

ВДОСКОНАЛЕННЯ СПОСОБУ ФАРБУВАННЯ МАЗКІВ КРОВІ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЦИТОМЕТРИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ КРОВІ РИБ

В. О. КУРЧЕНКО, Т. С. ШАРАМОК, О. М. МАРЕНКОВ

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара,
пр. Гагаріна, 72, м. Дніпро, 49050, Україна,
e-mail: kurchenko.viktoriiia.3@gmail.com

Кров відіграє роль чутливого індикатора стану здоров'я риб. Як показник ступеню забрудненості водою можливо використовувати цитометричні показники клітин червоної крові риб. Еритроцити риб чутливі до забруднення навколишнього середовища і їх морфологічні зміни можуть бути використані як біоіндикатор токсичності водного середовища, а ті чи інші патології клітин крові можуть бути викликані певними забруднювачами. Недоліком існуючих способів фарбування мазків крові риб є те, що вони незручні у польових умовах, коли необхідно дослідити кров риб при іхтіологічних дослідженнях або є довготривалими. У зв'язку з цим існує необхідність у швидкому та надійному способі фарбування клітин крові риб, яке може застосовуватися як у лабораторних, так і в польових умовах.

Метою роботи було вдосконалити спосіб фарбування мазків крові риб для зручнішого та швидшого виконання, без погіршення якості фарбування.

Запропонований спосіб фарбування мазків крові риб випробували на базі лабораторії кафедри загальної біології та водних біоресурсів Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара. Об'єктом досліджень була молодь корокових риб (Cyprinidae). Вдосконалений спосіб заснований на класичному способі фарбування за Папенгеймом, але відрізняється інтервалом часу відведеного на фарбування у розчині барвника Романовського. Мазки крові досліджували під мікроскопом Ulab XY-B2TLED (збільшення об'єктиву 40^x) з використанням мікрофотознімання цифровою камерою «Sciencelab T500 5.17 М».

Аналіз показав, що еритроцити на препаратах, які перебували у розчині Романовського 5 хвилин, мали правильну форму з чіткими контурами, темно-фіолетове ядро, розташоване в центрі клітини. Було виявлено, що даний спосіб може бути застосований при цитометричних дослідженнях для визначення таких показників: великий повздовжній та малий поперечний діаметри еритроцитів, площі еритроцита, площі ядра еритроцита, ядерно-цитоплазматичного співвідношення, відсоток зрілих та незрілих еритроцитів та їх форм. Також його можна використовувати при аналізі наявності патологій еритроцитів.

Встановлено, що скорочення часу (з 20 хвилин до 5 хвилин) перебування препаратів у розчині барвника Романовського не впливає на якість їх забарвлення, а тому є надійним та швидким способом, який може бути успішно застосований при морфологічних та цитометричних дослідженнях крові риб.

Ключові слова: кров риб, мазки крові, еритроцити, фарбування.

Вступ. Наразі визначення стану крові риб залишається досить актуальним, оскільки кров відіграє роль чутливого індикатора стану здоров'я риб (Кузіна, 2009). Багаточисельними дослідженнями показано, що як показник ступеню забрудненості водою можливо використовувати цитометричні показники клітин червоної та білої крові (Velcheva et al., 2006; Минеев, 2012).

Еритроцити риб чутливі до забруднення навколишнього середовища і їх морфологічні зміни можуть бути використані як біоіндикатор токсичності навколишнього середовища (Kurchenko et al., 2018). За результатами досліджень, патології клітин крові можуть бути викликані різними органічними і неорганічними забруднювачами (Witeska, 2013).

Накопичений матеріал дозволив виявити ряд закономірностей стосовно змін у цитометричних показниках еритроцитів периферійної крові

різних видів риб під впливом важких металів (Шарамок та ін., 2015), технологічних умов штучного вирощування (Серпунин, 2002) тощо. Встановлені співвідношення клітин еритроїдного та лейкоїдного ряду крові деяких видів риб за різних умов існування (Gayatri et al., 2014).

І тому існує необхідність у швидкому та надійному способі фарбування клітин крові риб як у лабораторних, так і в польових умовах.

Метою роботи було вдосконалити спосіб фарбування мазків крові риб для його зручнішого та швидшого виконання, без погіршення якості фарбування.

Матеріали та методи. Представлений спосіб фарбування мазків крові риб випробували на базі лабораторії кафедри загальної біології та водних біоресурсів Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара.

Об'єктом досліджень була молодь корокових риб (Cyprinidae) (38 екземплярів). Даний спосіб

фарбування мазків крові риб заснований на класичному способі за Папенгеймом (Давидов, 2006), але відрізняється інтервалом часу відведеного на фарбування у розчині барвника Романовського. Після просушування мазки крові досліджували під мікроскопом Ulab XY-B2TLED (збільшення об'єктиву 40^x) з використанням мікрофотознімання цифровою камерою «Sciencelab T500 5.17 М». На препаратах проглядали 200 полів зору.

