



## ВЛИЯНИЕ НА НАРАСТВАЩИ КОНЦЕНТРАЦИИ МЕД (Cu) ВЪРХУ ХИСТОЛОГИЧНИЯ СТРОЕЖ НА БЪБРЕКА И МОРФОЛОГИЯТА НА ЕРИТРОЦИТИТЕ НА КАРАКУДА (*Carassius gibelio*)

*Атанас Д. Арnaudов, Илиана Г. Велчева,  
Елена Ст. Томова, Стела Г. Стоянова*

*ПУ „Св. Паусий Хилендарски“, Биологически факултет,  
ул. „Цар Асен“ 24, 4000 Пловдив,  
E-mail: arnaudov@uni-plovdiv.bg*

**Abstract.** The influence of increasing concentration of copper on morphological quantitative characteristic of erythrocytes and histological texture of kidney of *Carassius gibelio* was studied.

It was found that the copper causes significant decreasing of the percentage of normal and dividing erythrocytes in peripheral blood, whereas the percentage of malformed cells increased.

Under the histological investigation of the kidney it was found that the copper causes increasing of hemopoetic tissue and basophil colorizations of parenchyma's cells. In the tubules various types of degeneration were found. The burden of the degeneration depends on the copper concentration in the water.

**Key words:** *Carassius gibelio*, copper, erythrocytes, histopathology, kidney

### ВЪВЕДЕНИЕ

Тежките метали се отнасят към групата на широко разпространените, високотоксични и дълго съхраняващи се токсични за живите организми вещества. За разлика от токсикантите с органична природа, които се разграждат в някаква степен, трябва да се разглеждат като постоянен компонент на природните води.

Медта е метал, който съпоствен с другите тежки метали като кадмий, олово, живак, цинк е по-слабо проучван в сладководните екосистеми. Според Мур § РАМАМУРТИ (1987) има не много публикации за разпределението на медта в трофичните вериги, за съдържанието и разпределението му в организма на сладководните риби.

Промени в хистологията на различни органи под действието на мед се описват в работите на МУНВИЧ *et al.* (1995); КАРАН *et al.* (1998), ХАНДИ (2003);

ASHISH & BANALATA (2008); CARLA *et al.* (2002); OLIVA *et al.* (2008) посочват, че наред с изменение на хрилната тъкан се наблюдават и такива в еритроцитите и хематокритните стойности на кръвта на риби, подложени на хронично въздействие на мед. Според ХАМИДОВ *и др.* (1978) бъбрекът е основният хемопое-тичен орган при шарановите риби и в него протича диференциацията на всички кръвни клетки.

HOUSTON *et al.* (1993) посочват, че промените в морфологията на еритроцитите на рибите е по-чувствителен индикатор за настъпил стрес, предизвикан от тежки метали, в сравнение с рутинните хематологични изследвания. В наше предишно проучване (VELCHEVA *et al.*, 2006) установихме разнообразни патологични промени в морфологията на еритроцитите на каракуда (*Carassius gibelio*) под действието на нарастващи концентрации мед.

Целта на настоящото проучване е да се проследи влиянието на нарастващи концентрации мед (Cu) върху морфологични количествени характеристики на еритроцитите и хистологичния строеж на бъбрека на каракуда (*Carassius gibelio*).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Като опитни животни бяха използвани по 10 индивида от вида *Carassius gibelio*. Рибите произхождат от рибно стопанство за стоково отглеждане. Всички екземпляри използвани в експеримента бяха от еднаква размерно-възрастова група, дължина 9.5÷12 cm, тегло 90÷120 g. По време на теста те не бяха хранени.

Опитните индивиди бяха без патологични изменения по кожата, очите, люспите и перките и с нормална подвижност.

Експериментите се провеждаха в аквариуми с обем 25 литра. Поддържани бяха следните параметри на водата температура 20°C, pH от 7 до 7.5, твърдост 9 Dh.

