

Морфологични промени в еритроцити на каракуда Carassius gibelio (Bloch, 1782) при дълговременна експозиция на мед (Cu)

Атанас Б. Илиев

ПУ "Паисий Хилендарски", Биологически факултет
ул. "Цар Асен" №24, 4000 Пловдив, E-mail: arnaudov@uni-plovdiv.bg

Abstract. Morphological changes in erythrocytes of Prussian carp (*Carassius gibelio*) during long-term exposition of copper and recovery period were studied. We examined the percent of normal erythrocytes, deformed erythrocytes and dividing cells in the blood smears. It was found that influence of long-term exposition in concentration of 0.05 and 0.1 mg/l rose up rate of deformed erythrocytes and these changes disappeared during recovery period. We found different morphological changes in the erythrocytes like tearing to peaces of cell membrane and changes in size and form of cells and their nucleus.

Key words: *Carassius gibelio*, copper, erythrocytes, long-term exposition, morphological changes

Въведение

Хематологичните изследвания при риби, поради голямата си чувствителност, имат голямо значение при проследяване на физиологичните и патологичните промени индуцирани от природни или антропогенни фактори, като например замърсяване на водите с тежки метали (HOUSTON *et al.*, 1993). Има многобройни съобщения за краткосрочно влияние на мед върху хематологичните параметри на риби (DICK & DIXON, 2000; MAZON, 2002), но има малко съобщения за хроничните медни ефекти и физиологичните механизми на въздействие при риби

използвайки хематологичните параметри като чувствителен показател.

CAVAS & GARANKO (2005) използват честотата на микроядрата при еритроцити за скрининг тестовете на сладководни басейни. JIRAUNGKOORSKUL & SAHAPHONG (2007) използват изменение във формата на ядрата в своите скрининг тестове. VELCHEVA *et al.* (2006) препоръчват използването на промени в морфологията на еритроцити за целите на екологичния биомониторинг.

В проучвания на VELCHEVA *et al.* (2006), АРНАУДОВ *и др.* (2008), ARNAUDOVA *et al.* (2008) и ARNAUDOV *et al.* (2008) са установени разнообразни

патологични промени в морфологията на хемопоетичните органи и на еритроцитите на каракуда (*Carassius gibelio*) под действието на нарастващи концентрации мед.

SVOBODOVA *et al.* (1994) установява, че директните ефекти на мед върху кръвните параметри са обичайно асоциирани с увеличени разпадания на еритроцити или загуба на хемопоетичната системата. Увеличените стойности на хематокрит, хемоглобин и брой еритроцити могат да се обяснят като компенсаторен механизъм за доставяне на необходимото количество кислород поради нарушения в кръвните параметри.

В редица опити е следено възстановяването при показатели като количество хемоглобин, хематокрит и брой еритроцити като след 21-дневен период на възстановяване се достигат стойности близки до контролните нива без достигане на изходните стойности (GARCIA & SALAZAR, 2001; MAZON, 2002; CERQUEIRA & FERNANDES, 2002).

До този момент липсват съобщения за проследяването на морфологичните промени в еритроцитите в процеса на възстановяване след дълговременна експозиция на тежки метали, в т.ч и мед (Cu) върху организма на риби.

Целта на настоящото проучване е да се проследи влиянието на ниски концентрации (0.05 mg/l и 0.1 mg/l) върху морфологични количествени характеристики на каракуда (*Carassius gibelio* (Bloch, 1782) при дълговременна експозиция на мед, от гледна точка на установяване на възстановителните процеси в посочените показатели след 21-дневен възстановителен период в чиста вода.

Материал и методи

Опитна постановка. В аквариум с обем 25 литра поставихме дехлорирана

чешмяна вода. За целта на експеримента работихме с концентрации на меден сулфат ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$). Началната концентрация бе 0.05 mg/l, която е под ПДК по БДС за мед във води. Опитните концентрации бяха 0.05 и 0.1 mg/l меден сулфат. За контрола използвахме дехлорирана чешмяна вода. В хода на експеримента бе поддържана температура на водата за всички опити и контролата от 20°C, рН от 7 до 7.5 и твърдост на водата 9.5 dH.

