

## ИССЛЕДОВАНИЕ *CITELLUS FULVUS* В ЗАГРЯЗНЕННЫХ ФЕНИЛПИРАЗОЛАМИ БИОТОПАХ

© 2013 г. С. Ж. Колумбаева\*, Д. А. Бегимбетова, А. В. Ловинская, А. М. Калимагамбетов

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, 050040 Казахстан, г. Алматы, просп. аль-Фараби, 71

E-mail: S\_kolumb@mail.ru

Поступила в редакцию 29.08.2011 г.

Выявлены фипронил и фипронил-сульфон в объектах природных экосистем, подверженных воздействию пестицидов на основе фипронила. Для *Citellus fulvus* в загрязненных фенилпиразолами биотопах установлена цитогенетическая нестабильность, проявляющаяся в повышении частоты структурных и геномных мутаций, а также активация процессов ПОЛ. В спектре структурных нарушений хромосом преобладают перестройки хроматидного типа, что свидетельствует о наличии в окружающей среде мутагенного фактора химической природы.

**Ключевые слова:** *Citellus fulvus* (суслик желтый), фенилпиразолы, фипронил, фипронил-сульфон, клетки костного мозга, мутаген, хромосомные aberrации, перекисное окисление липидов (ПОЛ), Южно-Казахстанская область.

DOI: 10.7868/S0367059712060066

Интенсивное развитие сельского хозяйства требует производства и применения новых классов пестицидов, которые в большинстве своем действуют подобно мутагенам (González et al, 2003; Losi-Guembarovski, 2004). По данным ВОЗ, число отравлений пестицидами в продуктах питания ежегодно составляет 1%. При использовании пестицидов поражаются не только целевые, но и многие другие виды, не являющиеся мишенями действия препаратов, в том числе естественные хищники и паразиты подавляемых форм. Кроме того, это приводит к возникновению устойчивых к пестицидам популяций видов-вредителей и негативному действию на генетический аппарат живых организмов (Biolognesi, 2003; Mukhopadhyay, 2004). Однако применение пестицидов неизбежно, так как обусловлено экономической необходимостью.

В различных регионах Казахстана в последние годы для борьбы с саранчовыми и другими вредителями широко используют инсектициды нового поколения, относящиеся к классу фенилпиразолов, основным действующим веществом которых является фипронил (Сагитов и др., 2002). Установлено, что в природной среде и организме млекопитающих фипронил подвергается биотрансформации с образованием метаболитов, обладающих большей токсичностью и стойкостью, чем исходное вещество (Fung et al. 2003). На белых беспородных крысах было показано (Бегимбетова и др., 2009, 2010), что фипронил и его метаболит

фипронил-сульфон обладают выраженными токсическими и генотоксическими свойствами, проявляющимися в достоверном увеличении частоты структурных и геномных мутаций, а также аккумулируются в висцеральных органах животных. В связи с этим нами было изучено содержание фенилпиразолов в объектах окружающей среды и проведено цитогенетическое исследование одного из представителей фоновых видов грызунов суслика желтого (*Citellus fulvus*), отловленного в Южно-Казахстанской области (ЮКО) на сельскохозяйственных угодьях, обрабатываемых инсектицидами на основе фипронила.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были почва, растения, саранча и суслик желтый (*Citellus fulvus*). Отбор образцов и отлов животных проводили в трех районах ЮКО: Арыском, Шардаринском и Казыгуртском (зона условного контроля). В каждом районе было отловлено по 5 животных-самцов. Забой подопытных животных производили под нембуталовым наркозом. У животных после забоя забирали костный мозг из бедренной кости и готовили цитологические препараты по общепринятой методике (Графодатский, Раджабли, 1988). Препараты окрашивали азур-эозином по Романовскому-Гимзе. Цитогенетический анализ осуществляли с помощью метафазного метода, определяли общую частоту и спектр хромосом-

