

**УДК 546.74+591.11.1+639.215.2**

## **ОСОБЛИВОСТІ ЛЕЙКОЦИТАРНОЇ ФОРМУЛИ КРОВІ ТА КРОВОТВОРНИХ ОРГАНІВ *CYPRINUS CARPIO* L. ЗА ДІЇ ТОКСИЧНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ІОНІВ НІКЕЛЮ**

**Дрогомирецька І.З., Мазепа М.А.**

В експериментальних умовах дослідили вплив іонів нікелю на лейкоцити *Cyprinus carpio* L. Встановлено, що 96-годинна експозиція іонами нікелю викликає перерозподіл клітин в лейкоцитарній формулі периферійної крові риб із зниженням відсотку мієлоцитів, метамієлоцитів, паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів, збільшенням кількості пролімфоцитів та лімфоцитів. В нирці та селезінці риб також відмічено істотні зміни кількості лейкоцитів усіх досліджуваних груп.

**Ключові слова:** *Cyprinus carpio*, лейкоцити, периферійна кров, нирка, селезінка, нікель.

### **ВСТУП**

Дослідження імунної системи риб викликають значну цікавість в зв'язку з тим, що риби складають досить велику частку продуктів харчування людини і є об'єктом риборозведення і промислу. Крім того, імунна система риб, яка здійснює захист внутрішнього середовища від вторгнення чужорідних антигенів, є досить чутливим показником стану як самого організму, так і середовища існування [1]. В цьому плані дослідження різних складових імунної системи риб досить важливі для оцінки імунотоксичності різних сполук, зокрема іонів нікелю. З літературних даних відомо, що гематологічні показники – це найважливіші параметри для оцінки імунного статусу риб [2]. В основі всіх варіантів захисту організму лежить взаємодія клітин імунної системи [3]. Вивчення лейкоцитарної системи дає можливість скласти уяву про загальний фізіологічний стан організму [4], його стійкість, здатність адаптуватись до умов середовища і, зокрема, до токсичних речовин, що забруднюють водойми [5]. В літературних джерелах зустрічаються повідомлення стосовно динаміки накопичення іонів нікелю в органах і тканинах риб, зокрема в зябрах, шкірі, нирці, печінці [6], в крові та м'язах [7]. Однак, практично не досліджено вплив іонів нікелю на лейкоцити кровотворних органів *Cyprinus carpio* L., зокрема нирки і селезінки. Метою нашої роботи було дослідження особливостей впливу іонів нікелю на лейкоцити периферійної крові та кровотворних органів *Cyprinus carpio*.

### **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ**

Для дослідження використовували дворічки *Cyprinus carpio* у весняний період. Контрольну групу риб витримували 96 годин в токсичному середовищі. В якості токсиканта застосовували розчин солі  $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , який вносили у воду акваріумів у концентраціях 0,5 мг/л, що відповідала 5-ти гранично допустимим концентраціям

(ГДК) іонів нікелю ( $\text{Ni}^{2+}$ ) та 1,0 мг/л (10 ГДК  $\text{Ni}^{2+}$ ). Контрольну групу риб витримували 96 годин в звичайних умовах акваріуму. В усіх 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 *S. carpio* за допомогою шприца. Готували мазки крові і мазки-відбитки селезінки та нирки, фарбували препарати за Папенгеймом [8]. Мікроскопіювання препаратів здійснювали під світловим мікроскопом Leitz, застосовуючи імерсійний об'єктив, збільшення  $\times 1600$ . Клітини крові та кровотворних органів риб диференціювали залежно від їхньої приналежності до тих або інших груп лейкоцитів за допомогою «Атласа кліток крові риб» (Іванова Н.Т.), далі підраховували відсотковий вміст клітин.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми «MYNOVA», використовуючи t-test Student. Дані представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього [9].

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В експериментальних умовах дослідили вплив 96-годинної експозиції іонів нікелю на лейкоцити периферійної крові та кровотворних органів *Cyprinus carpio* у весняний період. Особливістю кровотворення у риб є відсутність кісткового мозку, функції якого виконує головна нирка, та наявність в периферійній крові молодих форм лейкоцитів. Встановлено, що в периферійній крові риб контрольної групи не зустрічалися молоді форми – гемоцитобласти, лімфобласти, мієлобласти та промієлоцити. За умов дії іонів нікелю в крові риб з молодих форм з'являлися промієлоцити, що були відсутні в контролі (табл. 1).

Таблиця 1.

