

© ЦАРЁВА А.А., ИГНАТЬЕВ С.Д., ЕГОРОВА О.В., АВЕРЬЯНОВА Н.С., КОТНОВА А.П., ИЛЮШИНА Н.А., 2023

Царёва А.А., Игнатьев С.Д., Егорова О.В., Аверьянова Н.С., Котнова А.П., Илюшина Н.А.

Влияние пестицида из класса фталимидов на лимфоциты периферической крови человека *in vitro*: индукция повреждений ДНК

ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 141014, Московская область, Мытищи, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Введение. Каптан – контактныйfungицид из класса фталимидов, используется в сельском хозяйстве для борьбы с болезнями растений. Вопрос о генотоксичности этого пестицида для человека до сих пор остается открытым. В исследованиях мутагенной активности каптана с использованием разных тестов получены противоречивые данные.

Цель исследования – изучение способности каптана индуцировать повреждения ДНК в лимфоцитах периферической крови человека *in vitro* с использованием метода щелочного гель-электрофореза отдельных клеток.

Материал и методы. Оценку ДНК-повреждающего действия каптана (0; 2,5; 5,0; 10,0; 12,5 и 25 мкг/мл) на лимфоцитах 26 доноров проводили в двух параллельных вариантах: в условиях метаболической активации (+S9) и без неё (–S9), с помощью ДНК-кометного анализа.

Результаты. В отсутствие метаболической активации каптан оказывал выраженное генотоксическое действие на клетки. Статистически значимые эффекты каптана обнаружены на лимфоцитах всех доноров. Уровень ДНК-повреждающего действия на лимфоциты 20 из 26 доноров зависел от концентрации. Кратность превышения показателя «%ДНК в хвосте комет» по сравнению с отрицательным контролем при концентрации 25 мкг/мл варьировала в диапазоне 4,3–226 раз. В присутствии смеси S9 слабые, но значимые эффекты, удовлетворяющие критериям положительного ответа, выявлены только для трех доноров, но при этом значения не выходили за рамки диапазона отрицательного контроля.

Ограничение исследования. Изучение генотоксичности каптана проведено только в условиях *in vitro*.

Заключение. Каптан индуцирует повреждения ДНК в лимфоцитах периферической крови человека *in vitro* в отсутствие метаболической активации. В условиях метаболической активации не выявлено биологически значимых генотоксических эффектов. Поэтому мутагенное действие этого пестицида *in vivo* маловероятно. Уровни повреждений ДНК в лимфоцитах периферической крови разных доноров после экспозиции с каптаном заметно различались, что свидетельствует о необходимости учитывать индивидуальную чувствительность к генотоксикантам при использовании метода ДНК-комет для оценки потенциальной мутагенной активности химических веществ.

Ключевые слова: fungициды; фталимиды; генотоксическое действие; метод ДНК-комет; лимфоциты человека

Соблюдение этических стандартов. Исследование с участием добровольцев одобрено Этическим комитетом ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора (Протокол №1 от 29.09.2020).

Для цитирования: Царёва А.А., Игнатьев С.Д., Егорова О.В., Аверьянова Н.С., Котнова А.П., Илюшина Н.А. Влияние пестицида из класса фталимидов на лимфоциты периферической крови человека *in vitro*: индукция повреждений ДНК. Токсикологический вестник. 2023; 31(6): 376–384. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2023-31-6-376-384>

Для корреспонденции: Илюшина Наталья Алексеевна, доктор биол. наук, зав. отд. генетической токсикологии ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Мытищи, Российская Федерация. E-mail: ilushina.na@fnrg.ru

Участие авторов: Царёва А.А., Котнова А.П., Аверьянова Н.С. – сбор материала; Игнатьев С.Д. – обработка материала; Егорова О.В. – концепция и дизайн исследования, сбор материала, анализ результатов, написание текста; Илюшина Н.А. – концепция и дизайн исследования, сбор данных литературы, анализ результатов, написание текста. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Дата поступления: 10 ноября 2023 / Дата принятия в печать: 03 декабря 2023 / Дата публикации: 29 декабря 2023

Tsareva A.A., Ignatyev S.D., Egorova O.V., Kotnova A.P., Averianova N.S., Ilyushina N.A.

Effect of a phthalimide pesticide on human peripheral blood lymphocytes *in vitro*: induction of DNA damage

FBES "Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman" of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 141014, Mytishchi, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. Captan is a contact fungicide from the phthalimide class, used in agriculture to combat plant diseases. However, the question of its genotoxicity for humans remains open. Various studies examining the mutagenic activity of captan using different tests have yielded conflicting results. This study aims to investigate the potential of captan to induce DNA damage in human peripheral blood lymphocytes *in vitro* using single-cell alkaline gel electrophoresis.

Material and methods. The DNA-damaging effect of captan (0; 2.5; 5.0; 10.0; 12.5 and 25 µg/ml) on lymphocytes of 26 donors was assessed with metabolic activation (+S9) and without it (-S9) using DNA comet analysis.

Results. In the absence of metabolic activation, captan exhibited a pronounced genotoxic effect on cells. Statistically significant effects of captan were found on lymphocytes of all donors. The level of DNA-damaging effect on lymphocytes from 20 out of 26 donors depended on the concentration. The fold increase in the "%DNA in the tail of comets" indicator compared to the negative control at a concentration of 25 µg/ml varied in the range of 4.3–226 times. In the presence of the S9 mixture, weak but significant effects meeting the criteria for a positive response were detected only in three donors.

Limitations. The genotoxicity of captan was studied only *in vitro*.

Conclusion. Captan induces DNA damage in human peripheral blood lymphocytes *in vitro* in the absence of metabolic activation. Under conditions of metabolic activation, genotoxic effects were low. The levels of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of different donors after exposure to captan varied markedly, indicating the necessity to consider individual sensitivity to genotoxins when utilizing the DNA comet method to assess the potential mutagenic activity of chemicals.

Keywords: fungicides; phthalimides; genotoxic effect; DNA comet method; human lymphocytes

Compliance with ethical standards. The study was approved by the Ethics Committee of the Federal Scientific Center for Hygiene. F.F. Erisman" of Rospotrebnadzor (Protocol No. 1, September 29, 2020).

