

УДК 579.6/9 : 504.74.054

## ВЛИЯНИЕ БЕНЗИНА НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ

Т. Ю. Пескова, А. А. Вафис

**Влияние бензина на гематологические показатели озерной лягушки.** – Т. Ю. Пескова, А. А. Вафис. – Исследуемые сорта бензина (АИ–76 и АИ–95) при сходстве общего действия на гематологические показатели озерной лягушки обладают некоторыми специфическими особенностями, касающимися, в основном, динамики гематологических показателей при разных концентрациях токсических загрязнителей. В присутствии бензина АИ–76 на фоне общего лейкоцитоза изменения лейкограммы в целом минимальны по сравнению с контролем. В растворах бензина АИ–95 на фоне общего лейкоцитоза в крови озерной лягушки выявлена нейтропения (главным образом, за счет уменьшения палочкоядерных нейтрофилов), единичны базофилы и эозинофилы. Эти изменения лейкограммы подобны изменениям белой крови лягушек в условиях интенсивного радиационного загрязнения.

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

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

### Введение

О неблагоприятном воздействии нефтепродуктов на водные экосистемы писали еще в конце 19 – начале 20 века. Однако некоторые ученые считали, что небольшие дозы нефти и нефтепродуктов (ввиду малой их растворимости и незначительного всасывания в кишечник) не наносят особого вреда организму животного [1]. В связи с интенсивной добычей нефти в конце 20 столетия стало очевидным, что она представляет серьезную опасность не только для водных, но и для наземных экосистем. Нефтяное загрязнение, получившее в последние годы глобальное распространение, затрагивает не только акватории морей и океанов, но также участки суши, реки и пресные водоемы в районах добычи и транспортировки нефти. В результате этого и наземные, и водные животные и растения испытывают на себе влияние нефтепродуктов.

Источниками загрязнения служат сточные воды, транспорт, нефтеперерабатывающие предприятия. ПДК нефти и нефтепродуктов превышены в некоторых водоемах в 100 и более раз [2].

Отмечено, что амфибии, как правило, избегают водоемов с пленкой нефти, масел, жиров [3]. В то же время в литературе описано, что в водоемах небольшой площади (24 — 30 м<sup>2</sup>), загрязненных бензином и машинным маслом, было обнаружено значительное число головастиков озерной лягушки на разных стадиях, что свидетельствует, по мнению автора, об относительной устойчивости вида к нефтяному загрязнению [4]. Известно, что кровь и кровяная система чувствительны к действию неблагоприятных факторов окружающей среды.

Цель данного исследования – изучение в лабораторных условиях реакции крови озерной лягушки *Rana ridibunda* Pall. на добавление в воду различных концентраций бензина АИ–76 и АИ–95.

Современные товарные автомобильные бензины представляют собой смесь компонентов, получаемых в результате различных технологических процессов переработки нефти. В зависимости от марки автомобильные бензины готовят на основе бензинов прямой перегонки, каталитического крекинга и каталитического риформинга с вовлечением в качестве компонентов бензина термического крекинга, коксования (для низкооктановых бензинов), алкилбензина, изопентана, толуола (для высокооктановых бензинов). В товарные автомобильные бензины вовлекают также легкие компоненты, получаемые при нефтепереработке: бутан, бутан–бутиленовую и пентан–амиленовую фракции, газовый бензин и др. [5]. Крекинг–бензины резко отличаются от бензинов прямой гонки значительным содержанием непредельных и ароматических углеводородов и малым содержанием нафтенов. В бензинах присутствуют в основном моноциклические нафтены рядов циклопентана и циклогексана с короткими боковыми цепями [6].

Бензин АИ–76 готовят на основе бензинов каталитического риформинга и каталитического крекинга с добавлением легкого бензина прямой перегонки (15 – 30%) и некоторого количества бензина термического крекинга.

Бензин АИ–95 готовят на основе бензина каталитического риформинга жесткого режима (70 — 75%), к нему добавляют алкилбензин и изопентан

(25 – 28%), а также бутан–бутиленовую фракцию (5 – 7%) [5].

