

М.Р. ВЕРГОЛЯС <sup>1</sup>,  
Н.М. ВЕЯЛКІНА <sup>2</sup>, В.В. ГОНЧАРУК <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут колоїдної хімії і хімії води ім. А.В. Думанського  
НАН України, Київ

E-mail: vergolyas@meta.ua

<sup>2</sup> Центральна науково-дослідна лабораторія ДУО «Білоруська медична  
академія післядипломної освіти», Мінськ

E-mail: veyalkina@mail.ru

## ВПЛИВ ІОНІВ МІДІ НА ГЕМАТОЛОГІЧНІ ТА ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ПОКАЗНИКИ ПРИСНОВОДНИХ РИБ *CARASSIUS AURATUS GIBELIO*



*Досліджено вплив іонів міді на показники клітин білої крові *Carassius auratus gibelio*. Оцінено зміни параметрів цитогенетичної нестабільності еритроцитів та епітеліальних клітин зябер у відповідь на дію розчинів міді. Проведено аналіз частоти появи епітеліальних клітин зябер на стадії апоптозу. Показано можливість використання комплексу гематологічних показників та параметрів цитогенетичної нестабільності для оцінки впливу ксенобіотиків на організм риб.*

© М.Р. ВЕРГОЛЯС, Н.М. ВЕЯЛКІНА, В.В. ГОНЧАРУК, 2010

**Вступ.** Забруднення води іонами металів залишається одним з актуальних питань сучасної екоотоксикології. Мідь є одним із есенціальних мікроелементів для людини й тварин, у той же час підвищення концентрації іонів міді у воді може призводити до проявів гострої й хронічної токсичності. Риби надзвичайно чутливі до різних забруднюючих речовин, що розчинені у воді, тому часто використовуються в моніторингових дослідженнях та при оцінці якості води методами біотестування [1]. Актуальність питання про використання гематологічних параметрів риб як показників антропогенного впливу була відзначена багатьма авторами [3]. Система крові тонко відображає реакцію організму на дію різноманітних фізіологічних та патологічних факторів на організм.

Зябра виконують кілька життєвих функцій (а саме респіраторну, осморегуляторну й екскреторну), мають велику поверхню, що безпосередньо контактує із зовнішнім середовищем, і є тим органом у риб, який одним з перших зазнає впливу хімічних і фізичних змін водного середовища. Клітини зябер визнані чутливим індикатором якості та токсичності води [4]. Вплив розчинів важких металів, включаючи розчини міді, на морфофункціональні показники зябер риб описані в багатьох дослідженнях [5, 6]. Дегенерацію клітин зябер як наслідок негативного впливу іонів міді відносили як до некротичних змін, так і до процесів апоптозу. Однією з функцій апоптозу є елімінація клітин з порушеннями структури молекули ДНК та хромосом [7, 8]. До таких цитогенетичних порушень належить поява клітин з мікроядрами.

Утворення мікроядер зв'язують із ушкодженням молекули ДНК або хромосомних білків, чи ж з ураженням обох компонентів хромосоми. Мікроядерний тест на рибах є чутливим методом оцінки генотоксичності речовин і перспективним для виявлення токсичних речовин у воді [9]. Серед всіх типів клітин риб клітини зябер й еритроцити периферичної крові найбільш часто використовуються для мікроядерного тесту [10].

Паралельний аналіз клітинного складу білої крові, частоти утворення клітин з ознаками апоптозу і клітин з цитогенетичними порушеннями міг би дати комплексну картину токсичного впливу іонів міді на організм риб.

**Матеріали й методи.** Об'єктом дослідження були карасі *Carassius auratus gibelio* з водойм

рибгоспу м. Яготин, яких утримували в акваріумах лабораторії впродовж шести місяців.

Відбирали особин масою 15–20 г, довжиною 80–100 мм. Для кожної групи, контрольної та дослідної, було відібрано по 12 риб.

Досліджувані розчини міді готували шляхом розчинення у воді солі сульфату міді ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) з розрахунку 50 мг/л за іоном міді. Концентрація міді була з огляду на попередні дослідження та літературні дані, як  $1/2$  96-год ЛК<sub>50</sub> [11, 12].

В ході експерименту контрольну групу особин поміщали на чотири доби у стандартну лабораторну воду, досліджувану групу – на чотири доби у лабораторну воду, що мала в собі 50 мг/л міді (у формі сульфату). Після закінчення інкубації від кожної особини отримували зразки зябер та крові.