**Таблица 1.** Содержание фенилпиразолов в природных объектах ОС, подверженных воздействию инсектицидов на основе фипронила

Район отлова	Содержание фипронила, мг/кг		
	почва	растения	саранча
Арысский	0.074 ± 0.007	0.037 ± 0.004	0.097 ± 0.010
Шардаринский	0.090 ± 0.009	0.056 ± 0.005	0.078 ± 0.010
Казыгуртский (зона условного контроля)	—	—	—
Содержание фипронил-сульфона, мг/кг			
Арысский	0.045 ± 0.006	0.007 ± 0.001	0.040 ± 0.005
Шардаринский	0.057 ± 0.010	0.005 ± 0.001	0.040 ± 0.006
Казыгуртский (зона условного контроля)	—	—	—

**Таблица 2.** Содержание фенилпиразолов в организме суслика желтого из загрязненных биотопов

Район отлова	Содержание фипронила, мг/кг		
	печень	почки	мышцы
Арысский	0.0030 ± 0.0001	0.0010 ± 0.0001	0.0001 ± 0.0001
Шардаринский	0.0030 ± 0.0001	0.0010 ± 0.0001	0.0004 ± 0.0001
Казыгуртский (зона условного контроля)	—	—	—
Содержание фипронил-сульфона, мг/кг			
Арысский	0.0040 ± 0.0001	0.0010 ± 0.0001	0.0005 ± 0.0001
Шардаринский	0.0050 ± 0.0001	0.0020 ± 0.0001	0.0001 ± 0.0001
Казыгуртский (зона условного контроля)	—	—	—

ных аберраций. Метафазные пластинки анализировали и фотографировали в световом микроскопе Axioskop-40 (Zeiss).

Биохимическое исследование ПОЛ проводили с помощью стандартных и отработанных методик: содержание гидроперекисей липидов (ГПЛ) определяли по В.Б. Гавриловой и М.И. Мишкорудной (1983), а малонового диальдегида (МДА) — по И.Д. Стальной и Г.Г. Гаришвили (1977). Содержание фипронила в объектах измеряли согласно “Методическим указаниям 4.1.1400-03”, утвержденным Главным государственным санитарным врачом РФ 24.06.2003; фипронил-сульфона — методом газожидкостной хроматографии, разработанной В.А. Калининым с сотр. (2003).

Статистическую обработку результатов наблюдений проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента (Рокицкий, 1978).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Многие органические пестициды, в том числе фипронил и его метаболиты, могут накапливаться

в почве, организме животных и растений. В связи с этим нами было изучено содержание фенилпиразолов в почве, растениях, саранче и у суслика желтого, обитающих на подверженных воздействию фипронила территориях (табл. 1). Результаты проведенных исследований показали, что в образцах почв, отобранных на пастбищных полях Арысского и Шардаринского районов Южно-Казахстанской области, обработанных инсектицидом адонисом, содержание фипронила было больше значений ПДК в 1.5 и 1.8 раза при соответствующей норме расхода фипронила на полях против насекомых-вредителей (Справочник пестицидов (ядохимикатов), разрешенных к применению на территории Республики Казахстан, 2008). В растениях пастбищ Арысского и Шардаринского районов были обнаружены фипронил и фипронил-сульфон, в то время как в образцах растений Казыгуртского района отсутствовали даже следовые количества ксенобиотиков. Фипронил в окружающей среде под действием различных окислительных реакций в почве и растениях частично трансформируется в метаболит фипронил-сульфон. Транс-

**Таблица 3.** Частота и спектр структурных нарушений хромосом в клетках костного мозга *Citellus fulvus* из биотопов Южно-Казахстанской области, подверженных воздействию инсектицидов на основе фипронила

