

## АНИЗОЦИТОЗ ЭРИТРОЦИТОВ АФРИКАНСКОГО СОМА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ДИХРОМАТА КАЛИЯ

*Климук Анастасия Алексеевна, младший научный сотрудник «Центра Аквакультуры», ФГБОУ ВО МГУТУ имени К. Г. Разумовского (ПКУ)*

*Кочетков Никита Ильич, младший научный сотрудник «Центра Аквакультуры», ФГБОУ ВО МГУТУ имени К. Г. Разумовского (ПКУ)*

*Калита Татьяна Львовна, и.о. заведующего кафедры Биологии и биоинформатики ФБиРХ ФГБОУ ВО МГУТУ имени К. Г. Разумовского (ПКУ)*

*Головачева Наталья Алексеевна, доцент кафедры Биологии и биоинформатики ФБиРХ ФГБОУ ВО МГУТУ имени К. Г. Разумовского (ПКУ)*

*Кузьменко Евгений Олегович, аспирант 1 года обучения ФБиРХ ФГБОУ ВО МГУТУ имени К. Г. Разумовского (ПКУ)*

**Аннотация.** В данной работе изучали токсическое воздействие дихромата калия на эритропоэз молоди *Clarias gariepinus*. При экспозиции рыб в растворе с концентрацией токсиканта 4 и 6 мг/л, в крови увеличилась доля эритроцитов с диаметром ядра 8-9 мкм, что свидетельствовало о нарушении эритропоэза, выражающееся в индукции макроцитов.

**Ключевые слова:** дихромат калия, эритроциты, анизоцитоз, Африканский клариевый сом

**Введение.** Гематологический анализ крови является комплексным методом оценки степени воздействия поллютантов различной природы на жизнедеятельность рыб [1]. Так, тяжелые металлы, аккумулируясь в тканях рыб, могут воздействовать на морфологию элементов крови, индуцируя такие цитогенотоксические нарушения, как появление микроядер, амитоз, пойкилоцитоз, ивангинации ядерного материала и анизоцитоз [2]. Эти аномалии эритроцитов крови рыб используются для оценки токсичности многих химических веществ, например, тяжелых металлов, пестицидов, инсектицидов и др. [3]. На наш взгляд, изучение цитоморфологической патологии эритропоэза в форме анизоцитоза наиболее интересно для экспресс-оценки цитотоксичности различных веществ на организм рыб, так как проявляется в видимых изменениях диаметра ядер эритроцитов (микроцитов, макроцитов и мегалоцитов) за короткий период [2].

Дихромат калия ( $K_2Cr_2O_7$ ) – это высокотоксичный канцероген, мутаген, сильный окислитель 1 класса опасности, предельно допустимая концентрация которого в воде рыбохозяйственного назначения Российской Федерации составляет 0,05 мг/л [4]. Ранее его патогенотоксическое воздействие было оценено на таких видах рыб как *Labeo rohita*, *Heteropneustes fossilis* [5], *Pimephales promelas* [6], *Oreochromis nilotica* [7]. Согласно литературным источникам, Африканский клариевый сом является перспективным объектом тепловодной аквакультуры, отличающийся высокой устойчивостью к

токсикантам и иным поллютантам в водной среде [8]. Поэтому, настоящее исследование было проведено с целью изучить характер эритропоэза при воздействии дихромата калия в крови молоди *Clarias gariepinus*.

**Материалы и методы.** *Объектом исследования* являлась молодь Африканского клариевого сома в возрасте 2 мес., весом в среднем  $5 \pm 0.62$  г и размером  $8.3 \pm 0.52$  см. Исследования проводились на уникальной научной установке (УНУ) НТИРФ Рег №3662433 в экспериментальной инновационной лаборатории «Фитоэкологических аквабиотехнологий» факультета биотехнологий и рыбного хозяйства МГУТУ им. Разумовского (ПКУ). В качестве *цитотоксиканта* был использован дихромат калия (potassium dichromate,  $K_2Cr_2O_7$ , ГОСТ 2652-78, производство Россия), изученный ранее, как эталонный токсикант, индуцирующий различные аномалии клеток крови рыб [9].

