

УДК 591.3: 615.917

П. Сайлаубекова*, А. Гинц, Д. Байгазиева, М. Ашилова,
Е. Мухатаев, Л. Лебедева, Г. Рахимжанова

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

*E-mail: pakizats@gmail.com

**Изучение влияния водорастворимой фракции нефти
на развитие эмбрионов полосатого данио
(*Danio rerio*)**

В работе представлены результаты эксперимента по изучению влияния водорастворимых фракций нефти (месторождение Каракудук) на развитие зародышей полосатого данио (*Danio rerio*) in vivo. Показано, что воздействие водорастворимой фракции нефти в концентрациях 10%, 30% и 50% от объема среды приводит почти к 100% смертности эмбрионов до стадии 24 ч.п.о. при всех исследуемых концентрациях. Задержка и нарушения развития начинаются со стадии хвостовой почки (10 ч.п.о.), гибель зародышей наступает в последующие несколько часов.

Ключевые слова: водорастворимые фракции нефти, эмбрионы, полосатый данио (*Danio rerio*), эмбриотоксичность.

P. Sailaubekova, A. Gintz, D. Baygazieva, M. Ashilova,
E. Mukhataev, L. Lebedeva, G. Rakhimzhanova

**The investigation of oil water soluble fractions effects
on *Danio rerio* embryonic development**

The work is dedicated to investigation of oil water soluble fractions (Karakuduk oilfield) influence on development of *Danio rerio* embryos in vivo. It was shown that exposure to oil water soluble fractions in concentrations of 10%, 30% and 50% of incubation medium lead to almost 100% embryo mortality to stage 24 hpf even in least concentration. Delay and alterations in development began at tail bud stage (10hpf) with subsequent embryos death. The exposure of oil water soluble concentrations even in least concentration 10% of incubation media resulted in embryos death on stages of early organogenesis.

Keywords: oil water soluble fractions, embryo, *Danio rerio*, embryotoxicity.

П. Сайлаубекова, А. Гинц, Д. Байгазиева, М. Ашилова,
Е. Мухатаев, Л. Лебедева, Г. Рахимжанова

***Danio rerio* эмбриондарының дамуына
мұнайдың суда еритін фракцияларының әсерін зерттеу**

Бұл жұмыста in vivo жағдайында жолақ *Danio rerio* ұрығының дамуына мұнайдың (Қаракұдық) суда еритін фракцияларының әсерін тәжірибе арқылы зерттеп, нәтижелері ұсынылып отыр. Зерттеу нәтижелері көрсеткендей мұнайдың суда еритін фракцияларының 10%, 30% және 50% көлемдегі концентрациялары 24 сағат кезеңіндегі эмбриондардың 100% өліміне алып келді. Дамудың бұзылуы мен тоқталуы құйрық бүршігі жағынан басталып, бірнеше сағат ішінде эмбриондардың өліміне алып келді. Мұнайдың суда еритін фракцияларының 10% концентрациясының әсері ерте органогенез кезеңіндегі өліміне алып келді.

Түйін сөздер: мұнайдың суда еритін фракциялары, эмбриондар, *Danio rerio*, эмбриоулылық.

Нефть и нефтепродукты относятся к приоритетным загрязнителям окружающей среды, особую опасность они представляют как загрязнители гидросферы, поскольку крупнейшие нефтегазоносные бассейны расположены в шельфовых зонах океана и внутренних морей. За время освоения нефтегазовых месторождений экологическая обстановка в Атырауской, Мангыстауской, Западно-Казахстанской, Актюбинской и других областях Казахстана, и особенно в прибрежной зоне Каспийского моря, значительно ухудшилась в результате загрязнения рек, использования устаревших технологий добычи, транспортировки и переработки углеводородных ресурсов, а также в связи с утечкой нефти из затопленных скважин [1, 2]. Нефтяное загрязнение вод приводит к нарушению кислородного обмена в поверхностных слоях воды и оказывает токсическое воздействие на гидробионты. Как известно, наиболее уязвимы те виды, которые подвергаются воздействию нефти во время эмбрионального развития. После печально известной аварии в Мексиканском заливе мировое научное сообщество стало уделять больше внимания изучению влияния нефти на ихтиофауну, особенно хозяйственно ценные виды рыб. В Мексиканском заливе нерестятся около 52 видов рыб, среди которых много промысловых. Работы по изучению влияния на рыб нативной нефти Макондо и её водорастворимых фракций, особенно полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), выявили отклонения в развитии у зародышей тихоокеанской сельди и представителей семейства губановых [3].