Район отлова	Изучено метафаз	Частота aberrантных клеток ( $M \pm m$ ), %	Число хромосомных aberrаций на 100 метафаз			Полиплоидные клетки, %
			всего aberrаций	хромосомного типа	хроматидного типа	
Казыгуртский (контроль)	1028	2.44 ± 0.49	2.62 ± 0.41	0.29 ± 0.12	2.33 ± 0.45	0.19 ± 0.12
Арысский	814	6.18 ± 1.03*	7.20 ± 1.14**	0.76 ± 0.25	6.44 ± 0.31***	1.47 ± 0.30**
Шардаринский	921	7.25 ± 1.18**	8.47 ± 1.32**	0.82 ± 0.40	7.65 ± 1.04**	1.68 ± 0.49*

Примечание : \* –  $p < 0.05$ ; \*\* –  $p < 0.01$ ; \*\*\* –  $p < 0.001$  в сравнении с контрольными значениями.

формация фипронила с образованием фипронил-сульфона происходила и в организме саранчи, на что указывает присутствие метаболита в организме насекомых. У саранчи, отловленной на загрязненной фипронилом территории Казыгуртского района, обнаружены лишь следовые количества этих ксенобиотиков.

Результаты исследования содержания фипронила и фипронил-сульфона в организме *Citellus fulvus* приведены в табл. 2. В висцеральных органах грызунов были обнаружены фипронил и фипронил-сульфон, причем содержание метаболита превышало содержание фипронила в печени животных. Ранее нами (Бегимбетова и др., 2010) было показано, что с увеличением срока воздействия фипронила на лабораторных крыс его содержание в висцеральных органах животных снижалось на фоне увеличения количества фипронил-сульфона. Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о метаболизме фипронила в организме *Citellus fulvus* и накоплении его метаболита фипронил-сульфона в организме животных.

Результаты цитогенетического исследования *Citellus fulvus* (табл. 3), показали, что частота aberrантных и полиплоидных клеток у суслика желтого из Казыгуртского района (зона условного контроля) соответственно составила 2.44 и 0.19%, а число хромосомных aberrаций на 100 метафаз – 2.62. Спектр хромосомных перестроек был представлен нарушениями как хромосомного (парные концевые делеции), так и хроматидного (одиночные концевые делеции и точечные фрагменты) типов. Полученные результаты согласуются с данными по фоновому уровню aberrантных клеток (около 2–3%), установленному для популяций мелких млекопитающих из условно чистых районов (Гилева и др., 1992; Дмитриев, 1997).

Сравнительный анализ изучаемых показателей у животных из зоны условного контроля и загрязненных биотопов Арысского района свидетельствует о достоверном превышении частоты

структурных и геномных мутаций у животных в загрязненных фипронилом биотопах. Частота aberrантных клеток костного мозга у сусликов была в 2.5 раза ( $p < 0.05$ ) выше, чем у животных из зоны условного контроля. У этих же животных в 2.7 раза ( $p < 0.01$ ) было выше число хромосомных aberrаций на 100 метафаз. Наряду с увеличением частоты хромосомных aberrаций наблюдалось достоверное превышение и уровня полиплоидии в 7.7 раза ( $p < 0.01$ ). Спектр структурных нарушений хромосом также был представлен перестройками хромосомного и хроматидного типов.

Аналогичная картина хромосомной нестабильности наблюдалась и у животных, отловленных в Шардаринском районе. Общая частота aberrантных клеток превысила показатели контрольной группы в 3.0 раза ( $p < 0.01$ ), а число хромосомных aberrаций на 100 просмотренных метафаз – в 3.2 раза ( $p < 0.01$ ). Уровень полиплоидных метафаз был в 8.8 раза ( $p < 0.05$ ) выше по сравнению с животными из контрольной зоны. Спектр структурных перестроек хромосом также был представлен нарушениями хромосомного и хроматидного типов.