For citation: Tsareva A.A., Ignatyev S.D., Egorova O.V., Kotnova A.P., Averianova N.S., Ilyushina N.A. Effect of a phthalimide pesticide on human peripheral blood lymphocytes *in vitro*: induction of DNA damage. *Toksikologicheskiy vestnik / Toxicological Review*. 2023; 31(6): 376–384. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2023-31-6-376-384> (In Russian)

For correspondence: Nataliya A. Ilyushina, D.Sc. (Biology), Head of the department of genetic toxicology, FBES "Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman" of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. E-mail: ilushina.na@fnccg.ru

Author contribution: Tsareva A.A – the collection of material; Ignatyev S.D. – processing of material; Egorova O.V. – concept and design of the study, collecting and processing of material, analysis of the results; writing the text; Kotnova A.P. – the collection of material; Averianova N.S. – the collection of material; Ilyushina N.A. – concept and design of the study, processing of material, analysis of the results; writing the text. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Date of receipt: November 10, 2023 / Date of acceptance for printing: December 3, 2023 / Date of publication: December 29, 2023

Введение

Каптан, относящийся к группе фталимидов, является контактным фунгицидом, применяемом на плодово-ягодных культурах против гнилей, монилиоза; милдью; антракноза с 1950-х гг. Механизм действия данного фунгицида на целевые организмы не специфичен и основан на электрофильном взаимодействии с тиоловыми группами белков [1]. Каптан может поступать в организм человека алиментарным путём через обработанные продукты, а также при профессиональной экспозиции [2].

Известно о способности каптана ингибировать биосинтез ДНК и белков, повреждать клеточные мембранны и вызывать окислительный и репликативный стресс, а также повреждать ДНК, вступая в реакцию с гуанином. Согласно заключению экспертов международного агентства по изучению рака (IARC) каптан обладает мутагенной активностью *in vitro* в тестах на индукцию генных мутаций у бактерий и в клетках млекопитающих, при этом результаты исследований на животных не позволяют сделать однозначный вывод о мутагенном потенциале каптана *in vivo* ввиду недостаточности данных [3, 4].

Исследования генотоксичности каптана, проведённые нами ранее с помощью метода ДНК-комет на животных при пероральном введении, не выявили способности данного фунгицида индуцировать повышение уровня разрывов ДНК [5]. В тесте Эймса с использованием как стандартного, так и модифицированного протоколов выявлены статистически значимые, зависящие от дозы эффекты, которые подтверждают известные данные литературы о способности данного фунгицида индуцировать обратные генные мутации у бактерий [6]. Согласно гигиенической классификации пестицидов по степени опасности* каптан отнесён к 3-му классу по критерию «мутагенность».

Данные эпидемиологических исследований при профессиональной экспозиции каптаном ограничены немногочисленными публикациями. В большинстве из них не обнаружено влияния каптана на здоровье работающих [7, 8]. В работе R. Presutti и соавт. выявили ассоциацию между повышенным риском развития множественной меланомы у фермеров и экспозицией каптаном [9].

Цель исследования – изучить способности каптана индуцировать повреждения ДНК в лимфоцитах периферической крови человека *in vitro*

с использованием метода щелочного гель-электрофореза отдельных клеток (метод ДНК-комет).

Материал и методы

В исследовании участвовали 26 добровольцев в возрасте от 20 до 55 лет, обоих полов. Исследование с участием добровольцев одобрено Этическим комитетом ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора (Протокол № 1 от 29.09.2020).

Оценку повреждающего действия каптана проводили с помощью ДНК-кометного анализа в щелочной версии на лимфоцитах человека в двух параллельных вариантах: в условиях метаболической активации (+S9) и без неё (–S9). Лимфоциты выделяли из периферической крови доноров с помощью стандартного метода седиментации в градиенте плотности фиколла. Клетки инкубировали в среде RPMI-1640 с 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 1% глутамина, 2% пенициллин/стрептомицина в присутствии каптана в течение 3 ч, при 37 °C и концентрации CO₂ 5%. Общее количество клеток и их жизнеспособность оценивали с помощью счетчика клеток TC20 (BioRad, США) при окраске трипановым синим. Конечная концентрация лимфоцитов в среде составляла 2–4 × 10⁶ клеток/мл.

Постмитохондриальная фракция печени крыс (S9) получена в условиях индукции печеночных оксигеназ внутрибрюшинным введением раствора полихлорированных бифенилов (300 мг/кг) самцам белых крыс со средней массой 180–200 г, однократно за пять суток до эвтаназии. Конечная концентрация S9 в суспензии клеток составляла 20%.

Концентрации каптана 2,5; 5,0; 10,0; 12,5 и 25 мкг/мл, выбранные с учётом его цитотоксичности в предварительном эксперименте, готовили путём разбавления стокового раствора (10 мг/мл в диметилсульфоксиде (ДМСО)). Концентрация ДМСО в среде составляла 1%. В качестве позитивных контролей использовали метилметансульфонат (–S9, 1,4 мкг/мл) или циклофосфамид (+S9, 40 мкг/мл). По окончании инкубации клетки дважды отмывали фосфатным буфером (PBS) с 20 мМ ЭДТА, центрифугируя при 4 °C, 12 мин, 400g.

Для каждой концентрации, как в условиях метаболической активации, так и без неё, готовили по 4 микропрепарата. Электрофорез проводили в щелочном буфере (pH 13). Начальная сила тока составляла 300 mA, напряжение 17В (0,7 В/см), длительность 30 мин.

Окрашивание слайдов проводили красителем SYBR Green I в TE-буфере (pH 8,0).

* МР 1.2.0235–21 от 15.02.2021 «Гигиеническая классификация пестицидов и агрохимикатов по степени опасности».

Степень миграции ДНК отдельных клеток оценивали при помощи эпи-флуоресцентного микроскопа NIKON EclipseNi-U и программного обеспечения Comet Assay IV (Perceptive Instruments Ltd, Великобритания). На каждом микропрепарate считали не менее 100 клеток.

Статистический анализ выполнен с использованием программы SPSS Statistics v. 22 software. Сравнение эффектов при действии разных концентраций каптана с отрицательным контролем осуществляли с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (*t*-критерий Даннетта), используя средние значения медиан показателя «%ДНК в хвосте комет». Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Оценка наличия дозовой зависимости увеличения значений медиан «%ДНК в хвосте комет» от концентрации каптана проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена (при $\alpha = 0,05$). Критериями положительного ответа являлось наличие статистически значимого и зависимого от дозы увеличения показателя «%ДНК в хвосте комет» по сравнению с отрицательным контролем.

Сравнение чувствительности клеток разных доноров проводили с помощью построения аппроксимированных линий тренда (полином первой степени: $y = kx + b$) для кривых зависимости средних значений медиан «%ДНК в хвосте комет» от концентрации пестицида и последующего определения значений угловых коэффициентов (k).

Результаты

Концентрации каптана для исследования его способности повреждать ДНК лимфоцитов человека в диапазоне 2,5–25 мкг/мл выбраны, исходя из результатов предварительного эксперимента, в котором было установлено, что инкубация клеток с фунгицидом, начиная с концентрации 50 мкг/мл, приводит к их массовой гибели (более 50%). В основном эксперименте после экспозиции каптаном в максимальной концентрации 25 мкг/мл для клеток большинства доноров не отмечено гибели, по сравнению с отрицательным контролем (ДМСО), как в условиях с метаболической активацией, так и без неё.

В табл. 1 приведены значения медиан «%ДНК в хвосте комет» для лимфоцитов разных доноров при действии каптана в условиях метаболической активации (+S9) и в её отсутствие.