Кров відбирали з хвостової вени, робили мазки, фіксували 96%-ним етиловим спиртом 30 хв та висушували. Препарати фарбували за методикою Паппенгейма – Крюкова, яка полягає в комбінованій обробці мазків розчином Мая-Грюнвальда та 2%-ним розчином Романовського, що дає можливість краще диференціювати складові частини клітин [13].

Цитологічні препарати аналізували під світловим мікроскопом із загальним збільшенням  $\times 1000$ . Кількість клітин, проаналізованих для кожної риби при мікроядерному аналізі, становила 3000.

Для визначення формули крові в чотирьох ділянках мазка підраховували близько 1250 клітин, ідентифікуючи їх за класифікацією, запропонованою Івановою [14], а потім вираховували відсоток кожного типу клітин.

Для дослідження клітин зябер використовували техніку приготування нативних препаратів. Відбитки зябрової тканини фіксували метанолом й фарбували флуоресцентним ядерним барвником Hoechst 33258. На отриманих препаратах підраховували епітеліальні клітини з конденсованим або фрагментованим хроматином, що є характерною ознакою клітин у стані апоптозу. Препарати аналізували при загальному збільшенні  $\times 1000$  під люмінесцентним мікроскопом, з додатковим використанням ефекту змішаного висвітлення. Для кожного препарату переглядали не менш 1000 клітин.

З частини зяберної тканини тих самих особин готували цитологічні препарати для мікроядерного аналізу. Клітини фарбували розчином Романовського, визначали частоту епітеліальних клітин зябер з мікроядрами та подвійними ядрами. Аналіз проводили під світловим мікроскопом із загальним збільшенням  $\times 1000$ . Кількість клітин, проаналізованих для кожної риби при мікроядерному аналізі, становила 3000.

На заключному етапі досліджень здійснювали аналіз та статистичну обробку результатів за допомогою стандартного пакету програм Excel. В тексті та таблицях дані представлені у вигляді середнього значення та стандартного відхилення від середнього ( $M \pm m$ ). При оцінці статистичної достовірності використовували параметричний t-критерій Ст'юдента та непараметричний критерій. Різниця між значеннями показників в контролі та досліді вважалась достовірною при  $p < 0,05$ .

**Результати досліджень та їх обговорення.** У ході проведеного дослідження при інкубації риб в експериментальних і контрольних середовищах не спостерігали смертності й фізіологічних ознак гострої інтоксикації риб. Зовнішній вигляд та поведінка риб в обох групах не відрізнялись.

В периферичній крові досліджуваних особин *Carassius auratus gibelio* виділяли наступні формені елементи: бласти – незрілі форми, промієлоцити, мієлоцити, метамієлоцити, паличкоядерні нейтрофіли, сегментоядерні нейтрофіли, еозинофіли, базофіли, моноцити, лімфоцити. Велику увагу приділяли диференціації клітин мієлоїдного ряду.

При аналізі лейкоцитарної формули крові риб контрольної групи та особин, що зазнавали впливу іонів міді, було зазначено зростання вмісту паличкоядерних нейтрофілів в порівнянні з контрольними особинами (рис. 1) від  $1,5 \pm 0,4 \%$  в контролі до  $4,2 \pm 0,7 \%$  в піддослідній групі ( $p < 0,05$ ). Кількість зрілих форм нейтрофільних гранулоцитів зростала незначною мірою.

Спостерігалось стрімке зростання кількості еозинофілів – від  $1,7 \pm 0,5 \%$  в контролі до  $5,0 \pm 0,8 \%$  в піддослідній групі ( $p < 0,05$ ). Також значною мірою підвищився відсоток базофілів та моноцитів в крові піддослідних груп риб, тоді як в контрольній групі вміст цих клітин ста-

