

8. Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов: лабораторное руководство. – М.: «Наука», 1974.– 194 с.
9. Салманов М.А. Вопросы экологической безопасности трансграничных рек Азербайджана // Мат. III конф. РЭЦ Кавказа.– Тбилиси, 2003.– С. 210-216.
10. Сорокин Ю.И. Вопросы методики отбора проб при изучении водной микробиологии // Океанология.–1962. Т. II, Вып. 5.– С. 188-197.

УДК 597:504.4.054

**Сафиханова Х.М., Оруджева А.М., Рустамов Э.К.**  
*Институт физиологии им. А.И. Караева НАН Азербайджана (г. Баку)*

### **ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЖАБЕРНОЙ ТКАНИ У САЗАНА В РЕЗУЛЬТАТЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ СЫРОЙ НЕФТИ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ**

**Kh. Safikhanova, A. Orudjeva, E. Rustamov**  
*A.I. Karaev Institute of Physiology of Azerbaijan  
National Academy of Sciences, Baku*

#### **HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN THE CARP GILL TISSUE AS A RESULT OF EXPOSURE TO HIGH CONCENTRATIONS OF CRUDE OIL**

*Аннотация.* Показано воздействие высоких концентраций сырой нефти 100, 300, 500 мг/л с месторождения «Нефтяные камни» на клетки жаберной ткани куриного сазана. Нарушения были отмечены как в состоянии первичных ламелл, так и в организации вторичных ламелл. В зависимости от концентрации и экспозиции, наиболее ранними сдвигами в организации жаберной ткани были отрыв дыхательного эпителия от кровеносного комплекса вторичных ламелл, что приводило к геморрагии в жабрах и увеличение числа эпителиальных клеток. Кроме того, наиболее общие нарушения: гипертрофия эпителиальных клеток, разрыв целостности эпителиальной оболочки ламелл, телеангиэктазия, стазис (аневризм).

*Ключевые слова:* гистопатология, структура жабр, сырая нефть, куриный сазан.

*Abstract.* The effect of high concentrations of crude oil (100, 300, 500 mg/l) from the 'Oil Rocks' field on the cells of the gill tissue of Kura carp is shown. Violations were found in the state of the primary lamellae and in the organization of secondary lamellae. Depending on the concentration and exposure, the earliest changes in the organization of the gill tissues were characterized by the separation of respiratory epithelium of the blood complex of secondary lamellae, leading to hemorrhages in the gills and an increase in the number of epithelial cells. In addition, the most common violations were hypertrophy of the epithelial cells, epithelial membrane integrity gap lamellae, telangiectasis, stasis (aneurysm).

*Key words:* histopathology, structure of gills, crude oil, Kura carp.

Сырая нефть является одним из наиболее часто встречающихся органических загрязнителей водной среды. В случаях её присутствия в концентрациях выше предельно допустимых, она становится крайне опасной для живых организмов, включая рыб [3; 7; 8; 18; 20]. Токсические концентрации сырой нефти в природе происходят как во время её выхода на поверхность суши или дна водоёма так и, чаще всего, во время добычи нефти и её транспортировки [4]. Жабры рыб, представленные тонкими многочисленными выростами, имеющими огромную площадь (свыше 90 % от общей поверхности тела рыб), находятся постоянно в тесном контакте с водой [1; 21]. Вследствие постоянного контакта с окружающей средой, жабры

являются главной мишенью водных загрязнителей и основным местом их поглощения. В связи с этим происходят нарушения ряда физиологических процессов, что естественно приводит к сдвигам в структуре дыхательной поверхности жабр, выражающиеся в изменениях её гистологического строения [2; 5; 13; 19]. Объектом исследования были курунские сазаны, являющиеся одним из видов распространённых промысловых рыб Каспия. В настоящее время во многих рыбопроизводческих хозяйствах сазан выращивается до товарного вида. Целью работы было изучение воздействия сырой нефти высоких концентраций на жаберную ткань сазана.

