

УДК 597:504.4.054

**Голамиан С.А.,<sup>1</sup> Рустамов Э.К.,<sup>1</sup> Бахмани М.,<sup>2</sup> Джордехи А.Ю.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Институт физиологии им. А.И.Караева НАН Азербайджана (г. Баку)

<sup>2</sup>Международный институт исследования осетровых (г. Решт, Иран)

**ВЛИЯНИЕ СУБЛЕТАЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДИАЗИНОНА  
НА НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ,  
ТКАНИ ПОЧЕК И МЫШЦ МОЛОДИ ПЕРСИДСКОГО ОСЕТРА  
(*ACIPENSER PERSICUS*)**

**S. Gholamian<sup>1</sup>, E. Rustamov<sup>1</sup>, M. Bahmani<sup>2</sup>, A. Jourdehi<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>A.I. Karaeov Institute of Physiology, Azarbaijan National Academy of Sciences, Baku

<sup>2</sup>International Sturgeon Research Institute, Iran, Rasht

**EFFECT OF SUB-LETHAL CONCENTRATION OF DIAZINON  
ON SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS OF BLOOD, KIDNEY TISSUE  
AND MUSCLES OF PERSIAN STURGEON FINGERLINGS  
*ACIPENSER PERSICUS***

*Аннотация.* Данное исследование проведено с целью выявления действия сублетальной концентрации диазинона на некоторые биохимические показатели крови, почечную и мышечную ткани молоди персидского осетра. Воздействию диазинона различных концентраций были подвергнуты 120 особей молоди персидского осетра. Клинические ответы и показатели крови были изучены через 24 и 96 часов воздействия. Круговое плавание, быстрые движения жабр, дисбаланс тела наблюдались во всех экспериментах. Однако коллапс мышц, изменение цвета жабр и нижней части тела наблюдались лишь у рыб, подвергнутых более высоким концентрациям диазинона. Содержание кортизола зависело от концентрации и времени воздействия токсиканта. Содержание глюкозы при всех концентрациях увеличивается после 96 часовой экспозиции. Светооптическое исследование показало, что в почечной ткани молоди диазинон вызывает дегенерацию эпителиальных клеток мочевых протоков, кровоизлияние и выпадение гемосидерина, эозинофилию в мочевых путях, гиперплазию и расширение капсулы Боумена; в мышечной ткани – отеки, некрозы и выпадение гемосидерина.

*Ключевые слова:* персидский осетр, диазинон, кровь, почечная ткань, мышечная ткань.

*Abstract.* This study was carried out with the aim of detecting sub-lethal effects of diazinon on some biochemical parameters of blood, kidney and muscle tissues of Persian sturgeon fingerlings. A total of 120 fingerlings were exposed to different concentrations of diazinon. Clinical responses and also blood indices were studied after 24 and 92 hours. Circular swimming, fast motion of gills and body imbalance were observed at all the experiments, but muscle collapse and changes in gill and abdomen color were observed in fish exposed to higher concentrations of diazinon. Cortisol hormone level depended significantly on the concentration and time of exposure to the toxicant. Glucose level was increased significantly after 96 hours. Histopathological effects of diazinon on kidney and muscle tissues of fingerlings were studied using a light microscope. Diazinon toxin caused degeneration of urinal tract epithelium cells, petechiae, hemorrhage and hemosiderin sediment, existence of eosinophile in urinal tracts, hyperplasia and enlargement of Bowman's capsule in the kidney tissue. In the muscle structure of treated fishes, some disasters such as edema, muscle necrosis and hemosydrisis were observed.

*Key words:* persian sturgeon, diazinon, blood, kidney, muscle.