Показано, что в отсутствие метаболической активации каптан оказывал выраженное генотоксическое действие на клетки. Статистически значимые эффекты каптана при максимальной концентрации обнаружены на лимфоцитах всех

доноров ($p < 0,05$). Для лимфоцитов доноров 1, 5, 14 и 48 достоверное превышение показателя «%ДНК в хвосте комет» отмечено, начиная с концентрации 12,5 мкг/мл. Уровень ДНК-повреждающего действия на лимфоциты 20 доноров зависел от концентрации ($p < 0,05$). При этом кратность превышения показателя «%ДНК в хвосте комет» по сравнению с отрицательным контролем при максимальной концентрации варьировала в диапазоне 4,3–226 раз (табл. 2).

В условиях метаболической активации статистически значимое превышение уровня повреждений ДНК по сравнению с отрицательным контролем выявлено только при максимальной концентрации для клеток 12 доноров. Зависимость эффекта от концентрации обнаружена на лимфоцитах четырёх доноров (4, 16, 23, 29). При этом наличие одновременно и статистически значимых эффектов и значимой зависимости «концентрация-эффект» отмечено только на лимфоцитах трёх доноров (доноры 16, 23, 29). Следует отметить, что для лимфоцитов указанных трех доноров значения показателя «%ДНК в хвосте комет» не выходили за рамки диапазона отрицательного контроля и согласно критериям оценки генотоксичности не могут считаться биологически значимыми.

Таким образом, с учётом критериев оценки генотоксической активности можно сделать заключение, что каптан способен индуцировать повреждения ДНК в лимфоцитах периферической крови человека *in vitro* только в отсутствие метаболической активации.

Поскольку уровни повреждений ДНК в лимфоцитах периферической крови доноров после экспозиции с каптаном заметно отличались, для оценки индивидуальной чувствительности клеток разных доноров к генотоксическому действию этого фунгицида рассчитывали значения угловых коэффициентов (k), полученных для линий тренда кривых зависимости средних значений медиан «%ДНК в хвосте комет» от концентрации пестицида (см. табл. 1; рисунок на вклейке).

В отсутствие S9 максимальные величины k отмечены при использовании клеток доноров 1, 4, 5, 9 и 48 ($k > 2,0$), минимальные – в случае использования клеток добровольцев 10, 12, 13, 14, 20 и 32 ($k < 0,5$). При этом разница между максимальным (2,86) и минимальным (0,08) значением k составила 35,8 раз.

В условиях метаболической активации рассчитанные значения k были значительно ниже и не превышали 0,13 (донор 29). Минимальные значения этого показателя отмечены для лимфоцитов доноров 9, 20 и 21 ($k \leq 0$).

Таблица 1 / Table 1

Средние значения медиан «% ДНК в хвосте комет» для лимфоцитов периферической крови доноров при действии каптана *in vitro*

The average of median "% DNA in the comet tail" in peripheral blood lymphocytes of donors under exposure to captan *in vitro*

