

УДК 57.043:574.21

<sup>1</sup>Б.Б. Каупбаева, <sup>1</sup>А.А. Кулатаева, <sup>1</sup>А.Ж. Хамитов, <sup>2</sup>Б.А. Умбаев  
<sup>2</sup>А.К. Цой, <sup>1</sup>Т.М. Шалахметова\*

<sup>1</sup>Казахский Национальный Университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>Центр наук о жизни, Назарбаев Университет, Казахстан, г. Астана

\*e-mail: tamara.shalakhmetova@kaznu.kz

### **Оценка генотоксического стресса у озерной лягушки (*Rana ridibunda*) в условиях эксперимента и природной среды при воздействии нефтезагрязнения**

Были проведены исследования генотоксического действия нефти из месторождений Атырауской области на лягушку озерную (*Rana ridibunda*) в эксперименте, а также определен уровень генетических нарушений у животных этого же вида из биотопов Атырауской области, подверженных и неподверженных нефтезагрязнению. Результаты исследования показали, что водорастворимая фракция нефти вызывает дозозависимый кластогенный эффект у озерных лягушек в лабораторных условиях. Установлено также, что у амфибий, обитающих на нефтезагрязненных территориях, развиваются генетические нарушения в соматических клетках, уровень которых в значительной степени превышает таковой у лягушек в эксперименте.

**Ключевые слова:** нефтезагрязнение, лягушка озерная, эритроцит, микроядерный тест, биоиндикатор.

Б.Б. Каупбаева, А.А. Кулатаева, А.Ж. Хамитов, Б.А. Умбаев А.К. Цой, Т.М. Шалахметова

#### **Тәжірибе жағдайында және табиғи ортаның мұнаймен ластануында көл бақасының (*Rana ridibunda*) генотоксиндік стресін бағалау**

Тәжірибе жағдайында көл бақасына (*Rana ridibunda*) кен орны Атырау облысы болып табылатын мұнайдың генетикалық потенциалы зерттелді, сонымен қатар мұнаймен ластануға ұшыраған және ластанбаған Атырау облысының биотоптарының осы түрге жататын жануарларының генетикалық зақымдалуының деңгейі анықталды. Зерттеу нәтижелері, мұнайдың суда еритін фракциясы тәжірибежағдайында көл бақаларында мөлшерге тәуелді кластогенді эффект тудыратыны, ал, мұнаймен ластанған территорияларда тіршілік ететін амфибияларда, соматикалық клеткаларында генетикалық зақымданулардың дамуына алып келетінін көрсетті.

**Түйін сөздер:** мұнаймен ластану, көл бақа, микроядролық тест, эритроцит, биоиндикатор

B. Kaupbayeva, A. Kulatayeva, A. Khamitov, B. Umbayev, A. Tsoy, T. Shalakhmetova

#### **Assessment of genotoxic stress on lake frog (*Rana ridibunda*) in experimental and environmental conditions under exposure to petropollution**

We have evaluated the genotoxic potential of oil from Atyrau region in experimental conditions on the lake frog (*Rana ridibunda*). Furthermore the level of genetic defects was defined for animals of the same species from biotops of Atyrau region which were either under exposure or unaffected by petro pollution. Our results indicated that water-soluble fraction of oil causes a dose-dependent clastogenic effect in the lake frogs under experimental conditions. Also it was established that amphibians from the oil-contaminated areas, have developed genetic damage in somatic cells the level of which greatly exceeds that of the frogs in the experiment.

**Key words:** petro pollution, lake frog, erythrocyte, micronucleus test, bioindicator.

Прикаспийский регион является местом сосредоточения нефтедобывающих комплексов Казахстана [1-3]. В этом регионе старейшей нефтегазодобывающей областью является Атырауская область, в которой добыча углеводородного сырья осуществляется с 1912 года, а

переработка нефти с 1945 года [4]. По прогнозам к 2030 г. в этом регионе планируется добывать до 80 млн. тонн нефти в год [3]. Увеличение объема нефтедобычи приводит к стабильному росту выбросов вредных веществ в окружающую среду. Так, общий валовой объем загрязняющих