Лейкоцитарна формула крові *Cyprinus carpio* під впливом нікелю ( $\bar{x} \pm S \bar{x}$ )

Концентрація $\text{Ni}^{2+}$	Бластні форми			Нейтрофіли		Псевдоеозинофіли	Псевдобазофіли	Агранулоцити		
	Промієлоцити	Мієлоцити	Метамієлоцити	Паличкоядерні	Сегментоядерні			Моноцити	Пролімфоцити	Лімфоцити
Конт- роль	–	4,5 $\pm$ 0,5	6,0 $\pm$ 0,3	16,5 $\pm$ 0,7	5,7 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0 ,7	3,7 $\pm$ 0,3	9,3 $\pm$ 0,8	1,5 $\pm$ 0,3	48,8 $\pm$ 0,7
0,5 мг/л (5 ГДК)	0,2 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,2*	4,7 $\pm$ 0,5*	10,2 $\pm$ 1,4*	3,3 $\pm$ 0,9*	–	0,2 $\pm$ 0,1*	4,0 $\pm$ 1,3*	7,0 $\pm$ 0,6*	69,7 $\pm$ 3,2*
1,0 мг/л (10 ГДК)	0,7 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,6*	4,8 $\pm$ 0,7	11,7 $\pm$ 0,7*	3,2 $\pm$ 0,7*	0,5 $\pm$ 0,3*	–	8,5 $\pm$ 0,6	7,6 $\pm$ 0,5*	60,5 $\pm$ 2,4*

\* – достовірна відмінність від контролю  $p < 0,005$ .

## ОСОБЛИВОСТІ ЛЕЙКОЦИТАРНОЇ ФОРМУЛИ КРОВІ ТА КРОВОТВОРНИХ

Водночас під впливом іонів нікелю відбувалося достовірне зменшення кількості мієлоцитів та метамієлоцитів. Серед гранулоцитів крові риб як контрольної групи, так і обох досліджуваних, переважали паличкоядерні нейтрофіли, однак під дією обох концентрацій  $Ni^{2+}$  їх вміст достовірно зменшувався, аналогічно як і сегментоядерних нейтрофілів, що підтверджується літературними даними [10]. Стосовно вмісту псевдоеозинофілів та псевдобазофілів, як видно з таблиці 1, чітких закономірностей не встановлено. Кількість моноцитів в крові риб достовірно знижувалась при концентрації іонів нікелю 0,5 мг/л, однак при збільшенні концентрації металу була близькою до контрольного значення.

Таким чином, в периферійній крові *C. carpio* серед всіх досліджуваних нами груп лейкоцитів найбільший відсотковий вміст займали зрілі форми лімфоцитів, на що вказують інші дослідники [11]. Нами встановлено також достовірне збільшення кількості пролімфоцитів та лімфоцитів під впливом 96-годинної експозиції обох досліджуваних концентрацій іонів нікелю. Про появу значної кількості молодих форм лімфоцитів в крові риб за дії іонів нікелю повідомляють і інші автори [10].

Паралельно провели дослідження по вивченню впливу іонів нікелю на лейкоцити кровотворних органів *C. carpio*. Відсотковий вміст бластних форм лейкоцитів нирки наведено в таблиці 2.

**Таблиця 2.**

**Бластні форми лейкоцитів нирки *Cyprinus carpio* під впливом нікелю (% ,  $\bar{x} \pm S \bar{x}$  )**

Концентрація $Ni^{2+}$	Нейтрофільні					Еозинофільні		Базо- фільні
	Гемоцитобласти	Мієлобласти	Промієлоцити	Мієлоцити	Метамієлоцити	Мієлоцити	Метамієлоцити	Метамієлоцити
Контроль	1,6± 0,2	2,6± 0,2	4,6± 0,2	4,6± 0,2	5,6± 0,5	0,8± 0,2	1,8± 0,5	-
0,5 мг/л (5 ГДК)	1,2± 0,7	1,2± 0,2*	3,0± 0,4*	6,2± 0,5*	10,4± 1,2*	2,0± 0,5*	3,6± 1,0	-
1,0 мг/л (10 ГДК)	0,4± 0,2*	0,8± 0,3*	2,0± 0,3*	7,4± 0,5*	10,0± 0,8*	2,2± 0,4*	4,2± 0,9*	-

\* – достовірна відмінність від контролю  $p < 0,005$ .

