

УДК 579.6/9 : 504.74.054

## ВЛИЯНИЕ НЕФТИ НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ

Т. Ю. Пескова, Я. В. Шарпан

*Влияние нефти на гематологические показатели озерной лягушки. – Т. Ю. Пескова, Я. В. Шарпан. – В работе приведены результаты изучения в лабораторных условиях основных гематологических показателей озерной лягушки под влиянием различных концентраций нефти (от 0,005 до 0,2 мл/л). Установлено, что по мере увеличения концентрации нефти возрастает число эритроцитов при одновременном снижении количества гемоглобина (гипохромия), усиливается лейкоцитоз, в основном за счет нейтрофилии, при стабильном количестве лимфоцитов и очень сильной variability (вплоть до полного отсутствия) количества эозинофилов и базофилов.*

**Ключевые слова:** озерная лягушка, гематологические показатели, нефть.

**Адресс:** Кубанский государственный университет, Краснодар, ул. Ставропольская, 149. 350040. Россия, e-mail: peskova@kubanet.ru

### Введение

Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами оказывает влияние на живых организмов. Исследования характера этого влияния в основном проводятся на рыбах и других гидробионтах, главным образом, морских. Однако, пресноводные животные также испытывают воздействие этих загрязнителей.

Целью данного исследования было изучение в лабораторном эксперименте влияния нефти на гематологические показатели озерной лягушки *Rana ridibunda* Pall.

Сырая нефть содержит сотни разных химических компонентов, процентное содержание которых колеблется в широких пределах и зависит от особенностей нефтяных месторождений. Более 75% состава нефти приходится на углеводороды, остальную часть составляют производные углеводородов, в которых содержатся сера, азот и кислород. В низкомолекулярной части нефти это метановые, нафтеновые и ароматические углеводороды, в частности, бензол и его гомологи; в высокомолекулярной части – смесь большого количества веществ разнообразного состава и строения, в частности, смешанного, или гибридного. Непредельных углеводородов с ненасыщенными связями в цепи, как правило, в сырой нефти нет [1, 2].

Предельно допустимая концентрация (ПДК) для нефти – 0,05 мг/л в воде. Диапазоны концентрации нефтяных углеводородов  $10^{-3}$ – $10^{-2}$  мг/л для воды и 0,01–0,10 мг/г для донных отложений рекомендованы в качестве диапазонов значений ПДК, при которых биологические эффекты отсутствуют, либо имеют вид обратимых физиолого-биохимических реакций водных организмов [3]. Пресноводные водоемы могут оказаться загрязненными нефтью или нефтепродуктами из сточ-

ных вод, отходами от переработки сырой нефти, в результате течи в нефтепроводах (через почву), вследствие выброса нефти при бурении скважин [2]. ПДК нефти и нефтепродуктов превышены в некоторых водоемах в 100 и более раз. Хозяйственно-бытовые стоки, нефтехранилища и другие промузлы на берегах, большой и малый флот и т.д. – все это постоянные поставщики нефти и ее производных для многих акваторий [4].

Для любых живых организмов пагубным является не только непосредственный контакт с нефтепродуктами (эффект обволакивания живого организма нефтепродуктами); особую опасность вызывает взаимодействие с растворенными в воде углеводородами, в частности ароматическими и полициклическими, которые довольно легко проникают в организмы обитателей вод. Эти токсиканты даже при очень низких концентрациях ( $10^{-7}$ %) могут вызывать нежелательные изменения морских организмов. При концентрациях порядка  $10^{-6}$ – $10^{-5}$ % наблюдается серьезное нарушение физиологической активности, диапазон  $10^{-4}$ – $10^{-2}$ % является летальной дозой для личинок морских беспозвоночных, ракообразных, устриц, креветок и рыб [2].

Эксперимент проводили в 2006г. с озерными лягушками, отловленными в водоемах окрестностей г. Краснодара (Западное Предкавказье). Лягушек поместили в воду с добавлением нефти (концентрации 0,0005; 0,001; 0,05; 0,01; 0,05; 0,1 и 0,2 мл/л); контролем служила чистая водопроводная вода, отстоянная в течение 2–3 дней. В каждом их вариантов опыта и в контроле было по 10 лягушек. Через трое суток лягушки были взяты из растворов и усыплены, кровь для анализа брали при разрезании сердца. Определяли следующие гематологические показатели: количество гемо-

глобина (г/л), эритроцитов ( $10^{12}/л$ ), тромбоцитов ( $10^{10}/л$ ), лейкоцитов ( $10^9/л$ ), а также произвели подсчет лейкоцитарной формулы крови. Полученный цифровой материал обработан стандартными статистическими методами. В работе принят 5%–ный уровень значимости [5].