Химические токсические вещества (пестициды) в сельском хозяйстве используются для борьбы с вредителями растений, их болезнями и сорняками. В дальнейшем эти вещества в большом количестве вместе с сельскохозяйственными сточными водами попадают в реки и моря, вызывая тем самым гибель рыб в водных экосистемах. Хотя природа имеет способность

к самовосстановлению, но высокие концентрации загрязняющих веществ нарушают ее, что является причиной серьезных изменений в экосистеме, приводящих к исчезновению многих видов водных растений и животных [14]. Диазинон является одним из наиболее применяемых органо-фосфатных пестицидов в Иране, который обнаруживается как в поверхностных, так и в подземных водах [7].

В настоящее время наиболее важным источником пополнения запасов осетровых является их искусственное разведение и выпуск в Каспийском море. Персидский осетр является одним из эндемичных видов, обитающих в южной части Каспийского моря. Поскольку восприимчивость разных видов рыб к токсикантам различна, токсикологические эксперименты проводятся с каждым видом в отдельности. Количественное исследование крови является важным показателем физиологического состояния рыб, особенно на начальных стадиях развития, что играет важную роль при разведении и выращивании осетровых [19]. Кроме того, гистопатологическое исследование почечной и мышечной тканей является надежным инструментом для выявления уровня токсичности изучаемого вещества. Настоящая работа посвящена оценке воздействия подострых концентраций органо-фосфатного пестицида на некоторые показатели крови и почечную и мышечную ткани персидского осетра.

### Материалы и методы

Исследование проведено в Международном институте изучения осетровых Каспийского моря (Решт, Иран). Исследовано 120 особей молоди персидского осетра со средним весом  $10 \pm 2$  г. Рыбы были подвергнуты воздействию диазинона в концентрациях 0,01, 1,09 и 2,19 мг/л. Опыты ставились в трех повторениях. В каждом аквариуме после акклиматизации содержались по 10 особей рыб. Все аквариумы были оборудованы системой аэрации. Физико-химические условия содержания: температура, растворенный кислород

и общая жесткость воды периодически регистрировались (см. табл.). В течение всех опытов рыб не кормили, исходя из рекомендаций Организации экономического сотрудничества и развития [13]. Морфологические показатели (изменение цвета кожи, активность, секреция слизи), характер плавания и удержания равновесия аккуратно отмечались. Образцы крови отбирали из хвостовой вены с помощью шприца 2сс через 24 и 96 часов [3; 6]). Для отделения сыворотки был использован поллинг метод [4; 5]. Образцы сыворотки получали путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 минут. Для изучения биохимических показателей, таких, как содержание глюкозы и кортизола в крови, использовались радиоиммунологические (RIA) и колориметрические методы в величинах в мг/л и нг/мл соответственно [3; 5; 15]. Для гистологического исследования образцы тканей брались из средней части почки и мышц и фиксировали в жидкости Буэна. Затем резали толщиной 7 мкм. Окраску проводили гематоксилином и эозином. Окрашенные срезы изучали с помощью светового микроскопа (Nikon E600, Япония).

Статистический анализ выполнен посредством использования одностороннего ANOVA метода для определения значимых различий во всех случаях с достоверностью 95% использованием. После проверки однородности вариаций был использован тест Nuki и Duncan для сравнения экспериментальных групп друг с другом, а также T-тест независимых выборок. Анализ данных проводился с помощью SPSS 16 программного обеспечения.

Таблица

#### Физико-химические показатели воды, в которых содержались рыбы

Температура (°C)	Растворенный кислород (мг/л)	Общая жесткость (мг/л)
24,67±1,23	7,2±0,2	108±2

## Результаты

У контрольных рыб наблюдались нормальные поведенческие реакции, такие, как активное плавание и хороший баланс тела, а также отмечался нормальный цвет тела. У рыб при воздействии различных концентраций диазинона отмечалось увеличение секреции слизи на поверхности тела, круговые плавательные движения, быстрое закрытие и открытие жаберных крышек, неустойчивое положение тела, которые наступали при 24-часовой экспозиции и усиливались с увеличением концентрации токсиканта и временем его воздействия. Высокие концентрации диазинона приводили к коллапсу мышц, жаберному кровоизлиянию, обесцвечиванию как всего тела, так и нижней его части.