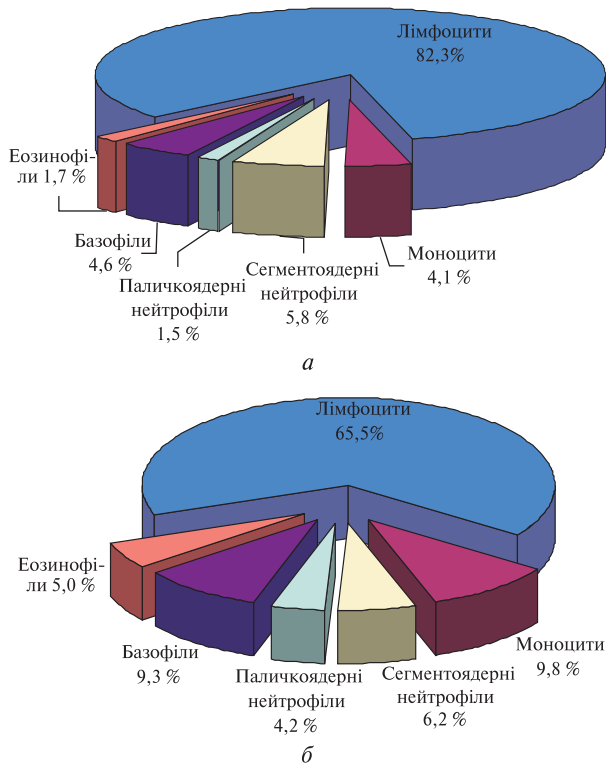


Рис. 1. Лейкоцитарна формула крові *Carassius auratus gibelio* контрольної групи (а) та групи особин, що зазнавали впливу іонів міді (50 мг/л) (б)

Показники апоптозу й цитогенетичних порушень в клітинах зябер *Carassius auratus gibelio*, ‰

| Кількість клітин             | Група       |               |
|------------------------------|-------------|---------------|
|                              | контрольна  | дослідна      |
| В стадії апоптозу            | 0 ± 0       | 22,8 ± 2,80 * |
| В початковій стадії апоптозу | 0,08 ± 0,05 | 10,0 ± 3,84 * |
| 3 мікроядрами                | 0,5 ± 0,35  | 13,3 ± 2,77 * |
| 3 подвійними ядрами          | 0,37 ± 0,31 | 5,95 ± 0,92 * |

\* p < 0,05.

новив  $4,6 \pm 0,8$  та  $4,1 \pm 0,7$  % відповідно. В групі особин, що утримувались у воді з підвищеним вмістом іонів міді, частка базофілів та моноцитів становила  $9,3 \pm 1,0$  та  $9,8 \pm 1,1$  % відповідно від загальної кількості лейкоцитів ( $p < 0,05$ ).

При мікроядерному аналізі еритроцитів периферичної крові досліджуваних риб було зазначено підвищення частоти появи еритроци-

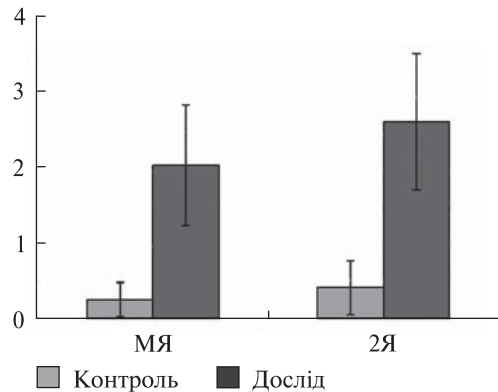


Рис. 2. Кількість еритроцитів периферичної крові (по вертикалі, ‰) *Carassius auratus gibelio* з порушеннями мітозу в контрольній групі та групі особин, що зазнавали впливу іонів міді (МЯ – клітини з мікроядрами, 2Я – клітини з подвійними ядрами)

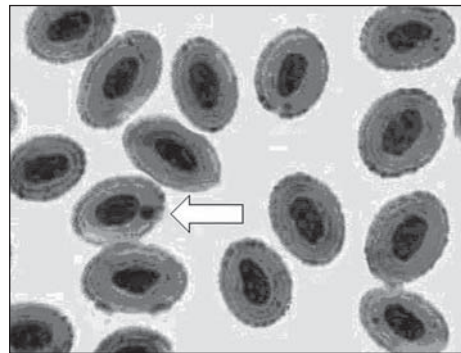


Рис. 3. Мікроядро в еритроциті периферичної крові риб *Carassius auratus gibelio*, що зазнавали впливу іонів міді. Забарвлення азур-еозином за Романовським, зб.  $\times 1000$

тів з мікроядрами та подвійними ядрами у особин, які зазнавали впливу іонів міді. Спостерігалось зростання обох параметрів цитогенетичної нестабільності (рис. 2) – від  $0,25 \pm 0,23$  ‰ в контролі до  $2,08 \pm 0,82$  ‰ в досліді для еритроцитів, які містили мікроядра, та від  $0,42 \pm 0,37$  ‰ до  $2,67 \pm 0,92$  ‰ для еритроцитів з подвійними ядрами ( $p < 0,05$ ).

