

УДК 591.111.1+597.554.3

## **ОСОБЕННОСТИ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ ОБЫКНОВЕННОЙ УКЛЕИ (*ALBURNUS ALBURNUS* LINNAEUS, 1758) ИЗ ВОДОЕМОВ РАЗНОГО ТИПА (НА ПРИМЕРЕ САРАТОВСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА И МАЛЫХ РЕК РЕСПУБЛИКИ УДМУРТИЯ)**

© 2012 Е.А. Калинин, А.К. Минеев

Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти

Поступила 20.12.2011

В 2011 году проведены исследования лейкоцитарной формулы у уклей Саратовского водохранилища и двух малых рек республики Удмуртия. Данные водоемы характеризуются разным гидрологическим режимом и степенью антропогенной нагрузки. Впервые произведен сравнительный анализ встречаемости особей с различным уровнем лейкоцитов в кровяном русле, установлены значительные различия по данному показателю в водоемах с различным уровнем загрязнения. Произведён расчет индекса сдвига лейкоцитов (ИСЛ); установлено, что его величина у большинства особей уклей Саратовского водохранилища не соответствует условной норме, что является признаком повышенного антропогенного стресса.

*Ключевые слова:* водоемы с различным гидрологическим режимом, антропогенная нагрузка, уровень лейкоцитов, лейкоцитарная формула, индекс сдвига лейкоцитов.

За последние десятилетия в ихтиофауне Саратовского водохранилища наблюдаются серьезные изменения, связанные, прежде всего, с ухудшением качества среды обитания и условий нереста всех видов рыб данного региона.

Многочисленными исследованиями показано, что кровь и сердечнососудистая система рыб, подвергающиеся выраженным функциональным расстройствам и патологическим изменениям при воздействии различных ядов, являются весьма ценными индикаторами состояния особи [22, 2, 9].

Известно, что рыбы очень чувствительны к содержанию в воде химических агентов и отвечают на их присутствие изменениями как в белой, так и в красной крови, даже если их концентрация не превышает ПДК [3, 6, 5], тем более, что действие различных токсикантов может суммироваться и усиливаться (аддитивный и синергический эффект). Ранее было установлено [12], что гематологические параметры карповых рыб в условиях Саратовского водохранилища подвержены негативным изменениям под воздействием различных неблагоприятных факторов (в том числе влиянию антропогенных загрязнений). Таким образом, некоторые показатели крови рыб, в том числе уклей – одного из массовых видов рыб в большинстве водоемов, являются надёжным индикатором степени токсичности или нетоксичности водной среды.

В то же время, малые реки Удмуртии подвержены антропогенной нагрузке значительно в меньшей степени, чем экосистема Саратовского водохранилища.

Целью настоящей работы явилось изучение лейкоцитарной формулы обыкновенной уклей из водоемов с различающимся уровнем загрязнения,

какими являются Саратовское водохранилище и реки Нылга и Ува (респ. Удмуртия), и использование ее отклонений в качестве одного из критериев экологического состояния данных водных объектов.

### **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

Для гематологических исследований особей уклей вылавливали в районе Мордовинской поймы Саратовского водохранилища, а также в двух малых реках республики Удмуртия – р. Нылга (правый приток р. Валы) и р. Ува (левый приток р. Валы). Сбор материала производился в весенне-летний период 2011 г. Возраст особей определяли по отоцитам [19]. Всего изучено 34 особи уклей двухлетнего возраста из трех водоемов.

Кровь отбирали из хвостовой артерии. Мазки крови изготавливали на месте вылова, затем фиксировали их 96° этанолом. После просушки препараты окрашивали по методу Романовского–Гимза. При подсчёте форм эритроцитов и лейкоцитарной формулы использовали оптический бинокулярный микроскоп с иммерсионным объективом. В качестве иммерсии применяли касторовое масло. На мазках крови подсчитывали подряд все встречающиеся в поле зрения форменные элементы крови и на специальных бланках отмечали их в зависимости от принадлежности к тем или иным группам. Согласно общепринятой методике [7] подсчет различных форм клеток начинали с середины мазка, перемещая поля зрения методом зигзага к краю предметного стекла, так как форменные элементы крови из-за их различного удельного веса размещаются на разных участках препарата. В середине мазка, например, среди эритроцитов преимущественно находятся лимфоциты, по краям – нейтрофилы, эозинофилы и т.д. [7]. Для оценки неблагоприятных воздействий на организм животных мы вычисляли соотношение эритроцитов и лейкоцитов, а также применяли Индекс Сдвига Лейкоцитов