веществ в Атырауской области за 2011 год составил 107368,45 тонны, в том числе от стационарных источников 97313,3 тонны, от передвижных 10055,15 тонны и основная доля загрязнений приходится на нефтегазовую отрасль [5,6]. Таким образом можно констатировать, что бурное развитие нефтегазовой промышленности является важнейшим антропогенным фактором, влияющим на экологическую ситуацию в Атырауской области. Здесь сложилась неблагоприятная экологическая ситуация, которая усугубляется опустыниванием, деградацией почв, истощением и загрязнением водных ресурсов, загрязнением атмосферы, сокращением биологического разнообразия и накоплением опасных и токсичных отходов [5-13]. Следует отметить, что уязвимость экосистем Атырауской области связана с тем, что большая часть территорий этого региона представлена пустынными и полупустынными ландшафтами со скудным видовым разнообразием [14]. Как известно, подобные экосистемы отличаются малой устойчивостью к воздействию человека. В этой связи особую важность приобретает изучение состояния природных популяций фоновых видов животных из биотопов, подверженных нефтезагрязнению.

Важным показателем нефти, как ксенобиотика, является наличие в составе ароматической фракции углеводородов, веществ мутагенной и канцерогенной природы, способных повреждать ДНК и способных привести к нарушению генетического гомеостаза и, как следствие, к снижению устойчивости популяций [15-19].

Для оценки такого воздействия используют биомаркеры генотоксических эффектов, которые могут проявляться в виде хромосомных aberrаций или образования фрагментов ядер, называемых микроядрами. Определение числа микроядер, называемое микроядерным тестом, является одним из наиболее распространенных и достаточно информативных тестов оценки генотоксического влияния неблагоприятных факторов окружающей среды, включая действие химических соединений и радиации [20,21]. Наиболее удобными для проведения микроядерного анализа являются позвоночные животные (рыбы, амфибии, рептилии, птицы) имеющие ядерные эритроциты [21]. Особого внимания заслуживает озерная лягушка – *Rana ridibunda*, которая является широко распространённым фоновым видом, с относительно небольшим ради-

усом индивидуальной активности, отсутствием сильной тенденции к миграции, высоким и достаточно хорошо изученным полиморфизмом, показатели организма которой отражает состояние локального местообитания [22]. Кровотворная система озерной лягушки очень чувствительна к изменениям состояния окружающей среды, поэтому определения количества микроядер в эритроцитах позволит оценить уровень повреждений генетического материала у конкретной особи и популяции в целом [23].

Сложность оценки воздействия нефти на биоту связана с тем, что нефть представляет собой смесь из 1000 индивидуальных веществ и тем, что состав нефти сильно варьирует в зависимости от месторождения [24]. Поэтому необходимо оценить генотоксический потенциал нефти из месторождений Атырауской области с помощью высокочувствительного микроядерного теста в лабораторных условиях на озерной лягушке (*Rana ridibunda*), а также определить уровень генетических нарушений у животных этого же вида из биотопов Атырауской области, подверженных и неподверженных нефтезагрязнению.

#### Материалы и методы

В экспериментах была использована сырая нефть месторождения Биикжал (скважина BS-4). Сырую нефть смешивали с водой в пропорции 1 : 9 с помощью магнитной мешалки в темноте в течение 48 часов. После перемешивания для разделения на фракции полученную смесь оставляли на 12 часов при комнатной температуре [25]. Далее с помощью делительной воронки отделяли водорастворимую фракцию, которую вводили в водную среду, где содержались озерные лягушки (*Rana ridibunda*) с частотой 2 дня, перед каждым днем предыдущая среда заменялась свежей.

В данных экспериментах всего было использовано 24 особи лягушек с массой тела 40-70 г. Животные были разбиты на 4 группы, по 6 животных в каждой: I – интактные животные (контроль, лягушки содержались в чистой воде); II- лягушки подвергались воздействию водорастворимой фракции сырой нефти в концентрации 0,05%, в течение 30 дней; III- лягушки подвергались воздействию водорастворимой фракции сырой нефти в концентрации 0,5%, в течение 30 дней; IV – лягушки подвергались воздействию водорастворимой фракции сырой нефти в кон-

центрации 1%, в течение 30 дней. В течение всего эксперимента амфибий содержали в акватеррариумах, которые имели габаритные размеры - Ш 31х В 31х Д 51 см.