У зябровій тканині особин, яких інкубували в стандартній лабораторній воді (контрольна група), клітини в стані апоптозу, а так само клітини з мікроядрами й подвійними ядрами практично були відсутні (рис. 4, а, б).

Присутність у воді 50 мг/л міді (у формі сульфату) викликало появу клітин у стані апоптозу (рис. 5, а). Індекс апоптозу в присутності міді становив 32,8 ‰. Відзначалося також різке

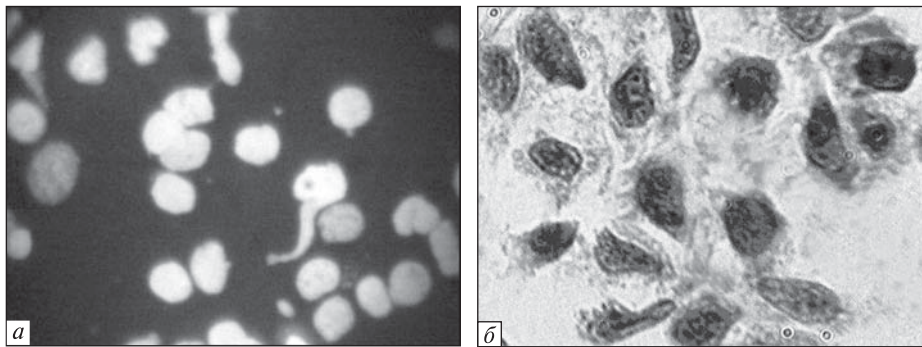


Рис. 4. Цитологічний препарат клітин зябер *Carassius auratus gibelio*: а – фарбування Ноеchst 33258; б – фарбування Майн-Грюнвальд, зб.  $\times 1000$

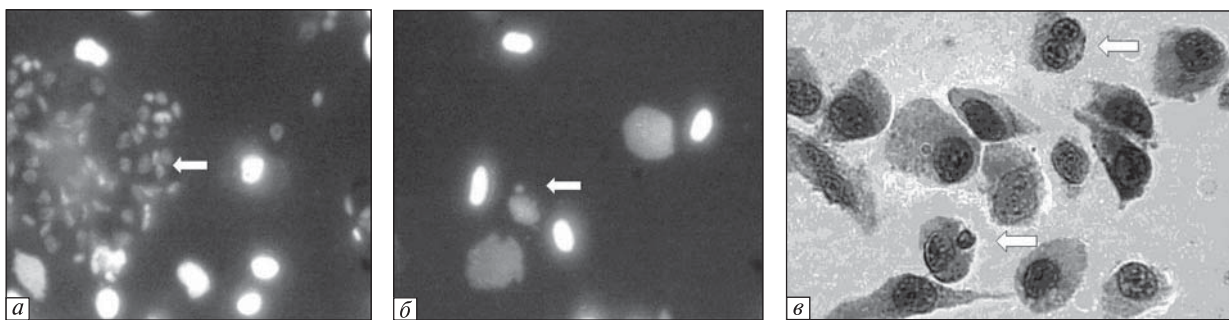


Рис. 5. Цитологічний препарат клітин зябер *Carassius auratus gibelio* після впливу розчину міді: а, б – фарбування Ноеchst 33258, в – фарбування Майн-Грюнвальд. Стрілками зазначені клітини на стадії апоптозу, мікроядра й подвійні ядра, зб.  $\times 1000$

збільшення кількості клітин зябер з генетичними порушеннями: 13,3 % клітин з мікроядрами й 5,95 % клітин з подвійними ядрами ( $p < 0,01$  відносно контролю) (таблиця).

Токсичний вплив іонів міді продемонстровано в багатьох дослідженнях [5, 9]. Щодо впливу іонів міді на гематологічні показники тварин літературні дані досить обмежені. Так показано, що внутрішньочеревне введення розчинів солі міді понад 40 мг Cu/kg на добу щурам спричиняло зниження гемоглобіну та викликало гепатотоксичні ефекти [15]. У риб при хронічному впливі розчинів іонів міді в сублетальних концентраціях спостерігали значні зміни лейкоцитарної формули [16, 17].