Экспериментальные данные свидетельствуют, что гематологические показатели озерной лягушки при экспозиции в растворах нефти концентраций

от 0,0001 до 0,2 мл/л изменяются достаточно существенно (табл. 1).

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.

Таблица 1. Гематологические показатели озерной лягушки (лимиты,  $X \pm m$ ,  $C_v$  %) в контроле и растворах нефти различной концентрации (n= 10 в каждом варианте)

Показатель	Концентрация нефти (мл/л)							
	0 Контроль	0,0005	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1	0,2
Эритроциты, $10^{10}/л$	35,7 —	64,5 —	60,0 —	68,7 —	94,0 —	93,3 —	93,3 —	106,7 —
	42,2	76,2	74,0	85,7	108,0	100,4	125,5	129,6
	$38,5 \pm$	$70,7 \pm$	$68,3 \pm$	$75,5 \pm$	$97,9 \pm$	$97,8 \pm$	$110,6 \pm$	$118,4 \pm$
	0,46 4,5%	1,52 6,5%	2,15 9,4%	2,04 8,1%	1,37 4,2%	0,92 2,8%	3,73 10,1%	2,62 6,6%
Гемоглобин, г/л	87 — 115	20 — 85	45 — 86	38 — 79	45 — 124	60 — 11,0	19 — 80	20 — 60
	$101,7 \pm$	$54,3 \pm$	$65,2 \pm$	$55,5 \pm$	$74,3 \pm$	$84,1 \pm$	$44,2 \pm$	$47,1 \pm$
	2,49	6,55	4,77	4,51	8,47	4,50	7,41	4,92
	9,2%	36,2%	22,0%	24,3%	34,2%	16,0%	50,3%	31,3%
Тромбоциты, $10^{10}/л$	7,0 — 15,8	8,6 — 10,9	6,2 — 14,8	4,7 — 9,4	4,1 — 10,1	3,3 — 15,0	3,0 — 11,1	6,3 — 10,5
	$10,1 \pm$	$9,2 \pm 0,29$	$9,7 \pm 1,0$	$6,2 \pm 0,43$	$7,3 \pm 0,71$	$10,4 \pm 1,35$	$5,7 \pm 0,86$	$8,8 \pm 0,38$
	0,57	9,5%	32,0%	20,8%	29,5%	47,6%	45,5%	13,0%
	21,3%							
Лейкоциты, $10^9/л$	5,6 — 9,8	10,8 —	20,0 —	34,0 —	43,0 —	43,8 —	40,7 —	53,3 —
	$6,7 \pm 0,28$	14,4	30,8	36,9	47,7	50,0	54,5	58,1
	15,6%	$12,5 \pm$	$26,5 \pm$	$35,2 \pm$	$45,0 \pm$	$46,9 \pm$	$51,0 \pm$	$55,8 \pm$
		0,42 10,0%	1,23 14,0%	0,37 3,1%	0,52 3,5%	0,62 3,9%	1,39 8,2%	0,51 2,7%

Таблица 2. Лейкоцитарная формула крови озерной лягушки (лимиты,  $X \pm m$ ,  $C_v$  %) в контроле и растворах нефти различной концентрации (n= 10 в каждом варианте)

