

**А. А. ТАШЕНОВА, М. Х. БАЙМУХАМЕДОВА, Н. П. КАБЫШЕВА, С. Б. ЗАЙПАНОВА,
Е. А. АРЫНОВА, К. М. БЕКЕТОВ, Е. Ж. ЖУМАБЕКОВ, Л. Б. ДЖАНСУГУРОВА**

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРИОРИТЕТНЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ ИЛЕ-БАЛХАШСКОГО РЕГИОНА В КРАТКОСРОЧНЫХ ТЕСТАХ

Институт общей генетики и цитологии

Изучен токсический потенциал наиболее распространенных загрязнителей воды из пяти точек Иле-Балхашского региона в кратковременных тестах: оценка мутагенности в тесте Эймса, исследование цито- и эмбриотоксичности на эукариотических моделях. По результатам химического анализа во всех пробах воды выявлено превышение ПДК по нитритам/нитратам, а также по концентрациям тяжелых металлов. Сравнительный анализ данных химического анализа и результатов определения генотоксичности свидетельствует о том, что именно высокое содержание тяжелых металлов в пробах воды является основным генотоксическим фактором.

Иле-Балхашский бассейн (ИББ) занимает территорию, площадью 413 тысяч км², часть которой находится в юго-восточной части страны, другая часть – на прилегающей к Китаю территории (северо-западные районы Синьцзянь-Уйгурского автономного округа). Река Или (протяженность на территории Казахстана составляет 815 км), берущая свое начало в Китае, является главным водоемом, впадающим в озеро Балхаш, обеспечивая 80 процентов притока воды в озеро.

В Прибалхашье проживает около 16% населения Казахстана. Население казахстанской части бассейна составляет порядка 3,3 миллионов человек. Большая часть – 1,6 миллионов – жители Алматинской области. Сельское население составляет 1,5 миллиона человек.

Регион располагает активно разрабатываемыми крупными месторождениями полиметаллических руд, каменного угля, строительных материалов, характеризуется отдаленным последствием Семипалатинского ядерного полигона, испытывает техногенную нагрузку промышленных предприятий Караганды, Алматы, Жамбыла и Усть-Каменогорска. Огромные площади земель традиционно используются для земледелия.

Промышленное загрязнение ИББ значительно. Центр загрязнения – озеро Балхаш, что связано с работой медеплавильного и цинкового завода, являющегося причиной неконтролируемого загрязнения. Городское население также имеет большое значение, а именно, высокий уровень населения и его высокая концентрация в городе Алматы.

Актуальным для Казахстана является исследование и управление окружающей средой в ИББ.

Целью исследований было изучение токсического действия основных загрязнителей водных экосистем ИББ в кратковременных тестах: оценка генотоксического потенциала в тесте Эймса, исследование цито- и эмбриотоксичности на эукариотических моделях.

Материалы и методы исследований

Материалом для исследований являлись пробы воды из 5 наиболее загрязненных точек ИББ:

1) Точка №1 – побережье реки Или и Чарын (Алматинская область, Панфиловский район, окрестности г. Жаркента и п. Чунджи).

2) Точка №2 – впадение реки Каскелен и реки Большой Алматинки в Капчагайское водохранилище в окрестностях г. Капчагай и пос. Николаевка (Алматинская область, Карасайский район);

3) Точка №3 – побережье реки Или в окрестностях г. Акжар и г. Баканас (Алматинская область), возле моста им. Д. А. Конаева;

4) Точка №4 – побережье озера Балхаш в окрестностях г. Приозерск и г. Сары-Шаган (Каргандинская область, Балхашский район);

5) Точка №5 – побережье озера Балхаш в районах медеплавильного и цинкового завода (г. Балхаш, Карагандинская область).

Материал отбирали в 3-х повторностях (для химического анализа) и по 3 дополнительные пробы для анализа: цито- и эмбриотоксичности, мутагенности и канцерогенности с использованием различных тест-систем.

Химический анализ проб воды проводился в лаборатории физико-химических методов анализа и экологии АО «Институт химических наук им. А. Б. Бекетурова» по стандартизованным методикам (ГОСТ 29269; СТ РК ИСО 8288-2005 Качество воды; СТ РК ГОСТ Р 51309-2003 Вода питьевая; МУК 4.1.1274-03; МУК 4.1.667-97; ГОСТ 277537-88; РД 52.34.581-95; РД 52.34.580-95).