Уровень содержания кортизола показал значительную разницу при 24- и 96-часовых экспозициях. Также отмечалось существенное увеличение показателей кортизола относительно контроля в концентрациях диазинона 0,01 и 2,19 мг/л (рис. 1). Увеличение уровня содержания глюкозы в различных концентрациях диазинона наблюдается на 96 час экспозиции (рис. 2).

Гистопатологические результаты выявили, что воздействие диазинона приводит к дегенерации эпителиальных клеток мочевых путей, кровоизлиянию, выпадению гемосидерина, присутствию эозинофилов в мочевых протоках, увеличению капсул Боумена и гиперплазии. В мышечной ткани экспериментальных рыб отмечались отеки, некроз мышц и выпадение гемосидерина. Выраженность этих патологий зависла от концентрации и времени воздействия токсиканта (рис. 3-6).

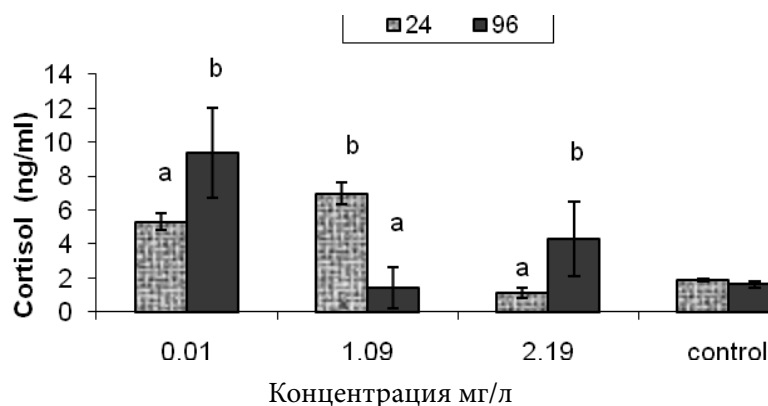


Рис. 1. Изменение уровня кортизола у молоди персидского осетра при различных концентрациях диазинона через 24 и 96 часов

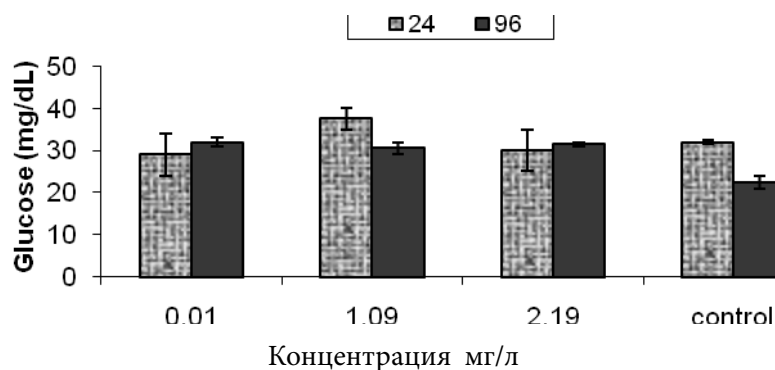


Рис. 2. Изменение уровня глюкозы у молоди персидского осетра при различных концентрациях диазинона через 24 и 96 часов