*Схема эксперимента.* Молодь африканского сома содержалась в 15 аквариумах объемом 40 л ( $55.5 \times 25.5 \times 31.5$  см) по 20 особей на аквариум при pH 7.1, температуре 26-28°C, фотопериоде L:D=12:12. Дихромат калия вносили одновременно в воду аквариумов в следующих концентрациях: 0 (контроль), 1, 2, 4 и 6 мг/л. Концентрации были определены исходя из литературных данных о появлении цитогенетических нарушений при воздействии дихромата калия на эритропоэз других видов рыб [3]. Эксперимент проводился в трехкратной повторности в течении 4 суток (96 ч).

*Гематологический анализ* проводился на первые (0 ч) и четвертые сутки (96 ч) эксперимента. Забор крови осуществлялся путем отсечения хвостового стебля; предварительно рыб седатировали в растворе гвоздичного масла в концентрации 0,05 мг/л. Мазки крови изготавливались по стандартной методике [10]. После изготовления, препараты просматривались под световым микроскопом Olympus BX53 («Olympus Corporation», Япония) и регистрировались с помощью цифровой камеры Carl Zeiss ERc 5s («Zeiss», Германия). Для автоматического подсчета клеток и измерения диаметра ядер эритроцитов использовали программное обеспечение ImageJ (National Institutes of Health, USA) согласно методике, описанной в работе [11]. Было просмотрено не менее 30 полей зрения для каждого варианта опыта. Диаметр эритроцитов измеряли в микрометрах у 100 клеток и более на препарат в четырехкратной повторности ( $n=4 \times 100$ ) в каждом варианте опыта. Частота встречаемости патологических отклонений и ядерных аномалий эритроцитов *Clarias gariepinus* определялась согласно работе [9].

*Статистическая обработка* и графическое представление полученных данных производилась с использованием GraphPad Prism 9.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Определение нормальности распределения численных данных осуществлялось при помощи теста Колмогорова–Смирнова. Достоверность отличий разных вариантов опыта оценивали с помощью t-критерия Стьюдента для независимых переменных (при  $p < 0,05$ ).

**Результаты и обсуждение.** *Воздействие токсиканта на эритропоэз* молоди клариевого сома. В контроле диаметр ядер эритроцитов в крови у

особей *Clarias gariepinus* на четвертые сутки эксперимента характеризовался нормальным распределением с наибольшей долей встречаемости ( $80,7 \pm 8,35\%$ ) эритроцитов 4-5 мкм (рисунок).

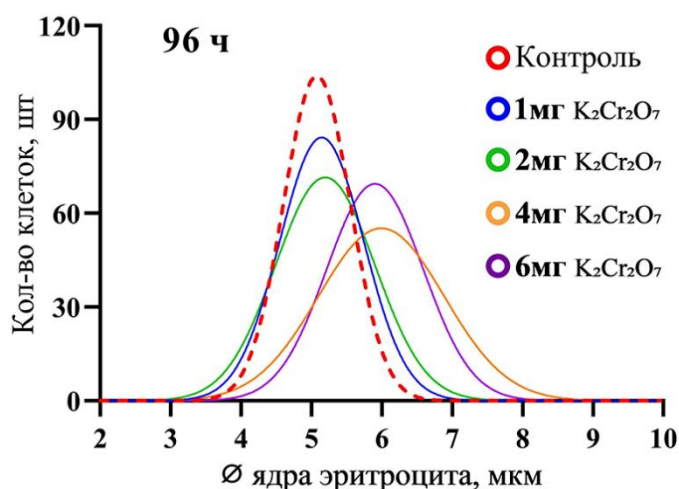


Рисунок 1 – Макроцитоз эритроцитов при 4 и 6 мг/л K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (диаметр 4-9 мкм) и нормальное количественное распределение ядер с диаметром 4-5 мкм в контроле, 1 и 2 мг/л

При экспозиции рыб в растворах с концентрацией дихромата калия 1-2 мг/л в течение 4 суток наблюдалась тенденция к снижению среднего количества ядер диаметром 4-5 мкм в 1,3 и 1,5 раза, соответственно; однако это снижение было статистически не достоверно. При этом концентрация дихромата калия в 2 мг/л вызывала достоверное повышение численности эритроцитов с диаметром ядра 3-4 и 6-7 мкм, что соответствовало увеличению в 2,1 и 6,6 раза доли этих ядер от общего числа ядер такого размера в контроле (при  $p < 0,05$ ).