Показатель	Концентрация нефти (мл/л)							
	0 Контроль	0,0005	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1	0,2
Нейтрофилы сегментоядерные	3 — 16	14 — 15	16 — 22	2 — 10	6 — 16	6 — 10	6 — 14	6 — 12
	$7,1 \pm 0,93$	$14,5 \pm$	$19,7 \pm$	$4,3 \pm 1,05$	$10,1 \pm$	$8,7 \pm 1,00$	$10,4 \pm$	$9,2 \pm 0,84$
	48,8%	0,18 3,6%	0,61 9,4%	75,1%	1,39 41,3%	34,8%	0,86 25,2%	27,5%
Нейтрофилы палочкоядерные	0 — 3	1 — 1	1 — 2	0 — 1	0 — 6	3 — 7	6 — 8	6 — 8
	$1,1 \pm 0,26$	$1,0 \pm 0,00$	$1,7 \pm 0,16$	$0,7 \pm 0,17$	$3,3 \pm 0,69$	$4,9 \pm 0,53$	$6,9 \pm 0,32$	$7,2 \pm 0,26$
	87,4%	0%	28,4	86,1%	60,8%	33,7%	14,2%	11,0%
Эозинофилы	0 — 3			2 — 10				
	$1,7 \pm 0,26$	0	0	$6,0 \pm 1,26$	0	0	0	0
	58,4%			62,9%				
Базофилы	0 — 2	1 — 2	2 — 2	0 — 2				
	$0,9 \pm 0,16$	$1,5 \pm 0,18$	$2,0 \pm 0,00$	$1,5 \pm 0,23$	0	0	0	0
	63,6%	35,1	0%	46,7%				
Лимфоциты	71 — 91	79 — 82	68 — 76	68 — 86	74 — 88	78 — 87	75 — 84	78 — 84
	$86,1 \pm$	$80,1 \pm$	$71,7 \pm$	$76,8 \pm$	$83,2 \pm$	$83,1 \pm$	$80,0 \pm$	$80,9 \pm$
	1,98	0,40	0,69	1,52	1,23	1,13	1,00	0,84
	8,5%	1,5%	2,9%	5,9%	6,6%	4,1%	3,8%	3,1%
Моноциты	0 — 8	2 — 4	3 — 8	6 — 16	3 — 4	2 — 4	2 — 4	2 — 4
	$3,1 \pm 0,70$	$2,9 \pm 0,29$	$4,9 \pm 0,61$	$10,7 \pm$	$3,4 \pm 0,17$	$3,3 \pm 0,29$	$2,7 \pm 0,28$	$2,7 \pm 0,27$
	83,5%	30,2%	37,8%	1,59 44,7%	15,2%	28,2%	32,4%	30,5%

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 [6]. Микроцитоза у озерной лягушки мы не наблюдали, следовательно, к гипохромии приводила относительная ненасыщенность эритроцитов гемоглобином.

Из литературы известно, что низкие концентрации пестицидов при воздействии на амфибий в течение 1–10 суток, как правило, не только не уменьшают количества эритроцитов и гемоглобина, но обычно увеличивают оба этих показателя или один из них. Увеличение кислородной емкости крови у амфибий в этих случаях, а также при постоянном обитании в водоемах, загрязненных пестицидами (и другими ксенобиотиками), можно считать адаптивным [7]. Судя по нашим данным, аналогичные адаптационные изменения имеют место и при действии нефти на организм озерной лягушки. Мы считаем, что, когда нефтяная пленка покрывает поверхность воды, в воде снижается количество кислорода, как и в присутствии пестицидов. Чтобы компенсировать гипоксию, у лягушек происходит увеличение числа эритроцитов.

Пониженные по сравнению с контролем значения числа тромбоцитов обнаружены в крови лягушек только при содержании в растворах нефти трех концентраций: 0,005, 0,01 и 0,1 мл/л; остальные концентрации нефти не влияют на количество тромбоцитов в крови.

У лягушек пребывание в растворах нефти всех исследованных концентраций вызывает существенный и возрастающий по мере увеличения концентрации токсиканта лейкоцитоз: количество лейкоцитов превышает контрольные значения в 1,9 — 8,3 раза соответственно. Лейкоцитоз был отмечен при действии на земноводных различных загрязнителей, в частности, пестицидов, тяжелых металлов [8]. Следовательно, нефть влияет на основные показатели крови озерной лягушки аналогичным образом.

Действие нефти на кровь некоторых других пойкилотермных животных (например, рыб) сходно с приведенными данными для земноводных. Так, при летальных и сублетальных концентрациях неочищенной нефти с возрастанием концентрации наблюдали увеличение числа эритроцитов, но снижение количества гемоглобина у мешкожаберного сома *Heteropneustes fossilis* [9]. Обитание рыб в условиях загрязнения воды нефтепродуктами приводит к значительному изменению функциональной активности систем эритропоэза и лейкопоэза. Появляется много аномальных клеточных структур [10].

В то же время при содержании морских черепах в аквариуме со слоем (5мм) сырой нефти на воде (часть нефти попадала в желудок) в крови увеличилось в 4 раза количество лейкоцитов, но в 2 раза уменьшилось количество эритроцитов [11].

Известно, что критерий содержания лейкоцитов приобретает полноценность лишь в том случае, если

он рассматривается не отдельно, а в совокупности с формулой клеток крови.

В лейкограмме крови озерной лягушки в растворах нефти различных концентраций происходят разнонаправленные изменения (табл.2).