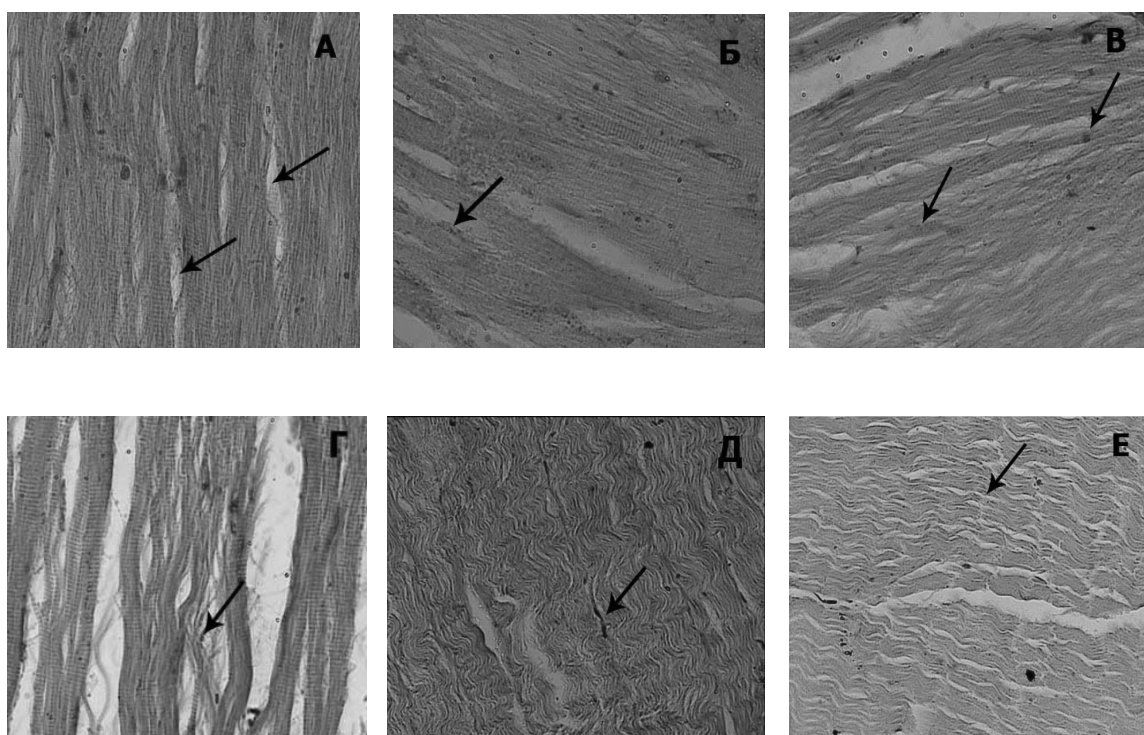


Рис. 3. Изменения в мышечной ткани молоди персидского осетра при воздействии диазинона различных концентраций и времени экспозиции (H & E).

- А: продольный срез отдельной мышцы. Продольный разрыв (стрелка); концентрация 0,01 мг / л, экспозиция 24 часа. (400X).
- Б: продольный срез отдельной мышцы. В больших ядрах ядрышки (стрелка); концентрация 0,01 мг / л, экспозиция 96 часов. (400X).
- В: продольный срез мышцы. Выпадение гемосидерина (стрелка); концентрация 1,09 мг / л, экспозиция 24 часа (400X).
- Г: продольный срез мышцы. Некроз (стрелка); концентрация 1,09 мг / л, экспозиция 96 часов (400X).
- Д: продольный срез мышцы. Появление аморфных клеток (стрелка); концентрация 2,19 мг / л, экспозиция 24 часа (200 X).
- Е: продольный срез мышцы. Некроз (стрелка); концентрации 2,19 мг / л, экспозиция 96 часов (200 X).