Як свідчать дані таблиці 2, в нирці риб за дії іонів нікелю відбувалося зменшення кількості гемоцитобластів, нейтрофільних мієлобластів та промієлоцитів. Відсотковий вміст нейтрофільних мієлоцитів та метамієлоцитів нирки достовірно зростав з 4,6 % у контролі до 7,4 % при 10 ГДК та з 5,6 % у контролі до 10,4 % при 5 ГДК. Кількість еозинофільних мієлоцитів та метамієлоцитів також збільшувалася за дії обох досліджуваних концентрацій іонів

нікелю. Деякі автори вважають, що збільшення кількості бластних форм лейкоцитів свідчить про регенеративні механізми гемопоезу у відповідь на іони нікелю [10]. На мазках-відбитках нирки *S. carpio* базофільні метаміелоцити і в особин контрольної і в дослідної груп були відсутні.

Отже, нами встановлено достовірне зниження найменш зрілих форм лейкоцитів в нирці під впливом іонів нікелю, з підвищенням дози токсиканту ця тенденція посилюється. Ці результати дають можливість припустити, що 5 і 10 ГДК Ni<sup>2+</sup> пригнічують лейкопоез у нирці *S. carpio*. Паралельно з цим, перерозподіл в лейкоцитарній формулі нирки відбувається в користь більш зрілих форм. Як видно з результатів, що наведені в таблиці 3, кількість паличкоядерних нейтрофілів під впливом токсичних концентрацій іонів нікелю збільшилась в 4,7 та 7 разів.

Таблиця 3.

Лейкоцитарна формула нирки *Syprinus carpio* під впливом нікелю (% ,  $\bar{x} \pm S \bar{x}$  )

Концентрація Ni <sup>2+</sup>	Гранулоцити				Агранулоцити					
	Паличкоядерні нейтрофіли	Сегментоядерні нейтрофіли	Псевдоеозинофіли	Псевдобазофіли	Монобласти	Промоноцити	Моноцити	Лімфобласти	Пролімфоцити	Лімфоцити
Контроль	2,2± 0,3	1,2± 0,3	3,2± 0,7	–	1,0± 0,3	1,4± 0,4	1,6± 0,2	2,6± 0,2	19,2± 0,3	44,0± 2,4
0,5 мг/л (5 ГДК)	10,4± 1,9*	2,2± 0,3*	–	1,6± 0,5	0,6± 0,2	1,2± 0,4	1,8± 0,4	1,4± 0,2*	13,6± 1,4*	39,6± 2,1
1,0 мг/л (10 ГДК)	15,8± 1,1*	1,0 ±0,3	1,0± 0,3*	0,6± 0,2	0,4± 0,2	0,6± 0,2	0,8± 0,2*	0,6± 0,4*	6,0± 0,5*	46,2± 2,0

\* – достовірна відмінність від контролю p<0,005.

Відсоток сегментоядерних нейтрофілів збільшувався за дії 0,5 мг/л іонів нікелю. Псевдоеозинофіли за дії 0,5 мг/л Ni<sup>2+</sup> не виявлялись, а за дії 1,0 мг/л Ni<sup>2+</sup> їх кількість зменшувалась порівняно з контролем. Обидві концентрації нікелю викликали появу псевдобазофілів у нирці риб, які у контрольних особин не виявлялись. Щодо агранулоцитів нирки *S. carpio*, спостерігалось зниження відсоткового вмісту молодих форм – монобластів, промоноцитів, лімфобластів та пролімфоцитів під дією обох досліджуваних концентрацій металу. Кількість зрілих форм лімфоцитів у нирці за дії іонів нікелю збільшувалась.

**ОСОБЛИВОСТІ ЛЕЙКОЦИТАРНОЇ ФОРМУЛИ КРОВІ ТА КРОВОТВОРНИХ**

В роботі вивчено також вплив токсиканту на бластні та зрілі форми лейкоцитів селезінки *C. carpio* (табл. 4, 5).

**Таблиця 4.**  
**Бластні форми лейкоцитів селезінки *Cyprinus carpio* під впливом нікелю**  
**(%,  $\bar{x} \pm S \bar{x}$ )**

Концентрація $Ni^{2+}$	Нейтрофільні					Еозинофільні		Базо- фільні
	Гемоцитобласти	Мієлобласти	Промієлоцити	Мієлоцити	Метамієлоцити	Мієлоцити	Метамієлоцити	Метамієлоцити
Контроль	0,4± 0,2	1,2± 0,3	2,8± 0,3	5,6± 0,7	7,0± 0,9	0,8± 0,4	4,2± 0,6	–
0,5 мг/л (5 ГДК)	0,4± 0,2	1,6± 0,6	2,2± 0,8	5,4± 0,6	8,8± 0,4	–	1,2± 0,7*	1,4± 0,6
1,0 мг/л (10 ГДК)	–	1,2± 0,2	1,4± 0,2*	7,0± 0,5	9,0± 0,7	–	1,2± 0,2*	–

\* – достовірна відмінність від контролю  $p < 0,005$ .