Так, при повышении концентрации нефти число сегментоядерных нейтрофилов колеблется: сначала при самых малых дозах нефти (0,0005 и 0,001мл/л) достоверно увеличивается по сравнению с контролем, затем резко снижается (при 0,005мл/л), снова возрастает при 0,01 (но не до максимального значения, отмеченного при концентрации 0,001мл/л) и остается на этом уровне в растворах даже самой высокой из исследованных концентраций. Число палочкоядерных нейтрофилов не меняется по сравнению с контролем в растворах концентраций от 0,0005 до 0,005 мл/л. В растворах всех последующих концентраций нефти число палочкоядерных нейтрофилов достоверно повышается дозозависимым образом. В результате общее число нейтрофилов в крови подопытных лягушек наивысшее при концентрации 0,001 (21,4%), наименьшее при повышении концентрации в 5 раз (0,005) — 5,0%, а далее держится на уровне 13,4 — 17,3%. Следовательно, отмечен нейтрофилиз в крови озерной лягушки во всех вариантах концентраций нефти, за исключением 0,005мл/л, где наблюдается нейтропения. Вариабельность количества нейтрофилов низка в самых малых и самых высоких концентрациях нефти, но высока в контроле и при концентрациях 0,005 и 0,01мл/л. Следовательно, при повышении концентрации с 0,001 до 0,005 не только существенно уменьшается общее число нейтрофилов, но при этом и повышается разброс показателей у отдельных особей.

Эозинофилы и базофилы отмечены в крови подопытных озерных лягушек редко: эозинофилы только после пребывания в растворе 0,005мл/л (эозинофилия по сравнению с контролем), а базофилы — в трех самых низких концентрациях нефти, при этом наблюдается незначительная базофилия. При экспозиции в растворах нефти более высоких концентраций (0,01 — 0,2 мл/л) в крови земноводных эозинофилы и базофилы не отмечены.

Общее число агранулоцитов в крови озерной лягушки и в контроле, и при содержании в присутствии нефти очень велико, в основном, за счет лимфоцитов (от 76,6 до 89,2%). Доля лимфоцитов несколько колеблется при содержании в растворах нефти различной концентрации: при малых концентрациях (0,0005 — 0,005мл/л) она снижается по сравнению с контролем, а далее проявляет тенденцию к возрастанию (различия по сравнению с контролем находятся в пределах статистической ошибки).

В растворах одной из концентраций (0,005мл/л) наблюдается моноцитоз: моноциты увеличены в числе в 3,5 раза по сравнению с контролем, а в растворах всех остальных исследованных концентраций нефти число моноцитов не отличается от контрольных цифр.

Таким образом, существенные изменения лейкоцитарной формулы отмечены в крови озерной лягушки, главным образом, в следующие моменты.

1) При экспозиции лягушек в растворе нефти концентрации 0,001 мл/л (имеет место нейтрофилез, базофилия, но лимфоцитопения, отсутствуют эозинофилы).

2) При повышении концентрации до 0,005мл/л отмечено существенное изменение картины белой крови озерной лягушки (нейтропения, эозинофилия, базофилия, моноцитоз и лимфоцитопения).

По литературным данным, в водоемах с интенсивным антропогенным воздействием у лягушек комплекса *Rana esculenta* установлен лейкоцитоз, сопровождаемый нейтропенией, эозинофилией, базофилией и лимфоцитопенией [12]. При развитии у рыб токсического заболевания отмечены моноцитоз и лимфоцитопения [4].

3) При дальнейшем увеличении концентрации нефти общее количество нейтрофилов снова увеличивается по сравнению с контролем (нейтрофилез), число лимфоцитов и моноцитов восстанавливается примерно до уровня контроля, а базофилы и эозинофилы исчезают из поля зрения. По литературным данным, влияние зомана и его реакционных масс на форменные элементы крови озерной лягушки проявляется в уменьшении числа эозинофилов и базофилов на фоне роста количества лимфоцитов. Изменения свидетельствуют о повышении напряжения гуморального звена иммунитета [13].

Для бесхвостых земноводных описаны два типа изменений показателей белой крови. При первом типе изменений гематологических показателей бесхвостых амфибий в условиях загрязнения, как правило, наблю-

дается лейкоцитоз. Белая кровь амфибий реагирует по первому типу, когда концентрация пестицида или другого загрязнителя не превышает некоторого критического значения, характерного именно для данного токсиканта. Значительный нейтрофилез является выражением полноценной защитной реакции организма. В сочетании с моноцитозом он обеспечивает адаптацию амфибий к существованию в условиях загрязнения. Нейтрофилез можно рассматривать в качестве адаптационного механизма, повышающего защитную функцию крови. Относительное увеличение числа моноцитов служит показателем развития иммунных процессов в организме. Эта общая картина изменений белой крови амфибий может несколько варьировать – она может быть дополнена разноплановыми изменениями числа лимфоцитов и эозинофилов. Второй тип изменения лейкограммы крови амфибий – нейтропения с моноцитозом и эозинофилией — обнаружен при действии высоких доз пестицидов, при хроническом действии радиационных факторов [14, 15, 8, 16].