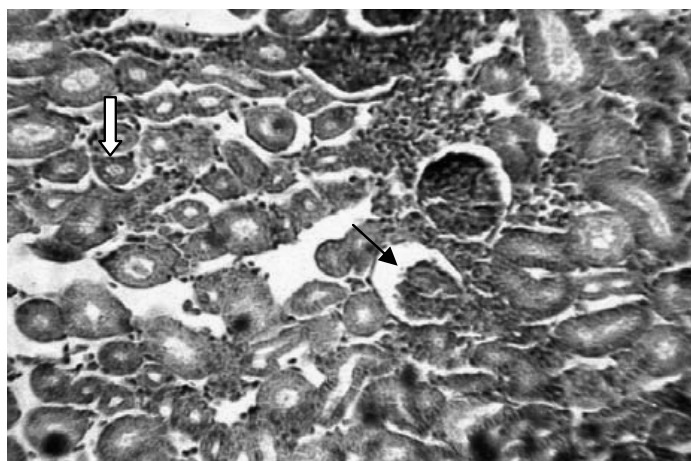


Рис. 4. Увеличение капсулы Боумена (черная стрелка) и наличие эозинофилов в мочевых протоках (белая стрелка) в почечной ткани молоди персидского осетра при концентрации диазинона 1,09 мг / л, экспозиция 96 часов.

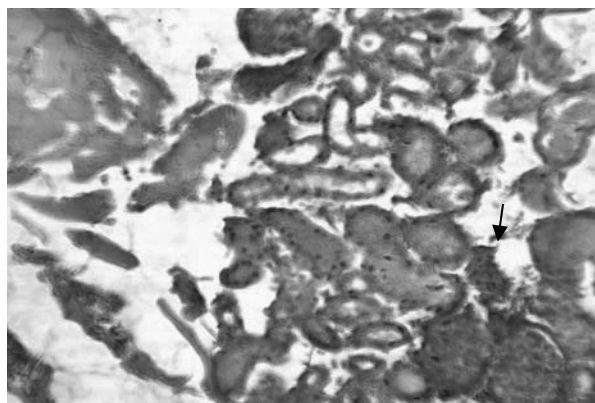


Рис. 5. Гиперплазия (стрелка) в почечной ткани молоди персидского осетра при концентрации 1,09 мг / л, экспозиция 96 часов.

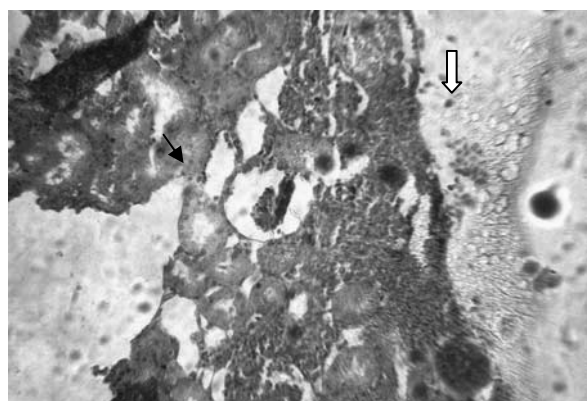


Рис. 6. Некроз мочевых путей (черная стрелка) и выпадение гемосидерина (белая стрелка) в почечной ткани молоди персидского осетра при концентрации 2,19 мг / л, экспозиция 96 часов.

### Обсуждение и выводы

Увеличение секреции слизи у рыб, подвергавшихся неблагоприятным экологическим условиям, является неспецифической реакцией организма и способом защиты от воздействия токсиканта. Эту защитную функцию слизи выполняет содержащийся в ней гидролитический фермент, который секретирует антитела против токсического воздействия загрязнителя. Считается, что у рыб слизь предотвращает снижение осмотической стойкости крови этим путем [16].

