

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА В ОЦЕНКЕ ОТДАЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ДЕЛЬЦИДА НА *RATTUS NORVEGICUS*

Скворцова Ксения Валерьевна

аспирант

Тюменский государственный университет, Тюмень

**Аннотация.** Показано увеличение частоты микроядер в лимфоцитах крыс *Rattus norvegicus* при действии малых концентраций пестицида дельцида. Выявлен отдаленный эффект действия дельцида у их потомков.

**Ключевые слова:** малые дозы, пестицид, дельцид, лимфоциты, микроядра, цитогенетическая нестабильность.

Механизмы биологического действия пестицидов по-прежнему остаются проблемой, вызывающей большой интерес со стороны ученых. Попадая в окружающую среду и циркулируя в ней, пестициды расходуются частично, а остаточные количества сохраняются в среде, формируя малые дозы, представляющие потенциальную угрозу здоровью человека. Сведения о действии малых доз пестицидов немногочисленны: показано их действие на метилирование ДНК [1], изменение гематологических показателей, окислительный стресс у рыб [2-4]. Актуальными также остаются вопросы об отдаленных эффектах и механизмах действия малых и сверхмалых доз пестицидов; биомаркерах, которые поз-

воляли бы с высокой степенью надежности судить об изменениях, возникающих в живых организмах под их воздействием.

Целью настоящей работы явилось изучение отдаленных последствий действия малых доз пестицида – дельцида на крыс на основе использования микроядерного теста.

Работы проводились в Центре биотехнологии и генодиагностики Тюменского государственного университета в 2012-2015 гг. Были использованы беспородные крысы *Rattus norvegicus* высокоинбредной (потомство одной самки и одного самца) линии 6 поколения селекции, которые подвергались воздействию пестицида дельцида в лабораторных условиях. Дельцид – инсектоакарицидный препарат, синтетический пиретроид, содержащий в качестве действующего вещества 4 % дельтаметрина, в качестве вспомогательных компонентов твин-80, неонол и нефрас (разработан ООО «Научно-внедренческим центром «Агроветзащита С-П», Московская обл.). Крысы 6 поколения, подобранные по полу и возрасту, были разделены на три опытных варианта (в каждом варианте опыта использовали по 20 крыс – 10 самок и 10 самцов в возрасте 20 суток). Все животные были предварительно взвешены и помечены. Перед началом опыта у всех животных (опытных и контрольных) была взята кровь в качестве контрольного образца. Концентрации дельцида были подобраны экспериментально и составляли: 0,0001 %, 0,00001 %, 0,000001 %. Пестицид добавляли в воду для питья до нужной концентрации на протяжении 6 месяцев, объем ежедневно поглощаемой воды дозировался и учитывался при расчете концентраций. Прижизненный забор крови производили по окончании опыта. Все процедуры осуществлялись в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Министерства высшего и среднего специального образования № 742 от 13.11.84 г.), «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (№ 267 от 19.06.2003 г.). Отдаленные

последствия действия пестицида изучали на потомках (7 и 8 поколение) крыс, подвергшихся воздействию дельцида.

Мазки крови животных готовили и фиксировали по стандартной методике [5]. Окрашивали 2 %-м раствором Гимза (Giemsa, фирмы «Merck»). Препараты рассматривали при увеличении об.100 х ок.10 с использованием микроскопа «Axiostar plus» (фирмы «Zeiss»). Документирование проводили с использованием программы «AxioVision». Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакетов прикладных программ «Statistica» и «MS Excel».

Микроядерный тест, как метод оценки состояния генетического аппарата клетки в условиях действия факторов различной природы (радиации, химических загрязнителей, вирусов), получил широкое распространение [6-8]. Этот метод позволяет выявлять цитогенетические последствия как отдаленной во времени экспозиции пестицидов, так и непосредственные воздействия [9].

В экспериментах с дельцидом в крови крыс 6 поколения из всех опытных вариантов по завершении опыта были обнаружены лимфоциты с микроядрами, что свидетельствует о его генотоксическом действии. Результаты представлены в таблице 1.