Изменения лейкограммы крови озерной лягушки под влиянием нефти похожи на описанный выше первый тип изменения белой крови земноводных (в большинстве случаев нейтрофилез), хотя не повторяют их полностью, в частности, стабильно количество лимфоцитов, но очень сильно меняется (вплоть до полного отсутствия) количество эозинофилов и базофилов. Возможно, в этом проявляется специфичность действия нефти как токсиканта на кровь озерной лягушки.

- 1.Эрих В.Н. Химия нефти и газа. М.–Л.: Изд-во «Химия», 1966. 282с.
- 2.Квеситадзе Г.И., Хатисашвили Г.А., Садунишвили Т.А., Евстигнеева З.Г. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях. М.: Наука, 2005. 199с. ISBN 5–02–033440–5.
- 3.Никаноров А.М., Страдомская А.Г., Иваник В.М. Локальный мониторинг загрязнения водных объектов в районах высоких техногенных воздействий топливно–энергетического комплекса. С.–Пб.: «Гидрометеоздат», 2002. 156с. ISBN 5–286–01465–8.
- 4.Житенева Л.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. Основы ихтиогематологии (в сравнительном аспекте). Ростов–на–Дону: «Эверест», 2004. 311с. ISBN 5–7509–0011–8.
- 5.Лакин Г.Ф. Биометрия. М., 1980. 293 с.
- 6.Козловская Л.В., Николаев А.Ю. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования. М.: «Медицина», 1985. 288с.
- 7.Жукова Т.И., Пескова Т.Ю. Реакция крови бесхвостых амфибий на пестицидное загрязнение // Экология, 1999. № 4. С. 288 — 292.
- 8.Пескова Т.Ю. Влияние антропогенных загрязнений среды на земноводных. Волгоград, 2001. 156 с. ISBN 5–93499–046–2.
- 9.Prasad M.S., Prasad P., Singh D. Some hematological effects of crude oil on freshwater catfish *Heteropheustes fossilis* (Block) // Acta hydrochim. et hydrobiol., 1987. 15, №2. P. 199 — 204. РЖ Биология 1987 10 С193.
- 10.Аленичев С.В. Картина крови при отравлении нефтепродуктами // Современные проблемы водной токсикологии. Борок, 2002. С. 28 — 29.
- 11.Lutcavage M.E., Lutz P.L., Bossart G.D. et al. Physiologic and clinicopathologic effects of crude oil on loggerhead sea turtles // Arch. Environ. Contam. and Toxicol. 1995. V.28. № 4. P.417—422. РЖ Биология 96.07–04 И5.95.
- 12.Романова Е.Б., Романова О.Ю. Особенности лейкоцитарной формулы периферической крови зеленых лягушек в условиях антропогенной нагрузки / Е.Б. Романова, // Журн. эволюц. биохимии и физиол. 2003, №4. С.384 — 387.
- 13.Конешова Е.Ю., Шляхтин Г.В., Конешов С.А. Влияние зомана и его реакционных масс на форменные элементы крови амфибий // Фундаментальные и прикладные аспекты функционирования водных экосистем: проблемы и перспективы гидробиологии и ихтиологии в 21 веке: Материалы Всероссийской научной конференции. Саратов, 2001. С. 84 — 86. РЖ Биология 04.11 — 04 И 5.90.
- 14.Исаева Е.И., Вязов С.О. Иммуный статус // Последствия Чернобыл. катастрофы: Здоровье среды/ Центр. экол. политики России. М., 1996. С.54 — 61.
- 15.Чернышова Э.В., Старостин В.И. Морфологические исследования клеток периферической крови //Последствия Чернобыл. катастрофы: Здоровье среды/ Центр. экол. политики России. М., 1996. С.62 — 64.
- 16.Романова Е.Б. Гематологические аспекты механизмов адаптации природных популяций зеленых лягушек в условиях антропогенного стресса // Актуальные проблемы герпетологии и токсикологии. Вып.8. Тольятти, 2005. С.169 — 176.

Отримано: 9 січня 2007 р.

Прийнято до друку: 16 лютого 2007 р.