 2,1*	3,4± 0,8	2,4± 0,6*	–	7,0± 1,3*	69,6± 2,2*

* Достовірна відмінність від контролю $P < 0,005$.

Наступним етапом роботи було дослідження лейкоцитарної формули нирок коропа під впливом іонів кадмію. Серед бластних клітин нирок (табл. 2) у дослідних особин спостерігалось збільшення відсотка нейтрофільних мієлобластів за 5 ГДК Cd²⁺ та метамієлоцитів за 5 і 10 ГДК Cd²⁺. Кількість нейтрофільних промієлоцитів та мієлоцитів достовірно знижувалась під дією обох досліджуваних концентрацій іонів кадмію. Гемоцитобласти, мієлобласти та базофільні метамієлоцити зникали у формулі нирок риб за 10 ГДК Cd²⁺. Відсотковий вміст еозинофільних мієлоцитів та метамієлоцитів збільшувався під впливом досліджуваних концентрацій іонів кадмію.

У нирках риб кількість паличкоядерних нейтрофілів збільшувалась за 5 ГДК Cd²⁺ до 10, за 10 ГДК — до 19,4 проти 1,6% у контролі (табл. 3). Кількість сегментоядерних нейтрофілів у дослідних особин істотно не змінювалась. Незначне підвищення кількості сегментоядерних нейтрофілів описана в літературі [2]. Відсоток псевдоеозинофілів та псевдобазофілів нирок знижувався під дією Cd²⁺. Кількість псевдоеозинофілів зменшувалась від 4 у контролі до 2,4% за 10 ГДК; кількість псевдобазофілів — від 1,8 у контролі до 0,8% за 10 ГДК. Стосовно монобластів та промоноцитів, то їх відсотковий вміст достовірно знижувався за 5 ГДК; при концентрації 0,05 мг/л Cd²⁺

Таблиця 2. Бластні клітини нирки коропа під впливом кадмію (%), $M \pm m$

Концентрація Cd ²⁺	Нейтрофільні					Еозинофільні		Базофільні
	Гемоцитобласти	Мієлобласти	Промієлоцити	Мієлоцити	Метамієлоцити	Мієлоцити	Мета-мієлоцити	Метамієлоцити
Контроль	1,0± 0,3	2,8± 0,2	5,8± 0,2	9,6± 0,2	8,0± 0,3	1,0± 0,3	2,2± 0,2	1,0± 0,3
0,025 мг/л (5 ГДК)	0,4± 0,2	3,8± 0,5	3,2± 0,5*	7,4± 0,4*	11,2± 0,7*	1,8± 0,8	3,4± 0,9	2,0± 0,5
0,05 мг/л (10 ГДК)	—	—	1,4± 0,2*	5,6± 0,5*	11,0± 0,4*	1,6± 0,2	9,6± 0,8*	—

* Достовірна відмінність від контролю $P < 0,001$.

Таблиця 3. Лейкоцитарна формула нирки коропа під впливом кадмію (%), $M \pm m$

Концентрація Cd ²⁺	Гранулоцити				Агранулоцити					
	Паличкоядерні нейтрофіли	Сегментоядерні нейтрофіли	Псевдоеозинофіли	Псевдобазофіли	Монобласти	Промоноцити	Моноцити	Лімфобласти	Пролімфоцити	Лімфоцити
Контроль	1,6± 0,2	1,0± 0,3	4,0± 0,4	1,8± 0,3	1,0± 0,3	1,2± 0,2	1,6± 0,2	4,8± 0,2	14,2± 0,3	37,6± 0,5
0,025 мг/л (5 ГДК)	10,0± 1,6*	0,6± 0,2*	3,4± 0,6	1,0± 0,3	0,4± 0,2	0,4± 0,2*	1,4± 0,2	1,4± 0,2*	8,4± 0,4*	39,0± 3,9
0,05 мг/л (10 ГДК)	19,4± 0,4*	1,4± 0,2	2,4± 0,5*	0,8± 0,3*	—	—	0,4± 0,2*	—	5,4± 0,2*	41,2± 2,6

* Достовірна відмінність від контролю $P < 0,005$.

їх не було у нирках взагалі. Іони кадмію спричиняли також і зниження кількості моноцитів за 10 ГДК — у 4 рази. Цікаво, що під впливом іонів кадмію кількість лімфобластів та пролімфоцитів достовірно знижується, а кількість лімфоцитів навпаки зростає від 37,6 у контролі до 41,2% при 10 ГДК. Збільшення кількості клітин у дослідних особин деякі дослідники пояснюють тим, що на початкових стадіях інтоксикації іони кадмію ініціюють адаптаційні або відновні процеси [10]. Перерозподіл кількості лейкоцитів у формулі коропа можливо є результатом пошкоджуючого впливу іонів кадмію на процеси гранулопоезу чи лімфопоезу.