Для определения цито- и эмбриотоксичности, а также мутагенности использовали пробы воды, стерилизованные автоклавированием.

Определение цитотоксичности проводили по стандартным методикам [1, 2]. В работе использованы первичные (клетки куриных фибробластов, КФ) и перевиваемые культуры клеток (клетки МДСК, перевиваемая культура клеток почки собаки Мадин-Дарби и злокачественно трансформированные клетки человека РД, рабдомиосаркома). Пробы воды готовили путем добавления 10-кратного солевого раствора Хенкса (9:1) с целью сохранения нормального осмотического давления. После 2-х часовой экспозиции с пробами воды в культуральные флаконы вносили поддерживающую питательную среду и инкубировали клетки при 37 °C. На одно разведение препарата использовали 3 флакона с монослоем культуры клеток. Цитотоксическое действие препарата на клетки учитывали по степени изменения монослоя и контролировали в течение 3 суток. Контролем служили интактные клетки такого же срока культивирования. Все опыты проводили в трехкратной повторности. Статистическую обработку проводили общепринятыми методами [3].

Эмбриотоксичность оценивали на 10-дневных развивающихся куриных эмбрионах (КЭ) по стандартной методике [4]. На каждую пробу воды использовали по 20 КЭ, опыты проводили в 3 повторностях. Контролем являлись куриные эмбрионы такого же срока инкубации, которым введено по 0,2 мл дистиллированной воды.

Для оценки мутагенности использована тест-система *Salmonella*/микросомы, штаммы TA100 и TA98 (тест Эймса) [5,6]. Набор указанных штаммов позволяет регистрировать действие мутагенов, вызывающих замену пар оснований в молекуле ДНК (штамм TA100) и сдвиг рамки считывания генетического кода (штамм TA98). В качестве позитивных контролей использовали стандартные мутагены НММ и ДДТДП.

Результаты исследований и их обсуждение

По результатам химического анализа во всех пробах воды не выявлено превышения ПДК по фенолам, бенз[а]пирену, однако выявлено превышение ПДК по содержанию нитритов/нитратов (от 1,35 до 2,4 ПДК), а также по концентрациям тяжелых металлов. При определении содержания тяжелых металлов обнаружено превышение ПДК в пробах воды: в точке № 1 – по кобальту (24 ПДК), в точке №2 – по свинцу (4 ПДК) и кобальту (20 ПДК), в точке №3 – по кобальту (20 ПДК), в точке №4 – по кадмию (2 ПДК), свинцу (3 ПДК) и кобальту (30 ПДК), в точке №5 – по кобальту (24 ПДК). Таким образом, во всех пробах выявлено превышение ПДК по кобальту в 20–30 раз.

Для анализа цитотоксичности каждый опыт проводили в трех повторностях. Степень токсичности проб воды в культуре клеток (цитотоксическое действие, ЦТД) оценивали по четырехкрестовой системе, где 100% деструкция клеток обозначается четыре креста +++, на 75% обозначается тремя крестами ++, на 50% обозначается двумя крестами ++ и на 25% обозначается одним крестом +. Минимальная концентрация испытуемого вещества, вызывающая цитотоксический эффект на 50% (++) , рассматривается как цитопатогенная доза (ТЦД₅₀).

В табл. 1 приведены данные, полученные в трех опытах.

Таблица 1. Определение цитотоксичности проб воды

№ флакона	Пробы воды					
	Контроль	1	2	3	4	5
Клетки куриных фибробластов						
1	---	---	---	+-	++-	---
2	---	---	---	++-	++-	+-
3	---	---	---	+-	++-	---
Клетки МДСК						
1	---	---	---	+-	++-	+-
2	---	---	---	+-	+-	---
3	---	---	---	+-	++-	---
Клетки РД						
1	---	---	---	+-	++-	+-
2	---	---	---	+-	++-	+-
3	---	---	---	+-	+-	---
Цвет среды	желто-розовый	желто-розовый	желто-розовый	розовый	розовый	желто-розовый
Токсичность, %	0	0	0	26,7±2,88	44,5±4,79	11,1±4,81

Примечание: * – степень выраженности ЦГД через 24 часа:
 +++++ – выраженная дегенерация клеточного монослоя;
 +--- – умеренная дегенерация клеточного монослоя;
 +- – слабая дегенерация клеточного монослоя;
 ---- – отсутствие дегенерации клеток.

