

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности «8D05101 – Биология»

Исследование морфогенеза белого амура *Stenopharyngodon Idella Valenciennes* в условиях загрязнения рыбохозяйственных водоемов

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена изучению морфогенеза белого амура (*Stenopharyngodon idella*) из различных рыбохозяйственных водоемов (реки Иле и Капчагайского водохранилища).

Актуальность темы диссертации. В настоящее время усиление антропогенного пресса на окружающую среду приводит к дестабилизации природных экосистем, снижению биологического разнообразия и росту заболеваемости населения [1]. Большую обеспокоенность в мире вызывает загрязнение водоемов, как источников чистой питьевой воды и среды обитания гидробионтов, в том числе, промысловых рыб [2]. Таким образом, можно сказать, что биоразнообразие гидробионтов отражает экологическое состояние водоема. Сегодня в Казахстане практически невозможно найти чистых рек, озер, водохранилищ и других мест обитания гидробионтов [3]. Загрязнение водоемов происходит в результате бесконтрольного развития сельского хозяйства и промышленности [4]. При этом загрязняется различными ксенобиотиками не только вода, но донные отложения, а также почвы прибрежных зон. Многие отечественные исследователи отмечают сокращение численности аборигенных и интродуцированных видов рыб, а также других гидробионтов в реке Иле и Капчагайском водохранилище [5-6].

Река Иле является одной из основных водных артерий юго-восточного региона Казахстана. Она обеспечивает до 80 % всего притока воды в озеро Балхаш, впадая в ее западную часть. В 60-70-е годы для регулирования речного стока была построена плотина и Капчагайская ГРЭС, в результате чего образовалось искусственное водохранилище с объемом 28,14 км³. В настоящее время Капчагайское водохранилище – второй по величине водоём в Казахстане, являющийся не только источником гидравлической энергии, но резервуаром для нужд ирригации, рыбоводства и рекреационно-курортной зоны для жителей мегаполиса Алматы и Алматинской области [7]. В этой связи река Иле и Капчагайское водохранилище подвержены антропогенной нагрузке и могут содержать разнообразные загрязняющие вещества с токсической и гентоксической активностью. Многие загрязнители могут быть причиной стерильности, нарушений метаболизма и различных функций водных организмов [8]. Как известно в водной среде проходит рост и развитие рыб, а также других гидробионтов. Нарушение их эмбриогенеза в результате воздействия неблагоприятных условий приводит к появлению пороков и уродств, снижающих жизнеспособность и выживаемость вида, в результате чего гибнут целые популяции и истощаются биоресурсы [9].

Все вышесказанное свидетельствует о важности и необходимости проведения комплексного исследования воды, развития, а также состояния взрослых форм ценных промысловых рыб из различных водоемов Казахстана.

Цель работы: Изучить морфогенез белого амура (*Stenopharyngodon Idella*) из разных рыбохозяйственных водоемов (реки Иле и Капчагайского водохранилища, прудового хозяйства).

Задачи исследования:

1. Определить химический состав поверхностных вод из реки Иле, Капчагайского водохранилища и прудового хозяйства Алматинской области.
2. Изучить влияние тяжелых металлов на развитие белого амура в эксперименте.
3. Определить уровень экспрессии генов Wnt – β catenin сигнального пути, регулирующего эмбриональное развитие белого амура в норме и при воздействии тяжелых металлов.
4. Изучить роль окислительного стресса и металлотионина в развитии белого амура в норме и при воздействии тяжелых металлов.
5. Определить содержание тяжелых металлов (цинк, медь, свинец) в висцеральных органах белого амура из реки Иле, Капчагайского водохранилища и прудового хозяйства
6. Провести определение содержания металлотионина, активности супероксиддисмутазы и каталазы в печени взрослых особей белого амура из реки Иле, Капчагайского водохранилища и прудового хозяйства
7. Провести генотоксический анализ клеток крови белого амура из реки Иле, Капчагайского водохранилища и прудового хозяйства
8. Изучить гистоструктуру висцеральных органов белого амура из реки Иле, Капчагайского водохранилища и прудового хозяйства

Объект исследования: икра, эмбрионы, личинки, взрослые особи, кровь и висцеральные органы белого амура из разных водоемов Казахстана.

Предмет исследования: химический состав воды из разных участков реки Иле и Капчагайского водохранилища, прудового хозяйства, эмбриогенез белого амура, цито- и генотоксичность выявленных в поверхностных водах исследуемых водоемов тяжелых металлов.

