

УДК 575.224.46:599.323.4

ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕСТИЦИДА ФИПРОНИЛА НА СОМАТИЧЕСКИЕ И ГЕНЕРАТИВНЫЕ КЛЕТКИ МЫШЕЙ

© 2016 г. А. В. Ловинская¹, С. Ж. Колумбаева¹, О. Л. Коломиец², С. К. Абилов²

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы 050040, Казахстан
e-mail: annalovinska@rambler.ru

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва 119991
Поступила в редакцию 17.09.2015 г.

С использованием метода ДНК-комет установлено, что фипронил при всех использованных дозах (4.75, 9.50, 19.00 и 31.70 мг/кг) при однократном воздействии на мышей вызывал выраженный генотоксический эффект в клетках печени, легких и селезенки. Выявлена органоспецифичность генотоксического действия изученного пестицида. Наиболее чувствительным органом к действию фипронила оказалась печень. Фипронил в дозе 9.50 мг/кг при однократном и многократном воздействии (в течение 10 дней) индуцировал в клетках костного мозга мышей хромосомные aberrации с частотой, превышающей спонтанный уровень мутирования ($p < 0.01$, $p < 0.001$ соответственно). Фипронил также проявлял генотоксическую активность и в половых клетках экспериментальных животных, вызывая нарушения структуры синаптонемных комплексов сперматоцитов.

Ключевые слова: фипронил, разрывы ДНК, хромосомные aberrации, синаптонемный комплекс, пестицид.

DOI: 10.7868/S0016675816050076

Вследствие интенсификации всех отраслей промышленности биосфера насыщается огромным количеством разнообразных искусственно синтезированных химических соединений (пестициды, пищевые добавки, лекарственные препараты, красители, детергенты и др.), число которых ежегодно увеличивается. По данным Chemical Abstracts Service от 03.08.2015 г. официально зарегистрировано более 101 млн химических соединений [1]. Для подавляющего большинства этих ксенобиотиков характерна мутагенная и канцерогенная активность [2]. Воздействия химических веществ на человека в любой момент времени могут привести к вредным последствиям и для репродуктивного здоровья. Например, пренатальное воздействие некоторых пестицидов приводило к увеличению риска рака у потомков; воздействие пестицидов вызывало у взрослых мужчин изменение качества спермы, бесплодие и рак простаты, а у женщин – нарушение репродуктивной функции, в том числе полового созревания, менструального цикла и овуляции, плодовитости и менопаузы [3]. По самым скромным оценкам специалистов в мире бесплодием страдают около 48.5 млн супружеских пар [4].

Интенсивное развитие сельского хозяйства требует производства и применения новых классов пестицидов. Зачастую пестицидами поражаются не только целевые виды, являющиеся ми-

шенями действия препаратов, но и многие другие виды, в том числе естественные хищники и паразиты подавляемых форм. Кроме того, формируются устойчивые к пестицидам популяции видов-вредителей. Однако применение пестицидов неизбежно, так как обусловлено экономической необходимостью. До настоящего времени в мировой практике широко используются пестициды на основе фипронила ([5-амино-[2,6-дихлор-4-(трифторметил)фенил]-4-[(1R,S)-(трифторметил)сульфинил]-1H-пиразол-3-карбонитрил]), в том числе в России и Казахстане для борьбы с саранчовыми [5, 6]. На основе фипронила разработан ряд пестицидов нового поколения (адонис КЭ, космос КС, регент ВДГ, регент КС и регент КЭ), применяемых для подавления саранчовых, проволочников, колорадского жука, клопа вредной черепашки и многих других вредителей на зерновых, картофеле, сахарной свекле. Несмотря на имеющиеся сведения о токсических и генотоксических эффектах пестицидов на основе фипронила на организм млекопитающих [7–9], их влияние на половые клетки и репродуктивный потенциал животных практически не изучено. Поэтому исследование токсического и генотоксического действия данных ксенобиотиков не только на соматические, но и на половые клетки млекопитающих, исследование механизмов нарушения мейоза, приводящих к стерильности и бесплодию, представляются крайне актуальны-

ми. Знание механизмов генотоксического действия ксенобиотиков на соматические и половые клетки млекопитающих позволит вести целенаправленный поиск средств защиты организма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах было использовано 60 лабораторных мышей-самцов линии *BALB/c Ywal* в возрасте 2–3 мес. с массой тела 25–30 г, разделенных на 12 групп по пять мышей в каждой: I группа – интактные животные (негативный контроль); II–V группы – животные, однократно получавшие фипронил в дозах 4.75, 9.50, 19.00, 31.70 мг/кг соответственно и забиваемые через 6 ч после введения ксенобиотика; VII–X группы – животные, получавшие однократно фипронил в дозах 4.75, 9.50, 19.00, 31.70 мг/кг соответственно и забиваемые через 24 ч после введения ксенобиотика; VI, XI – животные, однократно получавшие алкилирующий противоопухолевый препарат циклофосфамид в дозе 50.00 мг/кг и забиваемые соответственно через 6 и 24 ч (позитивный контроль); XII группа – животные, получавшие фипронил в дозе 9.50 мг/кг ежедневно в течение 10 дней.