**Таблиця 5.**  
**Лейкоцитарна формула селезінки *Cyprinus carpio* під впливом нікелю (%,  $\bar{x} \pm S \bar{x}$ )**

Концентрація $Ni^{2+}$	Гранулоцити				Агранулоцити					
	Паличкоядерні нейтрофіли	Сегментоядерні нейтрофіли	Псевдоеозинофіли	Псевдобазофіли	Монобласти	Промоноцити	Моноцити	Лімфобласти	Пролімфоцити	Лімфоцити
Контроль	9,6± 1,2	5,0± 0,7	2,4± 0,4	0,6± 0,2	0,4± 0,2	1,6± 0,2	2,8± 0,3	0,4± 0,2	9,6± 1,2	45,2± 3,1
0,5 мг/л (5 ГДК)	10,2± 2,0	1,8± 0,3*	0,6± 0,2*	2,6± 0,8*	0,4± 0,2	1,2± 0,2	2,6± 0,2	–	8,6± 0,4	51,0± 2,0
1,0 мг/л (10 ГДК)	7,8± 0,4	1,2± 0,2*	1,4± 0,2*	–	–	0,6± 0,2*	3,2± 0,2	–	8,2± 0,2*	58,0± 1,5*

\* – достовірна відмінність від контролю  $p < 0,005$ .

Як видно з таблиці 4, в селезінці риб контрольної групи ми виявили всі молоді форми лейкоцитів, за винятком базофільних метамієлоцитів.

На відміну від нирки, в селезінці був нижчим відсоток гемоцитобластів, мієлобластів та промієлоцитів. Під дією іонів нікелю спостерігалось зменшення відсотку нейтрофільних промієлоцитів та еозинофільних метамієлоцитів, а також незначне збільшення відсотку нейтрофільних метамієлоцитів. В селезінці нами не було виявлено за дії іонів нікелю еозинофільних мієлоцитів. Також були відсутні гемоцитобласти при 10 ГДК нікелю. Базофільні метамієлоцити на мазках-відбитках знайдено тільки при концентрації нікелю 0,5 мг/л.

Як свідчать результати (табл. 5), в селезінці спостерігалось достовірне зниження відсоткового вмісту сегментоядерних нейтрофілів та псевдоеозинофілів під впливом обох досліджуваних концентрацій іонів нікелю. Кількість псевдобазофілів при 5 ГДК  $Ni^{2+}$  збільшувалась в 4,3 рази, при 10 ГДК  $Ni^{2+}$  даний тип клітин не було виявлено.

При дослідженні агранулоцитів селезінки нами отримані наступні результати: зменшення кількості промоноцитів та пролімфоцитів за дії обох концентрацій  $Ni^{2+}$ .

### ВИСНОВКИ

1. В лейкоцитарній формулі крові *C. carpio* під впливом іонів нікелю відбулись наступні зміни: поява промієлоцитів; зниження відсотку мієлоцитів, метамієлоцитів, паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів; збільшення кількості пролімфоцитів та лімфоцитів.
2. В нирці риб іони нікелю викликали: підвищення відсоткового вмісту нейтрофільних мієлоцитів та метамієлоцитів, еозинофільних бластних клітин та зниження кількості решти досліджуваних бластних клітин; появу псевдобазофілів та значне зростання паличкоядерних нейтрофілів; зменшення кількості агранулоцитів, за винятком пролімфоцитів та лімфоцитів, кількість яких збільшувалась.
3. Під дією токсиканту в селезінці *C. carpio* відмічалось зменшення кількості нейтрофільних промієлоцитів та еозинофільних метамієлоцитів, сегментоядерних нейтрофілів та псевдоеозинофілів, промоноцитів та пролімфоцитів, а також зростання кількості лімфоцитів.
4. Токсичні ефекти іонів нікелю на імунну систему риб можуть слугувати біомаркером для контролю забруднення та екологічної оцінки якості води.

