

Н.А. Илюшина, Г.В. Масальцев, Н.С. Аверьянова

ОЦЕНКА ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ IN VIVO ПРИ ДЕЙСТВИИ ГЛИФОСАТА

ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Мытищи, Россия

Резюме. Глифосат широко применяется в качестве гербицида во всем мире. Однако в последние годы появились новые данные о его генотоксичности и канцерогенности, на основании которых в 2015 году Международное агентство по изучению рака классифицировало глифосат как «вероятный канцероген для человека» (группа 2А).

В статье представлены результаты оценки генотоксической активности технического продукта глифосата кислоты в тканях мышей линии CD-1 методом ДНК-комет. Показано, что глифосат индуцировал повреждения ДНК в клетках костного мозга при высокой дозе (2000 мг/кг массы тела). Эффекты, наблюдаемые в клетках печени, были статистически незначимы. Полученные данные свидетельствуют о слабой генотоксической активности исследуемого технического продукта глифосата.

Ключевые слова: глифосат, генотоксичность, ДНК-кометы.

Актуальность. Препараты на основе глифосата, N-(фосфонометил)-глицина, применяются в качестве гербицидов широкого спектра действия в течение нескольких десятилетий. На протяжении всего периода использования глифосата его считали малотоксичным веществом, не обладающим мутагенными и канцерогенными свойствами [11]. В 2015 году Международное агентство по изучению рака (МАИР) классифицировало глифосат как «вероятный канцероген для человека» (группа 2А) [6]. Кроме того, в заключении МАИР указано, что получены веские доказательства того, что действующее вещество глифосат и препаративные формы на его основе обладают генотоксичностью.

Однако в Европе в 2017 году глифосат прошел перерегистрацию на срок 5 лет с некоторыми дополнительными требованиями, направленными на минимизацию его использования в общественных местах и обеспечение безопасного применения. В ноябре 2017 года Комиссией по канцерогенным факторам при Роспотребнадзоре было принято решение об отнесении глифосата к подклассу 2С по классификации канцерогенности пестицидов [2].

Канцерогенные вещества в большинстве случаев обладают мутагенной активностью, поэтому краткосрочные тесты в отношении генотоксичности могут быть использованы не только для выявления генотоксикантов, но и как прогностические в отношении потенциальной канцерогенности таких веществ.

Целью настоящей работы было исследование способности технического продукта глифосата вызывать повреждения в молекулах ДНК в клетках костного мозга и печени млекопитающих методом «ДНК-комет».

Материал и методы исследования. Исследования проводили на мышах линии CD1 обоих полов. Животных получали из питомника Филиала «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства России.

Тестировали технический продукт глифосат-кислоты с содержанием действующего вещества более 95%.

Введение глифосата осуществляли внутрижелудочно 2 раза с интервалом 24 часа. В качестве отрицательного контроля использовали 1% крахмал. Положительным контролем служил метилметансульфонат (40 мг/кг), который вводили внутрибрюшинно один раз параллельно со вторым введением глифосата. Мышей умерщвляли через 3 часа после последней обработки методом цервикальной дислокации. Извлекали бедренные кости, из которых аспирировали костный мозг, и небольшие кусочки печени (массой 100-200 мг), которые подвергали гомогенизации. Получали суспензии клеток в фосфатном буфере, содержащем 10% ДМСО и 20 мМ ЭДТА-Na₂. Подготовку микропрепаратов (по 2 стекла на каждую ткань каждого животного), лизис и денатурацию осуществляли, как описано в [1]. Электрофорез проводили в течение 20 минут (300 мА, 24 В) при 7°C в камерах для электрофореза CSL-COM20 (Cleaver Scientific, Великобритания), используя охладитель для электрофоретических систем CSL-CHILLER (Cleaver Scientific, Великобритания). Микропрепараты подвергали нейтрализации в буфере PBS и дегидратации в 75% растворе этанола. Сушили на воздухе и красили SYBR Green I в течение 30 минут.

Микроскопический анализ проводили на эпифлюоресцентном микроскопе (Nikon Eclipse Ni-U, Япония), оснащенном камерой scA1300-32fm и программой для захвата изображения. Анализ ДНК-комет осуществляли с помощью программы анализа изображений Comet Assay IV (Perceptive Instruments Ltd, Великобритания). На каждом микропрепарате считали не менее 75 клеток (150 клеток на каждую ткань каждого животного). В качестве показателя повреждений ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте кометы (%ДНКхвт).

Статистическую обработку данных проводили с помощью построения 99% доверительных интервалов обобщенной линейной модели ($\alpha = 0,01$) для зависимой переменной lg %ДНКхв. и факторов доза и пол [12, 8], используя программу SPSS Statistics v. 22.0 (Корпорация IBM, Нью Йорк, США). Анализы данных для разного типа тканей (костный мозг и печень) осуществлялись независимо.