---

*Калинин Евгений Александрович*, асп., Минеев Александр Константинович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., mineev7676@mail.ru

(ИСЛ), который является в наших исследованиях одним из основных показателей состояния белой крови [5]. Статистическую обработку полученных данных осуществляли общепринятыми методами [10] с применением программы Excel 2007.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Водоёмы, из которых осуществлялся вылов уклеи для гематологических исследований, характеризуются различным гидрологическим режимом и определенной степенью антропогенной нагрузки.

Р. Нылга - правый приток Валы. Длина реки 80 км, средний уклон 1,35 м/км. В верховьях реки русло очень узкое - от 1,2 до 2,5 м, глубина до 0,4 м. В среднем течении (от водпоста до с. Нылга) река имеет ширину от 2,8 до 10,3 м, глубину от 0,4 до 1,6 м. Нижнее течение, от с. Нылга до впадения в р. Вала, характеризуется шириной русла от 8 до 20 м и глубиной от 1,4 до 2,5 м. На этом участке река имеет пологую, болотистую, равностороннюю пойму шириной до 2 км, местами заросшую смешанным лесом. Селений вдоль реки немного, все они расположены на возвышенных местах, в 1 - 2 км от воды. По берегам леса немного.

Р. Ува - правый приток Валы. Длина реки 112 км. Средний уклон 1,4 м/км. Верховья реки очень извилисты, глубина варьирует от 0,2 до 0,6 м, ширина - от 1,3 до 6,6 м. Берега сплошь покрыты смешанным и хвойным лесом, местами подболочены. Река имеет ширину от 6 до 12 м, глубину - от 0,4 до 1,5 м. Берега, как и в верховьях, покрыты смешанными и хвойными лесами. Селений на реке немного. Наиболее крупный поселок Ува - районный центр Удмуртии.

Обе малые реки не испытывают значительной антропогенной нагрузки. Основными загрязняющими веществами являются бытовые канализационные стоки в районе п. Ува, а также поллютанты сельскохозяйственного происхождения. В частности зафиксированы минимальные превышения ПДК для сульфатов - 1,02 ПДК, и значительные превышения для БПК<sub>5</sub> - 5,70 ПДК [17].

Уклея обыкновенная является одним из массовых представителей ихтиофауны в обеих реках.

В отличие от р. Нылги и Увы, которые подвержены минимальной антропогенной нагрузке, воды Саратовского водохранилища в местах вылова уклеи являются загрязненными в большей степени, отличается также и состав присутствующих в воде поллютантов. В весенне-летний период в район данного участка водохранилища поступает вода из расположенного выше устья р. Чапаевка, которая из года в год характеризуется как "3"А" класса качества (загрязнённая вода) и "3"Б" класса качества (очень загрязнённая). Основными загрязняющими веществами в этом районе являются фенолы (2 - 5 ПДК), соединения меди (1 - 5 ПДК), азот нитритный (1,2 - 1,4 ПДК) и сульфатные ионы (65 - 99 мг/л) [4].

В данных условиях соотношение клеток красной (эритроцитов) и белой крови (лейкоцитов), а также основные показатели лейкоцитарной формулы имеют существенные различия, так как особи уклеи в Саратовском водохранилище и в малых реках Нылга и Ува испытывают воздействие комплекса неблагоприятных факторов в разной степени.

Соотношение клеток эритроидного и лимфоидного ряда крови является одним из важных показателей состояния особи. Для взрослых рыб нормальным считается содержание в крови белых клеток соответствующее 25 - 35%. Установлено, что у рыб под воздействием различных загрязнений снижается функция иммунитета, по сравнению с таковой у рыб из незагрязненных участков обитания [16]. Эксперименты на плотве (*Rutilus rutilus*) показали, что аккумуляция ртути приводит к уменьшению количества лимфоцитов и возрастанию количества моноцитов и нейтрофилов [21]. Аккумуляция кадмия, также вызывает уменьшение количества лимфоцитов, повышение в кровяном русле клеток, обладающих фагоцитарной активностью, и разрушение миелоцитов [20].