У роботі були досліджені також різні групи лейкоцитів селезінки коропа. Серед лейкоцитів контрольної групи риб найчисленнішими в селезінці були лім-

фоцити і нейтрофіли, на що є вказівки також і в літературних джерелах [13]. У лейкоцитарній формулі селезінки риб (табл. 4) під впливом іонів кадмію нами встановлено зниження кількості нейтрофільних мієлобластів, промієлоцитів та метамієлоцитів. В особин дослідної групи за концентрації 0,05 мг/л Cd^{2+} не було виявлено гемоцитобластів. Еозинофільні мієлоцити були відсутні в особин контрольної групи та під дією 5 ГДК Cd^{2+} , однак з'явилися в селезінці риб за дії 10 ГДК Cd^{2+} . І в контрольній, і в дослідній групах у селезінці не було знайдено базофільних метамієлоцитів.

Відсоток паличкаядерних нейтрофілів зменшувався за дії обох концентрацій іонів кадмію; кількість сегментоядерних нейтрофілів за 10 ГДК недостовірно збільшувалась (табл. 5). Стосовно

Таблиця 4. Бластні клітини селезінки коропа під впливом кадмію (%), $M \pm m$

Концентрація Cd^{2+}	Нейтрофільні					Еозинофільні		Базофільні
	Гемоцитобласти	Мієлобласти	Промієлоцити	Мієлоцити	Метамієлоцити	Мієлоцити	Метамієлоцити	Метамієлоцити
Контроль	0,4± 0,2	1,6± 0,2	5,6± 0,7	4,6± 0,7	8,4± 0,2	—	2,8± 0,2	—
0,025 мг/л (5 ГДК)	0,4± 0,2	1,4± 0,5	3,2± 0,7*	5,2± 0,6	6,0± 0,8*	—	3,2± 0,6	—
0,05 мг/л (10 ГДК)	—	0,8± 0,4	1,4± 0,2*	3,4± 0,2	6,0± 0,8*	0,4± 0,2	5,8± 0,3*	—

* Достовірна відмінність від контролю $P < 0,025$.

Таблиця 5. Лейкоцитарна формула селезінки коропа під впливом кадмію (%), $M \pm m$

Концентрація Cd^{2+}	Гранулоцити				Агранулоцити					
	Паличкаядерні нейтрофіли	Сегментоядерні нейтрофіли	Псевдо-еозинофіли	Псевдобазофіли	Монобласти	Промоноцити	Моноцити	Лімфобласти	Пролімфоцити	Лімфоцити
Контроль	10,4± 0,6	3,0± 0,4	1,4± 0,2	0,8± 0,2	0,2± 0,2	0,8± 0,2	1,2± 0,2	0,2± 0,2	9,8± 0,3	49,4± 1,2
0,025 мг/л (5 ГДК)	9,2± 0,5	2,8± 0,4	1,4± 0,6	2,0± 1,1	—	0,8± 0,3	1,8± 0,5	—	9,0± 0,5	53,6± 0,5*
0,05 мг/л (10 ГДК)	8,4± 1,6	3,8± 0,3	5,8± 0,8*	—	—	1,4± 0,5	2,6± 0,5*	—	8,4± 0,6	51,8± 2,0

* Достовірна відмінність від контролю $P < 0,025$.

псевдоеозинофілів за 10 ГДК Cd^{2+} їхня кількість збільшувалася у 4 рази, однак псевдобазофіли за такої концентрації у селезінці не зустрічались. Під дією іонів кадмію у риб зникали монобласти та лімфобласти; кількість промоноцитів та моноцитів збільшувалась за 10 ГДК Cd^{2+} в 1,7 рази і в 2 рази відповідно, збільшення відсотка моноцитів описано іншими дослідниками [3]; кількість лімфоцитів недостовірно збільшувалась.

Для лейкоцитів селезінки коропа, як і для лейкоцитів крові нами виявлена вакуолізація цитоплазми. Дегенеративні зміни імункомпетентних клітин — такі, як вакуолізація цитоплазми бластних клітин і моноцитів, порушення міелоцитів описані в літературі під впливом сублетальних концентрацій сульфату кадмію [2, 3].

Таким чином, під дією іонів кадмію було виявлено перерозподіл кількості усіх форм лейкоцитів у крові та кровотворних органах риб. Це можна пояснити особливостями впливу токсиканта на загальні процеси гемопоезу коропа.