Красноватое брюхо возникает в результате накопления меланоцитов и снижения кро-

вообращения в артериях [2]. Склероз, лордоз и нервный паралич указывают на ацетилхолин, который уменьшается при воздействии диазинона, что снижает активность рыб, хищническое поведение, изменяет их место обитания и в конечном итоге приводит к снижению выживаемости животных в природной среде [8; 10]. У другого вида осетровых – шипа (*Acipenser nudiventris*) диазинон при концентрации 4,6 мг/л и экспозиции 96 часов вызывал такие нарушения, как нервный паралич, атония мышц в начале эксперимента, гиперактивность на воздействие внешних факторов, полукруглые формы плавания, мелкие кровоизлияния на поверхности тела (петехии) и повышение секреции слизи на жаберных лепестках [12]. Эти признаки также наблюдались и у севрюги (*Acipenser stellatus*) при концентрации диазинона 4,98 мг/л к 96 часу воздействия [11]. Аналогичные изменения наблюдались и у моноптеруса (*Monopterus albus*), выдержанных в 0,42 мкг/л эндосульфана в течение 10 - 20 минут [20]. Токсические эффекты эндосульфана были изучены также на молоди белуги (*Huso huso*). Показано, что время выдерживания рыб в этом токсиканте играет большую роль, чем его концентрация [17]. Схожие результаты были получены и в настоящем исследовании на молоди персидского осетра.

Результаты исследования действия диазинона на биохимические показатели карпа (*Cyprinus carpio*), как и у персидского осетра, показали значительное увеличение глюкозы в плазме крови [7]. По-видимому, стресс стимулирует образование глюкокортикоидных гормонов, которые, в свою очередь, способствуют повышению содержания глюкозы в крови за счет увеличения катаболизма белка в тканях. Как известно, изменение уровня глюкозы в крови приводит к нарушению иммунно-регуляторной системы животных. Так, при эспонировании кутума (*Rutilus frisii kutum*) в диазиноне наблюдается значительное увеличение уровня кортизола [9]).

Кортикостероидные гормоны увеличиваются при стрессовых ситуациях, вызывая разрушение почечной ткани, клеточных струк-

тур селезенки и печени с признаками мелких кровоизлияний, проникновение аморфных клеточных масс, полиморфизм клеточного ядра, вакуольную дегенерацию, многочисленные некрозы [18]. Кроме того, показано, что диазинон при концентрациях 0,06 и 0,12 мг/л у карпа приводит к разрушению клеток эпителия почечных протоков, некрозу этих путей, рассасыванию гломерул, увеличению капсулы Боумена [7]. У кутум при воздействии диазинона при концентрациях 1 и 1,5 мг/л наблюдался ряд гистопатологических изменений. Так, отмечены дегенерация клеток эпителия почечных протоков, расширение капилляров, уменьшение капсулы Боумена [1]. Аналогичные результаты получены при исследовании воздействия на разные ткани пестицида Lambda-cyhalothrin. Были выявлены проникновение аморфных масс, потемнение эпителиальных клеток, сокращение числа гломерул, увеличение пространства в капсуле Боумена, некроз эпителиальных клеток. Наиболее частым изменениям подвергаются эпителиальные клетки почечных канальцев [16].