В Каспийском море, как известно, обитают более 100 видов рыб, многие из которых – ценные промысловые виды (сазан, судак, карп, кефаль, килька, лещ, лосось, окунь и др) [4]. В Каспии сосредоточено 90% мировых запасов осетровых рыб, биопродуктивность которых с каждым годом снижается. Недооценка негативных эффектов нефти и нефтепродуктов на качество половых продуктов и развитие икры рыб может привести к потере многих ценных, эндемичных и краснокнижных видов рыб этого уникального водоема. Поэтому исследование влияния нефти на развитие гидробионтов, обитающих в водоемах, подверженных нефтезагрязнению, своевременны и крайне необходимы, особенно в части определения эмбриотоксичности нефти и нефтепродуктов. При этом, необходимо учитывать

состав нефтей разных месторождений, так как в данном регионе они значительно различаются. Оценка эффектов нативной нефти на процессы эмбрионального развития позвоночных животных крайне важна с позиции, как экологии, так и фундаментальной биологии и санитарии, учитывая возможность экстраполяции данных на вышших позвоночных и человека.

Изучение влияния ксенобиотиков на развитие гидробионтов *in situ* затруднительно, поэтому встал вопрос о разработке адекватной тест-системы по оценке эмбриотоксичности приоритетных загрязнителей водоемов. В последние годы в эмбриологических исследованиях в качестве модели используются эмбриональные стволовые клетки, однако подобные исследования не приемлемы во многих странах по этическим соображениям и законодательно запрещены. Исходя из этого, Организация Экономического Сотрудничества и Развития (ОЭСР) одобрила использование в эмбриотоксикологических исследованиях *Danio rerio* для оценки токсичности соединений для зародышей рыб – так называемый Fish Embryo Toxicity (FET) тест. Эта модель позволяет сократить затраты средств, времени и избежать этических проблем [5]. В настоящей статье, для изучения влияния водорастворимых фракций каспийской нефти на процессы индивидуального развития рыб мы использовали FET тест на *Danio rerio*.

Материалы и методы исследования

Исследования по эмбриотоксичности водорастворимых фракций нефти были проведены на зародышах *Danio rerio*. Производителей для получения икры содержали в аквариуме объемом 60 л с плотностью посадки из расчета 2 л на рыбу, при естественной смене дня и ночи, средней температуре 22-24°C. Гнездо готовых к размножению рыб (соотношение самцов и самок 3:2) отсаживали в нерестовый аквариум, предварительно обеззараженный, на дно которого была помещена сепараторная сетка. Температура в нерестовом аквариуме составляла 27°C. Посаженные с вечера в прогретую свежую воду производители мечут икру рано утром. Отнерестившихся производителей убирали из нерестового аквариума, сепараторную сетку встряхивали и также удаляли, икру собирали и отбирали оплодотворенные икринки для последующего эксперимента. Для получения водорастворимой фракции