### Список літератури

1. Ecotoxicology and innate immunity in fish / N.C. Bols, J.L. Brubacher, R.C. Ganassin [et al.] // Developmental and Comparative Immunology. – 2001. – Vol. 25. – P. 853-873.
2. Vosylienė M.Z. The effect of heavy metals on hematological indices of fish / M.Z. Vosylienė // Acta Zoologica Lituanica. Hydrobiologia. – 1999. – Vol. 9, N 2. – P. 76-82.
3. Кондратьева И.А. Современные представления об иммунной системе рыб. Функционирование и регуляция иммунной системы рыб / И.А. Кондратьева, А.А. Киташова // Иммунология. – 2002. – № 2. – С. 97-101.
4. Аминова В.А. Физиология рыб / В.А. Аминова, А.А. Яржомбек. – Москва: «Легкая и пищевая промышленность», 1984. – 200 с.

5. Заботкина Е.А. Влияние тяжелых металлов на иммунофизиологический статус рыб / Е.А. Заботкина, Т.Б. Лапирова // Успехи современной биологии. – 2003. – Т. 123, № 4. – С. 401-408.
6. Brucka-Jastrzębska E. Elimination dynamics of nickel, administered by a single intraperitoneal injection, in common carp, *Cyprinus carpio* L. / E. Brucka-Jastrzębska, M. Protasowicki // Acta Ichthyologica et Piscatoria. – 2004. – Vol. 34, N 2. – P. 181-192.
7. Ghazaly K.S. Sublethal effects of nickel on carbohydrate metabolism, blood and mineral contents of *Tilapia nilotica* / K.S. Ghazaly // Water, air and soil pollution. – 1992. – Vol. 64, N 3-4. – P. 525-532.
8. Иванова Н. Т. Атлас клеток крови рыб / Н.Т. Иванова. – М.: «Легкая и пищевая промышленность», 1983. – 179 с.
9. **Brooks S.P.J. A simple computer program with statistical test analysis of enzyme kinetics / S.P.J. Brooks // Bio Techniques. – 1992. – Vol. 13. – P. 906-911.**
10. Brucka-Jastrzębska E. Effects of cadmium and nickel exposure on haematological parameters of common carp, *Cyprinus carpio* L. / E. Brucka-Jastrzębska, M. Protasowicki // Acta Ichthyologica et Piscatoria. – 2005. – Vol. 35, N 1. – P. 29-38.
11. Sobeska E. Changes in the iron level in the organs and tissues of wels catfish, *Sirulus glanis* L. caused by nickel / E. Sobeska // Acta Ichthyologica et Piscatoria. – 2001. – Vol. 31, N 2. – P. 127-143.
12. Congleton J.L. Isolation of leucocytes from the anterior kidney and spleen of rainbow trout in a self-generating density gradient / J.L. Congleton, A.R. Greenlee, S.S. Ristow // Fish biology. – 2006. – Vol. 36, N 4. – P. 575-585.

**Дрогомирецкая И.З., Мазепа М.А. Особенности лейкоцитарной формулы крови и кроветворных органов *Cyprinus carpio* L. при действии токсических концентраций ионов никеля // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2009. – Т. 22 (61). – № 1. – С. 9-15.**

В эксперименте изучили влияние ионов никеля на лейкоциты *Cyprinus carpio* L. Установлено, что 96-часовая экспозиция ионами никеля вызывает перераспределение клеток в лейкоцитарной формуле периферической крови рыб со снижением процента миелоцитов, метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, увеличением количества пролимфоцитов та лимфоцитов. В почке и селезенке рыб также отмечено существенные изменения количества лейкоцитов во всех исследованных группах.

**Ключевые слова:** *Cyprinus carpio*, лейкоциты, периферическая кровь, почка, селезенка, никель.

**Drogomyretska I.Z., Mazepa M.A. The haemogram of blood and blood-forming organs of *Cyprinus carpio* L. under the toxic concentrations of nickel ions // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2009. – V.22 (61). – № 1. – P. 9-15.**

In experimental conditions investigated the effect of nickel ions on *Cyprinus carpio* L. leucocytes. It was shown that an exposition for 96 h with nickel ions lead to distribution cells in haemogram of fishes peripheral blood. It was observed the decrease in percentage of myelocytes, metamyelocytes, band and segmented neutrophils and increase of prolymphocytes and lymphocytes number. The material change in number of leucocytes was observed in kidney and spleen of all experimental groups.

**Keywords:** *Cyprinus carpio*, leucocytes, peripheral blood, kidney, spleen, nickel.

*Поступила в редакцию 26.04.2009 г.*