ВИСНОВКИ

Іони кадмію у концентраціях 0,025 (5 ГДК Cd^{2+}) та 0,05 мг/л (10 ГДК Cd^{2+}) впродовж 96-годинної експозиції у воді акваріуму зумовлюють перерозподіл лейкоцитів між кровотворними органами та периферичною кров'ю: зменшують відсотковий вміст бластів нейтрофільного ряду в нирках (за винятком метаміелоцитів, кількість яких достовірно збільшується) і селезінках риб та збільшують їх у крові, підвищують відсотковий вміст бластів еозинофільного та базофільного рядів у нирках та селезінках і зумовлюють відсутність їх у крові.

За дії обох концентрацій токсиканта в дослідних особин встановлена тенденція до зменшення кількості зрілих форм паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів як у крові, так і кровотворних органах, за винятком паличкоядерних нейтрофілів у нирках, кількість яких достовірно збільшувалась.

Під впливом іонів кадмію у крові, нирках і селезінках кількість лімфоцитів збільшувалась. У нирках і периферичній крові відсоток моноцитів зменшувався, у селезінках їх кількість зростала.

ЛІТЕРАТУРА

1. Bols N.C., Brubacher J.L., Ganassin R.C., Lee L.E.J. Ecotoxicology and innate immunity in fish // *Developmental and Comparative Immunology*. — 2001. — V. 25. — P. 853–873.
2. Лапирова Т.Б., Заботкина Е.А. Реакция лейкоцитов периферической крови рыб разных систематических групп на загрязнение вод кадмием // *Материалы междунар. науч. конф. "Ихтиологические исследования на внутренних водоемах"*. — Саранск, 2007. — С. 182–183.
3. Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б. Влияние тяжелых металлов на иммунофизиологический статус рыб // *Успехи современной биологии*. — 2003. — Т. 123, № 4. — С. 401–408.
4. Зайцев В.Ф., Щербакова Е.Н. Биогенная миграция и некоторые закономерности распределения тяжелых металлов в органах и тканях русского осетра в биогеохимических условиях Волго-каспийского региона // *Матер. междунар. науч. конф. "Ихтиологические исследования на внутренних водоемах"*. — Саранск, 2007. — С. 175–176.
5. Кондратьева И.А., Киташова А.А., Ланге М.А. Современные представления об иммунной системе рыб // *Вестник Московского университета*. — 2001. — Сер. 16 Биология. — № 4. — С. 11–20.
6. Brucka-Jastrzębska E., Protasowicki M. Effects of cadmium and nickel exposure on haematological parameters of common carp, *Cyprinus carpio* L. // *Acta Ichthyol. Piscat.* — 2005. — V. 35(1). — P. 29–38.
7. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. — М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983. — 179 с.
8. Brooks S.P.J. A simple computer program with statistical test analysis of enzyme kinetics // *Bio Techniques*. — 1992. — P. 906–911.
9. Witeska M. Changes in the common carp blood cell picture after acute exposure to cadmium // *Acta Zoologica Lituania*. — 2001. — V. 11(4). — P. 366–371.
10. Алиновская Ю.Б. Обратимость некоторых физиологических показателей карпа при хронической интоксикации ионами кадмия // *Материалы конф. молодых ученых Северного Кавказа по физиологии и валеологии*. — Ростов-на-Дону, 2000. — С. 47–48.
11. Vosylienė M.Z. The effect of heavy metals on hematological indices of fish // *Acta Zoologica Lituania. Hydrobiologia*. — 1999. — V. 9(2). — P. 76–82.

12. *Witeska M., Jezierska B., Wolnicki J.* Respiratory and hematological response of tench, *Tinca tinca* (L.) to a short-term cadmium exposure // *Aquaculture International*. — 2006. — V. 14(1–2). — P. 141–152.
13. *Congleton J.L., Greenlee A.R., Ristow S.S.* Isolation of leucocytes from the anterior kidney and spleen of rainbow trout in a self-generating density gradient // *Fish biology*. — 2006. — V. 36(4). — P. 575–585.

**ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАДМИЯ НА ЛЕЙКОЦИТЫ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
И КРОВЕТВОРНЫХ ОРГАНОВ КАРПА
(*CYPRINUS CARPIO* L.)**

И.З. Дрогомирецкая, М.А. Мазепа

Исследовали влияние ионов кадмия на клетки крови и кроветворных органов карпа. Показано, что его ионы в концентрациях 0,025 и 0,05 мг/л при экспозиции в течение 96 часов в воде аквариума вызывают ряд отрицательных последствий.

**THE EFFECT OF CADMIUM IONS
ON PERIPHERAL BLOOD AND BLOOD-FORMING ORGANS
LEUCOCYTES OF CARP (*CYPRINUS CARPIO* L.)**

I. Drogomyretska, M. Mazepa

Influence of cadmium ions was investigated on blood cells and blood-forming organs in carp. It was shown that exposition for 96 h with cadmium ions at concentrations of 0.025 mg/l and 0.05 mg/l in aquarium water caused some negative consequences.