

УДК 575.4.23:595.7:581.14:582.26:591.8

Т.М.Шалахметова\*, М.А.Суворова, Л.Р.Сутуева, А.С.Ондасынова, М.С.Жанкулова,  
Р. Иманкулова

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Республика Казахстан, г. Алматы  
\*E-mail: Tamara.Shalakhmetova@kaznu.kz

### **Ингаляционное действие паров сырой нефти месторождения Кумколь на крыс**

Статья посвящена исследованию биохимических показателей системы детоксикации ксенобиотиков, продуктов перекисного окисления липидов и ферментов антиоксидантной защиты клеток печени и почек лабораторных крыс при субхроническом ингаляционном воздействии паров нативной нефти месторождения Кумколь. Установлено достоверное снижение активности цитохрома P450, глутатион-S-трансферазы, СОД, каталазы и увеличение содержания ГПЛ и МДА в печени и почках, что свидетельствует об активации процессов ПОЛ и угнетении функции детоксикации и антиоксидантной защиты у интоксцированных животных.

**Ключевые слова:** месторождение Кумколь, нефть, ингаляционное воздействие, крысы, печень, ферменты детоксикации, продукты ПОЛ.

Т.М.Шалахметова, М.А.Суворова, Л.Р.Сутуева, А.С.Ондасынова, М.С.Жанкулова,  
Р. Иманкулова

### **Құмкөл кен орны шикі мұнай буларының егеуқұйрықтарға ингаляциялық әсері**

Мақала Құмкөл шикі мұнай булары субхроникалық ингаляция зертханалық егеуқұйрықтардың бауыр мен бүйрек клеткаларында биохимиялық ксенобиотиктердің детоксикация параметрлерін, липидтердің тотығуын, антиоксиданттық ферменттерін зерттеуге арналған. Цитохром P450, глутатион-S-трансфераз, СОД, каталазының айтарлықтай төмендеуі және бауыр мен бүйректе ГПЛ және МДА белсендіруі табылды. Ол уланған жануарлардың детоксикация және антиоксиданттық қорғау функциясының ауырлатуын көрсетеді.

**Түйін сөздер:** Құмкөл мұнай кен орны, мұнай, ингаляция, бауыр, егеуқұйрықтар, детоксикация ферменттер, липопероксидация өнімдері.

Shalakhmetova T.M., Suvorova M.A., Sutuyeva L.R., Ondassynova A.S., Zhankulova M.S., Imankulova R.  
**The inhalation effect of vapors of crude oil from the Kumkol field in rats**

The article investigates the biochemical parameters of detoxification of xenobiotics, lipid peroxidation and antioxidant enzymes of liver and kidney cells of laboratory rats after subchronic inhalation of vapors of native Kumkol oil. It was found a significant decrease in the activity of cytochrome P450, glutathione-S-transferase, SOD, catalase, and increase of lipid hydroperoxides and MDA in the liver and kidney, indicating the activation of lipid peroxidation and inhibition of detoxificational function and antioxidant protection in poisoned animals.

**Keywords:** Kumkol oilfield, inhalation, rats, liver, detoxification enzymes, lipid peroxidation products

В районах нефтяного загрязнения животные *in situ* подвергаются воздействию не только нефти, но и целого ряда других загрязнителей, в частности, сопутствующих тяжелых металлов [1]. Поэтому перед проведением токсико-экологических исследований на биоту в нефтезагрязненных регионах необходимо выявить токсические эффекты непосредственно нефти данного месторождения на лабораторных животных, а затем сопоставлять полученные показатели, например, системы ПОЛ и детоксикации, у животных природных популяций, обитающих в данном регионе. В настоящем исследовании проведено изучение влияния нефти месторождения Кумколь, расположенного на границе Кызылординской и Карагандинской областей, на лабораторных грызунов, с тем, чтобы в дальнейшем оценить состояние фоновых видов в экосистемах данных территорий. Нефть месторождения Кумколь - малосернистая, содержит много легких бензиновых (20%) и керосиновых (15%) фракций, в большом количестве n-алканы, но в отличие от других казахстанских нефтей - меньше циклических соединений [2]. Исходя из данного состава нефти, содержащей