Сравнительный анализ спектра хромосомных aberrаций, отмеченных у животных из загрязненных биотопов и зоны условного контроля, показал, что достоверное увеличение частоты aberrантных клеток и числа хромосомных aberrаций на 100 метафаз происходило за счет перестроек хроматидного типа. У сусликов из Арысского и Шардаринского районов эти показатели достоверно возросли – соответственно в 2.8 ( $p < 0.001$ ) и 3.3 ( $p < 0.01$ ) раза по сравнению с животными из зоны условного контроля. Достоверных различий по изучаемым показателям между представителями суслика желтого из Арысского и Шардаринского районов не выявлено.

Гистологическое исследование печени крыс, интоксцированных фипронилом в лабораторных условиях, показало развитие жировой дистрофии, приводящей к повреждению клеточных

мембран и усилению процессов перекисного окисления липидов (Бегимбетова и др., 2010). Биохимическое исследование содержания первичных и вторичных продуктов ПОЛ у суслика желтого из подверженных воздействию фенилпирозолов биотопов выявило аналогичную картину (табл. 4). У животных из Арысского района содержание ГПЛ и МДА было достоверно выше в 1.5 раза ( $p < 0.01$ ) по сравнению с животными из контрольной зоны, а у грызунов из биотопов Шардаринского района – в 1.6 раза ( $p < 0.05$ ). Не выявлено достоверных различий между уровнем содержания продуктов ПОЛ у природных грызунов из биотопов Арысского и Шардаринского районов.

В естественных условиях в соматических клетках любого организма могут возникать спонтанные мутации (Гилева и др., 1992, 2006; Дмитриев, 1997). Большинство клеток, которые несут несбалансированные хромосомные изменения, либо погибают из-за неспособности к осуществлению жизненно важных функций, либо удаляются иммунной системой организма. Однако при воздействии факторов, обладающих мутагенной активностью, частота таких нарушений может увеличиться. Воздействие генотоксикантов значительно подавляет работу системы репаративного синтеза ДНК и иммунной системы, вследствие чего происходят накопление хромосомных дефектов и нарушение цитогенетического гомеостаза организма.

Цитогенетические исследования представителей фоновых видов грызунов в биотопах, подверженных воздействию инсектицидов на основе фипронила, указывают на повышенную частоту структурных и геномных мутаций по сравнению с особями данного вида из района условного контроля. Увеличение частоты аберрантных клеток и числа хромосомных aberrаций на 100 метафаз обусловлено главным образом индукцией перестройки хроматидного типа. Повышенный уровень структурных нарушений хроматидного типа у природных грызунов свидетельствует о химическом загрязнении территории обитания суслика желтого.

Таким образом, результаты цитогенетического, газохроматографического и биохимического исследований свидетельствуют о неблагоприятном состоянии природных экосистем, подвергнутых воздействию пестицидов на основе фипронила. Кроме того, результаты цитогенетического анализа дают нам основание говорить о возрастании генетического груза в природных популяциях грызунов в исследуемых экосистемах. Ускорение частоты мутаций ведет к увеличению числа особей с врожденными дефектами. Увеличение объема генетического груза может стать опасным для существования популяций (Дубинин, 2000; Алтухов, 2004). Обнаруженные цитогенетические и биохимические изменения у *Citellus fulvus* сви-

**Таблица 4.** Содержание продуктов ГПЛ и МДА в печени *Citellus fulvus* из биотопов, подверженных воздействию инсектицидов на основе фипронила

Район отлова	Содержание, мМоль/мг	
	ГПЛ	МДА
Казыгуртский (зона условного контроля)	3.53 ± 0.27	4.06 ± 0.43
Арысский	5.39 ± 0.41**	6.13 ± 0.31**
Шардаринский	5.57 ± 0.74*	6.95 ± 0.55**

Примечание: \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$  в сравнении с контролем.

детельствуют о присутствии генотоксических факторов в естественной среде обитания изучаемых животных, а также об изменении общего состояния организма в популяциях млекопитающих в исследуемых районах.