Полученные результаты и их обсуждение. В исследовании использовали 10 групп мышей линии CD-1 обоих полов (по 4 мыши одного пола на группу): 2 группы (самцы и самки) отрицательного контроля, получавшие наполнитель (1% крахмал), 2 группы положительного контроля, получавшие 40 мг/кг массы тела метилметансульфоната, и 6 экспериментальных групп (3 группы самцов и 3 группы самок), получавшие глифосат в дозах 500, 1000 и 2000 мг/кг массы тела.

Оценка повреждений ДНК с использованием щелочного кометного анализа в группах мышей отрицательного контроля показала, что процентное содержание ДНК в хвосте комет не превышало 1,4% в образцах костного мозга и 6,0% в образцах печени. В группах животных положительного контроля оцениваемый показатель составлял в среднем 35,0% в случае костного мозга и 42,3% в случае печени.

Построение обобщенной линейной модели показало, что пол не являлся значимым фактором для показателя %ДНК в хвосте комет ни в случае костного мозга ($p = 0,229$), ни в случае печени ($p = 0,898$) при $\alpha = 0,01$.

Для корректной статистической обработки результатов полученные значения показателя %ДНКхв. были преобразованы в значения \lg %ДНКхв. согласно рекомендациям OECD №489 [10]. Метод построения 99% доверительных интервалов (ДИ) профильного правдоподобия в рамках обобщенной линейной модели показал, что значения отношения $\lg\%$ ДНК в опыте к $\lg\%$ ДНК в контроле ($\lg\%$ ДНКхв.опыт/ $\lg\%$ ДНКхв.контр.) в образцах костного мозга мышей, обработанных глифосатом в дозах 500 и 1000 мг/кг м.т., значимо не отличались от значений для группы отрицательного контроля. Однако в случае дозы 2000 мг/кг м.т. обнаружено статистически значимое повышение такого показателя при $\alpha = 0,01$ по сравнению с отрицательным контролем. При этом глифосат не оказывал значимого генотоксического действия на ДНК в клетках печени при $\alpha = 0,01$.

Данные статистического анализа представлены в таблице 1 и на рисунке 1. В таблице наряду с результатами оценки относительных величин приведены абсолютные значения и доверительные интервалы для среднего %ДНК в хвосте комет.

Таблица 1.

Результаты анализа мутагенной активности глифосата методом ДНК-комет *in vivo*. Доверительные интервалы (ДИ) средних значений %ДНКхв и значений отношения $\lg\%$ ДНКопыт/ $\lg\%$ ДНКконтроль.

Ткань	Параметр ДИ	Доза (мг/кг массы тела)			
		0	500	1000	2000
Костный мозг	нижняя граница	.	0,643	0,519	1,607
	среднее	1	0,988	0,798	2,469*
	верхняя граница	.	1,517	1,226	3,793
	нижняя граница	0,681	1,11	1,088	1,299
	среднее	1,177	1,174	1,139	1,494*
	верхняя граница	2,034	1,28	1,221	1,853
Печень	нижняя граница	.	0,337	0,433	0,685
	среднее	1	0,638	0,819	1,295
	верхняя граница	.	1,207	1,549	2,45
	нижняя граница	1,328	1,66	1,918	2,803
	среднее	4,502	2,611	3,429	7,017
	верхняя граница	15,053	6,147	10,282	39,882

* Односторонняя значимость по сравнению с дозой 0 при $\alpha = 0,01$;