большое количество летучих веществ, нами, в качестве способа введения, был выбран ингаляционный, представляющий наибольшую опасность для живых организмов. В качестве биомаркерных показателей были взяты биохимические, а именно показатели системы детоксикации и антиоксидантной защиты, перекисного окисления липидов (ПОЛ), как отражающие состояние животных при воздействии ксенобиотиков. Ранее подобные исследования были проведены нами на амфибиях при воздействии нефти из месторождений Каракудук и Биикжал Мангыстауской области [3], и были выявлены положительные корреляции исследуемых показателей у лабораторных животных и животных природных популяций из биотопов, подверженных воздействию нефтезагрязнения в данном регионе. Таким образом, целью настоящего исследования явилось изучение показателей процессов ПОЛ, систем детоксикации и антиоксидантной защиты в печени и почках лабораторных грызунов при субхроническом ингаляционным воздействием паров нативной нефти месторождения Кумколь.

#### **Материалы и методы исследования**

Для выявления ингаляционного влияния паров нефти на лабораторных грызунов исследования проводились на половозрелых беспородных белых крысах-самцах, массой 250 - 300 г. Животные для эксперимента были представлены Вивариумом факультета биологии и биотехнологии КазНУ имени аль-Фараби. Для адаптации, до начала эксперимента в течение недели животные выдерживались на карантине, а затем делились на две группы - интактные и подвергавшиеся экспозиции парами нефти. Животные содержались в клетках по пять в каждой, воду и пищу получали *ad libitum*. В рацион животных входили зерновые, свежая зелень, постное вареное мясо для поддержания баланса белковых, жировых и углеводных компонентов пищи.

Ингаляция парами сырой нефти из месторождения Кумколь проводилась индивидуально в специальной ингаляционной камере объемом 5 л в течение 2 часов. Ингаляция проводилась 5 раз в неделю в течение 30 дней, после чего животные умерщвлялись в соответствии с международными требованиями под эфирным наркозом. Сразу же после забоя образцы печени и почек перфузировали охлажденным 0,1 М фосфатно-солевым буферным раствором. Для получения гомогената тканей кусочки печени и почек измельчали на льду и гомогенизировали в 10 мл того же буфера с помощью гомогенизатора Potter-Elvehjem, а затем центрифугировали при 6000 в течение 40 минут. Супернатант отбирали и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  для последующего биохимического анализа.

Среда для гомогенизации содержала 20 мМ НЕРЕС, 1,0 мМ ЭДТА, 210 мМ маннитола и 70 мМ сахарозы (для определения СОД); 1,0 мМ ЭДТА, 1,0 мл/л тритон-Х (для определения каталазы); 2,0 мМ ЭДТА для определения глутатионтрансферазы.

Методика биохимического определения содержания гидроперекисей липидов в печени и почках основана на измерении светопоглощения конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов в области 232-234 нм [4]. Для определения содержания малонового диальдегида в супернатанте гомогената печени животных использовали метод с тиобарбитуровой кислотой [5]. Для изоляции микросом использовали модифицированный метод Шенкмана и Цинти [6]. Активность глутатион-S-трансферазы (GST) определяли согласно протоколу (набор Cayman Technologies) [7]. Данный метод основан на измерении конъюгации 1-хлор-2,4-динитробензена с редуцированным глутатионом, что свидетельствует об активности GST в образцах печени. Метод определения активности супероксиддисмутазы основан на количественном измерении красного формазана. Он образуется в результате восстановления нитросинего тетразолия и супероксидных радикалов, которые генерируются ксантинооксидазой. 50% ингибирования этой системы соответствуют 1 условной единице активности данного фермента. Для определения активности каталазы применяли метод H.Luck [8].

#### **Результаты исследований и их обсуждение**

Для изучения влияния нативной нефти из месторождения Кумколь был проведен ряд экспериментов по субхроническому ингаляционному воздействию нефти на белых

беспородных крыс. Животные, отобранные для контрольных групп, в течение всего эксперимента сохраняли хороший аппетит, адекватное поведение, шерсть оставалась чистой и блестящей. При субхронической интоксикации сырой нефтью в течение 30 дней у животных не отмечалось изменений аппетита, незначительно снижалось водопотребление, шерсть становилась более тусклой, взъерошенной, отмечалось пожелтение уrogenитальной области, наблюдались также признаки слабого угнетения центральной нервной системы - крысы становились более вялыми, сонными, менее любопытными. Данные явления обусловлены слабым наркотическим действием алканов нефти и их угнетающим действием на центральную нервную систему. У интактных животных не отмечалось признаков расстройства нервной системы. У интоксигированных животных изучались основные молекулярные, клеточные и тканевые биомаркеры нефтяного воздействия.