Значительное воздействие на эритропоэз оказывают концентрации дихромата калия 4 и 6 мг/л. Так, при экспозиции в растворе 4 и 6 мг/л было зафиксировано в среднем достоверное снижение встречаемости эритроцитов с диаметром ядер 4-5 мкм в 3,5 раза и увеличение доли ядер 5-6 и 6-7 мкм в 3,9 и 43 раза ( $p < 0,05$ ), соответственно (таблица), относительно контрольных величин. Кроме того, в крови рыб, содержащихся при концентрации дихромата калия 2, 4 и 6 мг/л были зафиксированы эритроциты с диаметром ядер 7-8 мкм.

Таблица 1

**Изменение процентного количества ядер эритроцитов разного размера при кратковременной экспозиции (96ч) в растворе единовременного внесения дихромата калия различных концентраций**

Диаметр ядра эритроцита, мкм	Количество ядер, %				
	Концентрация дихромата калия, мг				
	0 (контроль)	1	2	4	6
2-3	0	0,16±0,39	0,13±0,32	0,66±1,36	0
3-4	6,3±0	10,7±6,51	13,39±6,14*	8,4±11,77	5,83±6,88
4-5	80,7±8,35	64,4±5	54,2±8,47	24,8±8*	22,2±12,91*
5-6	12,6±7,8	23,8±8,4	29,4±10,15	44,36±12,7*	54,5±12,91*
6-7	0,4±0,5	0,94±1,36	2,62±1,84*	19,82±14,6*	14,65±13
7-8	0	0	0,26±0,64	1,57±1,41	2,7±1,9*
8-9	0	0	0	0,26±0,7	0,16±0,35

*Примечание.* Данные в таблице представлены в виде среднего значения ± SD, \* при p<0,05, согласно t-критерию Стьюдента.

Таким образом, более 75% эритроцитов при экспозиции в растворе дихромата калия в концентрациях 4 и 6 мг/л имели диаметр 5-6 и больше мкм, тогда как в контроле такой диаметр ядер встречался в среднем у 13% клеток. Такое изменение размерного состава ядер позволяет сделать вывод о развитии патоморфологического отклонения течения эритропоэза – анизоцитоза с переходом в макроцитоз (увеличение размера эритроцита) при высоких концентрациях токсиканта.

### Библиографический список

1. Witeska M., Kondera E., Wojarski B. Hematological and Hematopoietic Analysis in Fish Toxicology—A Review //Animals. – 2023. – Т. 13. – №. 16. – С. 2625.
2. Житенева Л.Д., Полтавцева Т.Г., Рубницкая О.А. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб. – Ростов-на-Дону: Ростовское книжное издательство, 1989. – 111 с.
3. Islam S. M. M. et al. Acute effects of chromium on hemato-biochemical parameters and morphology of erythrocytes in striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* //Toxicology Reports. – 2020. – Т. 7. – С. 664-670.
4. Приказ Министерства сельского хозяйства "Об утверждении нормативов качества воды, водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах, водных объектов рыбохозяйственного значения" от 13.12.2016 № 552 // Официальный интернет-портал правовой информации. - с изм. и допол. в ред. от 10.03.2020.
5. Bakshi A., Panigrahi A. K. A comprehensive review on chromium induced alterations in fresh water fishes //Toxicology reports. – 2018. – Т. 5. – С. 440-447.

6. de Lemos C. T., Rödel P.M, Terra N.R, Erdtmann B. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes //Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal. – 2001. – Т. 20. – №. 6. – С. 1320-1324.
7. Çavaş T., Ergene-Gözükara S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents //Aquatic toxicology. – 2005. – Т. 74. – №. 3. – С. 264-271.
8. Lima L. et al. Levels of arsenic, mercury and selenium in *Clarias gariepinus* from Sagua la Grande River, Cuba //Annales de Limnologie-International Journal of Limnology. – EDP Sciences, 2013. – Т. 49. – №. 2. – С. 113-119.
9. Симаков Ю. Г. Цитопатологические нарушения в эритроцитах *Brachydanio rerio* при загрязнении водной среды шестивалентным хромом // Рыбное хозяйство. 2014. № 5. С. 45-48.
10. Bolognesi C., Hayashi M. Micronucleus assay in aquatic animals //Mutagenesis. – 2011. – Т. 26. – №. 1. – С. 205-213.
11. Kochetkov N. I., Smorodinskaya S. V., Nikiforov-Nikishin D. L., Klimov V. A., Golovacheva N. A., Nikiforov-Nikishin A. L., Grozescu Y. N. Evaluating possible genotoxicity of three feed additives recommended for aquaculture by using micronucleus test on *Danio rerio* erythrocytes // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. – 2022. – №. 3. – С. 48-59.