Водный раствор фипронила вводили животным внутривенно. Максимальная доза фипронила соответствовала 1/3 ЛД₅₀ для мышей – 95.0 мг/кг [10]. Животных забивали под изофлурановым наркозом, забирали образцы тканей внутренних органов (печень, селезенка, легкие) для исследования повреждений ДНК с помощью метода ДНК-комет, образцы костного мозга – для цитогенетического анализа, образцы семенников – для получения тотальных препаратов синаптонемных комплексов с последующим их иммуноцитохимическим анализом.

Для оценки уровня повреждений ДНК использовали щелочной вариант метода ДНК-комет (“DNA-comet assay”, другое название – гель-электрофорез изолированных клеток). Подготовка материала для анализа по методу ДНК-комет проводили по методическим рекомендациям [11].

Для изучения степени повреждения ДНК клеток внутренних органов образцы тканей гомогенизировали, клетки иммобилизовали в 0.5%-ной теплой (37°C) легкоплавкой агарозе. Полученную взвесь клеток наносили на подготовленный слайд (1%-ная нормоплавкая агароза на воде), затем клетки подвергали действию лизирующего раствора (2.5 мМ NaCl, 100 мМ Na₂EDTA, 10 мМ трис-HCl, с добавлением непосредственно в день эксперимента 10% DMSO и 1% тритона ×100 (в % от конечного объема), pH 10) в течение одного часа при 4°C. Слайды, содержащие лизат клеток, помещали в щелочной буфер (1 мМ Na₂EDTA, 300 мМ NaOH, pH 13) на 20 мин для раскручивания спирали ДНК и реализации щело-

челабильных сайтов в однонитевые разрывы. После этого последовательно проводили: электрофорез (0.7 В/см, 200 мА, 10 мин), нейтрализацию слайдов в нейтрализующем буфере (трис-HCl, pH 7.5), высушивание их. После электрофореза каждое клеточное ядро приобретает форму кометы. Ее ядро составляет основная масса ядерной ДНК, а “хвост” – фракция ДНК, образовавшаяся в результате появления разрывов высокомолекулярной хромосомной ДНК. Далее слайды окрашивали акридиновым оранжевым и проводили флуоресцентный анализ препаратов с помощью универсального флуоресцентного микроскопа Axio Imager D1 (Carl Zeiss, Германия). Учитывали содержание ДНК в хвосте комет (в %) с помощью программы Comet score. Показатель “% ДНК в хвосте кометы” отражает количество низкомолекулярной ДНК в виде однонитевых фрагментов, образовавшихся в результате разрывов и реализации щелочелабильных участков ДНК и мигрировавших в сторону анода при электрофорезе.

Метафазный метод по учету хромосомных aberrаций в клетках костного мозга животных проводили согласно общепринятой методике [12]. Для окраски хромосомных препаратов использовали краситель Азур-Эозин по Романовскому-Гимзе. Метафазные пластинки анализировали и фотографировали в световом микроскопе Axioskop-40 (Zeiss).

Тотальные препараты распластанных синаптонемных комплексов (СК) получали и фиксировали по методу Navarro et al. [13] с модификациями Kolomiets et al. [14]. Иммуноокрашивание тотальных препаратов проводили по методу Anderson et al. [15]. СК и осевые элементы хромосом выявляли с помощью кроличьих антител против белка SCP3 в разведении 1 : 250 (Abcam, Cambridge, UK). В качестве вторичных антител использовали козы антитела против IgG кролика, меченные FITC (Jackson ImmunoResearch), в разведении 1 : 400. Центромеры выявляли с использованием первичных антител IgG человека против белков кинетохора (CREST), 1 : 500 (Antibody Incorporated, California, USA), и вторичных козых антител против IgG человека, конъюгированных с Alexa Fluor 546, 1 : 200 (Invitrogen, USA). Отмывали препараты водно-солевым буфером и заключали в среду Vectashield с DAPI. Иммунофлуоресцентный анализ препаратов СК проводили с помощью универсального флуоресцентного микроскопа Axio Imager D1 (Carl Zeiss, Германия). Учитывали ядра с фрагментацией, нарушением формирования полового тельца, ассоциацией аутосом с половым бивалентом, преждевременным десинапсисом половых хромосом, а также ядра с кольцевыми СК, атипичной структурой СК.