За предизвикване на токсично въздействие на мед бяха използвани поредица от нарастващи концентрации на меден сулфат ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). съответно – 0.1, 0.5, 1.0 и 2.0  $\text{mg.l}^{-1}$ . Като контрола беше използвана отстояла чешмяна вода. Експозицията на всяка концентрация и на контролата беше 96 часа.

След края на експозицията, рибите бяха изваждани от водата и веднага от тях беше получавана кръв за изледване. Пробите получавахме чрез сърдечна пункция и събирахме в моновети с антикоагулант (EDTA). От тях приготвихме кръвни намазки, които оцветявахме с набор за експресно оцветяване ДКК-Колор-200 (VIVA MT-Пловдив). От всяка приготвена намазка наблюдавахме по 1000 еритроцита и определяхме процентното съотношение между еритроцитите с нормална морфология, деформираните и дялящите се клетки.

От всеки екземпляр бе отделян бъбрека. Фиксирането на пробите се извършваше в 10 % формалин за 12 часа. Пробите за хистологичен анализ бяха обработени по методики, описани от ЕВГЕНИЕВА (1983). Получените парафинови срези бяха с дебелина 0.5-0.7  $\mu\text{m}$  и бяха оцветени с хематоксилин и еозин (ХЕ).

Резултатите бяха обработени вариационно-статистически по методики, описани от СЕПЕТЛИЕВ (1986). За достоверни разлики между сравняваните резултати приемахме при степен на достоверност  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### Морфологични промени в еритроцитите

Под действието на медта, още при най-ниската концентрация ( $0.1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) беше отчетено достоверно намаляване процента на нормалните еритроцити в периферната кръв (табл. 1). Успоредно с това, беше отчетено достоверно увеличаване процента на деформираните клетки. Тази тенденция се засилваше с увеличаване на медната конентрация, като при най-високата ( $2.0 \text{ mg.l}^{-1}$ ) процентът на деформираните клетки беше над 3 пъти по-голям, в сравнение с контролната група.

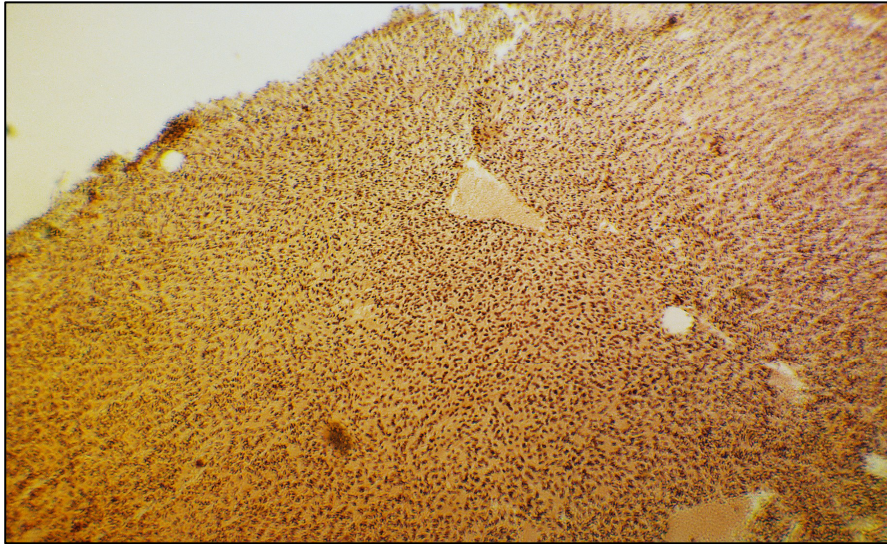
**Таблица 1.** Морфологична характеристика на еритроцити на каракуда (*Carassius gibelio*) под действие на нарастващи концентрации мед.