### Материал и методика

Работа проводилась на молоди сазана (*Cyprinus carpio*), выращенной на Хыльинском рыбноводном заводе (Нефчалинский район, Азербайджан). Возраст подопытных рыб 6 месяцев, вес – 33,1- 41,6 г, длина – 19,5-25,4 см. Все рыбы (120 особей) содержались в ёмкостях объёмом 200 л с проточной водой при температуре 21-23°, их кормили олигохетами и мотылём в достаточном количестве. Для проведения гистопатологических опытов рыб брали из одной партии и распределяли по специальным аэрируемым рыбноводным ваннам объёмом 40 л по группам, каждая из которых состояла из 15 особей. Одна группа – контрольная, содержалась в воде без добавления сырой нефти. Остальные группы рыб содержались в загрязнённой воде с концентрацией сырой нефти 100, 300, 500 мг/л в течение 5, 10 и 15 суток. Сырая нефть была с месторождения «Нефтяные камни». Нарушения, имеющие место в жаберной ткани, изучались с помощью гематоксилин-эозиновой методики. Жабры заливали в парафин, затем резали на ротормном микротоме (Leica 2245), срезы толщиной 7 мкм окрашивали двумя красителями: гематоксилином по Майеру и эозином. Изучение окрашенных срезов проводили под световым микроскопом NU2 (Carl Zeiss, Jena), фотографирование – цифровой камерой Canon J-9.

### Результаты

Жаберный аппарат у сазана, как и у других костистых рыб, представлен четырьмя парами жаберных дуг. Каждая жаберная дуга несёт на себе два ряда лепестков, или первичных ламелл. Каждая первичная ламелла несёт на себе поочерёдно расположенные лепесточки, или вторичные ламеллы. Первичные и вторичные ламеллы покрыты оболочкой из эпителиальных клеток. Именно эпителиальные клетки вторичных ламелл, выполняющие основную функцию жабр – газовый обмен, называются дыхательным эпителием. Морфологическая организация как вторичных, так и первичных ламелл у контрольной группы рыб какой-либо выраженной патологии не имела (рис. 1), не считая изредка встречающиеся незначительные утолщения эпителиального слоя вторичных ламелл и их соприкосновение. Следует отметить, что вторичные ламеллы, расположенные на дистальном конце первичных ламелл, большей частью являются слитными между собой.

На пятые сутки воздействия сырой нефти при концентрации 100 мг/л в жаберной ткани у испытуемых рыб наблюдается отрыв дыхательного эпителия от поверхности отдельных вторичных ламелл (рис. 2), увеличение числа эпителиальных клеток на поверхности лепесточков – гиперплазия, которая происходит как вдоль ламеллы, так и на её вершине (*clubbing*). При воздействии сырой нефти в концентрации 300 мг/л в те же сроки (5 суток) отмечается процесс усиления гиперплазии, гипертрофия дыхательных эпителиальных клеток и слияние вершинок отдельных вторичных ламелл (рис. 3). При дальнейшем повышении концентрации сырой нефти в воде до 500 мг/л в жаберной ткани подопытных рыб было отмечено усиление неконтролируемой пролиферации эпителиальных клеток как первичных, так и вторичных ламелл, увеличение числа разрывов эпителиальной оболочки, инфильтрация форменных элементов крови, отмечается появление эозинофилов в межламеллярном пространстве. Наблюдается

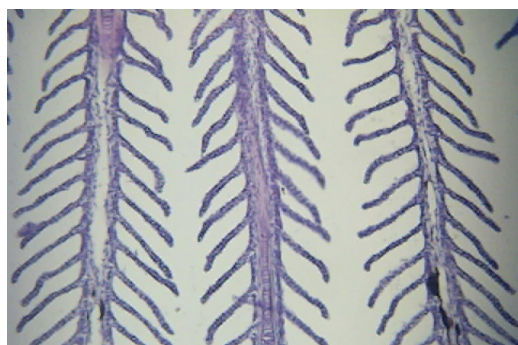


Рис. 1. Нормальная организация жабр у контрольной группы рыб

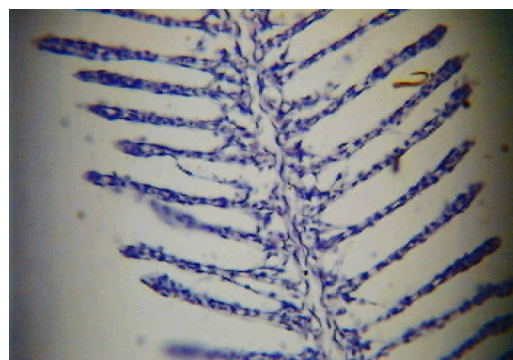


Рис. 2. Отрыв дыхательного эпителия



Рис. 3. Гиперплазия вторичных ламелл

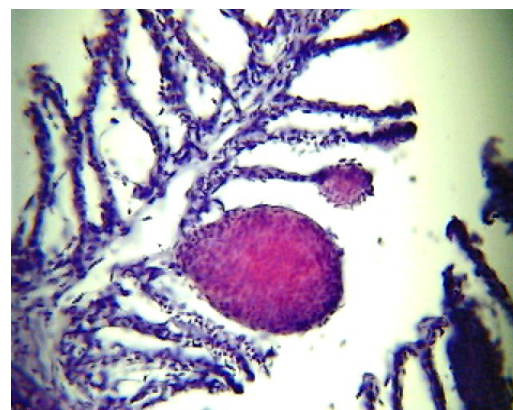


Рис. 4. Аневризм (Стасис)

также увеличение числа слияний соседних вторичных ламелл.