В настоящей работе была установлена прямая зависимость степени проникновения аморфных клеточных масс от концентрации токсиканта и времени его воздействия. При высоких концентрациях диазинона наблюдалось выпадение гемосидерина и воспаление мышечной ткани. Как установлено, патология мышечной ткани может проявляться в изменении саркоплазмы [16]. Таким образом, использование диазинона в сельскохозяйственных фермах, особенно в тех, которые расположены недалеко от водных артерий, должно быть резко ограничено, поскольку он представляет реальную угрозу для жизни молоди персидского осетра.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Anoosheh I. Physiological effects of diazinon on gonad, liver, kidney and gill of *Rutilus frisii kutum*: MSc. thesis. – Tehran University, 2011. – 113 p.
2. Bahmani M. Ecophysiological evaluation of stress via affects on HPG, HPI axis, immune system and reproductive system in *Asipenser persicus*: PhD. thesis. – Islamic Azad University, 1999. – 274 p.
3. Bahmani M., Oryan S., Vosoughi G. Ecophysiological indicators of stress in female Persian sturgeon *Acipenser persicus* // *Iranian J. of Fisheries Sciences*. – 2000. – Vol. 2 (№ 1). – P. 37-45.
4. Bahmani M., Kazemi R., Donskaya P. A comparative study of some hematological features in young reared sturgeon // *Fish Physiology and Biochemistry*. – 2001. – Vol. 24. – P. 135-140.
5. Bahmani M. Study of stress hormones effects on ovarian follicular and testis apoptosis in gold fish, *Carassius auratus*: Postdoctoral research fellow thesis in comparative reproductive endocrinology. – University of Calgary. Biological Sciences Dept. (Canada), 2002. – 475 p.
6. Bahmani M. Qualitative evaluation of several year old sturgeon at artificial conditions. Final report of research project / M. Bahmani, R. Kazemi, K. Amiri et al. – [Iranian Fisheries Research Publications]. – 2004. – 80 p.
7. Banaie M. Evaluation of hematology and histopathology in experimental toxicity with diazinon in common carp (*Cyprinus carpio*). Fisheries publication // *J. of Iranian Natural Resources*. – 2011. – Vol. 64. – P. 1-13.
8. Duttat H.M., Arends D.A. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish // *Environmental Research*. – 2003. – Vol. 91 (№ 3). – P. 157-162.
9. Fekri N. Investigation of diazinon effect on acetylcholine esterase and hematology of Caspian Sea *Rutilus rutilus*: MSc. thesis on marine pollution, 2012. – 67 p.
10. Koprucu S.S. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish *Silurus glanis* / S.S. Koprucu, K. Koprucu, V.S. Ural et al. // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. – 2006. – Vol. 86 (№ 2). – P. 99-105.
11. Khoshbavar Rostami H., Soltani M., Yelghi S. Effect of diazinon on some blood indices of *Acipenser stellatus*, LC50 detection // *Iranian J. of Fisheries*. – 2005. – Vol. 5. – P. 100-108.
12. Khoshbavar Rostami H., Soltani M. Effect of acute toxicity of diazinon on some blood indices of *Acipenser nudiventris* and LC50 detection // *Iranian J. of Fisheries Sciences*. – 2005. – Vol. 3. – P. 49-60.
13. OECD Guidelines for Testing of Chemicals [№ 203: Fish, acute toxicity test. № 204: Fish, prolonged toxicity test]. – Paris: OECD, 1992. – 11 p.
14. Pajand Z. Lethal concentration detection of machete herbicide on fingerlings *Acipenser persicus* and *Acipenser stellatus* // *Iranian Fisheries J.* – 2005. – Vol.14 (№ 1). – P. 41-50.
15. Pottinger T.G., Carrick T. R. Stress responsiveness affects dominant –Subordinate relationships in

- rainbow // *Hormones and Behavior*. – 2001. – Vol. 40 (№ 3). – P.419-427.
16. Tachashima F., Hibia T. Atlas of fish histology. Natural figures and Histopathology / Translated by Posti A. and Sedigh Marvasti A. – Tehran University Publications, 1999. – 328 p.
17. Sharifpoor A., So, Tanim M., Javadi M. 96 - LC50 detection and histopathological effect of Endosulfan in fingerling *Huso huso* // *Iranian J. of Fisheries Sciences*. – 2003. – Vol. 4. – P. 69-84.
18. Sharifpoor A. Study on organs of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) exposed to different concentrations of sub lethal concentrations using light and electronic microscope / A. Sharifpoor, R. Pourgholam, M. Soltani et al. // *Iranian J. of Fisheries Sciences*. – 2006. – Vol. 5. – P. 111-136.
19. Shamloofar M. 96-LC 50 of diazinon and its sub lethal concentration on some blood factors of beluga, *Huso huso* / M. Shamloofar, A. Kamali, M. Piri et al. // *Iranian J. of Fisheries Sciences*. – 2006. – Vol. 4. – P. 69-78.
20. Siang H.Y., Yee L.M., Seng C.T. Acute toxicity of organochlorine insecticide endosulfan and its effect on behavior and some hematological parameters of Asian swamp eel *Monopterus albus*, Zuiew // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. – 2007. – Vol. 86 (№ 1). – P. 46-53.