Методы исследования. В диссертационной работе были использованы химические, эмбриологические, биохимические, молекулярно-биологические, генетические, гистологические и статистические методы.

Научная новизна исследования:

1. Впервые с помощью физико-химических методов в поверхностных водах реки Иле и Капчагайского водохранилища в период исследования установлено содержание таких тяжелых металлов, как Zn, Cu и Pb, превышающее ПДК для рыбохозяйственных водоемов.
2. Впервые по показателям летальности эмбрионов и выявленным отклонениям от нормального развития личинок белого амура установлено, что наибольшим эмбриотоксическим и тератогенным действием в ряду исследуемых ТМ обладают: $Pb > Cu > Zn$.

3. Впервые показано, что тяжелые металлы: Zn, Cu и Pb подавляют экспрессию генов Wnt – β catenin сигнального пути, регулирующего нормальное развитие белого амура, что приводит к эмбриотоксическим и тератогенным эффектам (летальности и уродствам, несовместимым с выживаемостью личинок в данных условиях).
4. Впервые установлена дозозависимая зависимость содержания белка металлотиионаина (MT), активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ) от действующей концентрации исследованных ТМ у личинок белого амура в ходе развития, свидетельствующая об активации у них оксидативного стресса.
5. Впервые установлено накопление Zn, Cu и Pb в печени, жабрах и кишечнике белого амура, отловленных на разных участках реки Иле и Капшагайского водохранилища (№ 1-№ 4), кроме рыб из участков № 5 и № 6.
6. Впервые обнаружены структурные нарушения и повреждения ДНК эритроцитов периферической крови белого амура из реки Иле и Капшагайского водохранилища, свидетельствующие о действии на рыб мутагенных факторов.
7. Впервые выявлено снижение содержания MT и активности СОД и КАТ в печени взрослых особей белого амура из разных участков реки Иле. При этом, наибольшее развитие окислительного стресса наблюдалось у рыб на участке № 1 (верхнее течение реки Иле), что, вероятно, связано с загрязненностью воды ТМ на этом участке и накоплению их в висцеральных органах.
8. Впервые с помощью гистологических и морфометрических методов исследования установлено, что самая высокая встречаемость рыб с гистопатологиями жабер, печени и кишечника наблюдалась на участках по верхнему течению реки Иле и в Капшагайском водохранилище около плотины и г. Конаев (№1 - №4), в меньшей степени в северной части Капшагайского водохранилища около насосных станций (№5).

Научно-практическая значимость диссертационной работы: Полученные результаты дополняют и расширяют имеющиеся научные сведения об эмбриогенезе низших позвоночных животных, в частности, рыб в условиях антропогенного воздействия на среду их обитания. Так, на основании биотестирования поверхностных вод реки Иле и Капшагайского водохранилища, проведения комплексного биохимического, генетического, морфологического и морфометрического исследования развития личинок белого амура было сделано важное заключение о патогенезе негативного воздействия тяжелых металлов на гидробионты, приводящие к их гибели в результате активации окислительного стресса и инициации мутационных процессов.

Результаты диссертационной работы могут быть использованы при разработке санитарно-гигиенических норм для рыбохозяйственных водоемов, для организации безопасного рыбозаводства и лова промысловых рыб, будут способствовать устойчивому развитию в этой отрасли экономики, улучшению

состояния окружающей среды и здоровья населения.

Результаты проведенных исследований внедрены в учебный процесс на кафедре биоразнообразия и биоресурсов Казахского национального университета в курс «Биология клетки и гистология», 2 курс бакалавра докторантура по специальности «5В095102 – Биология» (Приложение А).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В поверхностных водах реки Иле и Капшагайского водохранилища содержание Zn, Cu и Pb превышали ПДК для рыбохозяйственных водоемов.
2. По показателям летальности эмбрионов и выявленным отклонениям от нормального развития личинок белого амура наибольшим эмбриотоксическим и тератогенным действием обладают: свинец > медь > цинк.
3. Уровень экспрессии генов Wnt – β catenin сигнального пути, регулирующего развитие белого амура, подавляется при воздействии Zn, Cu и Pb.
4. Содержание металлотииона (MT) и активность антиоксидантных ферментов (СОД и КАТ) у личинок белого амура при воздействии тяжелых металлов достоверно возрастали. Напротив, содержание MT и активность СОД и КАТ в печени взрослых рыб из разных участков реки Иле и Капшагайского водохранилища снижались.
5. Содержание тяжелых металлов (Zn, Cu и Pb) превышали уровень ПДК в висцеральных органах белого амура из разных участков реки Иле и Капшагайского водохранилища, что вызывало развитие патологических процессов в организме рыб.
6. Поверхностные воды из разных участков реки Иле и Капшагайского водохранилища проявляли высокую генотоксическую активность, индуцируя повреждение ДНК клеток крови белого амура со статистически значимой частотой.
7. Наиболее высокая встречаемость рыб с гистопатологиями жабер, печени и кишечника наблюдалась в реке Иле (верхнее течение) и в Капшагайском водохранилище (около плотины и г. Конаев), но в меньшей степени - в северной части водоёма. Рыбы из прудового хозяйства Алматинской области были практически здоровыми.