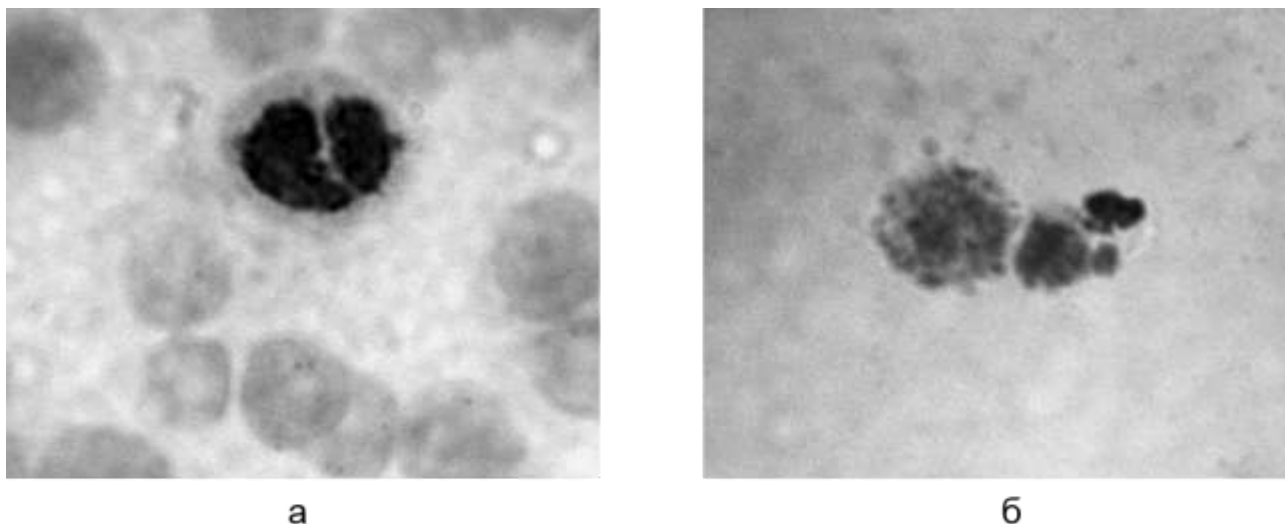
Таблица 1

**Частота (%) образования микроядер в лимфоцитах крыс при воздействии дельцида**

Показатель	Концентрация дельцида			
	0,0001 %	0,00001 %	0,000001 %	Контроль
Частота микроядер	1,38 ± 0,09	1,01 ± 0,07	0,77 ± 0,05	0
Исследовано животных, экз.	20	20	20	20
Просмотрено клеток, шт.	945	1003	974	846

В препаратах крови, полученных от крыс до начала опыта и в контрольном варианте, клеток с микроядрами не выявлено.

Обнаружено два типа микроядер (см. рис. 1). Микроядра 1 типа представлены в форме дополнительного ядра, меньшего по размеру, чем основное. Микроядра 2 типа представлены мелкими образованиями, число которых может достигать пяти и более на одну клетку.