Збільшення кількості еозинофілів є характерним для процесів токсичного враження печінки, які супроводжуються алергізацією організму. Можемо припустити, що гостре токсичне ураження організму риб відбувається подібно до вищих хребетних організмів. Подібним чином реагує система крові на токсичний вплив, що проявляється в різкому збіль-

шенні кількості еозинофілів, базофілів, моноцитів та нейтрофілів.

В наукових публікаціях останніх років описано генотоксичний та мутагенний вплив іонів міді на клітини тварин і рослин [18, 19]. Результати нашого дослідження ще раз підтвердили наявність генотоксичних властивостей іонів міді.

Дегенерацію клітин зябер як наслідок негативного впливу іонів міді відносили як до некротичних змін, так і до процесів апоптозу [6]. Але було зазначено, що некроз викликаний прямим впливом високих концентрацій міді, а апоптоз у тканині зябер фіксували при дії більш низьких концентрацій міді й зв'язували з послідовною дією внутрішніх факторів [20]. Даний факт був підтверджений результатами нашої роботи. Досліджувана концентрація міді не викликала ефектів гострого токсичного ураження, однак зазначено зміну ряду гематологічних показників, які свідчать про негативний вплив іонів міді на організм риб. В клітинах зябер спостерігали активацію процесів апоп-



тозу. Одночасно було відзначено різке підвищення кількості клітин із цитогенетичними порушеннями, що дає можливість припустити, що апоптоз, який спостерігали у клітинах зябер, був стадією елімінації цих клітин. Дане припущення підтверджується й іншими дослідженнями [21]. Аналіз генетичних ушкоджень у клітинах різних органів і тканин тварин дозволяє оцінити не тільки рівень токсичного впливу, але й можливий наслідок цього впливу на організм. Апоптоз — це генетично запрограмована клітинна загибель, що запускається як внутрішньоклітинними, так і зовнішніми ініціюючими чинниками. У зв'язку тим, що репарація ДНК рідко буває повною, однією з функцій апоптозу є ліквідація клітин на певних стадіях клітинного циклу у відповідь на ушкодження ДНК, що може зменшити число клітин із цитогенетичними ушкодженнями [8, 9]. Виходячи з літературних та власних даних вважаємо, що процеси утворення мікроядер і запуску апоптозу взаємозалежні й можуть бути ланками одного ланцюга токсикологічних ефектів на цитогенетичному рівні.

**Висновки.** Токсичний ефект присутності міді у воді виявляється в зміні лейкоцитарної формули риб *Carassius auratus gibelio*, а саме збільшенні відсотку еозинофілів, базофілів, моноцитів та нейтрофілів. Зафіксовано зростання кількості еритроцитів периферичної крові з мікроядрами та подвійними ядрами. В тканині зябер спостерігали значну активацію процесів апоптозу, а також появу аномальних клітин з різними порушеннями мітозу. Необхідно зазначити, що використані цитогенетичні показники виявились більш чутливими до впливу іонів міді, ніж зміни на рівні цілого організму *Carassius auratus gibelio*. Роль зазначених процесів у розвитку клітинної патології при нагромадженні в організмі надлишкових кількостей металів потребує подальшого дослідження.

*M.R. Vergolyas,*

*N.N. Veyalkina, V.V. Goncharuk*

INFLUENCE OF COPPER IONS  
ON HEMATOLOGICAL AND CYTOGENETICS  
PARAMETERS OF FRESH-WATER FISHES  
*CARASSIUS AURATUS GIBELIO*

Influence of copper ions on white blood cells parameters in *Carassius auratus gibelio* was investigated. Changes

in cytogenetic parameters and instability in erythrocytes and epithelial cells of gills were estimated in reply to influence of copper solutions. The frequency of epithelial gill cells at a stage of apoptosis was investigated. The opportunity to use the hematological parameters and cytogenetic instability set for xenobiotics effects in fishes was shown.