ID № донора		Каптан, мкг/мл						k	ID № донора		Каптан, мкг/мл						k	
		0	2,5	5	10	12,5	25				0	2,5	5	10	12,5	25		
1	-S9	μ 0,33	0,48	0,79	2,10	5,93*	69,05*	2,7069	17	-S9	μ 0,21	0,48	1,22	0,79	1,55	16,03*	0,6105	
		σ 0,15	0,31	0,46	0,66	1,96	7,70			+S9	μ 1,71	0,14	0,27	0,47	2,00	3,37*		
	+S9	μ 1,71	0,14	0,27	0,47	2,00	3,37*	0,1043			σ 1,10	0,07	0,19	0,42	0,55	0,67	0,0299	
		σ 1,10	0,07	0,19	0,42	0,55	0,67				σ 0,44	0,27	0,03	0,41	0,56	0,39		
2	-S9	μ 0,97	0,50	0,86	1,90	4,34	38,31*	1,4860	19	-S9	μ 1,96	4,09	2,02	5,29	5,54	35,22*	1,2903	
		σ 1,78	0,26	0,45	0,90	1,31	8,65			+S9	μ 1,43	2,64	1,23	3,14	1,81	9,65		
	+S9	μ 0,42	0,28	0,18	0,21	0,50	1,32*	0,0399			μ 1,58	1,45	0,71	0,88	2,38	1,68	0,0198	
		σ 0,56	0,21	0,11	0,12	0,41	0,66				σ 1,67	0,70	0,23	0,87	0,59	1,0		
3	-S9	μ 2,04	2,06	3,30	3,08	1,74	43,34*	1,5877	20	-S9	μ 2,84	2,47	0,81	1,19	0,61	12,20*	0,3683	
		σ 2,29	2,18	3,89	3,18	2,65	2,93			+S9	μ 3,32	0,98	0,21	0,69	0,29	2,13		
	+S9	μ 3,97	7,42	3,25	2,24	3,68	8,55	0,1226			μ 3,67	3,83	4,83	3,87	4,65	1,62	-0,0855	
		σ 4,10	8,38	4,01	2,37	4,08	8,14				σ 3,29	3,34	2,18	2,0	3,57	1,01		
4	-S9	μ 2,25	3,84	5,05	6,83	6,19	58,95*	2,1854	21	-S9	μ 2,39	2,26	4,35	4,86	5,46	29,22*	1,0511	
		σ 2,37	3,89	5,59	5,04	1,95	19,42			+S9	μ 2,20	1,49	0,87	1,39	1,10	25,14		
	+S9	μ 2,89	3,74	3,14	3,24	3,77	5,88	0,1073			μ 3,87	3,11	8,15	1,56	0,54	4,89	-0,0238	
		σ 2,49	4,17	2,69	3,82	3,56	5,37				σ 2,88	1,66	6,64	0,52	0,26	4,32		
5	-S9	μ 1,66	0,65	1,44	3,35	8,66*	65,0*	2,5356	22	-S9	μ 1,33	0,46	1,66	1,60	2,87	27,82*	1,0327	
		σ 0,92	0,39	0,65	0,79	1,22	6,01			+S9	μ 1,44	0,20	0,15	0,44	0,72	2,93		
	+S9	μ 1,28	1,08	0,45	2,25	1,18	1,93	0,0381			μ 0,40	0,21	0,48	0,67	0,12	0,91	0,0205	
		σ 0,69	0,41	0,12	0,47	0,87	0,72				σ 0,23	0,19	0,25	0,59	0,06	0,89		
6	-S9	μ 0,53	0,78	0,90	4,17*	3,58	35,88*	1,395	23	-S9	μ 0,13	0,20	0,71	1,53	2,18	26,44*	0,8445	
		σ 0,64	0,25	0,73	3,09	1,14	3,77			+S9	μ 0,06	0,24	0,71	0,11	1,21	5,13		
	+S9	μ 2,06	2,34	1,78	2,16	3,35	2,33	0,019			μ 0,32	0,71	0,54	0,94	0,79	2,03*	0,0627	
		σ 2,1	1,16	0,94	1,44	0,55	1,33				σ 0,23	0,61	0,49	0,41	0,59	1,31		
8	-S9	μ 0,61	0,84	0,51	1,66	1,38	24,38*	0,9274	24	-S9	μ 0,83	0,41	1,48	2,43	3,89	21,88*	1,3776	
		σ 0,39	0,11	0,43	0,81	0,81	3,65			+S9	μ 0,77	0,24	0,83	0,90	2,04	5,05		
	+S9	μ 1,46	0,65	0,88	0,54	0,73	2,17	0,0389			μ 0,48	0,34	0,98	0,65	0,72	1,53*	0,04	
		σ 1,19	0,74	0,93	0,24	0,63	1,43				σ 0,54	0,23	0,29	0,54	0,47	0,78		
9	-S9	μ 1,23	0,61	0,65	1,67	5,98	72,67*	2,8258	26	-S9	μ 0,16	0,40	0,74	1,83	1,42	35,59*	1,3776	
		σ 1,74	0,15	0,32	0,56	0,77	7,15			+S9	μ 0,11	0,33	0,46	0,38	0,78	5,41		
	+S9	μ 0,61	0,44	0,52	0,64	0,50	0,38	-0,0060			μ 0,63	0,42	0,32	0,36	0,39	1,80*	0,0497	
		σ 0,38	0,16	0,36	0,25	0,29	0,25				σ 0,34	0,26	0,14	0,18	0,14	1,42		
10	-S9	μ 0,35	0,19	0,38	0,58	1,07	5,47*	0,2075	27	-S9	μ 0,22	0,85	0,44	0,59	1,24	14,71*	0,5585	
		σ 0,33	0,09	0,20	0,34	0,55	1,47			+S9	μ 0,15	0,77	0,18	0,27	0,76	3,50		
	+S9	μ 1,44	0,80	0,70	0,75	2,0	2,46	0,0606			μ 0,58	0,77	0,35	1,42	0,99	2,00*	0,0595	
		σ 1,97	0,71	0,24	0,32	0,62	0,75				σ 0,29	0,68	0,25	0,83	0,37	1,08		
12	-S9	μ 0,33	0,74	0,48	0,95	1,37	14,77*	0,5617	28	-S9	μ 0,12	0,17	0,33	0,49	0,66	15,17*	0,5859	
		σ 0,20	0,35	0,32	0,65	0,45	6,31			+S9	μ 0,05	0,09	0,18	0,26	0,35	6,16		
	+S9	μ 0,67	0,48	0,65	0,18	0,63	1,28*	0,0255			μ 0,31	0,52	0,32	0,34	0,25	1,52*	0,0429	
		σ 0,26	0,15	0,18	0,05	0,25	0,36				σ 0,17	0,40	0,05	0,17	0,04	0,39		
13	-S9	μ 0,66	9,37	0,14	1,18	1,45	7,54*	0,1375	29	-S9	μ 0,34	0,32	0,53	0,60	1,34	19,03*	0,7217	
		σ 0,28	3,32	0,10	0,44	0,16	1,23			+S9	μ 0,42	0,27	0,45	0,25	0,50	2,16		
	+S9	μ 0,34	1,02	0,15	0,14	0,24	1,04	0,0169			μ 0,62	0,32	0,60	0,65	1,31	3,61*	0,1268	
		σ 0,13	0,77	0,08	0,06	0,19	0,90				σ 0,54	0,12	0,24	0,24	0,47	2,41		
14	-S9	μ 0,94	3,09	4,04	4,83	5,30*	10,12*	0,3327	32	-S9	μ 0,13	0,22	0,10	0,42	0,26	2,23*	0,082	
		σ 0,74	3,52	3,31	3,20	1,99	3,00			+S9	μ 0,07	0,17	0,04	0,43	0,17	0,73		
	+S9	μ 1,54	0,83	2,15	1,40	1,16	2,05	0,0219			μ 0,25	0,22	0,21	0,37	0,22	0,58*	0,0135	
		σ 1,29	0,58	2,45	0,41	0,30	0,73				σ 0,10	0,10	0,10	0,30	0,04	0,31		
16	-S9	μ 0,87	0,72	0,68	1,02	1,71	15,02*	0,5602	48	-S9	μ 0,73	1,18	2,24	4,00	7,76*	56,56*	2,206	
		σ 1,17	0,63	0,31	0,43	0,82	3,93			+S9	μ 0,54	0,42	0,37	0,99	0,94	5,91		
	+S9	μ 0,08	0,26	0,30	0,50	0,42	1,22*	0,0424			μ 4,50	3,34	6,13	4,86	3,88	5,34	0,0305	
		σ 0,04	0,17	0,39	0,34	0,17	0,72				σ 1,25	0,66	1,44	1,10	0,75	0,14		

Примечание. μ – среднее значение медиан «% ДНК в хвосте комет»; σ – стандартное отклонение; * – статистически значимое увеличение средних значений медиан «% ДНК в хвосте комет» по сравнению с отрицательным контролем.

Таблица 2 / Table 2

Кратность превышения средних значений медиан «%ДНК в хвосте комет» по сравнению с сопутствующим отрицательным контролем в условиях экспозиции лимфоцитов с каптаном
Fold increase of the average of median "% DNA in the comet tail" compared with the concurrent negative control under exposure of lymphocytes to captan