Като опитни риби използвахме по 10 индивида от вида *Carassius gibelio*. Рибите бяха вземани от чист водоем за промишлено отглеждане на риби, като показателите на водата съответстваха на експерименталните. Опитните индивиди бяха без външни патологични промени и от една размерно-възрастова група (дължина 9.5-12cm, тегло 90-120g). По време на теста рибите не бяха хранени. Продължителността на теста за всяка концентрация бе 21 дни. По време на експозицията бяха следени и поведенческите реакции на опитните животни. След 21 дневен престой в съответната концентрация на меден сулфат част от рибите бяха обработвани за снемане на морфологични, хематологични и хистологични показатели. Останалите индивиди бяха върнати в чиста вода за проследяване на възстановяване на органите от въздействието на меден сулфат за 21 дни, след което рибите бяха обработвани за снемане на морфологични и хематологични показатели.

Хематологични показатели. Кръвните проби бяха взети, чрез сърдечна пункция. Пробите събирахме с антикоагулант (EDTA). На кръвните натривки микроскопски определяхме: процент нормални еритроцити; процент деформирани еритроцити (патологични промени в ядрото,

протоплазмата и мембраните); процент дялящи се еритроцити.

От всички натривки изброявахме по 1000 еритроцита и установените нормални, деформирани и дялящи се клетки изразявахме в проценти. Кръвните натривки за морфологичните изследвания бяха оцветени с помощта на набор за експресно оцветяване на кръвните натривки ДКК Колор-200.

Статистическа обработка. Резултатите бяха обработени вариационно-статистически по методики, описани от СЕПЕТЛИЕВ (1986). Използвахме t-тест, като за достоверни разлики между сравняваните резултати приемахме при степен на достоверност $p \leq 0.05$.

Резултати

При концентрация 0.05 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ на 21-вия ден (след края на експозицията) се установиха достоверно намаляване на процента нормални клетки, както и достоверно увеличение на процента деформирани и дялящи се клетки (Табл. 1).

На 42-рия ден (след 21 дневен възстановителен период) се установиха недостоверни разлики в процента нормални клетки (недостоверно намаляване) и процента дялящи се клетки (недостоверно увеличение), следователно концентрация 0.05 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ води до увеличение на процента деформирани клетки, така че дори и след 21-дневен възстановителен период техният процент е висок.

При действие с 0.1 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ на 21-вия ден се установиха достоверно намаляване на процента нормални клетки и достоверно увеличаване на процента деформирани и дялящи се клетки.

На 42-рия ден процента нормални клетки е по-нисък от процента при контролната група, но с ниска степен на

достоверност. Процента деформирани клетки е много близък до процента деформирани клетки в контролната група и за това разликите между тях са недостоверни. Процента дялящи се клетки и на 42-рия ден си остава доста по-висок от този на контролата. Следователно, под действие на 0.1 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ се предизвиква увеличение на дялящите се клетки, които не се възстановяват след съответния период.

При сравняване на възстановителните способности на еритропоезата при *Carassius gibelio* се получиха следните резултати отразени в таблици 3 и 4. Под действие както на 0.05 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, така и на 0.1 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ се установиха достоверни разлики в процента нормални деформирани и дялящи се клетки (т.е. процента на нормалните клетки се увеличава, а тези на деформирани и дялящите се намалява, но без стойностите на трите показателя да достигат стойностите на контролите).

При сравняване действието на отделните концентрации се получиха следните данни отразени в Таблицы 5 и 6. На 21-вия ден установихме достоверни различия в процента на нормалните клетки, като концентрация 0.1 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ предизвиква по-силно намаляване. Процента на увеличение на дялящите се клетки е по-голям при 0.1 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, спрямо същия показател при 0.05 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$. Интересен е факта, че процента на деформирани клетки е много близък и при двете концентрации, което показва, че концентрацията на метала не оказва влияние върху този показател.

На 42-рия ден се установиха недостоверни различия между трите показателя т.е. концентрацията на метала не оказва влияние върху възстановителните процеси.