Опитни групи	нормални	деформирани	делящи се
Контрола	84,27 $\pm$ 5,1	14,87 $\pm$ 5,4	0,86 $\pm$ 0,5
0.1 mg/l-1	75,17 $\pm$ 1,86 *	24,18 $\pm$ 1,65 *	0,66 $\pm$ 0,43*
0.5 mg/l-1	63,41 $\pm$ 1,08 *	36,08 $\pm$ 1,38 *	0,39 $\pm$ 0,40*
1.0 mg/l-1	64,75 $\pm$ 2,05 *	35,26 $\pm$ 4,51 *	0,57 $\pm$ 0,3 *
1.5 mg/l-1	63,78 $\pm$ 4,17 *	35,40 $\pm$ 4,13 *	0,81 $\pm$ 0,45
2.0 mg/l-1	56,53 $\pm$ 4,33 *	43,24 $\pm$ 4,43 *	0,22 $\pm$ 0,33*

Процентът на дялящите се еритроцити също намаляваше при контролните проби, с изключение на тези от конц.  $1.5 \text{ mg.l}^{-1}$ , при които не се установи достоверна разлика с контролната група. Ние считаме, че промените в морфологията на еритроцитите доказват настъпване на стрес, предизвикан от медта. Нашето мнение напълно съвпада с това на HOUSTON *et al.* (1993). Те също установяват намаляване на съотношението нормални клетки (деформирани и дялящи се) деформирани клетки под действието на кадмий. Това говори, че деформирането на еритроцитите може да се посочи като общ ефект в отговор на действието на тежки метали. Подобни изследвания върху гръбначни животни извършват и HOWKEY *et al.* (1991).

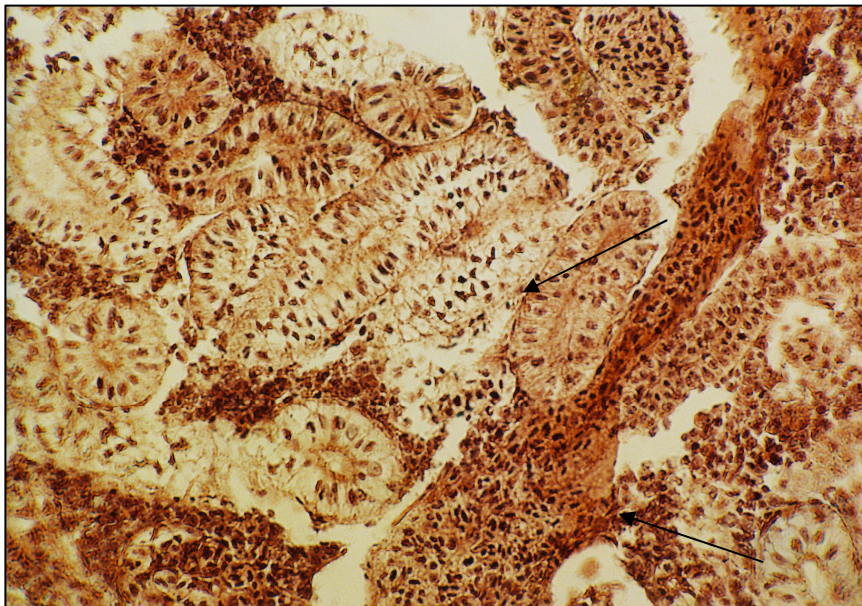
### Хистопатологични промени в бъбрека

Под действието на медта, в клетките на ретикулярната тъкан и на бъбречните каналчета се установи базофилно оцветяване на ядрата им. С повишаване на медната концентрация, това оцветяване ставаше по-силно. Клетките на рибите от контролната група имаха еозинофилно оцветени ядра. Хемопоеичната тъкан беше разраснала (Фиг. 1). В нея се наблюдаваха обширни участъци с различни по големина еритроцитни струпвания. Кръвоносните съдове в хемопоеичната тъкан бяха разширени и изпълнени също с голямо количество еритроцити.