Для оценки генетических аномалий у лягушки озерной из естественных биотопов, подвергнутых нефтезагрязнению, исследование проводили на половозрелых особях, которые были отловлены в 3 районах Атырауской области: 1) Махамбетский район - река Черная (рукав р. Урал 30 км от Атырау) - координаты WGS 84 - N 47°17.246', E 051°50.549', 2) город Атырау - Атырауский нефтеперерабатывающий завод (АНПЗ), координаты WGS 84 - N 47°04.480', E 051°56.835', 3) Исатайский район (территория нефтедобычи) – река Акбас, координаты WGS 84 - N 47°01.741', E 050°40.273'. Махамбетский район был принят за условный контроль в связи с меньшим числом нефтедобывающих предприятий.

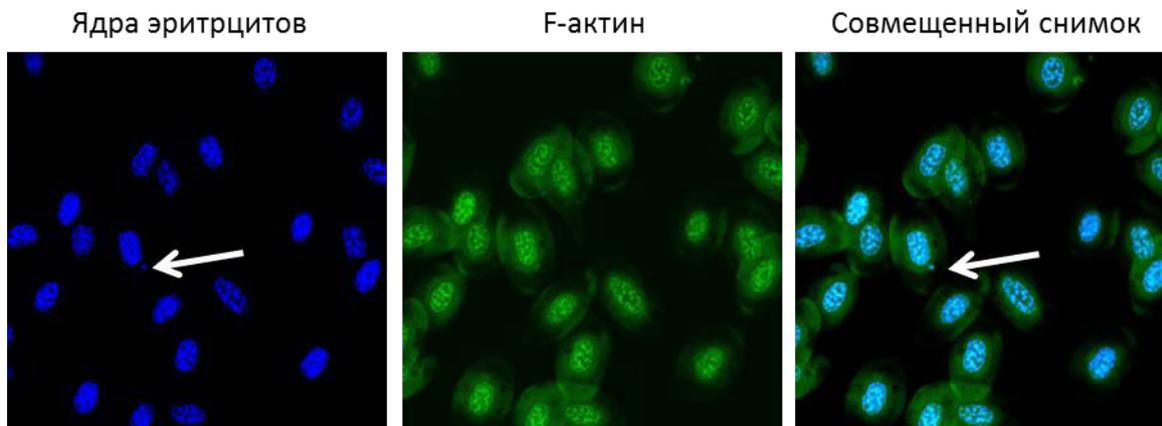
Для оценки уровня микроядер у исследуемых животных, как в эксперименте, так и у животных из природных популяций, во время забоя производили забор крови. Затем изготавливали мазки крови, которые фиксировали абсолютным метанолом. После чего полученные препараты окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид, Sigma), который, как известно, специфически окрашивает двухцепочечную ДНК. При этом максимум экстинкции конъюгата DAPI/ДНК наблюдается при длине волны 358 нм, а максимум эмиссии - 461 нм. По сравнению с традиционным методом окрашивания красителем Гимза данный метод обладает рядом преимуществ. Например, использование красителя Гимза может служить причиной фонового окрашивания цитоплазмы и появлению артефактов, иногда принимаемых за микроядра, что может привести к неверным подсчетам. DAPI, в отличие от красителя Гимза, является интеркалятором и специфически окрашивает только ДНК, что позволяет полностью исключить фоновое окрашивание цитоплазмы и появлению артефактов. DAPI не окрашивает цитоплазму клеток, однако для оценки локализации микроядра внутри клетки необходимо выявить ее границы. Исходя из этого, в настоящем исследовании для определения границ эритроцитов окрашивали их актиновый цитоскелет (F-актин) фаллоидином (Oregon green-phalloidin, Invitrogen) конъюгированным с

контрастным (по отношению к DAPI) флуоресцентным красителем Alexa 488 (экстинкция 495 нм, эмиссия 519 нм). Для окрашивания F-актина, до инкубирования клеток с красителем DAPI, проводили пермеабиллизацию клеток с помощью 0,1% раствора Тритон X-100 в течение 3 минут. Клетки промывали три раза по 5 мин в фосфатном буфере (pH 7,4) после чего инкубировали в 0,6 мкМ фаллоидина в течение часа, затем ополаскивали в фосфатном буфере.