Статистическую обработку данных проводили в надстройке “Анализ данных” Microsoft Excel,

Таблица 1. Содержание ДНК в “хвосте кометы” в клетках внутренних органов мышей, однократно интоксцированных фипронилом

Группа животных	Вариант; доза, мг/кг		ДНК ($M \pm m$), %		
			Печень	Легкие	Селезенка
I	Контроль		1.35 ± 0.04	1.30 ± 0.05	1.38 ± 0.04
II	Через 6 ч после введения фипронила	4.75	1.36 ± 0.05	1.46 ± 0.08*	1.38 ± 0.07
III		9.50	1.54 ± 0.07*	1.68 ± 0.07***	2.18 ± 0.10***
IV		19.00	2.74 ± 0.07***	3.03 ± 0.14***	3.34 ± 0.14***
V		31.70	3.70 ± 0.09***	5.45 ± 0.11***	3.44 ± 0.15***
VI	Циклофосфамид, 50.00		17.50 ± 0.75***	12 ± 0.45***	15 ± 0.60***
VII	Через 24 ч после введения фипронила	4.75	2.07 ± 0.09***	1.31 ± 0.06	1.26 ± 0.06
VIII		9.50	3.12 ± 0.10***	1.55 ± 0.07**	1.41 ± 0.07
IX		19.00	3.76 ± 0.10***	2.53 ± 0.09***	2.07 ± 0.09***
X		31.70	5.64 ± 0.13***	3.56 ± 0.13***	2.94 ± 0.07***
XI	Циклофосфамид, 50.00		12.45 ± 0.24***	7.32 ± 0.17***	6.70 ± 14***

Примечание. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ в сравнении с негативным контролем.

StatPlus и WINPIPI. Во всех случаях определяли средние значения и ошибки среднего. Достоверность различий средних оценивали, используя непараметрический U -тест Манна–Уитни и тест Стьюдента. Различия считались достоверными при доверительной вероятности 0.95.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение органоспецифичности генотоксического действия фипронила на внутренние органы грызунов

В результате проведенных исследований установлена чувствительность различных органов лабораторных мышей к генотоксическому действию фипронила в зависимости от используемой дозы и времени воздействия от момента однократной инъекции ксенобиотика (табл. 1). Фипронил при всех используемых дозах через 6 ч после введения животным статистически значимо увеличил повреждения ДНК в клетках печени, легких и селезенки по сравнению с негативным контролем. Исключение составила наименьшая доза фипронила, не проявившая генотоксической активности в клетках печени и селезенки. С увеличением дозы ксенобиотика от 4.75 до 31.70 мг/кг наблюдалось достоверное увеличение процентного содержания ДНК в “хвосте кометы” в клетках всех изучаемых органов. Отсутствовали статистически значимые различия только между содержанием ДНК в “хвосте кометы” в клетках селезенки мышей, интоксцированных фипронилом в дозах 19.00 и 31.70 мг/кг.

Анализ клеток через 24 ч после введения фипронила также выявил увеличение процентного содержания ДНК в “хвосте кометы”. Однако статистически значимое увеличение наблюдалось только в клетках печени при всех дозах фипронила по сравнению с интактными животными ($p < 0.001$), в то время как в легких – при второй, третьей и четвертой дозах ($p < 0.001$), а в селезенке – при третьей и четвертой дозах ($p < 0.001$).

Необходимо отметить, что в клетках легких и селезенки разрывы ДНК происходили в первые шесть часов после воздействия фипронила, а к 24 часам их уровень снижался. В клетках печени наблюдалась противоположная картина – через 24 ч после воздействия ксенобиотика наблюдалось увеличение частоты разрывов ДНК по сравнению с результатами, полученными через 6 ч после инъекции препарата животным.

Цитогенетический эффект фипронила в организме экспериментальных животных

Проведенный цитогенетический анализ клеток костного мозга лабораторных мышей показал, что фипронил при всех сроках воздействия на животных вызывал структурные нарушения хромосом с частотой, достоверно превышающей спонтанный уровень мутирования (табл. 2).