**Фиг. 1.** Разрастване на хемопоеичната тъкан. Разширен кръвоносен съд с новообразувани еритроцити. ХЕ x 400.

Пигментации, в това число и хемосидеринова не се откриваха, за разлика от контролната група, в която в отделни клетъчни струпвания в ретикулната тъкан бяха пигментирани. Промените в бъбречните каналчета се изразяваха основно в дистрофични изменения и гранулации (Фиг. 2).



**Фиг. 2.** Дистрофия на бъбречните каналчета и хиперемия на кръвоносен съд в хемопоеичната тъкан под действие на 0.5 mg/l-1 мед. ХЕ x 400.

Още в най-ниската концентрация ( $0.1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) бяха установени дистрофични изменения в клетките на бъбречните каналчета, макар и не при всички индивиди. Промените при концентрации  $0.1$  и  $0.5 \text{ mg.l}^{-1}$  бяха от типа “вакуолна дегенерация”. TRUMP *et al.* (1975) също посочват подобна патологична находка в бъбречните каналчета на риби под действието на живак.

При концентрации от  $1.0 \text{ mg.l}^{-1}$  и по-високи дегенерацията беше от хиалинно-капчест тип (Фиг. 3).

Наблюдаваха се множество добре видими еозинофилни гранули в протоплазмата. Еозинофилните гранули заемат по-голямата част от клетката, като ядрото е изтласкано в базалната и област (Фиг. 3). Дегенериралите клетки бяха хипертрофирани, което предизвикваше силно стесняване на лумена на каналчетата.

При всички опитни групи риби, в апикалния край на клетките на бъбречните каналчета беше наблюдавана голяма, добре оформена базофилна гранула. Ядрото и органелите на клетката бяха изтласкани към базалния ѝ край. В контролната група такава грануляция не беше наблюдавана (Фиг. 4).

Установените от нас хистологични промени в тубулите са сходни с посочените от KRISHNANI *et al.* (2003), който е наблюдавал тубулна дегенерация при риби (*Lates calcarifer*) под действие на мед в концентрации  $0.013$ - $0.018 \text{ mg.l}^{-1}$  при 96-часова експозиция.

Получените от нас резултати говорят, че въздействието на мед, дори в ниски концентрации, отключва защитни физиологични механизми в организма на рибите. Те са свързани с активиране на хемопоезата с оглед компенсирание на настъпваща асфикция. Подобни изводи правят и KARAN *et al.* (1998) който говорят за стес-реакция в организма на риби, провокирана от хронично действие на мед. ANN MURVICH *et al.* (1995), подобно на нашите резултати, посочват, че именно активирането на хемопоезата е отговора на организма на риби спрямо медно интоксикирание.