В качестве клеточных биомаркеров воздействия нефти нами рассматривались уровень первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов, а также основные ферменты детоксикации и антиоксидантной защиты в клетках печени и почек.

Как известно, одним из основных показателей состояния внутренних мембран в клетках является уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ). Это физиологический процесс, но при увеличении активных метаболитов, радикалов и активных форм кислорода данный процесс может стать избыточным и привести к нарушению целостности мембран клетки. Степень ПОЛ можно определить по содержанию в тканях первичных и вторичных продуктов перекисления липидов – гидроперексидом липидов (ГПЛ) и малонового диальдегида (МДА). Результаты определения продуктов ПОЛ при экспериментальной интоксикации крыс парами сырой нефти из месторождения Кумколь в течение 30 дней представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Уровень гидроперексидов липидов (ГПЛ) и малонового диальдегида (МДА) в печени и почках крыс при ингаляции парами сырой нефти из месторождения Кумколь в течение 30 дней,  $M \pm m$

	ГПЛ		МДА	
	контроль	нативная нефть	контроль	нативная нефть
печень	4,9±0,1	6,9±0,2***	1,6±0,1	3,5±0,2***
почки	4,4±0,1	7,4±0,3***	1,5±0,1	4,0±0,2***
Примечание: * $P \leq 0,05$ ; ** $P \leq 0,01$ ; *** $P \leq 0,001$ по сравнению с интактными животными (контроль)				

Как в печени, так и в почках интоксигированных крыс наблюдалось достоверное увеличение продуктов ПОЛ. Так, уровень ГПЛ и МДА в печени крыс при ингаляции нефтью увеличивался соответственно в 1,4 и в 1,7 раз ( $P \leq 0,001$ ) по сравнению с контролем. В почках уровень ГПЛ был выше контрольного в 2,6 раза ( $P \leq 0,001$ ), а в печени - в 2,0 раза ( $P \leq 0,001$ ). Таким образом, уровень ПОЛ в почках интоксигированных крыс был на 10% выше, чем в печени. По-видимому, некробиотические процессы в выделительной системе преобладали.

Инактивация продуктов перекисного окисления в клетках осуществляется ферментами антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазой и каталазой. Супероксиддисмутаза осуществляет инактивацию радикалов кислорода, которые могут возникнуть в ходе биологических реакций переноса электронов или при воздействии металлов с переменной валентностью, токсических веществ, радиации. Каталаза - геминовый фермент, содержащий в активном центре трехвалентное железо, катализирует реакцию разрушения перекиси водорода, накапливаемой при ПОЛ, и при этом образуются вода и молекулярный кислород.

Активность антиоксидантных ферментов в печени и почках крыс, интоксигированных парами нативной нефти месторождения Кумколь показана на рисунках 1 и 2.

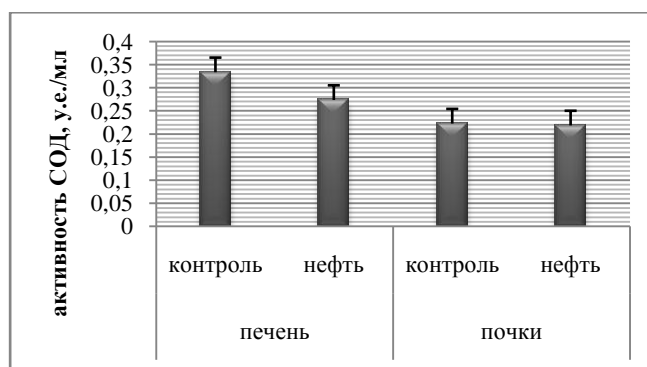


Рисунок 1 – Активность супероксиддисмутазы (СОД) в печени и почках крыс при ингаляции парами нефти месторождения Кумколь в течение 30 дней,  $M \pm m$

Как видно из данных рисунков, при ингаляции парами сырой нефти в печени крыс наблюдалось понижение уровня супероксиддисмутазы на 18% по сравнению с контролем ( $P \leq 0,05$ ), а в почках достоверной разницы уровня СОД не было обнаружено.