В водоемах с различным уровнем загрязнения различной была и встречаемость особей с нормальным соотношением эритроцитов и лейкоцитов (рис. 1).



Рис. 1. Встречаемость особей уклеи из разных водоемов с различным содержанием лейкоцитов в кровяном русле

В водоемах с минимальным уровнем антропогенной нагрузки, каковыми являются реки Нылга и Ува, большинство особей уклеи -  $65,0 \pm 10,9\%$  имеют нормальное соотношение лейкоцитов и эритроцитов в кровяном русле, в то время как среди уклеи из Саратовского водохранилища встречаемость таких рыб была заметно меньше  $57,1 \pm 13,7\%$ .

Количество же особей уклеи с пониженным содержанием лейкоцитов в кровяном русле и, соответственно, пониженными функциями иммунитета в Саратовском водохранилище соответствовало  $42,9 \pm 13,7\%$ , что явилось следствием повышенного уровня загрязнения данного водоема. Таким образом, наибольшее количество рыб с нормальным соотношением эритроцитов и лейкоцитов отмечено

нами в водоемах с минимальным уровнем антропогенной нагрузки (р. Нылга и р. Ува), а наименьшее – в Саратовском водохранилище, уровень загрязнения которого высок.

В 2011 г. особь уклей с повышенным содержанием лейкоцитов в кровяном русле (35,00 – 50,00%) была обнаружена в р. Ува в районе поселка Вавожь, что может являться признаком как повышенного иммунного статуса данной особи, так и свидетельством такого заболевания как лейкоцитоз. Однако, единичный факт встречаемости уклей с данным соотношением кровяных клеток не является свидетельством высокого уровня загрязнения воды в данном районе.

Рыб с патологически высоким (> 50,00%) содержанием лейкоцитов в крови не было встречено ни в Саратовском водохранилище, ни в реках Удмуртии.

Другим надежным критерием оценки состояния отдельной особи являются также отклонения в лейкоцитарной формуле [9, 1]. В качестве показателя, в некоторой степени подтверждающего условное неблагополучие исследованных особей плотвы, мы использовали Индекс Сдвига Лейкоцитов (ИСЛ), который отражает отклонения в гематологических параметрах [5]. Повышение относительного содержания незрелых нейтрофильных клеток в периферической крови называется сдвигом влево. Снижение доли палочкоядерных нейтрофилов и присутствие гиперсегментированных ядер определяется как сдвиг вправо [5]. Иными словами, ИСЛ является отношением гранулоцитов и агранулоцитов. У разных видов рыб допустимое значение ИСЛ может отличаться; в частности, у большинства рыб семейства *Cyprinidae* значение ИСЛ равно 0,30 [5].

Сдвиг ИСЛ в ту или иную сторону от условной нормы является признаком заболевания или усиленного негативного пресса со стороны окружающей среды, а высокая частота встречаемости таких особей является признаком неблагополучия популяции в целом, особенно если велика также доля рыб с ненормальным уровнем нормобластов и лейкоцитов в кровяном русле.

В нашем случае количество особей уклей с повышенным значением ИСЛ являлось доминирующим только в Саратовском водохранилище, их доля составила  $71,4 \pm 12,5\%$  (рис. 2), что свидетельствует о повышенной загрязненности данного водоема, в то время как в относительно чистых реках Удмуртии встречаемость таких рыб составила всего  $25,0 \pm 9,9\%$ , причем величина превышения ИСЛ в данных случаях незначительна, данный показатель был превышен всего на 0,01 – 0,02.

Встречаемость рыб с нормальным уровнем ИСЛ в 2011 г. в Саратовском водохранилище составила  $28,6 \pm 12,5\%$ , что является еще одним доказательством высокого уровня загрязнения данного водоема.