Результати та їх обговорення. Нині існує спосіб фарбування клітин крові, який проводиться у 2 етапи: спочатку розчином метиленового синього з дистильованою водою (1:5). Фіксований мазок розміщують у чашках Петрі з фарбою на 10-15 хвилин. Після фіксації препарат виймають із фарби пінцетом, промивають у дистильованій воді та чекають його висихання на повітрі. Потім азур-еозином за Романовським (з додаванням буферу) з розрахунку 10-12 крапель фарби на 10 мл дистильованої води. Мазок розміщують у чашках Петрі з фарбою на 15-20 хвилин. Після закінчення відведеного часу препарат також виймають із фарби пінцетом, промивають у дистильованій воді та чекають його повного висихання на повітрі (Клименко, 2016). Однак, недоліком даного способу є те, що на фарбування мазків відводиться чимала кількість часу.

Також є комбінований спосіб фарбування мазків крові за Папенгеймом: на нефіксований мазок наливають піпеткою 10-15 крапель готового барвника-фіксатора Май-Грюнвальда, через 3 хв. додають по краплях стільки ж води і продовжують фарбування ще 1 хв., після чого барвник змивають водою і мазок висушують на повітрі. Потім на висушений мазок наливають свіжоприготовлений водний розчин барвника Романовського на 15 хв., змивають фарбу водою і мазок висушують на повітрі (Кост, 1975). Цей спосіб забарвлення вважається найкращим, але

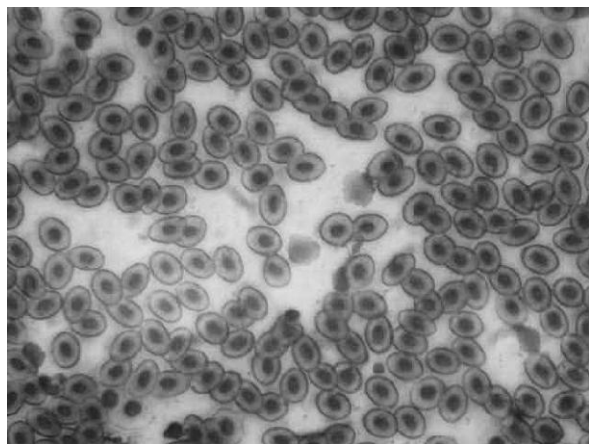
він має істотний недолік – від початку процедури дослідження крові і до її закінчення потрібно мати інтервал часу від 20 до 45 хвилин. Тому за основу у наших дослідженнях було обрано саме цей метод.

Кров у молоді коропових риб відбирали з хвостової вени. Невеличку краплю взятої від риби крові наносили на предметне скло на відстані 1-1,5 см від його кінця. Великим і вказівним пальцями правої руки брали за ребро шліфоване скло, встановлювали його до поверхні предметного скла під кутом 30-45° і акуратно підводили тильним боком до краплі крові, в результаті чого остання розтікалася. Потім ковзним рухом шліфованого скла вперед кров рівномірно розподіляли у вигляді мазка по предметному склу. Готовий мазок підсушували на повітрі.

Далі мазки фіксували у фіксаторі Май-Грюнвальда (2-3с.). Фіксовані мазки укладали на 2 містки, які складалися з двох скляних паличок кожен, покладених на два протилежні краї кювети. Потім мазки заливали розчином Романовського з дистильованою водою (1:9), яку наливали більш високим шаром. На першому містку фарбування тривало 5 хвилин, а на іншому 15 хвилин (за Папенгеймом). Після закінчення зазначеного часу фарбу змивали сильним струменем дистильованої води (рН 6,6-6,7) і залишали мазки вертикально у штативі для просушування.

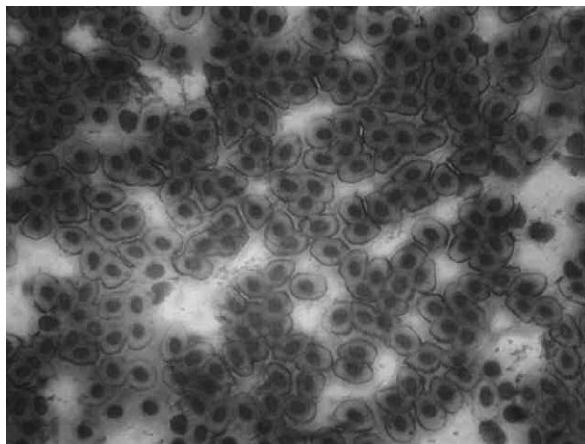
У результаті було виявлено, що мазки, які перебували у барвнику 5 хв., мали високу якість забарвлення (Рис.1А), навіть кращу, ніж мазки, які перебували у барвнику 20 хв. (Рис.1Б).