Недостаточность активности фермента антиоксидации способствует распространению неконтролируемого процесса ПОЛ. В отношении другого фермента антиоксидантной защиты – каталазы, наблюдается понижение активности и в печени и в почках – на 11% и 10%, соответственно. Такая низкая активность ферментов антиоксидантной защиты при довольно высоком уровне продуктов перекисного окисления свидетельствует о невозможности клетки противостоять нарастающему уровню перекисидации мембран.



Рисунок 2 – Активность каталазы в печени и почках крыс при ингаляции парами сырой нефти из месторождения Кумколь в течение 30 дней,  $M \pm m$

Детоксикацию ксенобиотиков в организме млекопитающих осуществляют специальные ферментные системы, активность которых во многом определяет возможности организма к адаптации [9]. Процесс детоксикации включает две последовательные фазы: в первой фазе, ключевым ферментом которой является цитохром P450, происходит гидроксилирование ксенобиотиков, а во второй фазе – конъюгации, происходит обезвреживание метаболитов 1-ой фазы и их дальнейшая биотрансформация в нетоксичные водорастворимые продукты. Основными ферментом второй фазы детоксикации являются фермент глутатионтрансфераза.

Результаты исследования уровня цитохрома P450 и активности глутатион-S-трансферазы в печени и почках лабораторных крыс при экспозиции парами нефти в течение 30 дней показаны на рисунках 3 и 4.

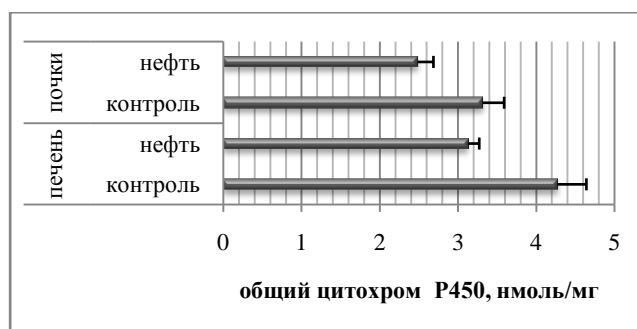


Рисунок 3 – Уровень общего цитохрома P450 в печени и почках крыс при экспозиции парами нативной нефти месторождения Кумколь в течение 30 дней,  $M \pm m$

Ферменты биотрансформации обнаружены во всех типах клеток позвоночных животных, но наибольшей активностью обладают детоксикационные системы клеток печени и, в меньшей степени, почек. Печень является центральным органом детоксикации, где осуществляется ферментативное превращение жирорастворимых экзогенных или эндогенных соединений в полярные водорастворимые метаболиты, легко выводимые из организма. Побочным эффектом биотрансформации является так называемая токсификация ксенобиотиков – процесс, при котором промежуточные продукты биотрансформации становятся более токсичными и обладают выраженной мутагенной, канцерогенной и даже тератогенной активностью, чем исходные соединения [10]. Важным свойством цитохрома P450 является способность его к индукции под действием внешних стимулов, в роли которых могут выступать различные факторы окружающей среды, особенно химические вещества.

Ранее нами было показана индукция ферментов детоксикации при кратковременной интоксикации нефтью месторождений Каракудук и Биикжал Мангыстауской области [3], а также изменения процессов биотрансформации при субхроническом внутрибрюшинном введении нефти крысам. Ароматические и, в меньшей степени, алифатические углеводороды нефти обладают способностью индуцировать изоформы цитохрома p450 вне зависимости от способа поступления токсикантов в организм.

В нашем эксперименте наблюдалось не увеличение, а достоверное снижение уровня общего цитохрома P450 – в 1,4 раза ( $P \leq 0,05$ ) в печени и в 1,3 раза ( $P \leq 0,05$ ) в почках интоксигированных животных. Уменьшение уровня фермента нужно рассматривать не как отсутствие его индукции, а скорее как результат разрушения внутренних мембран (цитоллиз) в клетках. Цитохром P450 – мембранный фермент и при нарушении нормального строения мембран его уровень в органах детоксикации падает. По-видимому, в результате токсического действия компонентов сырой нефти происходит значительный цитоллиз клеточных мембран.