Бензол и его гомологи в виде разных смесей применяют во многих видах топлива с целью повышения октанового числа горючего, заменяя при этом очень токсичную добавку бензина — тетраэтилсвинец. Бензол и его гомологи — давно и хорошо известные канцерогенные вещества, вызывающие лейкемию [7].

При естественном растекании нефтяных пятен нефтепродукты частично испаряются. Уже в первые сутки может испариться до 80% бензина, более 20% керосина, 15–20% нефти, 0,3% мазута. Обобщая имеющиеся данные, можно привести

следующие потери для разных типов нефти и нефтепродуктов в пленке: легкие – 75%, средние – 50%, тяжелые – 5–10% [8].

Для проведения эксперимента были отловлены половозрелые озерные лягушки в водоемах окрестностей г. Краснодара (Западное Предкавказье) летом 2006г. Для проведения опыта были сформированы группы лягушек (по 15 — 20 особей в каждой). Контрольные лягушки были помещены в чистую отстоянную водопроводную воду; опыт проводили с тремя концентрациями (0,001; 0,005 и 0,01 мл/л) каждого сорта бензина.

Таблица 1. Гематологические показатели озерной лягушки (лимиты,  $X \pm m$ ,  $C_v$  %) в контроле и растворах бензина различной концентрации

Показатель	Контроль	Бензин АИ-76			Бензин АИ-95		
		0,001(n=15)	0,005 (n=15)	0,01 (n=15)	0,001 (n=15)	0,005 (n=15)	0,01 (n=20)
Эритроциты, $10^{10}$ л	35,7 — 42,2	86,2 —	83,4 —	98,0 —	85,7 —	33,4 — 66,9	36,0 — 92,0
	$38,5 \pm 0,46$	106,1	107,0	119,9	110,8	$54,5 \pm 3,32$	$70,0 \pm 3,41$
	4,5%	$93,7 \pm 1,50$	$97,0 \pm 1,98$	$108,5 \pm 1,85$	$98,6 \pm 1,90$	22,8	21,2
Гемоглобин, г/л	87 — 115	79,0 — 88,0	60,0 — 90,0	32,0 — 80,0	30,0 — 37,0	30,0 — 82,0	11,0 —
	$101,7 \pm 2,49$	$83,2 \pm 0,78$	$79,3 \pm 2,35$	$57,6 \pm 4,10$	$33,5 \pm 0,63$	$53,3 \pm 4,97$	133,0
	9,2%	3,5%	11,5%	27,0%	7,0%	34,9%	$70,4 \pm 9,34$
							54,6% (n=18)
Тромбоциты, $10^{10}$ л	7,0 — 15,8	8,4 — 13,0	7,2 — 9,5	3,5 — 8,2	12,1 — 19,0	2,3 — 19,8	2,2 — 14,2
	$10,1 \pm 0,57$	$11,5 \pm 0,34$	$8,5 \pm 0,15$	$5,4 \pm 0,45$	$16,3 \pm 0,55$	$9,0 \pm 1,75$	$5,8 \pm 0,74$
	21,3%	11,0%	6,7%	30,5% n=14	13,4%	70,2%	55,6%
						(n=14)	
Лейкоциты, $10^9$ л	5,6 — 9,8	11,4 — 16,3	12,4 — 18,5	12,5 — 26,6	14,3 — 21,9	10,4 — 23,6	8,9 — 18,2
	$6,7 \pm 0,28$	$13,3 \pm 0,32$	$16,4 \pm 0,42$	$18,0 \pm 1,28$	$18,2 \pm 0,67$	$15,8 \pm 0,95$	$14,3 \pm 0,65$
	15,6%	9,0%	9,9%	25,6% (n=14)	13,7%	21,7% (n=14)	19,8%

Таблица 2. Лейкоцитарная формула крови озерной лягушки (лимиты,  $X \pm m$ ,  $C_v$  %) в контроле и растворах бензина различной концентрации (мл/л)