Фипронил в результате острого воздействия индуцировал в клетках костного мозга мышей хромосомные aberrации с частотой, превышающей контрольный уровень. Частота aberrантных клеток и число aberrаций на 100 метафаз возросли соответственно в 1.5 и 1.9 раза по сравнению с

Таблица 2. Частота и спектр структурных нарушений хромосом, индуцированных в клетках костного мозга лабораторных мышей при разных сроках воздействия фипронила

Вариант опыта	Сроки воздействия	Всего изучено клеток	Частота aberrантных клеток ($M \pm m$), %	Число хромосомных aberrаций на 100 метафаз			Частота полиплоидных клеток ($M \pm m$), %
				всего aberrаций	хромосомного типа	хроматидного типа	
Контроль		990	1.59 ± 0.32	1.68 ± 0.28	0.63 ± 0.24	1.05 ± 0.19	0.51 ± 0.23
Фипронил 9.50 мг/кг	Однократное (VIII группа)	955	2.41 ± 0.29	$3.23 \pm 0.35^{**}$	0.80 ± 0.11	$2.43 \pm 0.25^{**}$	$2.01 \pm 0.15^{***}$
	10 дней (XII группа)	1000	$3.63 \pm 0.39^{**}$	$4.47 \pm 0.22^{***}$	1.17 ± 0.25	$3.30 \pm 0.21^{***}$	$4.11 \pm 0.39^{***}$

Примечание: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ в сравнении с контрольными значениями.

контролем, однако статистически значимое увеличение отмечено только по числу структурных мутаций на 100 метафаз ($p < 0.05$). Спектр наблюдаемых хромосомных aberrаций у животных как контрольной, так и опытной группы был представлен нарушениями хромосомного (парные концевые фрагменты) и хроматидного (одиночные концевые делеции, ацентрические кольца и точечные фрагменты) типов. Достоверное увеличение числа хромосомных aberrаций на 100 метафаз происходило за счет перестроек хроматидного типа. Кроме того, наблюдалось достоверное увеличение частоты геномных мутаций, представленных полиплоидными наборами хромосом ($p < 0.001$).

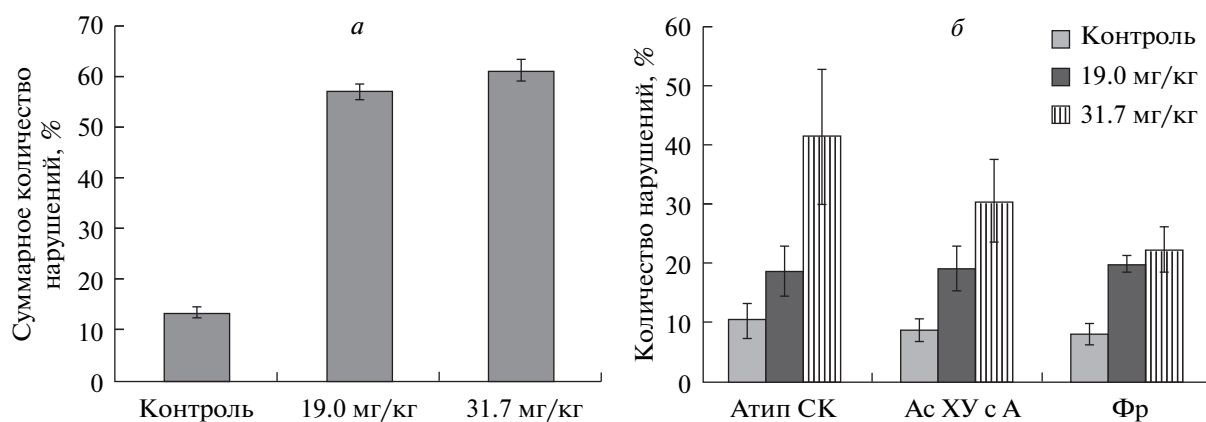
Подострое воздействие фипронила на опытных животных в течение 10 дней достоверно увеличило как частоту aberrантных клеток ($p < 0.01$), так и число хромосомных aberrаций на 100 метафаз ($p < 0.001$). Спектр хромосомных aberrаций был представлен перестройками хромосомного и хроматидного типов, с превалированием последних. Достоверное увеличение числа структурных

мутаций происходило также за счет нарушений хроматидного типа ($p < 0.001$). Анализ частоты геномных мутаций также выявил статистически значимое увеличение (в 8.4 раза, $p < 0.001$) уровня полиплоидных клеток у интоксцированных животных по сравнению с контролем.