Таблица 1. Морфологична характеристика на еритроцити на каракуда (*Carassius gibelio*) под действие на концентрация 0.05 mg/l CuSO₄·5H₂O

Еритроцити (%)	Контрола	21-ви ден	42-ри ден
Нормални	95.27±1.28	86.21±1.45 *	93.33±1.77 **
Деформирани	2.09±0.73	8.54±1.00 *	3.74±0.73 *
Делящи се	2.64±0.87	5.19±0.69 *	2.93±1.23 ***

* (p<0.001); ** (p<0.02); *** (p<0.1)

Таблица 2. Морфологична характеристика на еритроцити на каракуда (*Carassius gibelio*) под действие на концентрация 0.1 mg/l CuSO₄·5H₂O

Еритроцити (%)	Контрола	21-ви ден	42-ри ден
Нормални	95.27±1.28	82.51±1.41 *	93.03±1.34 **
Деформирани	2.09±0.73	8.29±0.79 *	2.61±0.98 ***
Делящи се	2.64±0.87	9.20±0.56 *	4.37±0.70 *

* (p<0.001); ** (p<0.01); *** (p<0.1)

Таблица 3. Възстановителна способност на еритропоезата при 0.05 mg/l

Еритроцити (%)	Контрола	21-ви ден	42-ри ден
Нормални	95.27±1.28	86.21±1.45	93.33±1.77 *
Деформирани	2.09±0.73	8.54±1.00	3.74±0.73 *
Делящи се	2.64±0.87	5.19±0.69	2.93±1.23 *

* (p<0.001); ** (p<0.01); *** (p<0.1)

Таблица 4. Възстановителна способност на еритропоезата при 0.1 mg/l

Еритроцити (%)	Контрола	21-ви ден	42-ри ден
Нормални	95.27±1.28	82.51±1.41	93.03±1.34 *
Деформирани	2.09±0.73	8.29±0.79	2.61±0.98 *
Делящи се	2.64±0.87	9.20±0.56	4.37±0.70 *

* (p<0.001); ** (p<0.01); *** (p<0.1)

Таблица 5. Сравняване действието на 0.05 mg/l и 0.1 mg/l след 21-ви ден

Еритроцити (%)	Контрола	0.05 mg/l	0.1 mg/l
Нормални	95.27±1.28	86.21±1.45	82.51±1.41 *
Деформирани	2.09±0.73	8.54±1.00	8.29±0.79 ***
Делящи се	2.64±0.87	5.19±0.69	9.20±0.56 *

* (p<0.001); ** (p<0.01); *** (p<0.1)

Таблица 6. Сравняване действието на 0.05 mg/l и 0.1 mg/l след 42-ри ден

Еритроцити (%)	Контрола	0,05mg/l	0,1 mg/l
Нормални	95.27±1.28	93.33±1.77	93.03±1.34 ***
Деформирани	2.09±0.73	3.74±0.73	2.61±0.98 **
Делящи се	2.64±0.87	2.93±1.23	4.37±0.70 **

* (p<0.001); ** (p<0.01); *** (p<0.1)

Дискусия

От направеното проучване можем да обобщим, че възстановяването на хемопоезата при каракуда след 21-дневна експозиция на ниски дози мед е недостатъчно. Въпреки значителното повишаване на процента еритроцити с нормална морфология и намаляване процента на деформирани клетки, техните стойности не достигат тези на рибите от контролната група. До подобни изводи са достигнали и други автори проучвали възстановяването на други хематологични и морфологични показатели на риби (GARCIA & SALAZAR, 2001; CERQUEIRA & FERNANDES, 2002). Вижда се, че възстановяването на хематологичните параметри след интоксикацията с ниски дози тежки метали на сладководни риби, като цяло не е пълно и опитните екземпляри не достигат стойностите преди интоксикацията.

Изследването на морфологията на еритроцитите е добър модел за проучване на възстановителните процеси след медна интоксикация на риби, тъй като според HOUSTON *et al* (1993) този метод е по-чувствителен индикатор за настъпил стрес, предизвикан от тежки метали, в сравнение със стандартните хематологични изследвания. Според нас, той ще може успешно да се комбинира с изследването честотата на поява на микронуклеи, тъй като според CAVAS & GARANKO (2005) процента на микронуклеи и двуядрените клетки значително се увеличават в кръвта на риби, обитаващи сладководни басейни с медно замърсяване в ниски концентрации.

Изводи

1. Действието на концентрации 0.05 mg/l и 0.1 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ води до достоверно намаляване на процента

нормални и достоверно увеличаване процента на деформирани и дялящи се клетки при 21 дневна експозиция.

2. Под действието на 0.05 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в продължение на 21 дни, процеса на възстановяване на процента деформирани клетки след 42-рия ден е недостатъчен.

3. Под действието на 0.1 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ процентното възстановяване на деформирани клетки е недостатъчно.