Воздействие сырой нефти в течение 10 суток проявило следующую картину. При её концентрации 100 мг/л в жаберной ткани отмечается гипертрофия клеток респираторного эпителия, как локальная гиперплазия эпителиальных клеток, так и тотальная, охватывающая целиком всю поверхность жаберных лепесточков; слияние нескольких лепесточков между собой и отдельные случаи геморрагии во вторичных ламеллах. При концентрации сырой нефти 300 мг/л к вышеперечисленным нарушениям прибавляются, не считая усиления выраженности патологии относительно воздействия 100 мг/л, расстройства сосудистой системы, проявляющиеся в виде отёков и застоя крови –

аневризмы (рис. 4). При концентрации сырой нефти 500 мг/л – гиперплазия и пролиферации охватывают достаточно большое число как первичных, так и вторичных ламелл, разрыв и отшелушивание эпителиальных клеток с поверхности лепесточков; геморрагию. Следует отметить, что наряду с увеличением числа эпителиальных клеток на лепесточках и утолщением стенок первичных ламелл, в жаберной ткани некоторых особей отмечены, наоборот, утоньшение эпителиального слоя и укорочение длины лепесточков. Сохраняется инфильтрация форменных элементов крови.

На 15 сутки нахождения рыб в воде, загрязнённой сырой нефтью при концентрации 100 мг/л, в жаберной ткани были отмечены нарушения, включающие: усиленное разрастание эпителиальных клеток с погру-



жением в них лепесточков и их сплошное слияние; отшелушивание эпителиальных клеток с поверхности лепесточков и искривление вторичных ламелл. При увеличении концентрации сырой нефти до 300 мг/л число искривлённых лепесточков возрастает; отмечается присутствие мест некроза ткани; отшелушивание эпителиальных клеток, значительное число искривлённых и аномальных лепесточков. При концентрации 500 мг/л наблюдается сплошное поражение жаберной ткани. В самой ткани отмечены многочисленные искривления и утолщения вторичных ламелл, отшелушивание дыхательного эпителия, оголение (исчезновение дыхательного эпителия с поверхности лепесточков).

### Обсуждение

В настоящем исследовании было изучено воздействие высоких концентраций сырой нефти (м/р «Нефтяные камни») на жаберную ткань молоди курицкого сазана. Изменения в жаберной ткани рыб считаются наиболее показательной реакцией организма на загрязнённость окружающей среды [8; 19]. Первой реакцией жаберной ткани на воздействие поллютанта у исследованных рыб было: отрыв дыхательного эпителия от поверхности ряда вторичных ламелл и разные формы гиперплазии. Как и у сазана, у трахинотуса (*Trachinotus carolinus*) первой отмеченной патологией при воздействии острых концентраций одного из производных сырой нефти явился отрыв дыхательного эпителия с поверхности вторичных ламелл [19].

Другая работа, проведённая на молоди зелёного эпинефелуса (*Epiner nelus coioides*) по воздействию высоких концентраций взвешенных частиц (рассматривалась плотность этих частиц в воде как один из важных параметров качества воды [10]) на жаберную ткань, показала нарушения в организации жаберной ткани, как и в настоящем эксперименте: отторжение респираторного эпителия, гиперплазия и уменьшение (редукция) эпителиального слоя [9]. Ранней реакцией жабр на токсикант (хлорпродуцирующий ок-

сидант) являлось отторжением (отставание) эпителиального слоя от поверхности вторичных ламелл (от пиллярных клеток), что было также отмечено и у лейостомуса (*Leiostomus xanthurus*). Как отмечается в работе, данная форма реакции не была приурочена к какому-либо одному месту на вторичных ламеллах, а охватывала почти всю поверхность вторичной ламеллы [14].