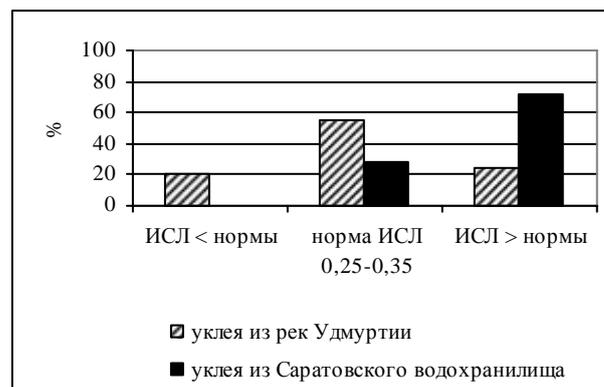


Рис. 2. Встречаемость особей уклей из разных водоемов с различным уровнем ИСЛ

В то же время в реках Нылга и Ува, характеризующихся минимальным уровнем антропогенной нагрузки, доля особей с показателем ИСЛ в пределах нормы составила  $55,0 \pm 11,4\%$ .

Количество уклей с некоторым несущественным понижением показателя ИСЛ (на 0,01 – 0,02) в водоемах Удмуртии также невелико –  $20,0 \pm 9,1\%$ . В Саратовском водохранилище особей уклей с пониженным показателем ИСЛ в 2011 г. не обнаружено.

Повышение показателя ИСЛ является симптомом таких заболеваний как нейтрофилез и эозинофилия. Нейтрофилез вызывается повышением доли нейтрофильных гранулоцитов (окрашивающихся нейтрально, в оттенки серого и светло-голубого цветов) среди лейкоцитов. Эозинофилия является следствием повышения количества эозинофильных гранулоцитов, данные клетки окрашиваются стандартными методами в оттенки красного, ярко розового и малинового цветов. В норме данные виды гранулоцитов должны содержаться в белой крови, но их количество должно быть в два-три раза ниже, чем количество лимфоцитов, палочкоядерных лейкоцитов и моноцитов, которые являются агранулоцитами.

Из таблицы 1 видно, что треть обследованных особей уклей Саратовского водохранилища (из числа рыб со значением ИСЛ не соответствующим норме) имели нормальное соотношение гранулоцитов и агранулоцитов, такое же количество рыб имеют признаки эозинофилии и 40,0% особей больны нейтрофилёзом, что является несомненным признаком неблагоприятных внешних воздействий как на отдельных рыб, так и на популяцию в целом.

По мнению некоторых авторов [3, 8, 11, 15, 23] у рыб в большинстве случаев отмечается лейкоцитоз в присутствии каких-либо загрязнителей. При этом наблюдается нейтрофилез, а остальные показатели весьма разнородны: могут быть как лимфоцитоз, так и лимфоцитопения – пониженное содержание лимфоцитов, как моноцитоз, так и моноцитопения, эозинофилия или число эозинофилов остаётся неизменным.

**Таблица 1.** Встречаемости особей уклей (среди рыб с повышенным показателем ИСЛ) с признаками эозинофилии и нейтрофилеза

Район исследования	Встречаемость особей с, %		
	нормальное соотношение гранулоцитов	эозинофилия	нейтрофилез
Саратовское водохранилище	30,0±15,3	30,0±15,3	40,0±16,3
р. Нылга и р. Ува	11,1±11,1	-	88,9±11,1

Нейтрофилы – активные ферментообразователи, им свойственна и фагоцитарная функция. Нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом влево (в сторону увеличения доли палочкоядерных нейтрофилов) наблюдается, как правило, при оформленных воспалительных процессах и различных интоксикациях [15, 23]. В этом случае повышенное количество рыб с признаками нейтрофилеза (табл. 1) в реках Удмуртии и, отчасти, в Саратовском водохранилище можно трактовать как следствие проявления у большинства рыб адаптационных реакций в ответ на неблагоприятные факторы среды. Таким образом, нейтрофилез можно рассматривать в качестве адаптационного механизма, повышающего защитную функцию крови в условиях воздействия комплекса неблагоприятных факторов [18]. Данный процесс, переходя в длительную или хроническую форму, впоследствии провоцирует различные нарушения во внутренних органах рыб (некрозы, дистрофии и т.д.) [13, 14].