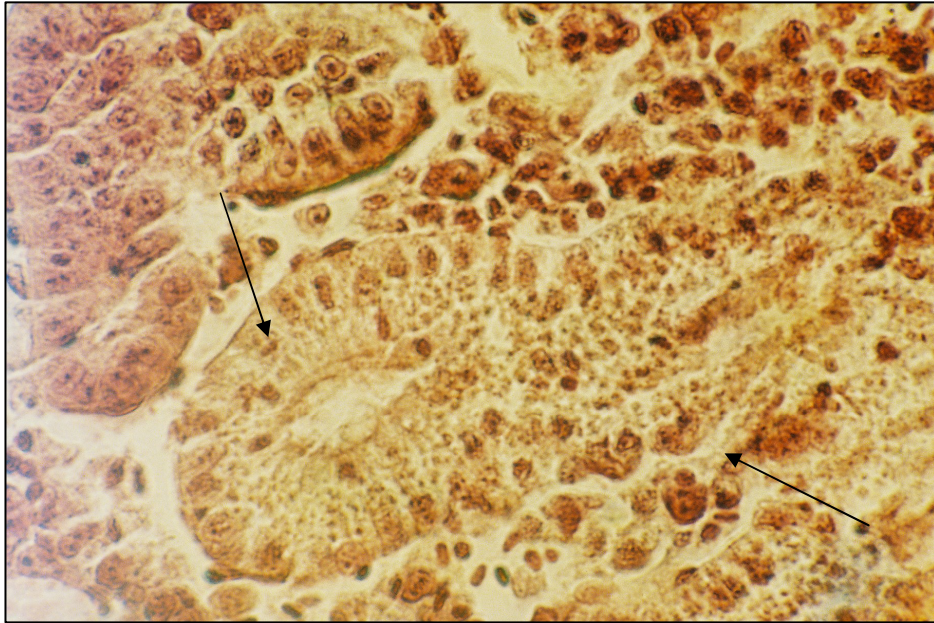
## ИЗВОДИ

1. Медта предизвиква достоверно понижаване процента на нормалните и дялящите се еритроцити, докато процента на деформираните клетки се увеличава.

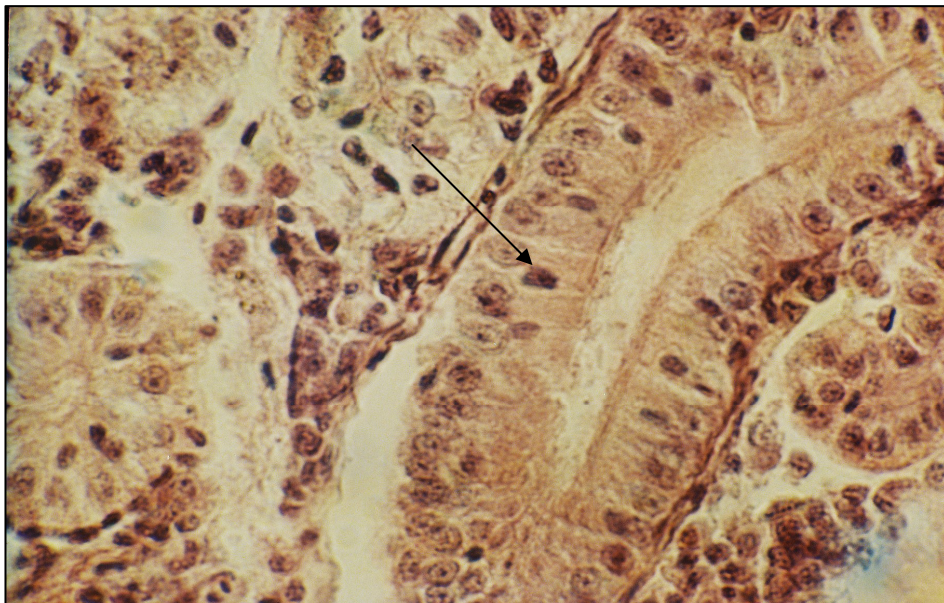
2. Под действието на медта, настъпва разрастване на хемопоетичната тъкан в бъбрека и базофилно оцветяване на клетките на паренхима.

3. В бъбречните каналчета настъпват дистрофични промени, чиито тежест зависи от концентрацията на мед във водата.





**Фиг. 3.** Хиалинно-капчеста дегенерация на тубулите под действие на 1.5 mg/l-1 мед. Еозинофилни гранули в клетките и изтласкване на ядрото към базалната част. ХЕ x 600.



**Фигура 4.** Базофилни гранули в клетките на бъбречните каналчета под действие на 0.1 mg/l-1 мед. ХЕ x 600.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящото проучване е финансирано от НПД – ПУ „Паисий Хилендарски“, Договор 07Б11 и 07Б59.

## ЛИТЕРАТУРА

МУР ДЖ., С. РАМАМУРТИ. 1977. Тяжелые металлы в природных вод. Москва, Мир, 285с.

СЕПЕТЛИЕВ Д. 1986. Медицинска статистика. София, Медицина и Физкультура, 207с.

ХАМИДОВ Д. Х., А. Т. АКИЛОВ, А. А. ТУРДИЕВ. 1978. Кров и кроветворение у позвоночных животных. ФАН, Ташкент, 165 с.