Морфо-цитометричний аналіз показав, що еритроцити на препараті, який перебував у розчині Романовського 5 хвилин, мали правильну, овоїдну форму з чіткими контурами, темно-фіолетове ядро, розташоване в центрі клітини.



А

Рис. 1. Мазки крові риб (інтервал фарбування): А- 5 хвилин; Б-15 хвилин.



Б

Fig. 1. Fish blood smears (coloring interval): A-5 minutes; B-15 minutes.

Наведений вище спосіб може бути застосований при цитометричних дослідженнях для визначення таких показників: великий повздовжній та малий поперечний діаметри еритроцитів, площу еритроцита, площу ядра еритроцита, ядерно-цитоплазматичне співвідношення, відсоток зрілих еритроцитів, відсоток незрілих еритроцитів та їх форм.

Також його можна використовувати при аналізі на наявність патологій еритроцитів, а саме: пойкилоцитоз еритроцитів, зсув ядра клітин, фестончатість мембрани еритроцитів, ядерні тіні та інші.

Отже, даний спосіб можна успішно використовувати при цитометричних та морфологічних дослідженнях клітин крові риб у лабораторних та польових умовах.

Висновки. Даний спосіб фарбування мазків крові риб заснований на класичному способі за Папенгеймом, але відрізняється інтервалом часу, відведеного на фарбування у розчині барвника Романовського.

Виявлено, що скорочення часу (з 20 хвилин до 5 хвилин) перебування препаратів у розчині барвника Романовського не впливає на якість їх забарвлення, а тому є надійним та швидким способом.

Розроблений нами спосіб є ефективним та зручним у використанні та може бути успішно застосований при морфо-цитометричних дослідженнях крові риб: визначенні патологій, співвідношенні клітинних форм, встановленні площ та діаметрів клітин та їх ядер.

Список літератури:

1. Кузина Т.В. Анализ гематологических показателей судака Волго-Каспийского канала // Естественные науки. – 2009. – №4 (29). – С. 96 – 100.
2. Velcheva I., Arnaudov A., Hadziablahovic S. A study on some physiological parameters of three hydrobiotic species under the influence of copper // Proceedings of II International Symposium of Ecologists of Montenegro. 2006. – P. 155 – 160.
3. Минеев А.К., Калинин Е.А. Особенности лейкоцитарной формулы у плотвы (*Rutilus rutilus* Linnaeus, 1758) из водоемов разного типа (на примере Саратовского водохранилища и малых рек республики Удмуртия) // Известия самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 213 – 217.
4. Kurchenko V., Sharamok T. Morphological and cytometric indicators of the bream (*Abramis brama* Linnaeus, 1758) erythrocytes from the Zaporizhian reservoir // World Scientific News. – 2018. – №112. – С.228 – 236.
5. Witeska, M. Erythrocytes in teleost fishes // Zoology and Ecology. – 2013. – № 23(4). – С. 1 – 4. doi: 10.1080/21658005.2013.846963.

6. Шарамок, Т., Єсіпова Н. Вплив антропогенних факторів на гематологічні показники риб // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету. – 2015. – № 3/4 (64). – С. 722 – 726.
7. Серпунин Г. Г. Гематологические показатели адаптаций рыб. Дисс. д-ра биол. наук. Калининград. – 2002. – 482 с.
8. Gayatri A., Prafulla M. The morphometrical characterisation of normal blood cells of two air breathing fishes, *Clarias batrachus* and *Anabas testudineus* // International Research Journal of Biological Sciences. – 2014. – №3(11). – С.37 – 41.
9. Клименко М.О., Пилипенко Ю.В., Бедункова О.О. Патент: Спосіб експрес-оцінки стану гідроекосистем за MN- тестом периферійної крові риб. – 2016.
10. Кост Е.А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. – Москва: Медицина, 1975. – 38 – 43 с.
11. Давыдов О. Н., Темниханов Ю.Д., Куровская Л.Я. Патология крови рыб. – Киев: Фирма «ИНКОС», 2006. – 52 с.