Изучение действия фипронила на половые клетки мышей

Для определения генотоксического действия фипронила на сперматоциты животных мы учитывали частоту и спектр нарушений синаптонемных комплексов в стадиях пахитены и диплотены мейоза. Анализ сперматоцитов через 6 ч после введения фипронила не выявил различий в сравнении с интактными животными. Распределение суммарного количества нарушений и их типов через 24 ч после однократного воздействия различных доз фипронила на лабораторных мышей представлено на рисунке.

При введении в организм животных фипронила в дозах 19.0 и 31.7 мг/кг количество ядер с на-



Распределение суммарного количества нарушений (а) и разных типов нарушений (б) после 24-часового однократного воздействия различных доз фипронила. Атип СК – атипичная структура СК; Фр – фрагментация СК; Ас ХУ с А – ассоциация полового бивалента с аутосомами.

рушениями превысило контрольный уровень в 4.3 и 4.6 раза соответственно. Спектр нарушений синаптонемного комплекса был представлен фрагментацией, ассоциацией аутосом с половым бивалентом, преждевременным десинапсисом половых хромосом, нарушением формирования полового тельца, кольцевыми СК, атипичной структурой СК, также обнаружено ядро с бактерией. К атипичным структурам осевых элементов СК отнесены изгибы, петли, истончение осевых элементов и скопление их в виде клубка. Преобладающими нарушениями явились атипичная структура СК, ассоциации аутосом с половым бивалентом и фрагментация СК. Так, атипичная структура СК выявлялась в ядрах сперматоцитов мышей, интоксцированных фипронилом в дозе 19.0 мг/кг, в 1.8 раза чаще по сравнению с интактными животными, а при дозе 31.7 мг/кг – в 4.0 раза. Количество ядер с ассоциацией аутосом с половым бивалентом при воздействии ксенобиотика в дозах 19.0 и 31.7 мг/кг увеличилось соответственно в 2.2 и 3.5 раза по сравнению с контролем, а с фрагментацией СК – в 2.5 и 2.8 раза.

С увеличением дозы ксенобиотика наблюдалось не только увеличение количества нарушений, но и расширение их спектра. Так, у интоксцированных фипронилом мышей выявлены кольцевые СК, преждевременный десинапсис половых хромосом и нарушение формирования полового тельца, отсутствовавшие у интактных животных. Необходимо отметить, что преждевременный десинапсис половых хромосом и нарушение формирования полового тельца обнаружены у мышей только при воздействии фипронила в дозе 31.7 мг/кг. Также в ядрах интоксцированных животных были выявлены как множественная фрагментация СК (“мейотическая катастрофа”), так и/или единичные фрагменты СК. В контроле встречались только единичные фрагменты СК.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время метод ДНК-комет широко используется в исследованиях генотоксичности различных фармацевтических препаратов, промышленных химических веществ, а также становится неотъемлемой частью программ по биомониторингу [2, 16–20]. Метод успешно применяется при исследовании динамики действия генотоксических агентов окружающей среды, когда низкие дозы сочетаются с большой длительностью воздействия фактора [16].

В наших исследованиях с помощью метода ДНК-комет установлена органоспецифичность к генотоксическому действию фипронила. Наиболее чувствительными оказались клетки печени, а наименее – легких и селезенки. ДНК-повреждающий эффект фипронила зависел от дозы и вре-

мени проведения анализа от момента воздействия ксенобиотика.

Из данных литературы известно, что основным метаболитом фипронила, обнаруженным в образцах тканей интоксцированных животных (жировая, мышечная ткани, печень, почки, матка), является фипронил-сульфон, который был обнаружен как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* [21–23]. Причем фипронил-сульфон обнаруживался у мышей в мозге, печени, почках через семь часов после введения фипронила [23]. Возможно, увеличение нарушений ДНК в клетках печени через 24 ч от момента воздействия по сравнению с шестью часами связано с метаболизмом фипронила и образованием фипронил-сульфона в клетках печени, обладающего более выраженным гепатотоксическим и генотоксическим эффектом.

В литературе встречаются достаточно противоречивые данные о генотоксичности фипронила [21, 24, 25]. Он в условиях *in vitro* не индуцировал мутации в лимфоцитах человека, в клетках китайского хомячка V79, в тесте Эймса *Salmonella*/микросомы, однако достоверно повышал частоту хромосомных aberrаций в культуре клеток CHL. Не увеличивал частоту микроядер в клетках костного мозга мыши [21].