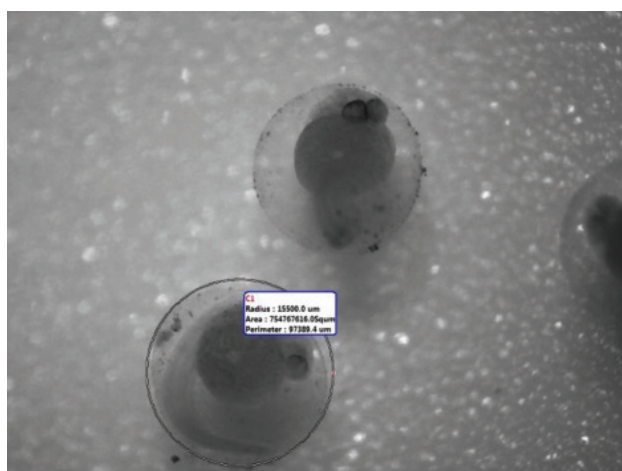
товарной нефти (месторождение Каракудук), её смешивали с дистиллированной водой в соотношении 1:10 и перемешивали на магнитной мешалке в течение суток. Затем смесь оставляли до полного разделения фракций, водорастворимую фракцию тщательно отфильтровывали и хранили при 4°C до использования. Эмбрионы были распределены на четыре группы: контрольная группа и три экспериментальные группы с добавлением водорастворимой фракции нефти в концентрациях 10%, 30% и 50% от объема среды инкубации. Икринки помещали в стерильный 12-ти луночный планшет для инкубирования, по 10 икринок на лунку. Каждая из четырех групп повторялась трижды. Икринки инкубировали при 27°C. Экспозиция фракциями нефти составляла 1 час, после чего среду инкубирования заменяли на чистую воду с добавлением метиленовой сини, чтобы предотвратить грибковое инфицирование. Анализ эмбрионов проводили *in vivo*, используя цифровой стереомикроскоп MotiC 320 со встроенной камерой и выводом изображения на экран ПК. Часть выживших эмбрионов фиксировали в 4% нейтральном забуференном формалине до последующего анализа.

Результаты и обсуждение

В нашем исследовании мы использовали зародыши полосатого данио (*D. rerio*) для исследо-

вания токсических эффектов водорастворимых фракций нефти. Эксперимент начинали приблизительно через 5 часов после оплодотворения. В контрольной группе смертность эмбрионов составляет около 10%, причем наибольшая гибель приходится на 12 и 24 часа после оплодотворения. Через 24 ч после оплодотворения зародыши находятся в стадии фарингулы, нотохорд хорошо различим, начинается пигментация зародыша, появляется пульсация сердца (рисунок 1). Дальнейшая инкубация зародышей в планшете сильно осложняется, так как возрастают требования эмбрионов к содержанию кислорода.

Экспозиция зародышей полосатого данио водорастворимыми фракциями нефти в течение часа приводит к повышенной смертности зародышей. Наибольшая смертность наблюдалась через 12 и 24 часа после оплодотворения – практически 90% эмбрионов погибли до стадии 24 ч п/о (рисунок 2). Причину гибели зародышей определить очень трудно, однако наблюдаются патологические изменения в развитии, в виде сильного отека гипобласта (рисунок 2). Изменения в развитии были зафиксированы через три часа после экспозиции – на стадии хвостовой почки (10 ч п/о) и по завершении обрастания. Все эмбрионы с зафиксированными явлениями отека гибли в течение последующих нескольких часов.



а



б

Рисунок 1 – Контрольная группа – эмбрионы *D. rerio*, 24 ч.п.о, увеличение 4х,

а – хорион сохранен,

б – хорион удален, окрашивание кармином после фиксации 4% забуференным формалином