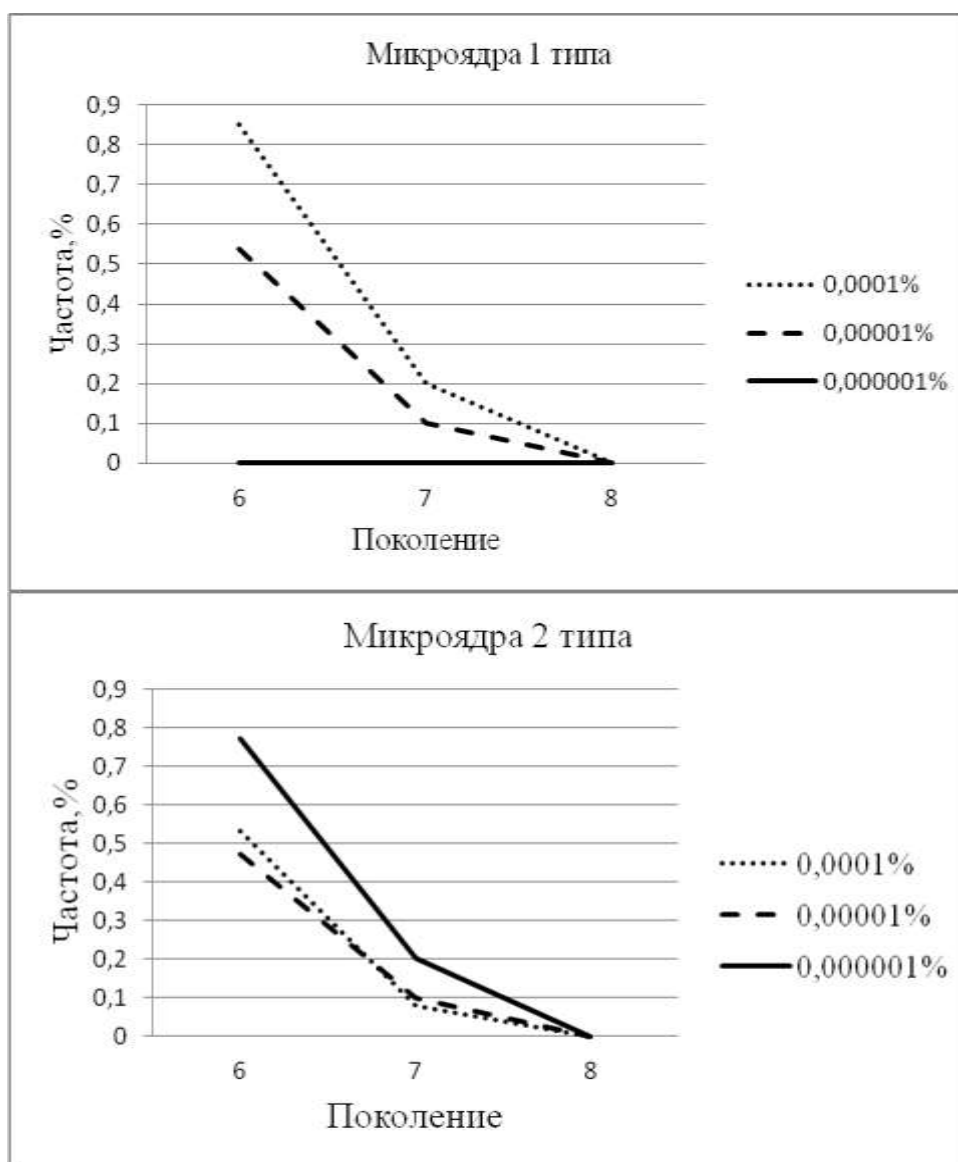


**Рис.1. Микроядра: а – 1 тип; б – 2 тип**

В вариантах с концентрациями 0,0001 % и 0,00001 % встречаются микроядра двух типов, в то время как в варианте с концентрацией 0,000001 %, только второго типа (см. рис. 2).

Ранее нами было показано, что введение дельцида в культуральную среду в концентрациях 0,005 % и 0,00005 % вызывало повышенную частоту образования пуфов в политенных хромосомах *Drosophila melanogaster* во 2 и 3 поколениях, что свидетельствует об отдаленном влиянии пестицида на изменение структуры хроматина и его декомпактизацию [10]. Отдаленное действие дельцида проявилось у крыс в виде микроядер в лимфоцитах. У потомков в 7 поколении частота микроядер существенно ниже, чем у родителей, непосредственно подвергавшихся

воздействию (см. рис. 2). В 8 поколении микроядра в лимфоцитах крыс не выявлены.



**Рис. 2. Частота микроядер 1 и 2 типа в лимфоцитах крыс из смежных поколений в опытных вариантах с разными концентрациями дельцида (в контроле частота микроядер равна 0)**

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что малые дозы пестицида дельцида способны вызывать отдаленные последствия в виде микроядер. Механизм подобного явления может быть связан с сохраняющейся на протяжении нескольких поколений цитогенетической нестабильностью, связанной с воздействием пестицидов. Ранее

подобное явление отмечалось в лабораторных колониях полевок, происходящих от животных из радиационных биогеоценозов [11]. Наши данные подтверждают выводы других ученых о том, что отдаленное последствие действия пестицидов в виде образования микроядер, является следствием дестабилизации генетического аппарата клеток, приводящим к фрагментации хроматина и появлению морфологических аномалий [10]. Микроядерный тест является эффективным методом выявления сохраняющейся на протяжении поколений генетической нестабильности клеток.

#### **Список использованных источников**

1. Wang C. et al. Effects of atrazine and chlorpyrifos on DNA methylation in the liver, kidney and gill of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2014. V. 108. P. 142-151. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.06.011.
2. Yonar S.M. Toxic effects of malathion in carp, *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of lycopene // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2013. V. 97. P. 223-229. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.07.020.
3. Shinn C., Santos M.M., Lek S., Grenouillet G. Behavioral response of juvenile rainbow trout exposed to an herbicide mixture // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015. V. 112. P. 15-21. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.10.013.
4. Pérez-Iglesias J.M. et al. Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015. V. 119. P. 15-24. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.04.045.
5. Роскин Г.И. Микроскопическая техника. М.: Советская наука, 1951. 447 с.

6. Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск: Изд. Томского ун-та, 1992. 272 с.
7. Harabawy A.S., Ibrahim A.T. Sublethal toxicity of carbofuran pesticide on the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822): Hematological, biochemical and cytogenetic response // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2014. V. 103. P. 61-67. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.09.022.
8. Schaumburg L.G., Poletta G.L., Siroski P.A., Mudr M.D. Baseline values of Micronuclei and Comet Assay in the lizard *Tupinambis meriana* (Teiidae, Squamata) // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2012. V. 84. P. 99-103. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.06.023.
9. Жулева Л.Ю. Повреждение хромосомного аппарата соматических клеток человека при воздействии диоксина: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.: Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, 2000. 21 с.
10. Голосова А.В., Пак И.В., Кузнецова Т.Ю. Генотоксические эффекты пестицидов дельтаметрина (дециса) и метсульфуронметила (магнума) // *Вестник экологии, лесоведения и ландшафтоведения*. 2010. № 10. С. 101-107.
11. Нохрин Д.Ю. Цитогенетическая и онтогенетическая нестабильность у видов-двойников обыкновенной полевки из лабораторных колоний и природных популяций при разной степени загрязнения. Автореферат дисс. ... канд. биол. наук. Екатеринбург: Институт экологии растений и животных, 1999. 15 с.