ГЕНЕТИКА, 2025, том 61, № 2, с. 12–23

ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

УДК 577.121.7:612.112.94:575.224.23:57.085.2

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ В КУЛЬТУРАХ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, ЭКСПОНИРОВАННЫХ ГЕРБИЦИДОМ ПАРАКВАТОМ

© 2025 г. Н. С. Кузьмина[1, 2, *], К. Г. Орджоникидзе [1, 3], Н. Ш. Лаптева[1], И. Н. Когарко[2], В. В. Петушкова[2], С. К. Абилев[1], А. В. Рубанович[1]

[1]*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия*
[2]*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия*
[3]*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия*
**e-mail: nin-kuzmin@yandex.ru*

Поступила в редакцию 17.09.2024 г.
После доработки 01.10.2024 г.
Принята к публикации 03.10.2024 г.

Проведены эксперименты по кратковременному (один час) тестирующему воздействию гербицида параквата – сильнейшего индуктора окислительного стресса на культивируемые клетки крови (поздняя G1-стадия первого митоза, 4 x 10^{-8} моль/л) девяти здоровых доноров. В 60-часовых (краткосрочных) и в 120-часовых (долгосрочных) культурах лимфоцитов, подвергшихся воздействию параквата *in vitro*, средние частоты аберрантных клеток составили, соответственно 4.05 ± 0.55 и 9.42 ± 1.23%, что существенно превышает соответствующие контрольные уровни: 1.16 ± 0.30 и 1.70 ± 0.50% (p = 0.008 и 0.018, соответственно). Наблюдаемые генотоксические эффекты обусловлены в первую очередь индукцией этим оксидантом простых аберраций хроматидного типа (одиночные фрагменты), уровни которых составили 3.32 ± 0.40 и 8.92 ± 1.40 на 100 клеток при кратковременном и длительном культивировании лимфоцитов, соответственно (против 1.03 ± 0.34 и 1.56 ± 0.38 на 100 клеток в соответствующем контроле). В клеточных культурах обоих типов частоты парных хромосомных фрагментов также значимо (или на уровне тенденции) превышали таковые показатели в контроле (p = 0.046 и 0.068 для 60- и 120-часовых культур, соответственно). Различий между 60- и 120-часовыми неэкспонированными культурами клеток по уровню аберрантных клеток и аберраций хромосом всех типов не выявлено. Напротив, долгосрочные культуры лимфоцитов, подвергшиеся воздействию параквата, демонстрируют значимо повышенный уровень аберрантных метафаз и одиночных хроматидных фрагментов по сравнению с краткосрочными экспонированными культурами (p = 0.001). Показано, что долгосрочные эффекты характеризовались более высокими индивидуальными значениями показателя омега Коэна (w) – от 0.157 до 0.259 по сравнению с таковыми для 60-часовых культур – от 0.057 до 0.153. Полученные данные свидетельствуют об индукции геномной нестабильности в отдаленных потомках лимфоцитов человека, подвергшихся в начале культивирования кратковременному воздействию параквата, и ее индивидуальном характере.

Ключевые слова: окислительный стресс, гербицид паракват, культуры лимфоцитов человека, нестабильность генома, отдаленные эффекты.

DOI: 10.31857/S0016675825020021 **EDN:** UWBNIC

Как известно, воздействие на организм человека в быту и на производстве множества экзогенных токсикантов сопряжено с развитием окислительного стресса (радиация, пестициды, фармпрепараты, тяжелые металлы и т. д.). Кроме того, такие эндогенные факторы как аллергические и аутоиммунные заболевания, хронические воспаления, травмы, чрезмерные физические нагрузки являются причиной выработки повышенного количества активных форм кислорода. В условиях развития в организме хронического оксидативного стресса, индуцированного вышеперечисленными факторами, при недостаточности резервов защитных механизмов (система антиоксидантной защиты, репарация ДНК и др.) нарушается клеточный гомеостаз [1]. В частности, это приводит к развитию гено-/цитотоксических эффектов, выраженность которых имеет индивидуальный характер.

По-видимому, пусковые механизмы индукции хронического оксидативного стресса в результате воздействия вышеперечисленных факторов различны. Тем не менее в последние годы накопилось достаточное количество данных, свидетельствующих о его патогенетической роли в преждевременном старении организма и развитии возраст-ассоциированных патологий [1–3].

В связи с вышесказанным создание прогностической тест-системы, направленной на выявление лиц с повышенной чувствительностью к хроническому окислительному стрессу и риском развития отдаленных неблагоприятных эффектов для здоровья, представляется важным и актуальным. Удобной моделью для этого являются культуры лимфоцитов периферической крови с оценкой не только краткосрочных, но и долгосрочных генотоксических эффектов в этих клетках, подвергшихся в начале культивирования кратковременному воздействию оксиданта.