При воздействии высоких концентраций сырой нефти (300, 500 мг/л) в жаберной ткани сазана имели место сильные изменения, такие, как искривление и аномальность вторичных ламелл, их слияние, появление разного рода разрастания эпителиального слоя на поверхности обеих ламелл или их оголение. Сходные изменения в жаберной ткани молоди сазана показало при воздействии на неё очень высоких концентраций хрома и времени его воздействия. В жаберной ткани этих рыб отмечалось: утолщение дыхательного эпителия особенно на концах вторичных ламелл (*clabbling*); слияние соседних вторичных ламелл (*fusion*); **скручивание вторичных ламелл** (*curling*); отторжение эпителиального слоя (*lifting*) и некроз ткани [16]. Такие же сильные изменения были обнаружены в жабрах при воздействиях острых концентраций одного из производных нефти – дизельного топлива. Так, у ханоса (*Chanos chanos*) в жаберной ткани наблюдаются: лифтинг эпителиального слоя с поверхности вторичных ламелл, их слияние, отёк, аномальная форма вторичных ламелл, гипертрофия клеток жаберной ткани, а также застой крови на дистальных концах вторичных ламелл (*telangi-estasiya*) и отшелушивание эпителиальных клеток [11]. Как видно из полученных данных и из литературных источников, наиболее часто встречающимся нарушением в жаберной ткани при действии поллютанта является лифтинг – отхождение эпителиальной оболочки от поверхности вторичных ламелл. Затем по частоте следуют: слияние вторичных ламелл, их гиперплазия и внутренний отёк. Предполагается, что упомянутые повреждения являются основной реакцией жабр на гидрокарбонаты [17; 19]. Все эти изменения

нарушают газовый обмен и вызываются высокими дозами загрязнителя [19] и в основном они рассматриваются как защитная реакция организма [12]. Предполагается, что стазис или застой крови в жаберных капиллярах проявляется при очень высоких концентрациях поллютантов, например, производных нефти и приводит к нарушению как газового, так и ионного обмена, что в конечном итоге может привести к смерти организма [6]. По мнению ряда авторов, такие патологии, как некроз, полная потеря дыхательного эпителия вторичных ламелл, считаются, как правило, необратимыми [15; 19].

Таким образом, изменения (нарушения), найденные в жаберной ткани сазана в результате воздействия одноразовых высоких концентрациях сырой нефти, позволяют оценить степень её действия в зависимости от времени воздействия. Кроме того, несмотря на неспецифичность повреждений, гистологический анализ на рыбах позволяет иметь достаточно действенный инструмент для оценки качества окружающей среды, особенно, после случающихся по разным причинам выбросов или утечки сырой нефти и её продуктов в открытые акватории.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Аминова В.А., Яржомбек А.А. Физиология рыб. – М: Лёгкая и пищевая промышленность, 1984. – 200 с.
2. Джомерт С.Р., Касимов Р.Ю., Рустамов Э.К. Кратковременное воздействие сырой нефти на печёночную и жаберную ткани бычка-песочника *Neogobius fluviatilis* Palla // Известия АН Грузии. Серия биол. А, 2009б. Т. 35б, № 5-6. – С. 457-465.
3. Касимов Р.Ю., Рагимова Н.Г., Рустамов Э.К. Влияние нефтяного загрязнения на рыб Каспийского моря. I. Ранние этапы развития // Известия АН Азербайджана – 2000. – № 4-6. – С. 138-151.
4. Мехтиев А.Ш., Гюль А.К. Техногенное загрязнение Каспийского моря. – Баку: «Элм», 2006. – 180 с.
5. Рустамов Э.К., Касимов Р.Ю., Рагимова Н.Г. Влияние нефтяного загрязнения на рыб Каспийского моря. II. Поздние этапы развития // Известия АН Азербайджана. – 2000. – № 4-6. – С. 183-191.
6. Ahmad I., Pacheco M., Santos M.A. Naphthalene-induced differential tissue damage association with circulating fish phagocyte induction // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2003. – v. 54(1). – P. 7-15.
7. Akaishi F.M., de Assis H.C., Jakobi S.C., Eiras-Stofella D.R., St-Jean S.D., Courtenay S.C., Lima E.F., Wagener A.L., Scofield A.L., Ribeiro C.A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil // *Arch Environ Contam Toxicol*. – 2004. – V. 46(2). – P. 244-253.
8. Au D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review // *Marine Pollution Bulletin*. – 2004, v.48. – P. 817-834.
9. Au D.W.T., Pollino C.A., Wu R.S.S., Shin P.K.S., Lau S.T.F., Tang J.Y.M. Chronic effects of suspended solids on gill structure, osmoregulation, growth, and triiodothyronine in juvenile green grouper *Epinephelus coioides* // *Marine ecology progress series*. – 2004. – V. 266. – P. 255-264.
10. Total suspended solids // *Canadian Environmental Quality Guidelines*, Environment Canada. – Ottawa: CCREM (Canadian Council of Resource and Environment Ministers), 1987.
11. Hesni M.A., Savari A., Sohrab A.D., Mortazavi M.S. Gill histopathological changes in milkfish (*Chanos chanos*) exposed to acute toxicity of diesel oil // *World Applied Sciences Journal*. – 2011. – V. 14(10). – P. 1487-1492.
12. Mallatt J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review // *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. – 1985. – V. 42(4). – P. 630-648.
13. Mataqueiro M., Nakaghi S., Souza P., Cruz C., Oliveira G., Urbinati E. Histopathological changes in the gill, liver and kidney of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposed to various concentrations of trichlorfon // *J. Appl. Ichthyol*. – 2008, v. 25. – P. 124-127.
14. Middaugh D.P., Burnet L.E., Couch J.A. Toxicological and physiological responses of the fish, *Leiostomus xanthurus*, exposed to chlorine produced oxidants // *Estuaries*. – 1980. – V. 3 (2). – P. 132-141.
15. Pacheco M., Santos M.A. Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla Anguilla* L.) // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2002. V. 53(3). – P. 331-347.
16. Parvathi K., Sivakumar P., Sarasu C. Effects of chromium on histological alterations of gill, liver and kidney of fresh water teleost, *Cyprinus carpio* (L.) // *Journal of Fisheries International*. – 2011. – V. 6(1). – P. 1-5.