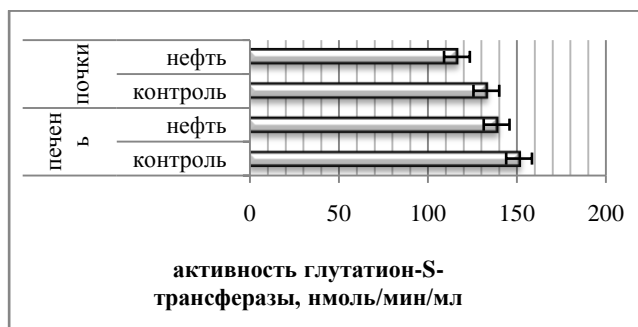


Рисунок 4 – Активность глутатион-S-трансферазы в печени и почках крыс при экспозиции парами нативной нефти месторождения Кумколь в течение 30 дней,  $M \pm m$

Глутатионтрансфераза (GST) является основным ферментом второй фазы биотрансформации, в ходе которой водорастворимые и активные метаболиты первой фазы вступают в реакции конъюгации для окончательной детоксикации. Ферменты конъюгации в некоторой степени нивелируют токсификацию соединений, проходящих через систему цитохрома P450. Для конъюгации глутатионтрансфераза использует восстановленный глутатион [10]. Усиление активации глутатионтрансфераз увеличивает способность организма приспосабливаться к возрастающему загрязнению внешней среды.

При субхронической экспозиции крыс парами нативной нефти месторождения Кумколь в дозе 10 мг/л наблюдается снижение активности фермента в печени крыс на 13% по сравнению с контролем ( $P \leq 0,05$ ). При этом в почках крыс наблюдалось практически такое же уменьшение активности глутатионтрансферазы – на 16% ( $P \leq 0,05$ ).

Таким образом, в настоящем исследовании было установлено, что при субхроническом ингаляционном воздействии парами сырой нефти из месторождения Кумколь у белых беспородных крыс происходит достоверное снижение активности ферментов системы детоксикации (цитохрома P450 и глутатион-S-трансферазы) как в печени, так и в почках. При этом процессы ПОЛ, наоборот, усиливаются (возрастает уровень ГПЛ и МДА) и угнетаются ферменты антиоксидантной защиты (СОД и каталазы).

Исследования были проведены в рамках грантового проекта 4927/ГФ4 «Токсико-экологическое изучение состояния окружающей среды нефтедобывающих регионов Казахстана и оценка экологического риска нефтяного воздействия» (2015-2017 гг), № госрегистрации 0115РК00381, научный руководитель - Т.М.Шалахметова.

### Литература

- 1 Galloway T. S. Biomarkers in environmental and human health risk assessment // Marine Pollution Bulletin. – 2006. – Vol. 53, № 10-12. – P. 606-613
- 2 Муханова М.У. Физико-химическая и спектральная характеристика нефти месторождения Кумколь // Геология, география и глобальная энергия. - 2010. – №2 (37). - с. 113 - 115.
- 3 Сутуева Л., Ондасынова А., Суворова М., Абдуллаева Б., Шалахметова Т. Экспериментальное исследование биохимических маркеров гепатотоксического действия Мангыстауской нефти // Вестник КазНУ. Серия биол. – 2013. – №2 (38). – с. 340 - 345.
- 4 Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. – 1983. – №3. – С. 23-25.
- 5 ATSDR. Toxicological Profile for Nickel. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, GA: 2009. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp15.pdf>
- 6 Pradnya S. Walawalkar, Pooja S. Serai, Iyer K.R. Isolation and catalytic competence of different animal liver microsomal fractions prepared by calcium-aggregation method // Indian journal of pharmaceutical sciences. - 2006. – Vol. 68, № 1. 2. – P. 262-265.
- 7 Herbig W.J, Pabst M.J, Jacoby W.B. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. -1974. – № 249. – P. 7139–7147.
- 8 Guengerich F.P., Hayes A.W (eds). Analysis and characterization of enzymes // In: Principles and methods of toxicology, 3rd Edn., Raven Press, New York. – 1994. – P. 1259–1313
- 9 Deer A.K., Henczova M., Banka L., Varanka Z., Nemcsok J. Effects of crude oil and oil fractions on the liver P450-dependent monooxygenase activities and antioxidant defence system of different freshwater fish species // Acta. Biol. Hung. – 2010. – Vol. 61. – P. 262–273.
- 10 С. А. Куценко. Основы токсикологии // Санкт-Петербург. – 2002.