ASHISH K., MISHRA AND BANALATA MOHANTY. 2008. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26,(2): 136-14.

CARLA C. C., CERQUEIRA AND MARISA N. FERNANDES. 2002. Gill Tissue Recovery after Copper Exposure and Blood Parameter Responses in the Tropical Fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52,(2): 83-91.

HANDY R. 2003. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 135(1): 25-38.

HAUSTON A., S. BLAHUT, A. MURAD, P. AMIKRITHARAJ. 1993. Changes in erytron organization during prolonged cadmium exposure: an indicator of heavy metal stress? *Canadian journal of Fisheries and Aquatic science*, 50(1): 217-224.

HAWKEY C. M., P. M. BENET, S. C. GASCOYNE, M. G. HART AND J. K. KIRKWOOD. 1991. Erythrocyte size, number and hemoglobin content in vertebrates. *British Journal of Haematology*, 77: 392-397.

KARAN V., S. VITOROVI, V. TUTUNDI AND V. POLEKSI. 1998. Functional Enzymes Activity and Gill Histology of Carp after Copper Sulfate Exposure and Recovery. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40,(1-2): 49-55.

KRISHNANINI K. K., I. S. AZAD, M. KAILASAM, A. R. THIRUNAVKKARASU, B. P. GUPTA, K. O. JOSEPH, M. MURALIDHAR, M. ABRAHAM. 2003. Acute toxicity of some heavy metals to *Lates calcarifer* fry mirth note on its histopathological manifestation. *Journal of Environmental science and health part A- Toxic /Hazardous substances & Environmental engineering*, 38(4): 645-65.

MUHVICH A. G., T. J. RAYMOND, A. S. KANE, R. S. ANDERSON AND R. REIMSCHUESSEL. 1995. Effects of chronic copper exposure on the macrophage chemiluminescent response and gill histology in goldfish (*Carassius auratus*L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 5,(4): 251-264.

OLIVA M., M. C. GARRIDO, D. S. MÁRQUEZ AND M. L. GONZÁLEZ DE CANALES. 2008. Sublethal and lethal toxicity in juvenile Senegal sole (*Solea senegalensis*) exposed to copper: A preliminary toxicity range-finding test. *Experimental and Toxicologic Pathology*. Article in Press.

TRUMP B. F., R. T. JONES AND S. SAPHONG. 1975. Cellular effects of mercury in fish kidney tubules. In: *Pathology of fish*. (ed. Rebelin, W. E. and G. Migaki) Wisconsin University Press, Medison, pp 585-613.

VELCHEVA I, A. ARNAUDOV, G. GEHEVA AND I. MOLLOV. 2006. A study on some physiological parameters of three hydrobiotic species under the influence of copper. Proceedings of II international symposium of ecologists of the republic of Montenegro, 155-161.

**INFLUENCE OF INCREASING CONCENTRATIONS OF COPPER (Cu) ON THE HISTOLOGICAL COMPOSITION OF THE KIDNEY AND THE MORPHOLOGY OF THE ERYTHROCYTES OF THE PRUSSIAN CARP (*Carassius gibelio*)**

*Atanas D. Arnaudov, Iliana G. Velcheva,  
Elena S. Tomova, Stela G. Stoyanova*

*University of Plovdiv, Faculty of Biology,  
24 Tzar Assen Str., 4000 Plovdiv, E-mail: arnaudov@uni-plovdiv.bg*

**(Summary)**

The influence of increasing concentration of copper on morphological quantitative characteristic of erythrocytes and histological texture of kidney of *Carassius gibelio* was studied.

It was found that the copper causes significant decreasing of the percentage of normal and dividing erythrocytes in peripheral blood, whereas the percentage of malformed cells increased.

Under the histological investigation of the kidney it was found that the copper causes increasing of hemopoetic tissue and basophil colorizations of parenchyma's cells. In the tubules various types of degeneration were found. The burden of the degeneration depends on the copper concentration in the water.