Показатель	Контроль	Бензин АИ-76			Бензин АИ-95		
		0,001 (n=15)	0,005 (n=15)	0,01 (n=15)	0,001 (n=15)	0,005 (n=15)	0,01 (n=20)
Нейтрофилы сегментоядерные	3 — 16	4 — 9	6 — 11	2 — 24	2 — 12	2 — 10	3 — 8
	$7,1 \pm 0,93$	$6,5 \pm 0,40$	$8,7 \pm 0,39$	$7,6 \pm 1,55$	$4,7 \pm 0,82$	$5,6 \pm 0,56$	$5,6 \pm 0,38$
	48,8%	23,0%	50,8%	76,2%	66,1%	35,2%	28,9%
Нейтрофилы палочкоядерные	0 — 3	0 — 4	0 — 4	0 — 1	0 — 2	0	0
	$1,1 \pm 0,26$	$1,4 \pm 0,40$	$2,2 \pm 0,32$	$0,1 \pm 0,07$	$0,5 \pm 0,20$		
	87,4%	107,3%	54,5%	387,1%	139,4%		
Эозинофилы	0 — 3	0 — 3	0 — 4	0 — 1	0 — 3	0 — 1	1 — 1
	$1,7 \pm 0,26$	$1,1 \pm 0,22$	$1,9 \pm 0,26$	$0,2 \pm 0,11$	$0,9 \pm 0,24$	$0,7 \pm 0,13$	$1,0 \pm 0$
	58,4%	73,6%	47,5	207,0%	94,7%	73,2%	0%
Базофилы	0 — 2	0 — 2	0	0 — 3	0 — 1	0 — 2	0 — 2
	$0,9 \pm 0,16$	$0,7 \pm 0,24$		$0,7 \pm 0,26$	$0,3 \pm 0,12$	$0,5 \pm 0,20$	$0,5 \pm 0,16$
	63,6%	134,9%		146,4%	171,6%	184,2	137,6%
Лимфоциты	71 — 91	79 — 92	73 — 85	77 — 97	78 — 96	80 — 93	87 — 93
	$86,1 \pm 1,98$	$86,2 \pm 1,19$	$80,9 \pm 0,90$	$87,2 \pm 2,38$	$90,9 \pm 1,42$	$89,3 \pm 0,99$	$89,5 \pm 0,52$
	8,5%	5,2%	4,0%	10,2	5,8%	4,1%	2,5%
Моноциты	0 — 8	1 — 7	6 — 10	1 — 15	1 — 6	1 — 7	1 — 5
	$3,1 \pm 0,70$	$4,1 \pm 0,51$	$7,2 \pm 0,29$	$4,2 \pm 1,03$	$2,7 \pm 0,40$	$3,9 \pm 0,54$	$3,4 \pm 0,26$
	83,5%	46,7%	14,8	93,7%	56,1%	52,5%	32,2%

Продолжительность эксперимента — трое суток, затем лягушек усыпляли с помощью эфира и брали кровь из сердца (при его надрезании). Определяли следующие гематологические показатели: количество гемоглобина (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 [9].

Под действием бензина двух сортов АИ-76 и АИ-95 в крови озерной лягушки меняется количество эритроцитов, но меняется по-разному в зависимости от сорта бензина (табл. 1).

Так, при внесении в воду бензина АИ-76 в самой маленькой концентрации (0,001 мл/л) статистически достоверно и резко (в 2,4 раза) возрастает количество эритроцитов по сравнению с контролем. При увеличении концентрации бензина в 5 и 10 раз возрастание количества эритроцитов происходит в 2,5 и 2,8 раза соответственно. Иначе говоря, степень возрастания количества эритроцитов определяется дозой токсиканта.

Одновременно наблюдаются постепенное уменьшение концентрации гемоглобина в крови озерной лягушки при экспозиции в растворах бензина возрастающих концентраций, то есть имеет место гипохромия.