Таким образом, в данной комплексной работе с использованием высокоинформативных методов физико-химического анализа, токсикологических, эмбриологических, молекулярно-генетических, биохимических, гистологических и морфометрических методов были изучены поверхностные воды реки Иле, Капшагайского водохранилища и прудового хозяйства Алматинской области, морфогенез личинок и состояние взрослых форм одного из ценных промысловых рыб - белого амура, отловленных на разных участках данных водоемов Казахстана.

В результате проведенных исследований выявлено загрязнение поверхностных вод изученных водоемов тяжелыми металлами, особенно Zn, Cu и Pb, содержание которых превышало ПДК для рыбохозяйственных водоемов. В

экспериментах на икринках и личинках белого амура были изучены процессы морфогенеза в условиях воздействия выявленных загрязняющих веществ (тяжелые металлы) и установлены их неблагоприятные эффекты, приводящее к высокой летальности эмбрионов и аномалиям развития личинок. В основе эмбриотоксического и тератогенного действия данных поллютантов установлено подавление экспрессии генов Wnt/ β -катенина сигнального пути и активация окислительного стресса. Подтверждением экспериментальных данных являлось обнаружение тяжелых металлов в висцеральных органах взрослых особей белого амура из разных участков реки Иле и Капшагайского водохранилища, а также аномалии в морфологии и повреждения ДНК клеток крови, гистоструктурные патологии висцеральных органов. Патогенетическим механизмом таких изменений у взрослых рыб, также, как и у личинок, являлась активация окислительного стресса, показателем которой являлись подавление работы ферментов антиоксидантной системы (СОД и КАТ) и снижение содержания белка металлотионеина, связывающего ТМ и защищающего от окислительного стресса.

Выявленные биохимические, структурные и мутагенные нарушения у белого амура вызывают определенную обеспокоенность состоянием не только гидробионтов, но и в целом биоты в Прибалхашье, а также здоровья населения, употребляющего рыбные продукты, воду из исследованных водоемов.

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Физико – химический анализ поверхностных вод из разных участков верхнего течения реки Иле и Капшагайского водохранилища выявил присутствие следующих тяжелых металлов: Pb, Co, Mn, Cd, Cu, Zn, Fe, Ni, Cr, однако содержание только трех из них: Zn, Cu и Pb превышало ПДК для рыбохозяйственных водоемов. Наибольшее превышение ПДК для Zn, Cu и Pb установлено в поверхностных водах верхнего течения реки Иле, Капшагайского водохранилища (около плотины ГРЭС и города Конаев), а наименьшее - в северной его части (около насосных станций). При этом рН воды, содержание растворенного кислорода, нитратов и нитритов в воде было на уровне ПДК.
2. Биотестирование влияния Zn, Cu и Pb на развитие белого амура - одного из ценных промысловых видов, выявило их дозозависимую эмбриотоксичность и тератогенность: летальность эмбрионов, различные морфологические аномалии у выживших личинок, задержку роста. Самый высокий процент нарушений развития составил 51,6% при концентрации свинца 100ШРК по сравнению с 7,2% в контрольной группе. Причем эмбриотоксический и тератогенный эффект среди исследованных металлов проявлялся в следующем порядке: свинец > медь > цинк.
3. Воздействие Zn, Cu и Pb на личинок белого амура значительно подавляло экспрессию генов *Wnt1*, *Gsk3 β* , *β -катенин*, *Lef1*, *Axin2*, *Myca* и *Cd1* сигнального пути Wnt/ β -катенина. В частности, экспрессия целевых генов была значительно снижена при 100ШРК цинка, тогда как медь и свинец были снижены при 10 и 100ШРК.