МКГ/ МЛ	-S9																									
	ID № донора																									
	1	2	3	4	5	6	8	9	10	12	13	14	16	17	19	20	21	22	23	24	26	27	28	29	32	48
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
2,5	1,44	0,52	1,01	1,71	0,39	1,47	1,38	0,49	0,55	2,27	14,09	3,28	0,83	2,26	2,09	0,87	0,95	0,35	1,51	0,49	2,55	3,92	1,46	0,95	1,74	1,62
5,0	2,38	0,90	1,62	2,24	0,87	1,70	0,85	0,52	1,09	1,47	0,21	4,28	0,78	5,69	1,03	0,28	1,82	1,25	5,32	1,78	4,69	2,01	2,83	1,56	0,81	3,07
10,0	6,35	1,96	1,51	3,03	2,02	7,85	2,74	1,35	1,67	2,89	1,77	5,13	1,17	3,70	2,70	0,42	2,03	1,20	11,50	2,91	11,61	2,73	4,13	1,77	3,23	5,49
12,5	17,9	4,50	0,85	2,75	5,23	6,75	2,27	4,84	3,09	4,17	2,19	5,63	1,96	7,23	2,83	0,22	2,28	2,16	16,38	4,67	9,01	5,74	5,62	3,94	2,00	10,65
25,0	208,40	39,69	21,24	26,18	39,23	67,59	40,19	58,85	15,84	44,94	11,35	10,74	17,27	74,80	17,99	4,30	12,21	20,96	198,45	26,25	226,30	68,06	129,05	56,11	17,21	77,61
МКГ/ МЛ	+S9																									
	ID № донора																									
	1	2	3	4	5	6	8	9	10	12	13	14	16	17	19	20	21	22	23	24	26	27	28	29	32	48
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
2,5	0,08	0,67	1,87	1,29	0,85	1,14	0,45	0,72	0,56	0,71	3,02	0,54	3,11	0,46	0,92	1,04	0,80	0,52	2,22	0,70	0,67	1,33	1,67	0,51	0,90	0,74
5,0	0,16	0,43	0,82	1,09	0,35	0,87	0,60	0,85	0,48	0,97	0,45	1,40	3,56	0,12	0,45	1,32	2,11	1,19	1,68	2,03	0,52	0,61	1,03	0,97	0,86	1,36
10,0	0,27	0,49	0,56	1,12	1,77	1,05	0,37	1,06	0,52	0,27	0,42	0,91	5,94	0,96	0,56	1,05	0,40	1,66	2,93	1,36	0,57	2,46	1,09	1,05	1,50	1,08
12,5	1,17	1,18	0,93	1,30	0,93	1,63	0,50	0,81	1,39	0,94	0,72	0,75	4,94	0,96	1,51	1,27	0,14	0,31	2,46	1,49	0,62	1,72	0,79	2,12	0,88	0,86
25,0	1,96	3,14	2,15	2,03	1,51	1,13	1,49	0,62	1,71	1,89	3,09	1,33	14,47	2,18	1,06	0,44	1,26	2,28	6,32	3,16	2,88	3,47	4,87	5,82	2,32	1,19

Обсуждение

С целью обеспечения безопасного применения пестицидов проводится их всесторонняя токсиколого-гиgienическая оценка как с точки зрения острых, так и отдалённых токсических эффектов, в том числе и по критерию «мутагенность». Для изучения генотоксичности химических веществ, относящихся к пестицидам, лекарственным и ветеринарным препаратам, пищевым добавкам и пр., разработаны многочисленные методы, позволяющие выявлять их способность повреждать генетический материал в клетках и, как следствие, вызывать определённые типы мутаций. Одним из таких методов является оценка повреждений ДНК в лимфоцитах периферической крови *in vitro*.

Каптан – контактный фунгицид, используется в сельском хозяйстве для борьбы с болезнями растений, вызванных возбудителями гнилей, способствует повышению лёгкости плодов в период хранения, часто применяется в составе баковых смесей. Генотоксичность этого пестицида для человека до сих пор не выяснена. Согласно имеющимся сведениям каптан проявляет му-

тагенные свойства в большинстве микробных тест-систем. При этом более высокая активность отмечена на штаммах бактерий, позволяющих регистрировать мутации типа замены пар оснований [4]. В исследованиях мутагенной активности каптана на животных с использованием тестов, позволяющих выявлять хромосомные и геномные мутации, получены противоречивые данные. Результаты большинства исследований свидетельствуют об отсутствии мутагенной активности каптана *in vivo* (тесты по учету наследуемых транслокации и доминантных летальных мутаций у млекопитающих, микроядерный тест) [1, 4]. В то же время De H.A. Hondt и соавт. показали, что обработка каптаном в дозах 50 или 500 мг/кг массы тела (м.т.) приводила к индукции хромосомных aberrаций в костном мозге крыс, включающих ассоциации «конец-в-конец», Робертсоновские транслокации, гены и хроматидные разрывы. Наблюдаемые статистически значимые эффекты зависели от дозы фунгицида [10]. В другом исследовании *in vivo* на клетках костного мозга мышей общий уровень хромосомных aberrаций статистически значимо не отличался от контроля, но были обнару-

жены 3 метацентрические хромосомы в группе мышей, получавших каптан в дозе 250 мг/кг м.т. (в контроле такие aberrации не обнаружены) [3].

В свете получения новых данных эпидемиологических исследований, указывающих на повышенный риск развития множественной меланомы у фермеров, подвергшихся воздействию данного фунгицида [9], а также выявление канцерогенных эффектов на некоторых видах лабораторных животных [4], расширение научно-доказательной базы в отношении безопасности применения препаратов на основе каптана, является актуальным.

В настоящем исследовании проведено изучение способности фунгицида из химического класса фталимидов индуцировать повреждения в молекулах ДНК с помощью метода ДНК-комет в тест-системе *in vitro* на лимфоцитах человека. Данный тест предназначен для оценки целостности молекулы ДНК и нашел широкое применение в токсикологии, фармакологии, биомониторинге, медицинской генетике.

Ранее нами был подтвержден мутагенный эффект каптана в teste Эймса [6]. В микроядерном teste *in vivo* каптан вызывал незначительное, но статистически значимое и зависимое от дозы повышение частоты микроядер в полихроматофильных эритроцитах. Однако значения не выходили за рамки исторического отрицательного лабораторного контроля [11]. В исследованиях с помощью метода ДНК-комет введение каптана в дозах 500–2000 мг/кг массы тела не приводило к индукции разрывов ДНК в костном мозге мышей [5].

Результаты данного исследования продемонстрировали способность каптана повреждать ДНК в лимфоцитах периферической крови доноров в условиях *in vitro*. Наибольшие ДНК-повреждающие эффекты наблюдали в отсутствие метаболической активации при концентрации каптана 25 мкг/мл (максимальное содержание ДНК в хвосте комет около 70%). Генотоксические эффекты каптана, выявляемые в условиях метаболической активации были слабо выражены и биологически не значимы. Снижение мутагенной активности может быть обусловлено быстрой деградацией каптана при взаимодействии с тиолами, присутствующими в смеси S9 [12].

С учётом полученных ранее и новых данных по оценке действия каптана на лимфоциты человека, можно полагать, что каптан является мутагеном прямого действия, вероятно за счет остатка тиофосгена в молекуле каптана.

Необходимо подчеркнуть, что уровни генотоксических эффектов в лимфоцитах разных

доноров отличались как при сопоставлении медианных значений показателя «% ДНК в хвосте комет», так и по кратности превышения уровня повреждений ДНК в максимальных концентрациях фунгицида по отношению к отрицательному контролю. Например, в отсутствие метаболической активации клетки доноров 10 и 32 были относительно устойчивы к действию каптана: медианные значения «% ДНК в хвосте комет» при концентрации 25 мкг/мл составили $5,47 \pm 1,47$ и $2,23 \pm 0,73\%$, соответственно. Тогда как, для клеток доноров 1 и 9 этот показатель составлял $69,05 \pm 7,70\%$ и $72,67 \pm 7,15\%$, соответственно. На лимфоцитах доноров 1 и 26 уровень повреждений ДНК при высокой концентрации каптана по сравнению с отрицательным контролем был повышен в 200 раз, в то время как кратность превышения показателя «% ДНК в хвосте комет» по сравнению с отрицательным контролем в клетках донора 20 не превышала 4,3.