При внесении в воду бензина АИ-95 в самой маленькой концентрации (0,001 мл/л) увеличение числа эритроцитов у лягушек происходит еще значительнее, чем в предыдущем опыте — в 2,6 раза (эритроцитоз). Однако, увеличение концентрации бензина АИ-95 в 5 и 10 раз сопровождается заметным снижением количества эритроцитов: число их остается большим, чем в контроле, но только в 1,4 — 1,8 раза. При самой низкой концентрации бензина АИ-95 на фоне очень высокого числа эритроцитов количество гемоглобина в крови лягушек резко (в 3 раза) падает по сравнению с контролем, а в более высоких концентрациях этот показатель (количество гемоглобина) постепенно возрастает. В результате гипохромия несколько сглаживается. Есть мнение, что у рыб уровень гемоглобина не является характерным показателем токсикоза [2].

Наиболее частая причина эритроцитоза — гипоксия. Судя по увеличенному количеству эритроцитов в крови озерной лягушки в присутствии двух сортов бензина, можно полагать, что повышение показателей красной крови (или хотя бы одного из них — числа эритроцитов) у лягушек в этих случаях можно считать компенсаторным. По литературным данным, под влиянием малых доз пиретроидных пестицидов у подопытных озерных лягушек количество гемоглобина и эритроцитов достоверно увеличивается. Степень этого увеличения пропорциональна продолжительности пребывания лягушек в растворах пестицидов [10, 11].

Нам известны также результаты исследования гематологических показателей озерной лягушки на Северном Кавказе — из рисового чека, загрязненного пестицидами, и чистого пруда ботанического сада Кубанского госуниверситета. У лягушек, отловленных летом (и половозрелых, и сеголеток), все гематологические показатели достоверно выше (на 21—29%) в загрязненном водоеме. За счет увеличения показателей красной крови у лягушек в условиях пестицидного загрязнения обеспечивается дыхательная функция крови. Кроме того, в условиях загрязнения достоверно в 2,1—4,3 раза в крови озерной лягушки увеличено число новообразованных эритроцитов — ретикулоцитов [12].

Достоверное уменьшение числа тромбоцитов в крови лягушек мы наблюдали только при экспозиции в самых больших из исследованных нами концентраций обоих сортов бензина (0,001 мл/л), а в самой маленькой концентрации бензина АИ-95 происходило достоверное увеличение числа тромбоцитов.

Тромбоцитам принадлежит важная роль в поддержании нормальной структуры и функции стенки микрососудов и в первичной реакции крови на травму сосудов. При тромбоцитопении возникает ломкость сосудов и диapedез (просачивание через неповрежденные стенки) эритроцитов через капилляры, что вызывает кровоточивость. Снижение продукции тромбоцитов вызывается действием ионизирующей радиации, химических агентов, обладающих универсальным депрессивным действием на костный мозг [13]. Вероятно, к числу таких токсических агентов принадлежит и бензин.

Количество лейкоцитов в крови лягушек в опытах с бензином АИ-76 повышающихся концентраций возрастает в 2 — 2,7 раза по сравнению с контролем, а в опытах с бензином АИ-95 в самой маленькой концентрации (0,001 мл/л) число лейкоцитов превышает контрольные цифры в 2,7 раза, а затем в более высоких концентрациях бензина лейкоцитоз уменьшается (превышение контроля только в 2,1).

Лейкоцитоз отмечен в большинстве случаев при действии токсикантов на лягушек как в лабораторных условиях, так и в природных водоемах (Пескова, 2001). Уровень количества лейкоцитов у лягушек из рисового чека достоверно выше, чем у амфибий из пруда Ботанического сада Кубанского университета —  $12,1 \pm 2,0$  и  $22,5 \pm 2,1$  тыс/мм<sup>3</sup>, что свидетельствует о возрастании защитной функции крови [12].

Таким образом, исследуемые сорта бензина при сходстве общего действия на гематологические показатели озерной лягушки обладают некоторыми специфическими особенностями, касающимися, в основном, динамики гематологических показателей при разных концентрациях токсических загрязнителей.