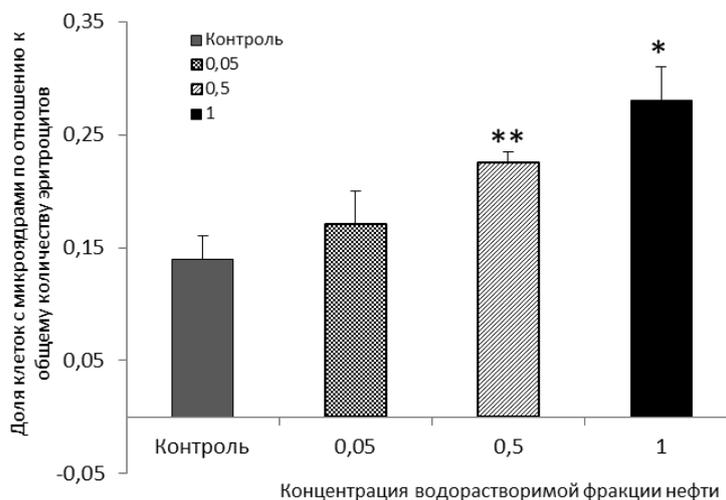
Для окрашивания мазков крови с помощью DAPI приготавливали стоковый раствор путем растворения 10 мг сухого красителя в 2 мл деионизированной воды. Для полного растворения DAPI в воде пробирку помещали в ультразвуковую мойку на 5 минут. После чего приготавливали рабочий раствор, для этого 1 мкл стокового раствора добавляли в 1 мл фосфатного буфера (pH 7,4). Мазки крови окрашивали в рабочем растворе DAPI в течение 5 минут, затем промывали три раза по 5 минут в фосфатном буфере (pH 7,4), высушивали на воздухе и заключали в специальную жидкость «Fluoromount» (Sigma) с низким коэффициентом преломления. Затем окрашенные мазки крови покрывали покровными стеклами и микроскопировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа (Carl Zeiss LSM 700).

Свечение окрашенных ядер и микроядер эритроцитов регистрировали с помощью высокочувствительного детектора - фотоэлектронного умножителя и программного обеспечения Zen Black Edition 2012. Основным отличием этого детектора от цифровых камер является его высокая избирательность к длинам волн света и сверхвысокая чувствительность. Таким образом, данная функциональная конструкция микроскопа позволяет отсекаать фоновое свечение и получать точный и чистый сигнал исключительно от определенного флуорофора.

Люминесценцию флуорофора Alexa 488 (экстинкция 495 нм, эмиссия 519 нм) возбуждали с помощью полупроводникового диодного лазера (488 нм) при диаметре конфокальной диафрагмы 1 условная единица, для возбуждения DAPI (экстинкция 358 нм, эмиссия 461 нм) использовали полупроводниковый диодный лазер (405 нм) при том же диаметре диафрагмы. Экспозицию устанавливали с помощью автоматических настроек в программе Zen Black Edition 2012 и использовали для всех групп без изменений.



**Рисунок 1** – Флуоресценция ядер (а), F-актина (б) и микроядер (с) (показано стрелками) в эритроцитах озерной лягушки (*Rana ridibunda*), подвергнутых воздействию водорастворимых фракций нефти. Увеличение x400.