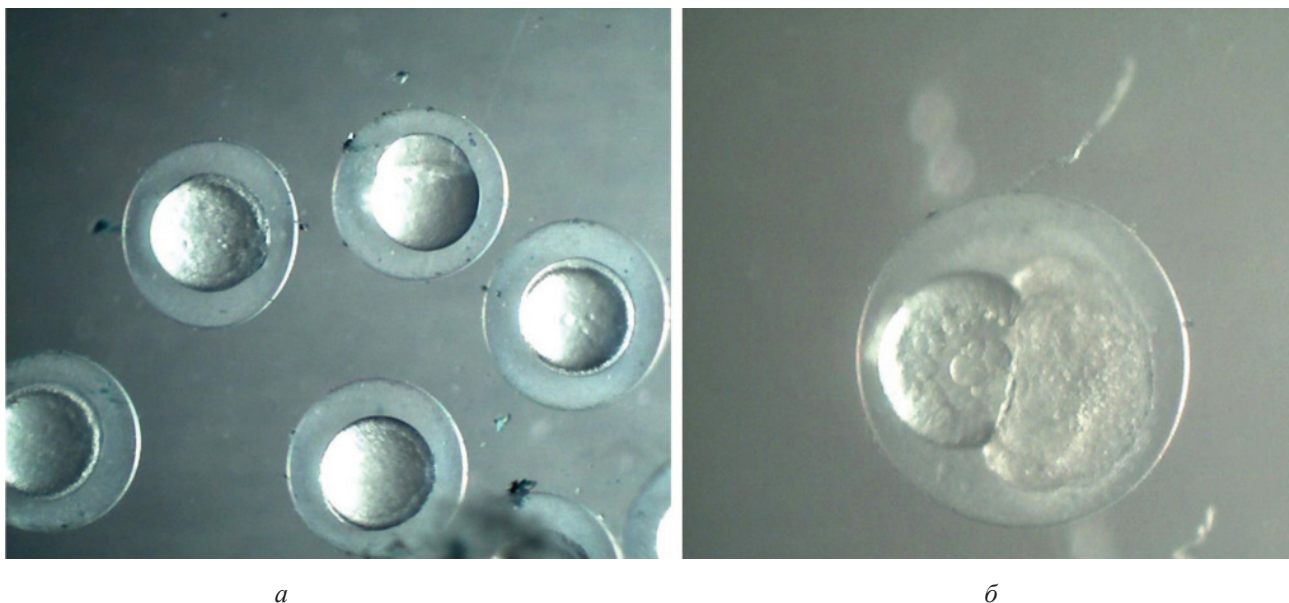


Рисунок 2 – Опытная группа – эмбрионы *D. rerio*, 10 ч.п.о., экспозиция 30% водорастворимой фракцией нефти.
а – х2, б – х4, нарушение развития

Механизмы эмбриональной токсичности детально не изучены ни для одного химического соединения, и лишь для немногих из них – в известной степени. Большинство эмбриотоксических исследований с *D. rerio* в качестве тест-объекта касаются полиароматических соединений, пестицидов, наибольшее внимание уделяется эмбриотоксичности 2,3,7,8-тетрахлородибензо-р-диоксина (ТХДД). Вместе с тем, исследований, касающихся воздействия нативной нефти на процессы эмбрионального развития *D. rerio* очень мало. Воздействие водорастворимых фракций нефти вызывает у зародышей *D. rerio* нарушения в развитии висцерального черепа и сосудистой системы, гисто- и органогенеза, избыточный апоптоз, нарушение локомоции и тд [3].

Примеров использования *D. rerio* в качестве модельного объекта в токсикологии и фармакологии не так много, как лабораторных грызунов. Однако, по мере улучшения технологии, появления мутантных линий *D. rerio*, внедрения высокопроизводительного скрининга и разработки новых методов исследования использование вида *Danio rerio* в качестве модельного объекта будет все более распространяться. Следует особо отметить, что, для *D. rerio*, более чем для какого-либо другого вида рыб, изучена «норма», включая эмбриональное развитие, морфологи-

ческие, биохимические и физиологические показатели для рыб на всех стадиях жизненного цикла, причем обоих полов. Это делает *Danio rerio* идеальным объектом для токсикологических исследований с целью изучения потенциальных эффектов химического воздействия и, в том числе, водорастворимых фракций нефти.

Тест FET с 2005 года является обязательным компонентом рутинных исследований сточных вод в Германии и уже стандартизован на международном уровне. Результаты исследований эмбриотоксичности более чем 143 ксенобиотиков подтверждают эффективность использования эмбрионов рыб для оценки токсичности и доказывают возможность экстраполяции данных FET на млекопитающих [6]. В начале 90-х насчитывалось более 100 публикаций с использованием *D. rerio* в качестве тест-объекта. К концу столетия эта цифра увеличилась до 1000 публикаций в год, и на 2008 г. было зарегистрировано около 3500 публикаций с использованием *D. rerio* в качестве биотеста на эмбриотоксичность [7].