Лейкоцитоз, как и лейкопения, редко характеризуются пропорциональным увеличением (уменьшением) числа лейкоцитов всех видов, в большинстве случаев имеется увеличение (уменьшение) какого-либо одного типа клеток [13].

В растворах бензина АИ-76 общее число нейтрофилов практически одинаково у контрольных и подопытных животных.

В растворах же бензина АИ-95 доля сегментоядерных нейтрофилов не меняется по сравнению с контролем, но доля палочкоядерных нейтрофилов в наименее концентрированном растворе бензина (0,001мл/л) резко уменьшается, а при повышении концентрации в 5 и 10 раз палочкоядерные нейтрофилы вообще не были обнаружены. Таким образом, в растворах бензина АИ-95 наблюдается нейтропения.

По мнению [14], существует обратная связь между уровнем среднего стресса (то есть загрязнения водоема, в котором обитают земноводные) и количеством нейтрофилов; возрастание антропогенной нагрузки приводит к развитию нейтропении в периферической крови животных.

У лягушек рода *Rana* из окрестностей крупного химического предприятия в Новгородской области и из зоны радиоактивного загрязнения в Брянской области обнаружено резкое подавление нейтрофильного гранулоцитопоза. Нейтропения обусловлена избирательным повреждением ряда дифференцировки нейтрофилов, что неизбежно приводит к «выпадению» всего ряда, хотя появление незрелых форм свидетельствует о компенсаторной стимуляции нейтрофильного гранулоцитопоза. Конкретные клеточные механизмы нейтропении, однако, остаются неясными; следствие нейтропении — ослабление защитных функций организма, что косвенно подтверждается находждением в периферической крови бактерий [15, 16].

В присутствии бензина статистически достоверно уменьшается доля эозинофилов у подопытных амфибий (для бензина АИ-76 только в самой высокой концентрации, а для бензина АИ-95 во всех исследованных концентрациях).

Количество базофилов чаще всего не меняется в крови лягушек в опыте при исследованных концентрациях бензина обоих сортов, за исключением того, что при концентрации бензина АИ-76 0,005мл/л их не было обнаружено, а при концентрации бензина АИ-95 0,001мл/л этих клеток было меньше, чем в контроле.

Количество лимфоцитов (главных клеточных элементов иммунной системы организма) практи-

чески остается постоянным в крови всех исследованных лягушек, лимфоциты составляют 80,9 — 90,9% всех лейкоцитов, то есть кровь имеет явно лимфоидный характер.

При экспозиции в растворах бензина АИ-76 в крови озерной лягушки наблюдается моноцитоз (отмечено либо тенденция к увеличению числа моноцитов, либо незначительное, но статистически достоверное увеличение). В растворах бензина АИ-95 количество моноцитов не меняется по сравнению с контролем.

На рыбах описаны факты снижения содержания гемоглобина (обычно параллельно с уменьшением количества эритроцитов) под действием нефтепродуктов. Так, действие на три вида черноморских рыб растворенных нефтепродуктов в концентрациях, вызывающих острое, подострое и хроническое отравление, выражается в патологических нарушениях форменных элементов крови, уменьшении количества эритроцитов, лейкоцитов, моноцитопении, эозинофилии, лимфоцитозе и нейтрофильном лейкоцитозе [17].

По литературным данным, влияние химического загрязнения на озерную лягушку *Rana ridibunda* проявляется в лейкоцитозе — моноцитоз и умеренная эозинофилия при снижении числа нейтрофилов [18].

Таким образом, в растворах бензина АИ-76 на фоне общего лейкоцитоза изменения лейкограммы крови озерной лягушки в целом минимальные по сравнению с контролем: доли нейтрофилов и лимфоцитов практически одинаковы, незначительные и разнонаправленные изменения (при разных уровнях концентрации) отмечены среди базофилов, эозинофилов и моноцитов.