Помимо морфологии клеток показателем жизнеспособности клеток является цвет питательной среды в сосудах с клеточными культурами. В норме, т.е. при наличии жизнеспособных клеток, среда имеет окраску, характерную для данного красителя (желтовато-розовый или оранжевый цвет) при слабокислом или нейтральном значении – pH (6,8–7,2).

Как следует из данных табл. 1, пробы воды из точек №3 и №4 проявили цитопатогенное действие, отмечена умеренная и слабая дегенерация клеточного монослоя (++, +). Морфология клеток менялась не сильно, но цвет питательной среды (сдвиг pH среды в щелочную сторону) свидетельствовал о снижении жизнеспособности культур. Остальные испытуемые пробы не оказали токсического действия. Клетки имели морфологию, характерную для изучаемой клеточной культуры, округления и отторжения их от поверхности стекла не отмечено.

Для определения эмбриотоксичности использовали 10-дневные куриные эмбрионы (КЭ). При проверке жизнеспособности эмбрионов обращали внимание на состояние зародыша (размеры, отечность, кровоизлияния) и оболочек (отечность, некрозы и кровоизлияния). За время инкубации эмбрионы просматривали под овоскопом каждый день до вылупления цыплят. В конце опыта регистрировали суммарную гибель эмбрионов, отмечая следующие показатели: а) ранняя гибель – на 2–4 дни инкубации; б) поздняя гибель – на 5–10 дни инкубации; в) вылупляемость цыплят. В табл. 2 приведены данные определения эмбриотоксичности изученных проб воды.

Таблица 2. Результаты определения токсичности для развивающихся куриных эмбрионов проб воды, взятых в различных регионах Алматинской области

№ пробы	Общее кол-во КЭ	Ранняя гибель	Поздняя гибель	Вылупилось цыплят	Выживаемость, %
Точка №1	60	4	5	51	85±5,00
Точка №2	60	3	3	54	90±5,00
Точка №3	60	9	3	48	80±5,00
Точка №4	60	12	6	42	70±8,66
Точка №5	60	6	6	48	80±9,00
Контроль (дист. вода)	60	2	1	57	95±8,66

Из данных табл. 2 следует, что анализируемые пробы воды из точек №1 и №2 при введении их в хорион-аллантоисную полость 10-дневных куриных эмбрионов не оказали выраженного эмбриотоксического действия. Однако снижение жизнеспособности куриных эмбрионов было отмечено при действии проб воды из точек №3 (побережье реки Или в окрестностях г. Акжар и г. Баканас), №4 (побережье оз. Балхаш в окрестностях г. Приозерск) и 5 (побережье озера Балхаш в районах медеплавильного и цинкового завода).

Для выявления мутагенной активности проб воды использовали стандартный тест Эймса. В каждом контрольном и опытном варианте использовали по 3 чашки на каждую модель. Эксперимент повторяли трижды. Учет результатов проводили через 48 часов инкубации и высчитывали среднее количество ревертантов на чашку в трех повторах (превышение уровня ревертантов над контролем до 2 раз – отсутствие мутагенного эффекта (–); превышение в 2–10 раз – слабый мутаген (+); превышение в 10–100 раз – мутаген средней силы (++) ; превышение в 100–1000 раз – сильный мутаген (+++). Полученные результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3. Мутагенная активность проб воды в стандартном методе Эймса

№ пробы	Среднее количество ревертантов на чашку		Превышение над контролем (О/К)		Результат	
	ТА 100	ТА 98	ТА 100	ТА 98	ТА 100	ТА 98
Контроль спонт.	16,00 ±1,03	9,00 ±1,20	1,50	0,75	–	–
ДМСО	22,00± 2,00	18,00± 1,70	1,10	1,05	–	–
НММ	602,00±6,40	–	37,8	–	–	–
ДДГДП	–	367,00±6,80		40,70		
№1	22,00±2,10	19,00±1,80	1,04	1,05	–	–
№2	20,00±1,05	19,00±1,90	1,90	1,00	–	–
№3	33,00±2,80	23,00±2,02	1,17	1,13	–	–
№4	25,00±2,20	12,60±0,98	1,13	1,28	–	–
№5	23,40±2,40	17,30±1,60	0,97	1,08	–	–

Как видно из табл. 3, в стандартном teste Эймса без метаболической активации, пробы воды из всех исследованных точек ИББ не проявляют мутагенной активности.