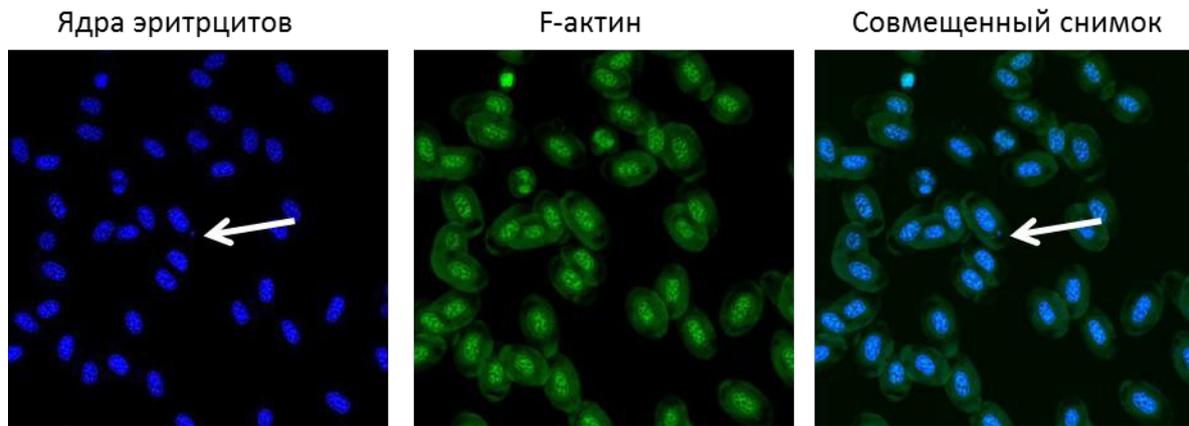
**Рисунок 2** – Количество микроядер (%) в эритроцитах интактных и подвергнутых воздействию водорастворимых фракций нефти лягушек (*Rana ridibunda*). \* -  $P \leq 0,05$ ; \*\* -  $P \leq 0,01$ , по сравнению с контролем.

Окончательную обработку снимков проводили с помощью программного обеспечения ImageJ версии 1.48P в модификации Fiji. Определяли соотношение количества эритроцитов с микроядрами к общему числу проанализированных клеток. Результаты количественных исследований подвергались статистической обработке. Во всех случаях определяли средние значения и ошибку средней величины. Достоверность различий средних величин оценивали, используя t-критерий Стьюдента. Различия счи-

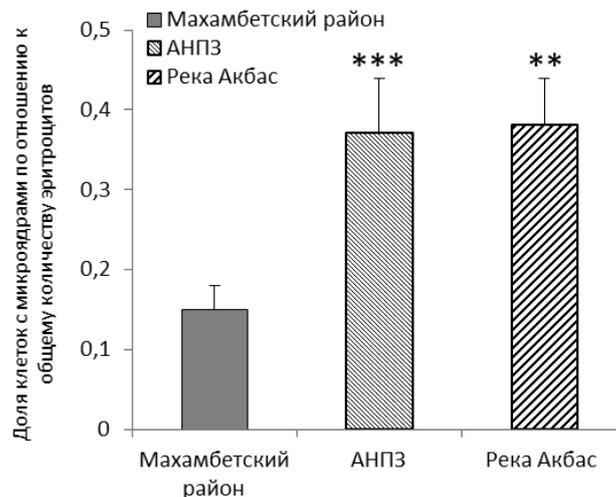
тались достоверными при доверительной вероятности, равной 0,95.

#### Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены флуоресцентные изображения эритроцитов озерной лягушки, подвергнутых воздействию разных концентраций водорастворимой фракции нефти в эксперименте. Реакция DAPI выявляла ярко синее-голубое свечение ядер эритроцитов (рисунок 1а), однако границы клеток при этом не обнаруживались. Окрашивание препаратов Oregon green-



**Рисунок 3** – Флуоресценция ядер (а), F-актина (б) и микроядер (с) (показано стрелками) в эритроцитах озерной лягушки (*Rana ridibunda*) из биотопов Атырауской области, подвергнутых нефтезагрязнению. Увеличение x400.



**Рисунок 4** – Количество микроядер (%) в эритроцитах озерной лягушки (*Rana ridibunda*) из биотопов вокруг АНПЗ (г.Атырау) и реки Акбас (Исатайский район) по сравнению с животными из биотопов реки Черная (Махамбетский район). \*\* -  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* -  $P \leq 0,001$  по сравнению с условно чистыми биотопами (Махамбетский район).

phalloidin (фаллоидином) на белки цитоскелета (F-актин) позволило определить четкие границы эритроцитов по характерному зеленому свечению (рисунок 1б). При совместном окрашивании DAPI и Oregon green-phalloidin четко определялась локализация микроядер, которые располагались в светящейся зеленым цветом цитоплазме эритроцитов и имели одинаковое с клеточным ядром ярко голубое свечение (рисунок 1с).