В наших исследованиях цитогенетический анализ клеток костного мозга лабораторных мышей, интоксцированных фипронилом, выявил достоверное увеличение структурных и геномных мутаций, что свидетельствует о его мутагенной активности. Сравнительный анализ полученных результатов показал, что с увеличением продолжительности воздействия фипронила возрастает и уровень индуцированного мутагенеза. Сравнительный анализ числа хромосомных перестроек на 100 метафаз и частоты полиплоидных клеток выявил достоверное увеличение этих показателей у интоксцированных в течение 10 дней животных (соответственно $p < 0.05$ и $p < 0.001$) по сравнению с острым воздействием.

При анализе токсического действия пестицидов особое внимание уделяется их влиянию на генетический аппарат [26, 27]. Большинство пестицидов и их метаболиты изменяют структурно-функциональную организацию ядерного генома при проникновении в клеточное ядро. Для ряда пестицидов установлено, что они вызывают трансформацию эмбриональных клеток, индуцируют генные и структурные мутации, сестринские хроматидные обмены, нарушение синтеза, репликации и транскрипции ДНК, синтеза РНК, индуцируют разрывы ДНК, способствуют окислительной модификации оснований, угнетают репаративные системы клетки [27].

В ряде исследований было показано, что лиганд-опосредованный механизм взаимодействия

ксенобиотиков определяет и регуляцию специфической транскрипции определенного набора генов, что дает логическое обоснование и объяснение чувствительности тканей к индуцированному пестицидами воздействию. Особое внимание уделяется роли липидов ядерного генома в связи с их участием в реакциях свободнорадикального окисления, в первую очередь в реакциях перекисного окисления липидов (ПОЛ) [28–30].

Обширные данные о генотоксическом действии продуктов ПОЛ свидетельствуют о первоочередной роли модификации процессов перекисного окисления хроматинсвязанных липидов в молекулярных механизмах генотоксического действия многих органических пестицидов [29, 30]. Ранее нами было показано, что в печени крыс, многократно интоксцированных фипронилом и его метаболитом фипронил-сульфоном, статистически значимо увеличивалось содержание первичных (гидроперекись липидов – ГПЛ) и вторичных (малоновый диальдегид – МДА) продуктов перекисного окисления липидов по сравнению с интактными животными [31, 32].

Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что одним из вероятных механизмов генотоксического действия пестицидов на основе фипронила является перекисное окисление липидов, сопровождающееся увеличением содержания МДА, что свидетельствует о непрерывности свободнорадикальных процессов. С большой долей вероятности токсичный фипронил и продукты его трансформации нарушают работу клеточной системы репарации, что влечет за собой переход первичных повреждений в молекуле ДНК в стойкие мутации.

К настоящему времени получены многочисленные данные, свидетельствующие о высокой информативности анализа СК для тестирования мутагенного действия физических и химических агентов. Этот анализ можно использовать как индикатор спонтанных и индуцированных хромосомных перестроек в мейозе, а также для выявления аномалий мейоза и причин бесплодия у человека и генетического риска при действии ксенобиотиков [33, 34].

Фрагментация СК может быть связана с процессом апоптоза или некроза мейотических клеток. Высокие уровни фрагментации СК (20–70%) также могут быть связаны с развитием блока мейоза на стадии сперматоцитов I [35]. Формирование одно- и двунитевых разрывов ДНК, разрывов хромосом несет риск формирования хромосомных aberrаций и комплексных хромосомных перестроек. Носители сбалansirованных комплексных хромосомных перестроек имеют высокий риск рецидивирующих спонтанных аборт, бесплодия и/или появления ребенка с умственной отсталостью и врожденными аномалиями [36].

Если фрагментация хромосом происходит на стадиях лептотены–зиготены, то на стадии пахитены формируются гетероморфные биваленты. Начиная с ранней пахитены, гетероморфные биваленты ассоциируют с половым (XY) бивалентом. Половой бивалент, ассоциированный с аутосомой, не перемещается на периферию ядра и не формирует “половое тельце”, обособленное от аутосом. У самцов млекопитающих нарушение синапсиса аутосом, нарушение формирования “полового тельца” вследствие ассоциации аутосомных СК с половым бивалентом приводят к блоку мейоза или пахитенному аресту. Отмеченные нарушения ведут к увеличению ошибок в мейотической сегрегации хромосом, снижая уровень рекомбинации и транскрипции. У человека такие нарушения приводят к самопроизвольным абортам на ранних стадиях беременности или к рождению потомков с такими заболеваниями, вызванными анеуплоидией, как синдромы Дауна, Клайнфельтера, Эдвардса и Тернера [37].