Работа выполнена в рамках проекта Фонда науки Республики Казахстан, ГР № 0109РК00153 (2009–2011 гг.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алтухов Ю.П. Динамика генофондов при антропогенных воздействиях // Вестн. ВОГиС. 2004. Т. 8. № 2. С. 40–59.
- Бегимбетова Д.А., Колумбаева С.Ж., Калимагамбетов А.М. и др. Генотоксическое действие фипронила на крыс разного возраста // Вестн. КазНУ. Серия биол. 2009. № 1 (40). С. 78–83.
- Бегимбетова Д.А., Колумбаева С.Ж., Калимагамбетов А.М. и др. Влияние пестицидов класса фенилпирозолов на организм млекопитающих // Наука и культура в глобализованном мире: Мат-лы 3-й международной междисциплинарной конференции Гумбольдт-Коллег в Кыргызстане. Бишкек, 2010. С. 83–86.
- Временные методические указания по определению остаточных количеств метаболита фипронил-сульфона в воде, почве, клубнях картофеля, зерне и соломе зерновых колосовых культур методом газожидкостной хроматографии. М., 1997. 65 с.
- Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лабораторное дело. 1983. № 3. С. 23–25.
- Гилева Э.А., Большаков В.Н., Косарева Н.Л., Габитова А.Т. Частота хромосомных нарушений у синантропных домашних мышей как показатель генотоксического эффекта загрязнителей окружающей среды // Докл. РАН. 1992. Т. 322. № 5. С. 1058–1061.
- Графодатский А.С., Раджабли С.И. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных млекопитающих. Новосибирск: Наука, 1988. 127 с.
- Дмитриев З.Г. Цитогенетическая нестабильность у трех видов грызунов в районе химического предприя-

- тия на севере России // Экология. 1997. № 6. С. 447–451.
- Дубинин Н.П.* Радиационный и химический мутагенез: Избр. труды. Т. 2. М.: Наука. 2000. 465 с.
- Определение остаточных количеств фипронила и его метаболита фипронил-сульфона в воде, почве, клубнях картофеля, зерне и соломе зерновых колосовых культур методом газожидкостной хроматографии: Методич. указания. МУК 4.1.1400-03. М., 2003. 31 с.
- Рокицкий Н.А.* Введение в статистическую генетику. Минск: Высшая школа, 1978. 448 с.
- Сагитов А.О., Бсак С., Евдокимов Н.Я.* Прогнозирование объемов химических обработок против вредных саранчовых в Казахстане // Защита и карантин растений. 2002. № 1. С. 19–20.
- Справочник пестицидов (ядохимикатов), разрешенных к применению на территории Республики Казахстан. Алматы: Рекламное агентство «АНЕС», 2008. 128 с.
- Стальная И.Д., Гаришвили Г.Г.* Определение МДА с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. Под ред. В.Н. Ореховича. М., 1977. С. 66–68.
- Biolognesi C.* Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies // *Mutat. Res.* 2003. № 6. 543. P. 251–272.
- González M. et al.* Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro. IV. DNA damage and repair kinetics assessed by single cell gel electrophoresis (SCGE) assay on Chinese hamster ovary (CHO) cells // *Mutation Research (Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis)*. 2003. V. 534. P. 145–154.
- Fung H.T., Chan K.K., Ching W.M., Kam C.W.* A Case of Accidental Ingestion of Ant Bait Containing Fipronil // *Clinical Toxicology*. 2003. V. 41. № 3. P. 245–248.
- Losi-Guembarovski R., Santos F.V., Dias F.L. et al.* Assessment of the ability of Imazaquin herbicide to induce chromosomal aberrations in vitro in cultured Chinese hamster ovary cells and micronuclei in vivo in mice // *Food and Chemical Toxicology*. 2004. V. 42. P. 1245–1249.
- Mukhopadhyay I., Chowdhuri Dk., Bajpayee M.* Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline comet assay // *Mutagenesis*. 2004. № 19 (2). P. 85–90.