Интересен тот факт, что в условиях минимального антропогенного воздействия у уклей из малых рек Удмуртии (р. Нылга и р. Ува) у большинства особей данного вида, из числа рыб с пониженным или повышенным значением ИСЛ, зафиксированы признаки нейтрофилеза, и лишь одна особь имела нормальное соотношение основных видов гранулоцитов. В то же время в данных водоемах не обнаружено рыб с признаками эозинофилии. У уклей из малых рек Удмуртии признаки нейтрофилеза выражены слабо, так как у рыб с нарушенным показателем ИСЛ из рек Нылга и Ува отклонения данного показателя в сторону уменьшения или увеличения незначительны и не превышают 0,01 – 0,02. В то же время подобные отклонения ИСЛ у особей уклей из Саратовского водохранилища достигают 0,13 – 0,15, что свидетельствует о более высоком уровне антропогенной нагрузки в данном водоеме.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным результатам, у уклей в условиях изученных водоёмов (Саратовское водохранилище и малые реки Удмуртии) испытывающих нагрузку комплекса отрицательных факторов среды в разной степени, различается, соответственно, и встречаемость особей с нарушенным со-

отношением эритроцитов и лейкоцитов и отклонениями ИСЛ от нормы. Количество рыб с нарушениями лейкоцитарной формулы значительно выше в водоеме с повышенным уровнем антропогенной нагрузки, каким является Саратовское водохранилище. В данном водоеме встречаемость уклей с нарушением содержания лейкоцитов в крови, а также с показателем ИСЛ не соответствующем норме, составила в 2011 г. 42,9% и 71,4% особей соответственно.

В малых реках – Нылга и Ува, подверженных незначительному антропогенному прессу, напротив, среди уклей преобладают особи с нормальным соотношением клеток красной и белой крови – 65,0% рыб, и с показателем ИСЛ в пределах нормы – 55,0% рыб. Даже у особей с нарушениями ИСЛ баланс гранулоцитов отклонялся от нормы несущественно.

Таким образом, различные нарушения лейкоцитарной формулы уклей, а также других видов карповых рыб, являются надежным критерием степени воздействия отрицательных факторов среды (в частности – различных видов загрязнений) на отдельных особей и на популяцию в целом, следовательно, могут успешно применяться в качестве индикатора экологического состояния различных водоемов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балобанова Л.В., Микряков В.Р. Сравнительная характеристика действия нафталина и фенола на показатели белой крови карася *Carassius carassius* (L.) // Биология внутренних вод. 2002. №2. С. 100-102.
2. Вернидуб М.Ф. Влияние сточных вод газосланцевого производства на физиологические процессы и на развитие личинок молоди лосося // В кн.: Материалы совещания по вопросам рыбоводства. М.: Наука. 1959. С.103 – 112.
3. Гольдин В.М. Некоторые гематологические показатели рыб Камского водохранилища в связи с загрязнением промышленными стоками // Учёные записки Пермского университета. 1975. Вып. 338. С. 123 – 131.
4. Государственный доклад о состоянии окружающей среды и природных ресурсов Самарской области в 2008 г. Астахов Ю.С., Губернаторов А.Е., Довбыш В.Н. и др. (ред.). Самара: Министерство природопользования, лесного хозяйства и окружающей среды Самарской обл., Вып. 19. 2009. 344 с.
5. Житенёва Л.Д., Рудницкая О.А., Калюжная Т.И. Эколого-гематологические характеристики некоторых видов рыб. Справочник. Ростов н/Д: АзНИИРХ, 1997. 149 с.
6. Иванова Н.Т. Метод морфологического анализа крови в ихтиопатологических исследованиях // Изв. ГосНИОРХ. 1977. № 5. С. 114 – 117.
7. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. Москва: "Лёгкая и пищевая промышленность", 1983. С. 64 – 71. 184 с.
8. Котов А.М. Сезонная динамика гематологических показателей у некоторых черноморских рыб и их изменение при экспериментальном отравлении нефтепродуктами // Гидробиологический журнал. 1976. Вып. 12. № 4. С. 63 – 68.
9. Крылов О.Н. Методические указания по гематологическому обследованию рыб в водной токсикологии. Л.: ГосНИОРХ. 1974. 39 с.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: "Высшая школа". 1990. 293