4. Процентът нормални клетки под действие на периода на възстановяване се увеличава спрямо 21-вия ден и при двете концентрации, но не достига контролните стойности.

Литература

- АРНАУДОВ А, И. ВЕЛЧЕВА, Е. ТОМОВА, С. СТОЯНОВА. 2008. Влияние на нарастващите концентрации мед (Cu) върху хистологичния строеж на бъбрека и морфологията на еритроцитите на каракудата (*Carassius gibelio*). – В: Велчева И., А. Цеков (Ред.). *Юбилейна научна конференция по екология*. 01 ноември 2008, Пловдив, стр. 336-343.
- СЕПЕТЛИЕВ Д. 1986. *Медицинска статистика*. София, Медицина и Физкултура, 207 стр.
- ARNAUDOVA D., A. ARNAUDOV, E. TOMOVA. 2008. Selected hematological indices of freshwater fish from Studen kladenets reservoir. - *Bulg. J. Agric. Sci.*, 14(2): 244-250.
- ARNAUDOV A., I. VELCHEVA, E. TOMOVA. 2008. Influence of copper and zinc on the erythrocyte-metric parameters of *Carassius gibelio* (Pisces, Cyprinidae). I. Influence of copper on the erythrocyte-metric parameters of *Carassius gibelio* (Pisces, Cyprinidae). - *Bulg. J. Agric. Sci.*, 14: 557-563
- CERQUEIRA C.; M. FERNANDES. 2002. Gill Tissue Recovery after Copper

- Exposure and Blood Parameter Responses in the Tropical Fish *Prochilodus scrofa*. - *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52(2): 83-99.
- CAVAS T., N. GARANKO, V. ARKHIPCHUK. 2005. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. - *Food and Chemical Toxicology*, 43(4): 569-574.
- DICK P., D. DIXON. 2000. Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, following acute and chronic exposure to copper. - *J. Fish Biol.*, 26: 475-484.
- GARSIA, N. & R. SALAZAR. 2003. Hematological response of freshwater fish *Colossoma macropomum* exposed to sublethal copper concentration. - In: *International Congress on the Biology of Fish*, Manus, Brazil, pp. 231-238.
- HAUSTON A., S. BLAHUT, A. MURAD, P. AMIKRITHARAJ. 1993. Changes in erythron organization during prolonged cadmium exposure: an indicator of heavy metal stress?. - *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 50(1): 217-224
- JIRAUNGKOORSKUL W., S. SAHAPHONG. 2007. Efficacy of Ascorbic Acid Reducing Waterborne Copper Toxicity in Butterfish *Poronotus triacanthus*. - *Journal of Biological Sciences*, 7(4): 620-625.
- MAZON A., E. MONTEIRO, G. PINHEIRO, M. FERNANDES. 2002. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. - *Braz. J. Biol.*, 63: 621-631.
- SVOBODOVÁ Z., B. VYKUSOVÁ, J. MÁCHOVÁ. 1994. The effects of pollutants on selected hematological and biochemical parameters in fish. In: R. Müller & R. Lloyd (eds.), *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Fishing News Books, London.
- VELCHEVA I., A. ARNAUDOV, G. GECHIEVA, I. MOLLOV. 2006. A study on some physiological parameters of three hydrobiontic species under the influence of copper. - In: Pešić V., S. Hadžiablahović (Eds.) *Proceedings of the Symposium, II International Symposium of Ecologists of Montenegro*. Kotor, 20-25.09.2006, pp. 155-160.

Morphological Changes in the Erythrocytes of Prussian Carp, *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) During Long-Term Exposition of Copper

Atanas B. Iliev

University of Plovdiv, Faculty of Biology
24 Tsar Asen Str., 4000 Plovdiv, BULGARIA
E-mail: arnaudov@uni-plovdiv.bg

Summary. Morphological changes in erythrocytes of Prussian carp (*Carassius gibelio*) during long-term exposition of copper and recovery period was studied. We examined rate (per cent) of normal erythrocytes, deformed erythrocytes and dividing cells in the blood smears. It was found that influence of long-term exposition in concentration of 0.05 and 0.1 mg/l rose up rate of deformed erythrocytes and these changes disappeared during recovery period. We found different morphological changes in erythrocytes like tearing to peaces of cell membrane and changes in size and form of cells and their nucleus.

Received: 19.05.2009

Accepted: 07.07.2009