Это позволило произвести подсчет количества микроядер в эритроцитах озерных лягушек и выявить их дозозависимое увеличение (рису-

нок 2). Числа микроядер у интоксцированных животных возрастало при воздействии концентрации 0,05% в 1,2 раза; при 0,5% в 1,6 раз и при 1% в 2 раза по сравнению с интактными животными.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что даже самые небольшие дозы (0,05 %) водорастворимой фракции нефти способны вызывать кластогенный эффект у озерных лягушек. Высокие концентрации водорастворимой фракции нефти (0,5 и 1,0 %) в значительной степени индуцируют генетические нарушения у амфибий.

Исследования животных природных популяций из биотопов Атырауской области, подвергнутых нефтезагрязнению, также выявили генотоксические нарушения в эритроцитах (рисунок 3 и 4). Следует отметить, что у озерных лягушек из биотопов, подверженных и неподверженных нефтезагрязнению, проявление флуоресцентных реакций было абсолютно идентичным, с точки зрения специфичности, как и у лабораторных животных (рисунок 3). Реакция DAPI выявляла сине-голубое свечение ядер (рисунок 3а), реакция с фаллоидином Oregon green-phalloidin – зеленую флуоресценцию цитоплазмы клеток (рисунок 3б), а совместное окрашивание DAPI и Oregon green-phalloidin – ярко голубое свечение микроядер (рисунок 3с).

Результаты количественного анализа уровня микроядер в эритроцитах исследуемых животных представлены на рисунке 4.

Видно, что в эритроцитах озерной лягушки из биотопов вокруг АНПЗ, количество клеток с микроядрами превосходит данный показатель

условного контроля в 2,5 раза, а количество клеток с микроядрами у животных из биотопов реки Акбас в 2,6 раза. Вместе с тем, по сравнению с лабораторными животными, которые подвергались интоксикации водорастворимой фракцией нефти, у лягушек природных популяций из биотопов, подвергнутых нефтезагрязнению, доля микроядер была выше, что может свидетельствовать о присутствии в среде обитания значительных концентраций нефти или нефтепродуктов.

На основании полученных результатов можно заключить, что у озерных лягушек, обитающих на нефтезагрязненных территориях, развиваются генетические нарушения в соматических клетках, причиной которых может являться загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами. Озерная лягушка может служить, таким образом, удобным тест-объектом для оценки степени загрязненности экосистем нефтью и ее производными.