*M.P. Vergoляс,*

*Н.М. Веялкина, В.В. Гончарук*

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ НА  
ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ  
ПОКАЗАТЕЛИ ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ  
*CARASSIUS AURATUS GIBELIO*

Исследовано влияние ионов меди на клеточные показатели белой крови *Carassius auratus gibelio*. Оценены изменения параметров цитогенетической нестабильности эритроцитов и эпителиальных клеток жабр в ответ на действие растворов меди. Проведен анализ частоты появления эпителиальных клеток жабр на стадии апоптоза. Показана возможность использования комплекса гематологических показателей и параметров цитогенетической нестабильности для оценки влияния ксенобиотиков на организм рыб.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Hayashi M., Ueda T., Uyeno K. et al.* Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms // *Mutat. Res.* — 1998. — № 399. — P. 125–133.
2. *Аленичев С.В.* Динамика гематологических показателей типичных представителей ихтиофауны водоемов Карелии : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Петрозаводск, 2000. — 25 с.
3. *Токсикозы рыб с основами патологии* : Справочник. — СПб, 2006. — 179 с.
4. *Wendelaar Bonga S.E.* The stress response in fish // *Physiol. Rev.* — 1997. — 77. — P. 591–625.
5. *Wood C.M.* Toxic responses of the gill // *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts. Vol. 1 / Eds D. Schlenck, W.H. Benson.* — London : Taylor & Francis, 2001. — P. 1–89.
6. *Fernandes M.N., Mazon A.F.* Environmental pollution and fish gill morphology // *Fish Adaptation / Eds A.L. Val, B.C. Kapoor.* — Enfield : Sci. Publ., 2003. — P. 203–231.
7. *Манских В.Н.* Пути гибели клетки и их биологическое значение // *Цитология.* — 2007. — 49, № 11. — С. 909–915.
8. *Decordier I., Dillen L., Cundari E., Kirsch-Volders M.* Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules // *Mutagenesis.* — 2002. — 17, № 4. — P. 337–344.
9. *Ergene S., Cavas T., Celik A., Köeli N., Aymak C.* Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test // *Environ. Mol. Mutagen.* — 2007. — 48, № 6. — P. 421–429.

10. *Cavas T., Ergene-Gözükara S.* Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2005. – **46**, № 1. – P. 64–70.
11. *Mazon A.F., Nolan D.T., Lock R.A.C., Fernandes M.N., Wendelaar Bonga S.E.* A short-term in vitro gill culture system to study the effects of toxic (copper) and non-toxic (cortisol) stressors on the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) // *Toxicology in vitro.* – 2004. – **18**. – P. 691–701.
12. *Cavas T., Garanko N.N., Arkhipchuk V.V.* Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate // *Food and Chem. Toxicol.* – 2005. – **43**. – P. 569–574.
13. *Бокуняева Н.И., Золотницкая Р.П.* Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под ред. Е.А. Кост. – М., 1968. – С. 290–295.
14. *Иванова Н.Т.* Атлас клеток крови рыб. – М.: Легкая и пищ. промышленность, 1983. – 184 с.
15. *Toxicological profile for copper* // Agency for Toxic Substances and Disease Registry U.S. Public Health Service, 1990. – 155 p.
16. *Микряков В.Р., Лапирова Т.Б.* Влияние солей тяжелых металлов на состав белой крови молоди ленокского осетра *Acipenser baeri* // *Вопр. ихтиологии.* – 1997. – **37**, № 4. – С. 538–542.
17. *Пат. України* за заявкою № 2008 01532, МПК (2006) G 01N 33/18. Спосіб визначення цитотоксичності водного середовища / В.В. Гончарук, М.Р. Верголяс. – Заявл. 06.02.2008. Рішення про видачу патенту від 24.11.2008.
18. *Prál D., Franke S. I., Giulian R., Yoneama M.L. et al.* Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice // *Bio. Metals.* – 2008. – **21**, № 3. – P. 289–297.
19. *Mediouni C., Houlhè G., Chaboutè M.-E., Ghorbel M.H., Jemal F.* Cadmium and copper genotoxicity in plants // *Biosaline Agriculture and High Salinity Tolerance.* – Basel : Birkhäuser, 2008. – P. 325–333.
20. *Pelgrom S.M.G.J.* Interactions between Copper and Cadmium in Fish : Metal Accumulation, Physiology and Endocrine Regulation: Ph.D thesis. – Katholieke Univ. Nijmegen, 1995.
21. *Fimognari C., Nüsse M., Cesari R., Cantelli-Forti G., Hrelia P.* Micronuclei induction, cell cycle delay and apoptosis as markers of cellular stress caused by ursodeoxycholic acid in human lymphocytes // *Mutat. Res.* – 2001. – № 495. – P. 1–9.

Надійшла 09.06.09