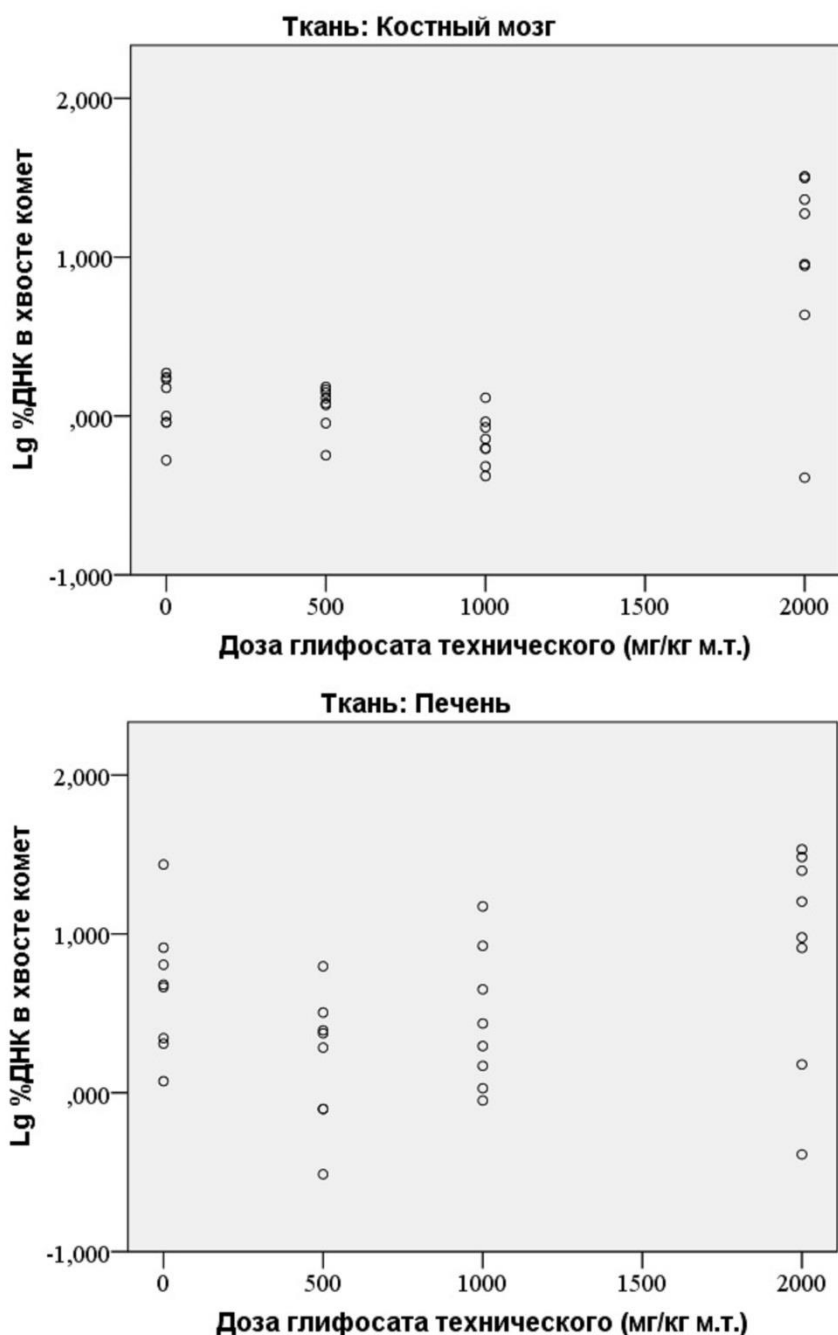


Рис. 1. График рассеивания точек Lg%ДНК в хвосте для клеток костного мозга и печени мышей.

Имеющиеся в литературе данные о генотоксической активности глифосата противоречивы. Глифосат не индуцировал мутации у бактерий *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* и *Escherichia coli* [7]. В экспериментах *in vitro* на лимфоцитах человека при действии глифосата выявлены разрывы ДНК [3] и повышенный уровень сестринских хроматидных обменов [5], но не обнаружено индукции хромосомных aberrаций и образования микроядер [4]. В тестах *in vivo* показано повреждающее ДНК действие в клетках печени и почек [9] и цитогенетические нарушения в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей [7]. Одной из причин различий в полученных результатах может быть использование для анализа разных

технических продуктов, в которых содержание мутагенных примесей (например, N-нитрозоглифосата и формальдегида) может отличаться.

Выводы. Полученные нами результаты показывают, что исследуемый технический продукт глифосата кислоты при пероральном поступлении в организм млекопитающих в высоких дозах может проявлять слабую мутагенную активность, и свидетельствуют о необходимости оценки генотоксичности всех поступающих в Российскую Федерацию пестицидов-аналогов.

Литература.