#### Литература

- 1 Dahl C., Kuralbayeva K. Energy and the environment in Kazakhstan // *Energy Policy*. -2001. -Vol. 29, № 6. - P. 429-440.
- 2 Kaiser M.J., Pulsipher A.G. A review of the oil and gas sector in Kazakhstan // *Energy Policy*. -2007. -Vol. 35, № 2. - P. 1300-1314.
- 3 Babali T. Prospects of export routes for Kashagan oil // *Energy Policy*. -2009. -Vol. 37, № 4. - P. 1298-1308.
- 4 Lydolph P.E., Shabad T. THE OIL AND GAS INDUSTRIES IN THE U.S.S.R // *Annals of the Association of American Geographers*. -1960. -Vol. 50, № 4. - P. 461-486.
- 5 Сериков Ф. О.Б. Экологический мониторинг и анализ состояния здоровья населения нефтегазоносных районов Атырауской области // *Поиск*. -2002. № 4. - P. 116-122.
- 6 Кенжегалиев А. Ж.Е., Хобдабергенова Г., Бозахаева З. . Состояние загрязнения Каспийского моря нефтяными углеводородами // *Нефть и газ Казахстана*. -1997. № 2. - P. 122-126.
- 7 З.Т. Д. Нефтехимическая загрязненность почв Прикаспийского региона // *Вестник КазГНУ. Сер. экологическая*. -2001. -Vol. 1, № 8. - P. 70-75.
- 8 Moore M.J., Mitrofanov I.V., Valentini S.S., Volkov V.V., Kurbskiy A.V., Zhimbey E.N., Eglinton L.B., Stegeman J.J. Cytochrome P4501A expression, chemical contaminants and histopathology in roach, goby and sturgeon and chemical contaminants in sediments from the Caspian Sea, Lake Balkhash and the Ily River Delta, Kazakhstan // *Mar Pollut Bull*. -2003. -Vol. 46, № 1. - P. 107-19.
- 9 de Mora S., Sheikholeslami M.R., Wyse E., Azemard S., Cassi R. An assessment of metal contamination in coastal sediments of the Caspian Sea // *Marine Pollution Bulletin*. -2004. -Vol. 48, № 1-2. - P. 61-77.
- 10 Tolosa I., de Mora S., Sheikholeslami M.R., Villeneuve J.P., Bartocci J., Cattini C. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in coastal Caspian Sea sediments // *Mar Pollut Bull*. -2004. -Vol. 48, № 1-2. - P. 44-60.
- 11 Netalieva I., Wessler J., Heijman W. Health costs caused by oil extraction air emissions and the benefits from abatement: the case of Kazakhstan // *Energy Policy*. -2005. -Vol. 33, № 9. - P. 1169-1177.
- 12 Efendiyeva I.M. Ecological problems of oil exploitation in the Caspian Sea area // *Journal of Petroleum Science and Engineering*. -2000. -Vol. 28, № 4. - P. 227-231.
- 13 de Mora S., Villeneuve J.-P., Reza Sheikholeslami M., Cattini C., Tolosa I. Organochlorinated compounds in Caspian Sea sediments // *Marine Pollution Bulletin*. -2004. -Vol. 48, № 1-2. - P. 30-43.
- 14 Lee V.M. Biomedicine. Tauists and beta-aptists united--well almost! // *Science*. -2001. -Vol. 293, № 5534. - P. 1446-7.
- 15 Hsie A.W., Brimer P.A., O'Neill J.P., Epler J.L., Guerin M.R., Hsie M.H. Mutagenicity of alkaline constituents of a coalified crude oil in mammalian cells // *Mutation Research/Genetic Toxicology*. -1980. -Vol. 78, № 1. - P. 79-84.
- 16 Sheppard E.P., Wells R.A., Georghiou P.E. The mutagenicity of a Prudhoe Bay crude oil and its residues from an experimental in situ burn // *Environmental Research*. -1983. -Vol. 30, № 2. - P. 427-441.

- 17 Pelroy R.A., Sklarew D.S., Downey S.P. Comparison of the mutagenicities of fossil fuels // *Mutation Research/Genetic Toxicology*. -1981. -Vol. 90, № 3. - P. 233-245.
- 18 Kennish J.M., French S.B. Trace water-soluble components from Prudhoe bay crude oil: Chemical characterization and mutagenicity // *Marine Environmental Research*. -1984. -Vol. 14, № 1-4. - P. 506-510.
- 19 Pashin Y.V., Bakhitova L.M. Mutagenic and carcinogenic properties of polycyclic aromatic hydrocarbons // *Environ Health Perspect*. -1979. -Vol. 30. - P. 185-9.
- 20 Bolognesi C. The micronucleus test as a biomarker of genomic damage: The validation process in environmental animals // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. -2010. -Vol. 157, Supplement 1, № 0. - P. S12-S13.
- 21 Fernandez M., L'Haridon J., Gauthier L., Zoll-Moreux C. Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating in vivo genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assessment // *Mutat Res*. -1993. -Vol. 292, № 1. - P. 83-99.
- 22 Gomez-Mestre I., Tejedo M. Local adaptation of an anuran amphibian to osmotically stressful environments // *Evolution*. -2003. -Vol. 57, № 8. - P. 1889-99.
- 23 Zhuleva L., Dubinin N.P. [Use of the micronucleus test for assessing the ecological situation in regions of the Astrakhan district] // *Genetika*. -1994. -Vol. 30, № 7. - P. 999-1004.
- 24 McCain W.D. *The Properties of Petroleum Fluids*. : PennWell Books, 1990.
- 25 Anderson J.W., Neff J.M., Cox B.A., Tatem H.E., Hightower G.M. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish // *Marine Biology*. -1974. -Vol. 27, № 1. - P. 75-88.