Способность каптана индуцировать повреждения ДНК в концентрациях 0,3–1,0 мМ была продемонстрирована ранее на клетках китайского хомячка V 79 [3]. Fernandez-Vidal и соавт. на культуре клеток СНО и HeLa показали, что при действии каптана происходит накопление поврежденных оснований ДНК, чувствительных к ДНК-гликозилазе Fpg, которые репарируются по XRCC1-зависимому пути. Каптан также вызывал репликативный стресс, опосредованный сигнальным ответом серин/треониновой протеинкиназы ATR и приводил к двухцепочечным разрывам и образованию микроядер [13].

Сопоставление уровней эффектов, наблюдаемых при использовании клеток 26 участников данного исследования, выявило индивидуальные отличия доноров в восприимчивости лимфоцитов к ДНК-повреждающему действию изучаемого фунгицида. Вариабельность ответа на ДНК-повреждающее действие каптана также была продемонстрирована в работе [8]. Изучение уровня повреждений ДНК в лимфоцитах периферической крови фермеров (12 человек) после однократной экспозиции каптаном показало, что доля клеток с высоким уровнем повреждений ДНК в день перед обработкой (S1) и спустя сутки после применения фунгицида (S3) была сопоставима для большинства доноров. Однако статистически значимое увеличение показателя «% ДНК в хвосте комет» по сравнению с уровнем спонтанных повреждений (S1) в лимфоцитах было характерно для 5 человек.

Ограничение исследования. Изучение генотоксичности каптана проведено только в условиях *in vitro*.

Заключение

Проведённое исследование показало, что каптан способен индуцировать повреждения ДНК в соматических клетках человека в условиях *in vitro* в отсутствии метаболической активации. В присутствии смеси для метаболической активации не выявлено биологически значимых генотоксических эффектов. Поэтому мутагенное действие этого пестицида *in vivo* маловероятно.

Уровни повреждений ДНК в лимфоцитах периферической крови разных доноров после экспозиции с каптаном заметно отличались. Полученные данные свидетельствуют о том, что в случае использования определения уровня повреждений ДНК в лимфоцитах периферической крови человека в качестве метода оценки потенциальной мутагенной активности химических веществ, необходимо учитывать индивидуальную чувствительность к генотоксикантам.

ЛИТЕРАТУРА

(пп. 1, 3, 4, 6–10, 12, 13 см. в References)

2. Федорова Н.Е., Березняк И.В., Бондарева Л.Г., Добрева Н.И., Егорченкова О.Е., Добрев С.Д. Каптан – проблемы определения в объектах окружающей среды и пищевой продукции. Пути решения. Химическая безопасность. 2022; 6(2): 227–42. <https://doi.org/10.25514/CHS.2022.2.23015>
5. Аверьянова Н.С., Кара Л.А., Егорова О.В., Илюшина Н.А. Изучение первичных повреждений ДНК в костном мозге мышей при комбинированном действии пестицидов. Токсикологический вестник. 2021; 29(4): 14–21. <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-4-14-21>
11. Илюшина Н.А. Системная оценка генотоксичности пестицидов в Российской Федерации: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.; 2020.
1. Elliot Gordon Independent Researcher. Captan and Folpet December 2010. In: Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. 1915–9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00090-2>
2. Fedorova N.E., Bereznjak I.V., Bondareva L.G., Dobreva N.I., Egorchenkova O.E., Dobrev S.D. Captan: Problems Associated with its Identification in Environmental Objects and Food Products. Ways of Solution. Chemical safety of food products. 2022; 6(2): 227–42. [Ytts://doi.org/10.25514/CHS.2022.2.23015](https://doi.org/10.25514/CHS.2022.2.23015) (In Russian)
3. Mary Ann Liebert, Inc., Publishers. Final Report on the Safety Assessment of Captan. Journal of the American college of toxicology. 1989; 8(4): 643–80. <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.3109/10915818909010526>
4. Arce G.T., Gordon E.B., Cohen S.M., Singh P. Genetic toxicology of folpet and captan. Critical Reviews in Toxicology. 2010; 40(6): 546–74.
5. Averianova N.S., Kara L.A., Egorova O.V., Ilyushina N.A. The study of primary DNA damage under the combined action of pesticides. Toksikologicheskiy vestnik (Toxicological Review). 2021; 29(4): 14–21. <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-4-14-21> (In Russian)
6. Egorova O.V., Ilyushina N.A., Rakitskii V.N. Mutagenicity evaluation of pesticide analogs using standard and 6-well miniaturized bacterial reverse mutation tests. Toxicology in Vitro. 2020; 69: 105006. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.105006>
7. Greenburg D.L., Rusiecki J., Koutros S., Dosemeci M., Patel R., Hines C.J., Hoppin J.A., Alavanja M.C. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to captan in the Agricultural Health Study. Cancer Causes Control. 2008; 19(10): 1401–7. <https://doi.org/10.1007/s10552-008-9187-9>
8. Lebailly P., Devaux A., Pottier D., De Meo M., Andre V., Baldi I., Severin F., Bernaud J., Durand B., Henry-Amar M., Gauduchon P. Urine mutagenicity and lymphocyte DNA damage in fruit growers occupationally exposed to the fungicide captan. Occup Environ Med. 2003; 60(12): 910–7. <https://doi.org/10.1136/oem.60.12.910>
9. Presutti R., Harris S.A., Kachuri L., Spinelli J.J., Pahwa M., Blair A., Zahm S.H., Cantor K.P., Weisenburger D.D., Pahwa P., McLaughlin J.R., Dosman J.A., Freeman L.B. Pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in men: An analysis of the North American Pooled Project. Int J Cancer. 2016; 139(8): 1703–14. <https://doi.org/10.1002/ijc.30218>
10. De Hondt H.A., Ali S.M., El-laithy A.F. Biochemical and chromosomal studies on rats injected with captan. Egypt. J. Genet. Cytol. 1982; 11(2): 245–54.
11. Ilyushina N.A. Systematic assessment of the genotoxicity of pesticides in the Russian Federation: Diss. Moscow; 2020. (In Russian)
12. Gordon E.B., Mobley S.C., Ehrlich T., Williams M. Measurement of the reaction between the fungicides captan or folpet and blood thiols. Toxicol. Methods. 2001; 11: 209–23.
13. Fernandez-Vidal A., Arnaud L.C., Maumus M., Chevalier M., Mirey G., Salles B., Vignard J., Boutelet-Robinet E. Exposure to the Fungicide Captan Induces DNA Base Alterations and Replicative Stress in Mammalian Cells. Environ Mol Mutagen. 2019; 60(3): 286–97. <https://doi.org/10.1002/em.22268>

ОБ АВТОРАХ:

Анастасия Анатольевна Царева – младший научный сотрудник отдела генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская область, г. Мытищи, Россия. E-mail: grabovskaya.aa@fncg.ru <https://orcid.org/0000-0002-3479-9602>

Семен Дмитриевич Игнатьев – младший научный сотрудник отдела генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская область, г. Мытищи, Россия. E-mail: ignitev.sd@fncg.ru <https://orcid.org/0000-0001-7415-5513> Scopus Author ID: 57219948146

Ольга Валерьевна Егорова – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская область, г. Мытищи, Россия. E-mail: egorova.ov@fncg.ru <https://orcid.org/0000-0003-4748-8771> Scopus Author ID: 57191422037

Алина Петровна Котнова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская область, г. Мытищи, Россия. E-mail: kotnova.ap@fncg.ru <https://orcid.org/0000-0002-4333-9288> Scopus Author ID: 9244982300

Наталья Сергеевна Аверьянова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская область, г. Мытищи, Россия. E-mail: averyanova.ns@fncg.ru <https://orcid.org/0000-0002-2973-8776> Scopus Author ID: 5720378893

Наталья Алексеевна Илюшина – доктор биологических наук, заведующая отделом генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская область, г. Мытищи, Россия. E-mail: ilushina.na@fncg.ru <https://orcid.org/0000-0001-9122-9465> Scopus Author ID: 6603049459

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Anastasiya A. Tsareva – junior researcher of the department of genetic toxicology, FBES “Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman” of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 141014, Moscow region, Mytishchi, Russian Federation. E-mail: grabovskaya.aa@fnrg.ru <https://orcid.org/0000-0002-3479-9602>

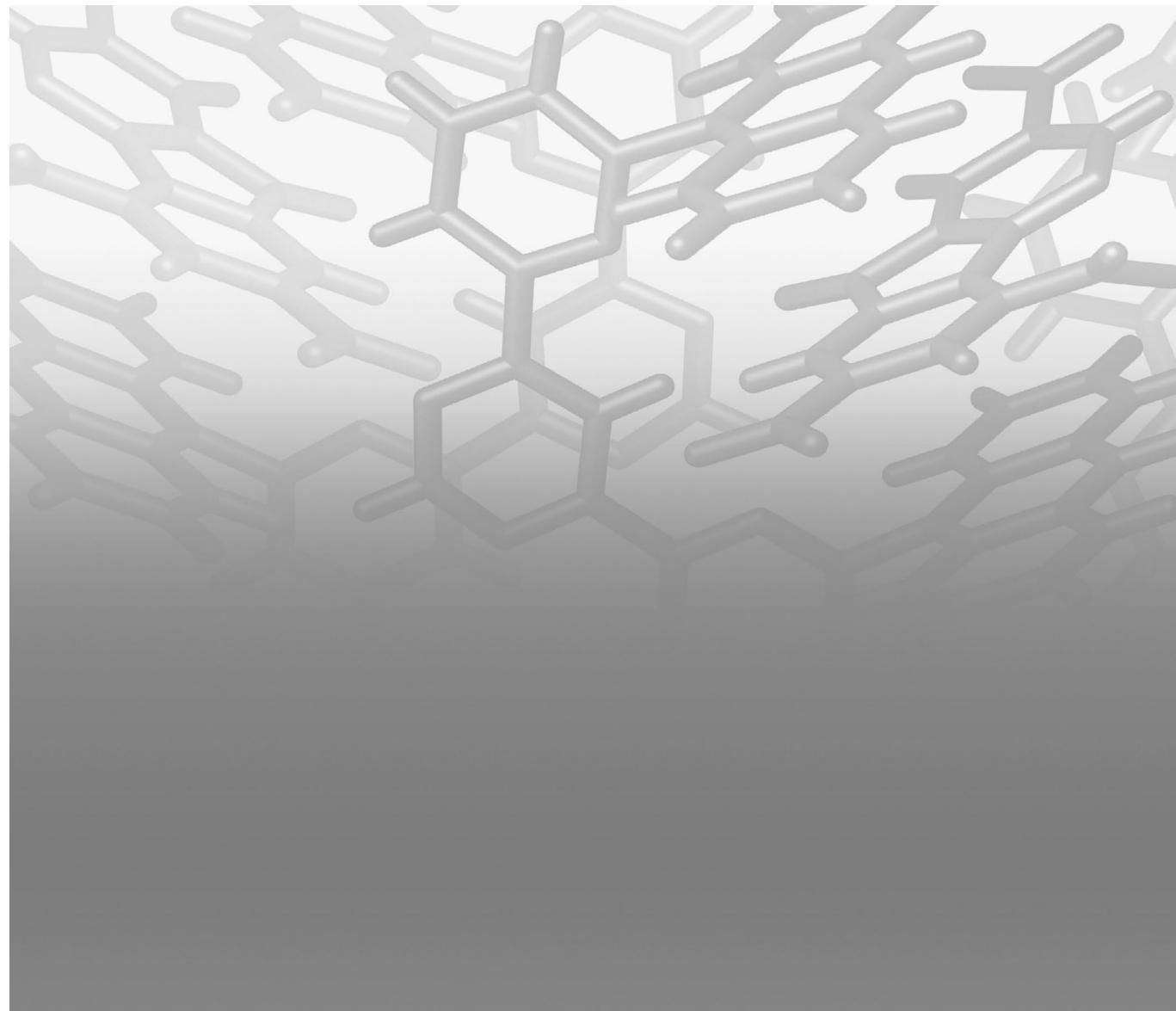
Semen D. Ignatyev – junior researcher of the department of genetic toxicology, FBES “Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman” of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 141014, Moscow region, Mytishchi, Russian Federation. E-mail: ignatev.sd@fnrg.ru <https://orcid.org/0000-0001-7415-5513> Scopus Author ID: 57219948146

Olga V. Egorova – Candidate of Biological Sciences, senior Researcher of the department of genetic toxicology, FBES “Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman” of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 141014, Moscow region, Mytishchi, Russian Federation. E-mail: egorova.ov@fnrg.ru <https://orcid.org/0000-0003-4748-8771> Scopus Author ID: 57191422037