Работа выполнена в рамках проекта МОН РК ГР № 0112РК00580. Руководитель: С.Ж. Колумбаева. Работа частично финансировалась Программой Президиума РАН “Живая природа”. Руководитель проекта С.К. Абилов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальный размер базы Chemical Abstracts Service (CAS). Available at: <http://www.cas.org/cgi-bin/cas/regexport.pl>
2. Абилов С.К., Глазер В.М. Генетическая токсикология: итоги и проблемы // Генетика. 2013. Т. 49. № 1. С. 81–93.
3. Sutton P., Perron J., Giudice L.C., Woodruff T.J. Pesticides matter: a primer for reproductive health physicians. San Francisco (CA): Univ. California, 2011. 25 p.
4. Agarwal A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M.R. A unique view on male infertility around the globe // Reproductive Biology and Endocrinology. 2015. V. 13. № 37. DOI: 10.1186/s12958-015-0032-1
5. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Часть I. Пестициды. М.: Мин-во сельского хоз-ва РФ, 2015. С. 124–125.
6. Список пестицидов, разрешенных к применению на территории Республики Казахстан на 2013–2022 годы // Приложение к Приказу Председателя Комитета государственной инспекции в агропромышленном комплексе Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан от “27” декабря 2012 года № 143. С. 26.
7. Çelik A., Ekinçi S.Ya., Guler G., Yildirim S. In vitro genotoxicity of fipronil sister chromatid exchange, cytokinesis block micronucleus test, and Comet assay // DNA and Cell Biology. 2014. V. 33. № 3. P. 148–154.
8. Kolumbaeva S.Zh., Begimbetova D.A., Lovinskaya A.V., Kalimagambetov A.M. Studies of the yellow ground squirrel (*Citellus fulvus* Licht.) in biotopes contaminat-