1. МР 4.2.0014-10. Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*. Методические рекомендации. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. – 16с.
2. СанПиН 1.2.2584-10. Гигиенические требования к безопасности процессов испытаний, хранения, перевозки, реализации, применения, обезвреживания и утилизации пестицидов и агрохимикатов. Санитарные правила и нормы. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора 2010. – 71с.
3. Comparison of the *in vivo* and *in vitro* genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms / C. Alvares-Moya [и др.] // *Genetics and molecular biology*. – 2014. – 37(1). – С. 105-110.
4. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup / C. Bolognesi [и др.] // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 1997. – 45(5). – С. 1975-1962.
5. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests / F. Manas // *Environmental toxicology and pharmacology*. – 2009. – 28(1). – С. 37-41.
6. IARC Monographs Volume 112. Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2015. – 2 с.
7. Li, A. P. An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate / A. P. Li, T. J. Long // *Fundamental and applied toxicology*. – 1988. – 10 (3). – С. 537-546.
8. Lovell D. P. Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* comet studies / D. P. Lovell, G. Thomas, R. Dubow // *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*. – 1999. – 19(2). – С. 109-19.
9. Mladinic N. Characterization of chromatin instabilities induced by glyphosate, terbuthilazine and carbofuran using cytome FICH assay / N. Mladinic, P. Perkovic, D. Zeljezic // *Toxicology letters*. – 2009. – 189 (2). – С. 130-137
10. OECD № 489. *In vivo* mammalian alkaline comet assay. Guideline. Organization of economic cooperation and development, 2014. – 27 с.
11. The Pesticide Manual/ под ред. C D S Tomlin. – 5-е изд. – Hampshire, UK: British Crop Production Council, 2009. – 1457 с.
12. Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay / J. Bright [и др.] // *Pharmaceutical statistics*. – 2011. – 10(6). – С. 485-493.

Abstract.

**N.A. Ilyushina, G.V. Masaltsev, N.S. Averianova
ASSESSMENT OF DNA DAMAGE IN MAMMALIAN
CELLS IN VIVO INDUCED BY GLYPHOSATE**

Federal Scientific Center of Hygiene named after F. F. Erisman of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Mytishchi, Russia

Glyphosate is a widely used herbicide around the world. However, the International Agency for Research on Cancer classified glyphosate as "a probable human carcinogen" (group 2A) on basis of new data on genotoxicity and carcinogenicity of glyphosate that emerged in recent years.

The results of the genotoxic activity estimation of the glyphosate acid technical product in the tissues of CD-1 mice by the DNA comet method are presented in the article. It was demonstrated that glyphosate induced DNA damage in bone marrow cells at the highest dose (2000 mg/kg body weight).

The effects observed in the liver cells were statistically insignificant. The obtained data indicate a weak genotoxic activity of the investigated technical product glyphosate.

Keywords: glyphosate, genotoxicity, DNA comets.

References.

1. MR 4.2.0014-10. Evaluation of genotoxic properties by DNA-comet assay in vitro. Methodological recommendations. – M.: Federal centre for hygiene and epidemiology of the Rospotrebnadzor, 2011. – 16p.
2. SanPin 1.2.2584-10. Hygienic requirements for protection of research process safety, storage, transportation, realization, deactivation and disposal of pesticides and agrochemicals. Sanitary rules and norms. – M.: Federal centre for hygiene and epidemiology of the Rospotrebnadzor 2010. – 71c.
3. Comparison of the in vivo and in vitro genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms / C. Alvares-Moya [and others] // Genetics and molecular biology. – 2014. – 37(1). – С. 105-110.
4. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup / C. Bolognesi [and others] // Journal of agricultural and food chemistry. – 1997. – 45(5). – С. 1975-1962.
5. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests / F. Manas // Environmental toxicology and pharmacology. – 2009. – 28(1). – С. 37-41.
6. IARC Monographs Volume 112. Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2015. – 2 c.
7. Li, A. P. An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate / A. P. Li, T. J. Long [and others] // Fundamental and applied toxicology. – 1988. – 10 (3). – С. 537-546.
8. Lovell D. P. Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of in vivo and in vitro comet studies / D. P. Lovell, G. Thomas, R. Dubow // Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis. – 1999. – 19(2). – С. 109-19.
9. Mladinic N. Characterization of chromatin instabilities induced by glyphosate, terbuthilazine and carbofuran using cytome FICH assay / N. Mladinic, P. Perkovic, D. Zeljezic // Toxicology letters. – 2009. – 189 (2). – С. 130-137
10. OECD № 489. In vivo mammalian alkaline comet assay. Guideline. Organization of economic cooperation and development, 2014. – 27 c.
11. The Pesticide Manual/ под ред. C D S Tomlin. – 5-th ed. – Hampshire, UK: British Crop Production Council, 2009. – 1457 c.
12. Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay / J. Bright [and others] // Pharmaceutical statistics. – 2011. – 10(6). – С. 485-493.

Сведения об авторах: Илюшина Наталия Алексеевна – к.б.н., зав. отделом генетической токсикологии, ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Институт гигиены, токсикологии пестицидов и химической безопасности, отдел генетической токсикологии

Pyushina-na@mail.ru; Масальцев Глеб Викторович – м.н.с., ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Институт гигиены, токсикологии пестицидов и химической безопасности, отдел генетической токсикологии; gmasaltsev@mail.ru; Аверьянова Наталья Сергеевна – к.б.н., с.н.с., ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Институт гигиены, токсикологии пестицидов и химической безопасности, отдел генетической токсикологии, belka1973@gmail.com