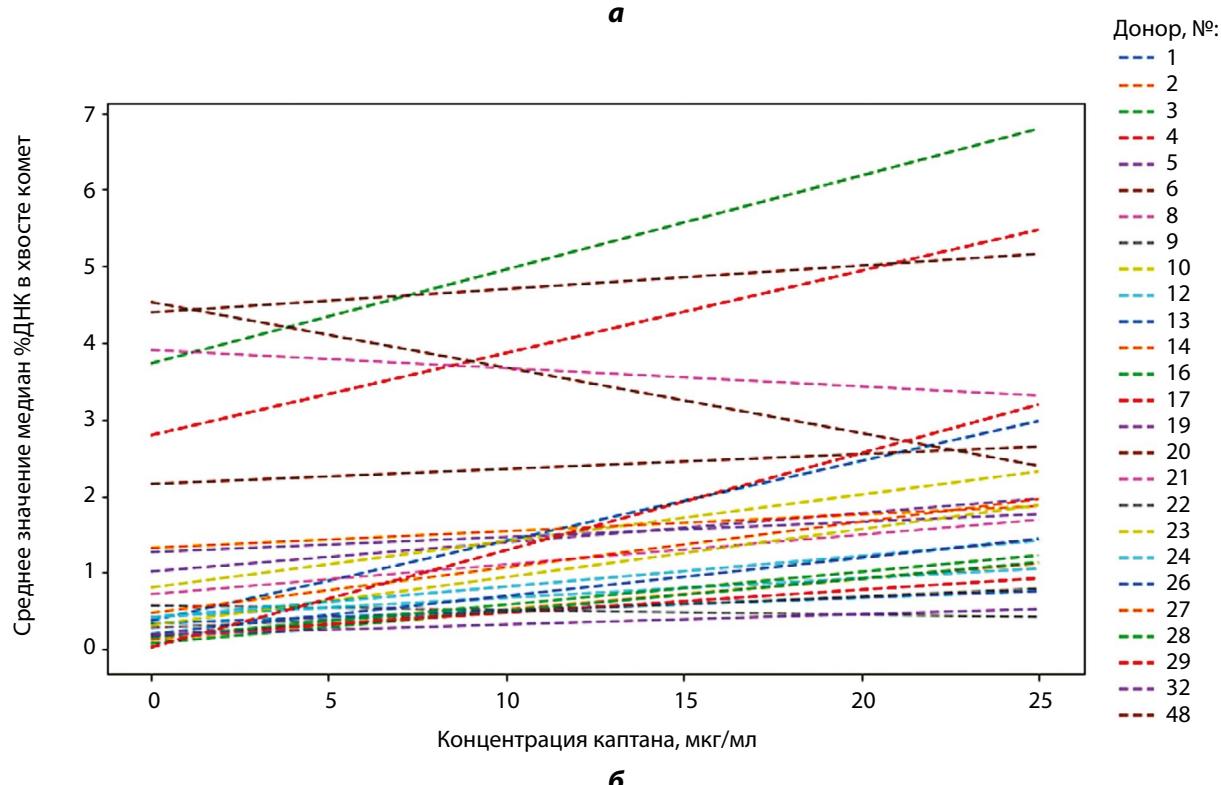
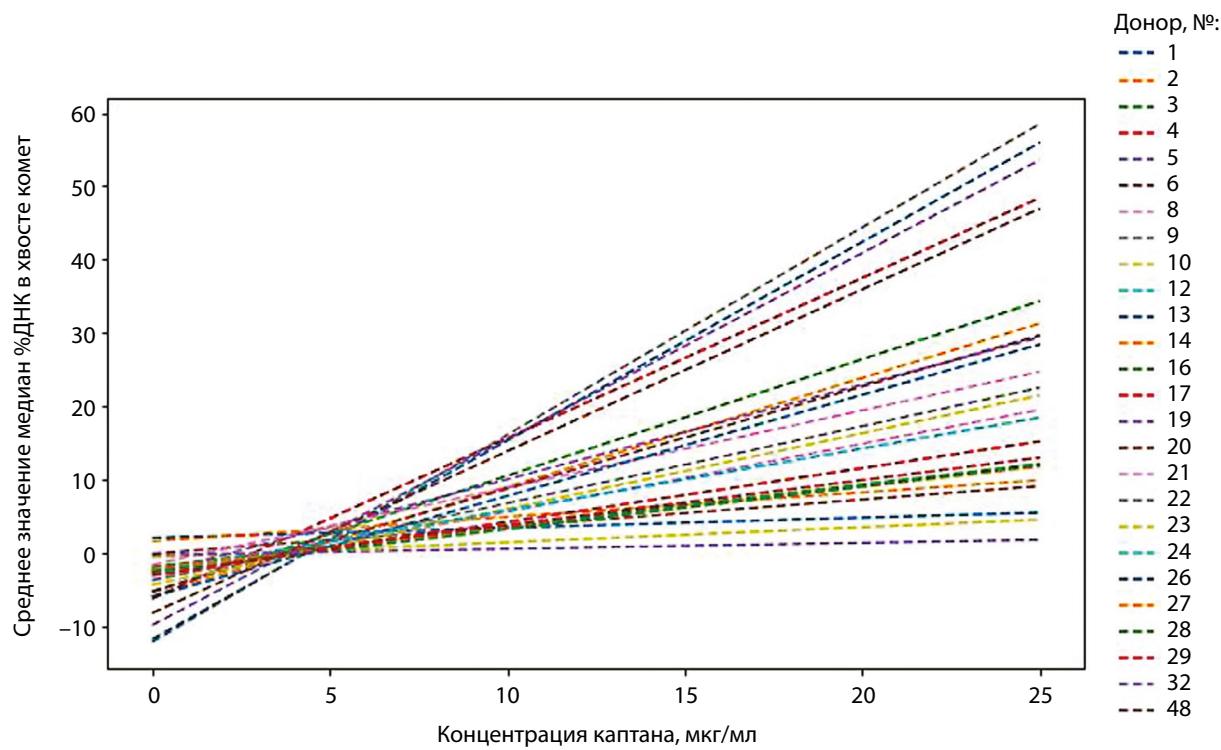
Alina P. Kotnova – Candidate of Biological Sciences, senior researcher of the department of genetic toxicology, FBES “Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman” of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 141014, Moscow region, Mytishchi, Russian Federation. E-mail: kotnova.ap@fnrg.ru <https://orcid.org/0000-0002-4333-9288> Scopus Author ID: 9244982300

Natalya S. Averianova – Candidate of Biological Sciences, senior researcher of the department of genetic toxicology, FBES “Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman” of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 141014, Moscow region, Mytishchi, Russian Federation. E-mail: averyanova.ns@fnrg.ru <https://orcid.org/0000-0002-2973-8776> Scopus Author ID: 57203788893

Nataliya A. Il'yushina – Doctor of Biological Sciences, head of the department of genetic toxicology, FBES “Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman” of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 141014, Moscow region, Mytishchi, Russian Federation. E-mail: ilushina.na@fnrg.ru <https://orcid.org/0000-0001-9122-9465> Scopus Author ID: 6603049459



К статье А.А. Царёвой и соавт.
To the article by Anastasiya A. Tsareva et al.



Аппроксимированные линии тренда (полином первой степени $y = kx + b$) для кривых зависимости средних значений медиан «%ДНК в хвосте комет» от концентрации пестицида:
а – без метаболической активации; б – в условиях метаболической активации.

Approximated trend lines (first degree polynomial $y = kx + b$) for curves of the dependence of the average of median "% DNA in the comet tail" on the pesticide concentration: а – without metabolic activation; б – under metabolic activation.