Главные достоинства использования эмбрионов *D. rerio* в качестве модели для токсикологических исследований следующие: 1) возможность *in vitro* наблюдать процессы в целом организме; 2) более быстрое, по сравнению с грызунами, развитие при значительной генетической

гомологии *D.rerio* и человека; 3) маленький размер производителей, легкость разведения, возможность получения до 300 зародышей с пары производителей; 4) маленький размер (~ 1 мм), вес (< 1 мг) и прозрачность зародышей позволяют легко проводить микроскопические исследования; 5) исследования проводятся на планшетах для культивирования клеток, что позволяет уменьшить объемы тестируемых веществ и реагентов; 6) полная расшифровка генома *D.rerio*, большая база данных различных исследований, связанных с изучением данного вида; 7) экспрессия генов и наиболее ранние стадии развития крайне консервативны у всех позвоночных животных, означая определенное сходство морфологии зародышей позвоночных [8]. При исследовании токсических эффектов водорастворимых фракций бразильской нефти (API27, Petrobras Campos Basin, Brazil) на ранние стадии эмбрионального развития *D.rerio* в течение 96 часов после оплодотворения, были обнаружены замедление сердечного ритма, ослабление пигментации, дефекты формирования хвоста и повышенная смертность зародышей [9]. Воздействие высоких концентраций нативной нефти вызывало гибель зародышей в результате развития летального порока сердца. Исследователи предположили, что главной причиной

гибели эмбрионов является кардиотоксическое действие ПАУ, входящих в состав нефти. Длительное воздействие нефти на взрослых особей *D.rerio* вызывает незначительные изменения в анатомии сердца и снижение минутного объема сердца [10]. Было доказано, что ПАУ обладают выраженным кардиотоксическим эффектом, сила которого зависит от структуры соединений [11]. В экспериментах по воздействию ПАУ на эмбрионы горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha*) показано увеличение смертности, отеки и анемия зародышей, задержка выклева, что свидетельствует о замедлении процессов развития [12].

В нашем эксперименте, воздействие водорастворимых фракций нефти месторождения Каракудук даже в концентрации 10% от объема среды приводит к задержке и нарушению развития эмбрионов, почти к 100% гибели зародышей до стадии 26 ч п/о. Необходимо дальнейшее проведение экспериментов по экспозиции эмбрионов *D.rerio* водорастворимыми фракциями нефти в меньших концентрациях, для выявления причин гибели эмбрионов. Несомненно, что сильное загрязнение водоемов водорастворимыми фракциями нефти и нефтепродуктов с большой долей вероятности приведет к гибели икры пелагических рыб.

Литература

- 1 S. de Mora, M. R. Sheikholeslami, Eric Wyse, Sabine Azemard, Roberto Cassi. An assessment of metal contamination in coastal sediments of the Caspian Sea // Marine Pollution Bulletin, Vol. 48, Issues 1-2, 2004, Pages 61-77
- 2 Netalieva, J. Wesseler, W. Heijman. Health costs caused by oil extraction air emissions and the benefits from abatement: the case of Kazakhstan // Energy Policy, Vol. 33, Issue 9, 2005, Pages 1169-1177
- 3 de Soysa TY, Ulrich A, Friedrich T et al. Macondo crude oil from the Deepwater Horizon oil spill disrupts specific developmental processes during zebrafish embryogenesis // BMC Biol., 2012. – 10(1):40. [Epub ahead of print]
- 4 Almaty (2008) The book. Animal life of the shores and waters of the Kazakhstan sector of the Caspian Sea // Ed: Muftakh D. Diarov, Alexandr A. Bolshov, Fedor A. Sarayev, Tlepkazy Zh. Yergaliyev, Atamura press, 423 pp.
- 5 OECD (2006) OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 222. Guideline for the testing of chemicals. Fish embryo toxicity (FET) Test.
- 6 Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? // Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2009. – 149(2). – pp.196-209.
- 7 R.T. Peterson, R. Nass, W.A. Boyd, J.H. Freedman, Ke Dong. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study // Neurotoxicology., 2008. – 29(3). – pp. 546–555.

- 8 M.C. Schmale, R.S. Nairn, R.N. Winn. Aquatic Animal Models of Human Disease // *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2007. – 145(1). – pp. 1–4.)
- 9 Pauka LM, Maceno M, Rossi SC, Silva de Assis HC Embryotoxicity and biotransformation responses in zebrafish exposed to water-soluble fraction of crude oil // *Bull Environ Contam Toxicol*. 2011, – 86(4). – pp.389-393.
- 10 Corinne E. Hickena, Tiffany L. Linbob, et al. Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish // *PNAS*, 2011. – 108 (17). – pp. 7086–7090
- 11 Westerfield, M. (2000). *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.
- 12 OECD (2000) OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23. Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environment Directorate, OECD, Paris.