Сравнивая полученные данные по исследованию генотоксичности с данными химического анализа, можно отметить, что именно высокое содержание тяжелых металлов в пробах воды является основным генотоксическим фактором. Так, умеренные цито- и эмбриотоксические эффекты были зарегистрированы для пробы №4, в которой обнаружено наиболее высокое содержание кобальта (30 ПДК), а также превышение ПДК по кадмию и свинцу.

Изучение мутагенного эффекта данных проб воды в тестах на *Drosophila melanogaster* показало, что все изученные пробы, за исключением проб воды из точки №3, проявляют повышенный уровень мутагенеза, выраженный в индукции рецессивных летальных мутаций аутосом и X-хромосомы. Канцерогенного эффекта в teste на дрозофиле не выявлено. Отмечено, что проявляемый пробами воды из ИББ уровень мутагенности коррелирует с содержанием кобальта [7]. Возможно, что для проявления генотоксического эффекта в teste Эймса необходима метаболическая активация.

ЛИТЕРАТУРА

1 Дьяконов Л.П., Глухов В.Ф., Поздняков А.А. и др. Культура клеток и тканей животных. Учебно-методическое пособие. – Ставрополь, 1980.

2 «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» / Под общ. ред. Р. У. Хабриева. 2005.

3 И. П. Ашмарин и соавт., 1974.

4 Ильенко В.И. Методы испытания и оценки противовирусной активности химических соединений в отношении вируса гриппа (методические указания). – Л., 1977.

5 Ames B.N., Mc Cann J., Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian – microsome mutagenicity test* // *Mutat. Res.* – 1975. – V. 31. – P. 347-364.

6 Абилев С.К. Вывявление и прогнозирование мутагенной активности химических соединений окружающей среды: автореферат дис. – М., 2003.

7 Амиргалиева А.С., Хусаинова Э.М., Бекетов К.М., Жумабеков Е.Ж., Мить Н.В., Джансугурова Л.Б. Изучение мутагенного эффекта основных загрязнителей воды Иле-Балхашского бассейна с использованием в качестве тест-системы плодовой мушки *drosophila melanogaster* // *Вестник КазНУ*. – Серия экологическая. – 2011.– №2. (В печати).

*A. A. Тәшенова, М. Х. Баймұхамедова, Н. П. Қабышева, С. Б. Заипанова,
Е. А. Арынова, К. М. Бекетов, Е. Ж. Жұмабеков, Л. Б. Жансугурова*

**ИЛЕ-БАЛҚАШ ӨҢІРІНІҢ СУ ЭКОЖҮЙЕСІН ЛАСТАНДЫРУШЫЛАРДЫҢ
ТОКСИКАЛЫҚ БЕЛСЕНДІЛІГІН ҚЫСҚА УАҚЫТТЫҚ ТЕСТ АРҚЫЛЫ ЗЕРТТЕУ**

Иле-Балқаш өнірінің бес нүктесінен алынған суды ластайтын токсингендік әлеуеттері қысқа уақыттық тестінде: Эймс тестінде мутагенділігі, цито және эмбриотоксикалық зукариоттық үлгілерде зерттелді. Химиялық талдау інтижелері бойынша нитриттар/нитраттар барлық су үлгілерінде КШМ (Концентраттың шектелінген мөлшері), сондай-ақ ауыр металдар концентрацияларының да жоғары екендігін көрсетті. Салыстырмалы талдау алынған химиялық талдау және алынған генотоксикалық қабілеттілігін анықтау, су үлгілеріндегі ауыр металдардың болуы негізгі генотоксикалық фактор деп табылды.

*A. A. Tashenova, M. X. Baimukhamedova, N. P. Kabysheva, S. B. Zaipanova,
E. A. Arynov, K. M. Beketov, E. Zh. Zhumabekov, L. B. Zhansugurova*

**STUDY OF PRIORITY POLLUTANTS OF WATER ECOSYSTEM TOXICITY
OF ILE-BALKHASH REGION AT SHORT-TERM TESTS**

The toxicity of more common water pollutants from five points of Ile-Balkhash region was researched using short-term tests such as mutability assessment by Aims test, cyto- and embryotoxicity on eucariotic models. The results of chemical analysis of all water samples identified the excess of limit permissible concentration of nitrite/nitrate, and of heavy metals concentration. Comparative study of chemical analysis data and results of the determination of genotoxicity testified that high content of heavy metals in water samples is the main genotoxic factor.