4. Установлена дозозависимая зависимость содержания МТ, активности СОД и КАТ у личинок белого амура в ходе развития при воздействии разных концентраций Zn, Cu, Pb. Воздействие данных ТМ в концентрациях 10 и 100 ПДК вызывало статистически значимое увеличение ($p \leq 0,05$) содержания МТ, активности СОД, КАТ у личинок рыб в период с 24-х часов до 144 часов развития.
5. Определено содержание Zn, Cu и Pb в висцеральных органах белого амура из разных участков реки Иле, Капшагайского водохранилища и прудового хозяйства, которое превышало нормы ПДК практически во всех точках исследования, кроме №5 (северная часть Капшагайского водохранилища) и №6 (прудовое хозяйство). При этом содержание Zn, Cu и Pb превышало ПДК в органах белого амура в следующей последовательности: печень > жабры > кишечник.
6. Выявлены следующие морфологические нарушения клеток крови: микроядра, амитоз, инвагинация ядер, апоптоз, вакуолизация клеток. Суммарный процент морфологических отклонений эритроцитов по сравнению с контрольной группой составил: наибольший в верховной течи реки Или в 3,9 раза, а наименьший в районе северной насосной станции Капшагайского водохранилища (№5) в 1,4 раза. Уровень повреждения ДНК в точке №1 составил 55,7%; №2 - 51%; №3 - 41%; №4 - 29,5%; №5 - 35%, тогда как в контрольной группе зафиксировано всего 17,5% повреждений.
7. Активность антиоксидантных ферментов (СОД и КАТ) и содержание металлотioneина в печени белого амура, взятого для исследования из реки Или и Капшагайского водохранилища, снизились. Это, в свою очередь, вызывает окислительный стресс. При этом наиболее выраженное изменение индекса окислительного стресса наблюдалось в точке исследования №1 (верховья реки Или): количество МТ увеличилось в 1,5 раза; активность СОД в 1,7 раза; активность КАТ снизилась в 2,0 раза.
8. В результате гистологических и морфометрических исследований установлено, что самая высокая встречаемость рыб с гистопатологиями жабер, печени и кишечника наблюдается в реке Иле (верхнее течение) и в Капшагайском водохранилище около плотины и г. Конаев (№1 - №4), в меньшей степени в северной части Капшагайского водохранилища около насосных станций (№5). Рыбы из прудового хозяйства (№6) были практически здоровыми. Основными гистопатологическими изменениями у белого амура из вышеназванных участков реки Иле и Капшагайского водохранилища являлись: в жабрах - дегенеративные изменения жаберных лепестков второго порядка (ламелл), гиперплазия и некроз клеток жаберного эпителия; в печени - полнокровие сосудов, расширение пространств Диссе, жировая дистрофия и некроз гепатоцитов; в кишечнике - отек

подслизистого слоя, воспалительные инфильтраты, слущивание эпителиоцитов на верхушках кишечных ворсин. Многие из данных деструктивных процессов не совместимы с жизнью рыб, что приводит к снижению биоразнообразия и биоресурсов водоемов.

Личный вклад соискателя заключается в непосредственном участии в сборе материала для диссертационной работы, анализе полученных результатов, статистической обработке количественных данных. Автор самостоятельно проанализировал, обобщил и представил полученные результаты, сформулировал выводы. Текст диссертации написан по плану, согласованному с научными руководителями. Доля личного участия автора в совместных публикациях пропорциональна числу соавторов.

Соответствие работы программе научных исследований. Диссертационная работа выполнена в рамках проекта Министерства образования и науки Республики Казахстан, грант № AP14869740 «Биотестирование воды и донных отложений реки Или и Капчагайского водохранилища и прогнозирование экологических рисков для биоразнообразия исследуемых экосистем» (2022-2024 гг.).

Проверка результатов диссертации. Результаты исследований диссертации были представлены и обсуждены на следующих международных научных конференциях:

- Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Мир Фараби», г. Капчагай, Республика Капчагай, 6-9 апреля 2020 г.;

- At the 5th International Scientific Conference «Reviews of Modern Science» (February 1-2, 2024) Zürich, Switzerland;

Публикации. Основные результаты диссертации опубликованы в 8 опубликованных научных работах, в том числе в 2 статьях с квартильными показателями Q2 (SJR – 0,659) и Q3 (SJR – 0,505). в научных журналах высокого уровня, входящих в базы данных Web of Science и Scopus; 4 статьи в отечественных периодических изданиях, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в науке и высшем образовании Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан; 2 тезиса опубликованы в трудах международной конференции.

Структура и объем диссертации. Диссертация написана на 94 страницах текста. Включает нормативные ссылки, обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, заключение и список из 227 ссылок. Диссертация содержит 26 рисунков и 10 таблиц.