- с.
11. *Метелев В.В.* Токсичность и некоторые вопросы механизма действия пропанида на организм рыб // Труды ВНИИ ветеринарной санитарии. 1974. Вып. 50. С. 72 – 75.
  12. *Минеев А.К.* Морфологический анализ и патологические изменения структуры клеток крови у рыб Саратовского водохранилища // Вопр. ихтиол. 2007. № 1. С. 93 – 100.
  13. *Минеев А.К.* Некоторые гистологические нарушения гонад у головешки-ротана (*Perccottus glenii* Dybowski, 1877) и бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus* Pallas, 1814) Саратовского водохранилища // Известия Самарского Научного Центра РАН. 2009. Т.11, № 1. С. 185 – 191.
  14. *Минеев А.К.* Некоторые гистологические патологии печени и сердца у головешки-ротана (*Perccottus glenii* Dybowski, 1877) и бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus* Pallas, 1814) Саратовского водохранилища // Известия Самарского Научного Центра РАН. 2011. Т.13, № 1. С. 203 – 206.
  15. *Моисеенко Т.И.* Морфологические перестройки организма рыб под влиянием загрязнения (в свете теории С.С. Шварца) // Экология. 2000. № 6. С. 463 – 472.
  16. *Моисеенко Т.И.* Водная экотоксикология. М.: Наука, 2009. 400 с.
  17. О состоянии окружающей природной среды Удмуртской Республики в 2009 г.: Государственный доклад. Ижевск, 2010. 228 с.
  18. *Пескова Т.Ю.* Адаптационные изменения земноводных в антропогенно загрязнённой среде: Дис. ... д-ра биол. наук. Тольятти. 2004. 284 с.
  19. *Правдин И.Ф.* Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных). М.: “Пищевая промышленность”, 1966. 376 с.
  20. *Степанова В.М., Чуйко Г.М., Павлова В.Ф.* Хроническое действие кадмия на клетки ретикулярной ткани селезёнки и периферической крови мозамбикской телпии (*Oreochromis mossambicus* Peters) // Биология внутр. вод. 1998. № 3. С. 136 – 140.
  21. *Талкина М.Г., Комов В.Т., Чеботарёва Ю.В., Гремячих В.А.* Комплексная оценка длительного воздействия ртути на молодь плотвы в экспериментальных условиях // Вопр. ихтиол. 2004. Т. 44. № 6. С. 847 – 852.
  22. *Терсков Г.В., Гутельзон И.И.* Метод химических (кислотных) эритрограмм // Биофизика. Т. 11. №. 2. М. 1957. С. 259 – 266.
  23. *Brozio F., Litzbarski H.* Untersuchungen über physiologische und histologische Veränderungen am Karpfen nach Toxapheneinwirkung // Teil I. Z. Binnenfisch. DDR. 1977. Vol. 24. № 4. P.215 – 226.

**LEUKOCYTE FORMULA FEATURES OF BLEAK (*ALBURNUS ALBURNUS* LINNAEUS, 1758) FROM DIFFERENT TYPE RESERVOIRS (FOR AN EXAMPLE OF SARATOV RESERVOIR AND SMALL RIVERS OF REPUBLIC OF UDMURTIYA)**

© 2012 E.A. Kalinin, A.K. Mineev

Institute of Ecology of Volga Basin RAS, Togliatti

In 2011, the leukocyte counts in bleak of Saratov reservoir and two small rivers in the republic of Udmurtiya were investigated. These reservoirs are characterized by different hydrological regime and degree of anthropogenic impact. For the first time comparative analysis of occurrence of individuals with different leukocytes level in the blood stream is made, significant differences for this indicator in reservoirs with different levels of pollution are set. The calculation of the index of leukocytes shift (ISL) is made. It is found that its value in the most of the bleak individuals of Saratov reservoir does not meet the conventional standard which is a sign of increased anthropogenic stress.

**Key words:** reservoirs with different hydrological regimes, anthropogenic load, white blood cell count, leukocyte formula, the index of the shift of leukocytes.