В растворах бензина АИ-95 опять-таки на фоне общего лейкоцитоза в крови озерной лягушки выявлена нейтропения (главным образом, за счет уменьшения палочкоядерных нейтрофилов), единичны базофилы и эозинофилы, доли моноцитов и лимфоцитов одинаковы при разных концентрациях токсиканта. Подобная картина белой крови была описана у лягушек гибридного комплекса *Rana esculenta* в районе интенсивного радиационного загрязнения: повышено количество лейкоцитов, в частности лимфоцитов, но понижено число нейтрофилов (нейтропения), моноциты без изменений [19].

Указанные изменения лейкоцитарной формулы крови озерной лягушки в присутствии бензина АИ-95 ближе ко второму типу изменений белой крови земноводных, описанному ранее [11].

1. Пястолова О. А. Экспериментальное изучение влияния нефти на рост *Bombina orientalis* Boul. // Животные в условиях антропогенного ландшафта. – Свердловск, 1990. – С.30 – 36.
2. Житенева Л. Д., Макаров Э. В., Рудницкая О. А. Основы ихтиогематологии (в сравнительном аспекте). – Ростов-на-Дону: Эверест, 2004. – 311 с.

3. Болотников А. М., Мажерина Л. Л. Влияние физико-химического состава воды на жизнедеятельность амфибий // Вопросы герпетологии. – Л., 1985. –С. 34.
4. Жукова Т. И. Пространственная структура и численность некоторых бесхвостых земноводных в нижнем течении реки Кубани // Актуальные вопросы изучения экосистемы бассейна Кубани. – Краснодар, 1988. – 1. – С. 123 – 126.

5. Товарные нефтепродукты. Свойства и применение: Справочник. – М.: Химия, 1978. – 470 с.
6. Эрих В. Н. Химия нефти и газа. – М.-Л.: Химия, 1966. – 282 с.
7. Квеситадзе Г. И., Хатисашвили Г. А., Садунишвили Т. А., Евстигнеева З. Г. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях. – М.: Наука, 2005. – 199 с.
8. Никаноров А. М., Страдомская А. Г., Иваник В. М. Локальный мониторинг загрязнения водных объектов в районах высоких техногенных воздействий топливно-энергетического комплекса. – С.-Пб.: Гидрометеиздат, 2002. – 156 с.
9. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.
10. Жукова Т. И., Пескова Т. Ю. Реакция крови бесхвостых амфибий на пестицидное загрязнение // Экология, 1999, № 4. – С. 288 – 292.
11. Пескова Т. Ю. Влияние антропогенных загрязнений среды на земноводных. – Волгоград, 2001. – 156 с.
12. Peskova T. Y., Zhukova T. I. Hematological indexes of *Rana ridibunda* in clean and contaminated ponds // Herpetologia Petropolitana. 2005, – S-Pb., – P.296 – 297.
13. Козловская Л. В., Николаев А. Ю. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования. М.: Медицина, 1985. – 288 с.
14. 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.
15. Чернышова Э. В., Старостин В. И. Периферическая кровь лягушек рода *Rana* как тест-система для оценки загрязнения окружающей среды // Известия РАН. Серия биологическая, 1994, № 4. – С. 656 – 659.
16. 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.
17. Котов А.М. Сезонная динамика гематологических показателей у некоторых черноморских рыб и их изменение при экспериментальном отравлении нефтепродуктами // Гидробиологический журн., 1976. – 12, №4. – С. 63 – 68.
18. Исаева Е.И., Вязов С. О. Общая оценка иммунного статуса // Экол. состояние бассейна р. Чапаевка в условиях антропогенного воздействия: Биол. индикация. – Тольятти, 1997. – С. 292 – 296.
19. Исаева Е. И., Вязов С. О. Иммунный статус // Последствия Чернобыл. катастрофы: Здоровье среды / Центр. экол. политики России. – М., 1996. – С. 54 – 61.

Отримано: 9 січня 2007 р.

Прийнято до друку: 16 лютого 2007 р.