References:

1. Kuzina T.V. Analysis of hematological indicators of the pike perch from the Volga-Caspian canal [Analiz gematologicheskikh pokazatelej sudaka Volgo-Kaspijskogo kanala] // Natural Sciences. 2009; №4 (29): 96 – 100. (in Russian).
2. Velcheva I., Arnaudov A., Hadziablahovic S. A study on some physiological parameters of three hydrobiotic species under the influence of copper // Proceedings of II International Symposium of Ecologists of Montenegro. 2006: 155 – 160.
3. Mineev A.K., Kalinin E.A. Features of leukocyte formula of the roach (*Rutilus rutilus* Linnaeus, 1758) from reservoirs of different types (on the example of the Saratov reservoir and small rivers of the Udmurtia Republic) [Osobennosti lejkocytarnoj formuly u plotvy (*Rutilus rutilus* Linnaeus, 1758) iz vodoemov raznogo tipa (na primere Saratovskogo vodokhranilishha i malyx rek respubliky Udmurtiya)]. // News of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. 2012; T. 14, №1: 213 – 217. (in Russian).
4. Kurchenko V., Sharamok T. Morphological and cytometric indicators of the bream (*Abramis brama* Linnaeus, 1758) erythrocytes from the Zaporizhian reservoir // World Scientific News. 2018; №112: 228 – 236.
5. Witeska, M. Erythrocytes in teleost fishes // Zoology and Ecology. 2013; № 23(4): 1 – 4. doi: 10.1080/21658005.2013.846963
6. Sharamok, T., Esipova. N. Influence of anthropogenic factors on fish hematological parameters [Vplyv antropohennykh faktoriv na hematolohichni pokaznyky ryb] // Scientific notes Ternopil National Pedagogical University. 2015; №3/4 (64): 722 – 726. (in Ukrainian).
7. Serpunin G. G. Hematological indicators of fish adaptations [Gematologicheskie pokazateli adaptacij]

- ryb]. Thesis of the Biol. Sciences. Prof., Kaliningrad. 2002: 482. (in Russian).
8. Gayatri A., Prafulla M. The morphometrical characterisation of normal blood cells of two air breathing fishes, *Clarias batrachus* and *Anabas testudineus* // *International Research Journal of Biological Sciences*. 2014; №3: 37 – 41.
 9. Klymenko M. O., Pilipenko Yu.V., Bedzunkova O.O. *Patent*: A method for express assessment of the state of hydro ecosystems for the MN-test of fish peripheral blood [Sposib ekspres-otsinky stanu hidroekosystem za MN- testom peryferiinoi krovi ryb]. 2016. (in Ukrainian).
 10. Kost E. A. Reference book on clinical laboratory research methods [Spravochnik po klinicheskim laboratornym metodam issledovaniya]. Moscow: Medicine. 1975: 38 – 43. (in Russian).
 11. Davydov O. N., Temnnhanov Yu.D., Kurovskaya L.Ya. Pathology of fish blood [Patologiya krovi ryb]. INKOS Company. 2006: 52. (in Russian).

THE IMPROVEMENT OF BLOOD SMEARS COLORING FOR THE DETERMINING OF FISH CYTOMETRIC BLOOD PARAMETERS

V. O. Kurchenko, T. S. Sharamok, O. M. Marenkov

Blood plays the role of a sensitive indicator of fish health. As an indicator of the degree of contamination of reservoirs it is possible to use cytometric indices of red blood cells of fish. Erythrocytes of fish are sensitive to environmental pollution and their morphological changes can be used as a bioindicator of the toxicity of the aquatic environment, and those or other pathologies of blood cells can be caused by certain pollutants. The disadvantage of existing methods of blood smears coloring is that they are inconvenient in the field conditions, when it is necessary to examine the fish blood during ichthyological researches or they are long-lasting. In this regard, there is a need for a fast and reliable method of coloring blood cells of fish, which can be used both in laboratory and in field conditions.

The aim of the work was to improve the method of coloring fish blood smears for easier and faster execution, without degradation of the quality of colouring. The proposed method of coloring fish blood smears was tested on the basis of the laboratory of the Department of General Biology and Water Bioresources of the Oles Gonchar Dnipro National University. The subject of the research was the young carp fish (Cyprinidae). The improved method is based on the classic method of painting by Papenheim, but differs in the interval of time devoted to colouring in a solution of the dye Romanovskogo. Blood swabs were examined under a Ulab XY-B2TLED microscope (40X lens enhancement) using a microscope with a Sciencelab T500 5.17 M digital camera.

The analysis showed that erythrocytes on medicine that were in the Romanovsky solution for 5 minutes had the correct form with clear contours, a dark purple core located in the center of the cell. It has been found that this method can be used in cytometric researches to determine such indicators: large longitudinal and small transverse diameters of erythrocytes, erythrocyte area, erythrocyte core area, nuclear-cytoplasmic ratio, percentage of mature and immature erythrocytes and their forms. It can also be used in analyzing the presence of erythrocyte pathologies.

It has been established that reduction of time (from 20 minutes to 5 minutes) of preparations in the dye solution of Romanovsky does not affect the quality of their coloring, and therefore it is a reliable and fast way that can be successfully applied in morphological and cytometric studies of blood of fish.

Keywords: fish blood of, blood smears, red blood cells, colouring.

Отримано редколегією 12.05.2019