17. Prasad M.S. SEM study on the effects of crude oil on the gills and airbreathing organs of climbing perch *Anabas testudineus* // Bulletin of Environmental Contamination Toxicology. – 1991. – V. 47(6). – P. 882-889.
18. Salamat N., Zarie M. Using of fish Pathological alterations to assess pollution: a review // World journal of fish and marine sciences. – 2011. V. 4(3). – P. 223-231.
19. Santos T., Gomes V., Passos J., Rocha A., Salaroli R., Ngan P. Histopathological alterations in gills of juvenile Florida pompano *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae) following sublethal acute and chronic exposure to naphthalene // Pan-American Journal of Aquatic Sciences. – 2011. V. 6(2). – P. 109-120.
20. Schwaiger J, Wanke R., Adam S., Pawert M., Honnen W., Triebkorn R. The use of histopathological indicators to evaluate conminantrelated stress in fish // Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery. – 1997. V. 6. – P. 75-86.
21. Wilson J.M., Laurent P. Fish gill morphology: inside out // Journal of experimental zoology. – 2002. V. 293. – P. 192-213.

УДК 577.151.05+ 575.857

*Цветков И.Л., Поликарпова Л.В., Дроганова Т.С., Коничев А.С.*  
*Московский государственный областной университет*

## КОНСТАНТА МИХАЭЛИСА КАК БИОХИМИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ ВНУТРИВИДОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ МОЛЛЮСКОВ

*I. Tsvetkov, L. Polykarpova, T. Droganova, A. Konichev*  
*Moscow Regional State University*

### MICHAELIS CONSTANT AS A BIOCHEMICAL CRITERION OF INTRASPECIFIC DIFFERENTIATION OF RIVER SNAILS

*Аннотация.* Исследован характер изменчивости константы Михаэлиса ( $K_m$ ) кислой фосфатазы и ДНКазы у пресноводного моллюска живородки речной (*Viviparus viviparus* L.), собранного в естественных водоемах Московской области. Эта изменчивость была использована нами в качестве маркера дифференциации при анализе причин межпопуляционного полиморфизма моллюсков. Кластерный анализ позволил верифицировать избранный дифференциатор и предположить, что он указывает не столько на территориальную удаленность популяций и возможность их взаимопроникновения, сколько на зависимость от условий обитания в соответствующих водоемах. Показано, что обитание моллюсков в сходных условиях приводит к увеличению степени сходства  $K_m$  даже у полностью изолированных популяций.

*Ключевые слова:* кислая фосфатаза, дезоксирибонуклеаза, константа Михаэлиса, внутривидовой полиморфизм, пресноводный моллюск.

*Abstract.* We studied the character of the Michaelis constant ( $K_M$ ) variability of acid phosphatase and DNase in river snails (*Viviparus viviparus* L.) collected in the natural waters of the Moscow region. This variability was used as a differentiation marker in order to analyze the reasons of interpopulation polymorphism in this molluscan family. Cluster analysis allowed us to verify the chosen differentiator and to assume that it refers not only to the territorial remoteness of populations and the possibility of their interpenetration but also to their dependence on the environmental conditions in the corresponding reservoirs. It was shown that the degree of  $K_M$  similarity increases among completely isolated populations living in similar conditions.

*Key words:* acid phosphatase, deoxyribonuclease, Michaelis constant, intraspecific polymorphism, freshwater snail.