- ed with Phenylpyrazoles // Russ. J. Ecology. 2013. V. 44. № 3. P. 231–234.
9. Колумбаева С.Ж., Бегимбетова Д.А. Мутагенные эффекты химических загрязнителей окружающей среды. Алматы: Казак унив., 2013. 196 с.
 10. Белан С.Р., Трапов А.Ф., Мельникова Г.М. Новые пестициды. М.: ВНИИХСЗР, 2001. 196 с.
 11. Hartmann A., Agurell E., Beevers C. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay // Mutagenesis. 2003. V. 18. № 1. P. 45–51.
 12. Графодатский А.С., Раджабли С.И. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных млекопитающих. Новосибирск: Наука, 1988. 127 с.
 13. Navarro J., Vidal F., Quitart M. A method for the sequential study of synaptonemal complex by light and electron microscopy // Hum. Genet. 1981. V. 59. P. 419–423.
 14. Kolomiets O.L., Matveevsky S.N., Bakloushinskaya I.Yu. Sexual dimorphism in prophase I of meiosis in mole vole (*Ellobius talpinus* Pallas) with isomorphic (XX) chromosomes in males and females // Comparative Cytogenetics. 2010. V. 4. № 1. P. 55–66.
 15. Anderson L.K., Reeves A., Webb M.L., Ashley T. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein // Genetics. 1999. V. 159. April. P. 1569–1579.
 16. Сорочинская У.Б., Михайленко В.М. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды // Онкология. 2008. Т. 10. № 3. С. 303–309.
 17. Жанатаев А.К., Дурнев А.Д., Оганесянц Л.А. Метод гель-электрофореза изолированных клеток (метод “ДНК-комет”) в пищевой генотоксикологии // Хранение и переработка сельхозсырья. 2007. № 1. С. 15–20.
 18. Sauvaigo S., Bonnet-Duquennoy M., Odin F. et al. DNA repair capacities of cutaneous fibroblasts: effect of sun exposure, age and smoking on response to an acute oxidative stress // Br. J. Dermatol. 2007. V. 157. № 1. P. 26–32.
 19. Møller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2005. V. 96. № 1. P. 1–2.
 20. Орджоникидзе К.Г., Занадворова А.М., Абилев С.К. Изучение органоспецифичности генотоксического действия циклофосфана и диоксидаина методом щелочного гель-электрофореза // Генетика. 2011. Т. 47. № 6. С. 853–855.
 21. Jackson D., Cornell C.B., Luukinen B. et al. Fipronil Technical Fact Sheet. National Pesticide Information Center: Oregon State Univ. Extension Services, 2009. 11 p.
 22. AFSSE. Evaluation des risques pour la santé humaine liés à une exposition au fipronil // Agence Française de Sécurité Sanitaire Environnementale, 2005. Mars. 173 p.
 23. CDPR. Fipronil [CASRN: 120068-37-3] // Materials for the July 28–29, 2009 Meeting of the California Environmental Contaminant Biomonitoring Program (CECBP) Scientific Guidance Panel (SGP). California Department of Pesticide Regulation. 4 p.
 24. Tavares M.A., Palma I.D.F., Medeiros H.C.D. et al. Comparative effects of fipronil and its metabolites sulfone and desulfinyl on the isolated rat liver mitochondria // Environmental Toxicology and Pharmacology. 2015. V. 40. № 1. P. 206–214.
 25. de Oliveira P.R., Bechara G.H., Denardi S.E. et al. Genotoxic and mutagenic effects of fipronil on mice // Experimental and Toxicologic Pathology. 2012. № 64. P. 569–573.
 26. Fahmy M.A. Cytogenetic studies on the effect of feeding mice with stored wheat grains treated with malathion // Mutat. Res. (Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis). 2002. V. 513. № 1 (2). P. 1–10.
 27. Дурнев А.Д. Методические аспекты исследований по модификации химического мутагенеза // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. 2008. Т. 146. № 9. С. 281–287.
 28. Буторина А.К., Калаев В.Н. Анализ чувствительности различных критериев цитогенетического мониторинга // Экология. 2000. № 3. С. 206–210.
 29. Lushchak V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification // Chemico-Biological Interactions. 2014. V. 224. № 5. P. 164–175.
 30. Моулисова В.И. Силибин уменьшает перекисное окисление липидов мембраны гепатоцитов крысы, индуцированное циклоспорином А // Биохимия. 2006. Т. 71. № 9. С. 1371–1376.
 31. Бегимбетова Д.А., Колумбаева С.Ж., Калимагамбетов А.М. и др. Генотоксическое действие метаболитов фипронила на крыс разного возраста. Часть 1. Эффект фипронил-сульфона на крыс при остром воздействии // Вестник КазНУ. Серия биол. 2008. Т. 37. № 2. С. 61–64.
 32. Колумбаева С.Ж., Бегимбетова Д.А., Ловинская А.В., Калимагамбетов А.М. Содержание первичных и вторичных продуктов перекисного окисления в печени лабораторных крыс при воздействии фипронила и фипронил-сульфона // Вестник КазНУ. Серия биол. 2012. Т. 56. № 4. С. 316–319.
 33. Коломиец О.Л., Абдуев Н.К., Мазурова Т.Ф. и др. Повреждающее действие антибиотиков на структуру синаптонемных комплексов мейотических хромосом мыши // Генетика. 2001. Т. 37. № 2. С. 197–206.
 34. Коломиец О.Л., Ацаева М.М., Дадашев С.Я. и др. Нарушения структуры синаптонемных комплексов и особенности селекции сперматоцитов I порядка у мыши в ответ на введение лекарственных препаратов // Генетика. 2013. Т. 49. № 11. С. 1261–1269.
 35. Tassistro V., Ghalamoun-Slaimi R., Saias-Magnan J., Guichaoua M.-R. Chronology of meiosis & synaptonemal complex abnormalities in normal & abnormal spermatogenesis // Indian J. Med. Res. 2009. V. 129. № 3. P. 268–278.
 36. Madan K. Balanced complex chromosome rearrangements: reproductive aspects. A review // Am. J. Med. Genet. A. 2012. V. 158A. № 4. P. 947–963.
 37. Guiraldelli M.F., Eyster C., Wilkerson J.L. et al. Mouse HFM1/Mer3 is required for crossover formation and complete synapsis of homologous chromosomes during meiosis // PLoS Genet. 2013. V. 9. № 3. P. e1003383.

Genotoxic Effects of Pesticide Fipronil in Somatic and Generative Cells of Mice

A. V. Lovinskaya^a, S. Zh. Kolumbayeva^a, O. L. Kolomiets^b, and S. K. Abilev^b

^a Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, 050040 Kazakhstan

e-mail: annalovinska@rambler.ru

^b Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

The pronounced genotoxic effect of fipronil in all used doses (4.75, 9.50, 19.00, and 31.70 mg/kg) at a single exposure in the liver, kidney, lungs, and spleen was ascertained by the Comet assay method. Organ specificity of genotoxic effects of the pesticide was revealed. The liver was the most sensitive to fipronil. Fipronil at a dose of 9.50 mg/kg in a single and repeated exposure (within 10 days) induced aberrations in mouse bone marrow cells with the frequency exceeding the spontaneous mutation rate ($p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively). Fipronil also showed genotoxic activity in the germ cells of the experimental animals, causing abnormalities of the structure of synaptonemal complexes in the spermatocytes.

Keywords: fipronil, DNA strand breaks, chromosome aberrations, synaptonemal complex, pesticide.