Гербицид паракват (1,1'-диметил-4,4'-дипиридил дихлорид) – сильнейший индуктор хронического окислительного стресса, который по этой причине часто используется в экспериментальных работах. Проявляя свойства окислителя, этот токсикант восстанавливается микросомальным донором электронов – НАДФН-цитохром-с-редуктазой и превращается в свободный радикал. Существует также НАДН-зависимая митохондриальная система восстановления параквата. Последний взаимодействует с молекулярным кислородом и восстанавливает его до супероксид анион-радикала. Таким образом, имеет место цикличное восстановление/окисление параквата в клетке. Хотя реакционная способность супероксида не очень велика, при его метаболизме образуются продукты (пероксид водорода и гидроксильный радикал), обладающие гораздо большей химической активностью. Кроме того, на нескольких экспериментальных объектах показано, что паракват вызывает нарушение цепи переноса электронов в митохондриях, разобщает процессы окислительного фосфорилирования, что приводит к обширному повреждению этих органелл. Запускаются процессы перекисного окисления липидов, приводящие к повреждению биомембран, белков, нуклеиновых кислот [4–6].

Таким образом, цель настоящей работы заключалась в моделировании in vitro динамики реализации цитогенетических нарушений в культурах экспонированных гербицидом паракватом лимфоцитов человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований являлись культуры лимфоцитов периферической крови человека, подвергшиеся в начале культивирования кратковременному воздействию параквата. Неэкспонированные культуры клеток рассматривались как контрольные. Забор крови для экспериментов был осуществлен венепункцией у девяти лиц (23–55 лет), не имеющих в анамнезе онкологической патологии, производственного контакта с мутагенами, вредных привычек (алкоголь, курение), а также в течение месяца, предшествовавшего обследованию, не проходивших рентгенодиагностические процедуры, не принимавших антибиотики и гормональные препараты, не болевших острыми респираторными заболеваниями; при наличии в анамнезе хронических патологий (бронхит, пиелонефрит, заболевания опорно-двигательного аппарата и др.), находящихся в стадии ремиссии как минимум 0.5 года.

Постановка в стерильных условиях культур и культивирование лимфоцитов периферической крови проводились по общепринятой методике согласно рекомендациям ВОЗ (1973) и МАГАТЭ (1986) [7, 8] с некоторыми модификациями. А именно: 0.8 мл цельной крови добавляли к 11 мл инкубационной среды, приготовленной заранее в стерильных флаконах (SPL Lifesciences) и состоящей из 9 мл среды RPMI 1640 с глутамином (Панэко), 1.8 мл сыворотки крупного рогатого скота (Панэко), 0.2 мл фитогемагглютинина (Панэко), 40 γ/мл антибиотиков (гентамицин). Время инкубации в термостате при 37°С составляло 60 и 120 ч для получения краткосрочных и долгосрочных культур лимфоцитов, соответственно.

Через 19 ч после стимуляции лимфоцитов фитогемагглютинином (поздняя G1-стадия первого митоза клеток) на один час в культуру вводили паракват в концентрации 4×10^{-8} моль/л (экспонированные культуры) или физиологический раствор (контрольные культуры) с последующим трехкратным отмыванием клеток от токсиканта. Последняя процедура осуществлялась и в отношении неэкспонированных культур. В долговременных культурах лимфоцитов проводилась замена инкубационной среды через 82 ч после начала культивирования клеток. Продолжительность культивирования и концентрация параквата выбраны исходя из результатов предварительных экспериментов. А именно: проведена оценка получаемых цитогенетических препаратов по критериям сохранения жизнеспособности клеток и достаточного пролиферативного потенциала, результатом чего является оптимальное количество метафазных пластинок. Предварительные эксперименты, проведенные в лаборатории с использованием методики дифференциального окрашивания сестринских хроматид (добавление в культуру 5-бромдезоксиуридина), показали, что в 60-часовых и 120-часовых культурах присутствовали преимущественно лимфоциты 1–2-го митозов и 4–6-го митозов соответственно. После окончания культивирования

клетки подвергались 10-минутному воздействию подогретого до 37°С гипотонического раствора (0.075 М KCl) с последующими трехкратной фиксацией смесью абсолютного этанола и ледяной уксусной кислоты в отношении 3 : 1 и приготовлением препаратов метафазных хромосом.

Анализ хромосомных аберраций проводили путем микроскопирования монохромно окрашенных, с хорошим разбросом метафазных пластинок. Учитывались все аберрации хроматидного и хромосомного типа. К первым относили одиночные и изохроматидные фрагменты, межхромосомные хроматидные обмены. Вторые включали простые (ацентрические парные фрагменты, центромерные разрывы, делеции, не сопровождающиеся ацентрическими фрагментами) и сложные обменные (дицентрики, центрические и ацентрические кольца, атипичные моноцентрики – симметричные транслокации, инверсии) хромосомные перестройки. Частичный кариотипический анализ (идентификация гомологичных хромосом и/или групп хромосом) применялся для выявления делеций, реципрокных транслокаций, инверсий.

Частично поиск метафазных пластинок на препаратах проводили с помощью светового микроскопа Axio Imager.M1 (Zeiss) с надстройкой Metafer (Metasystems) и соответствующим программным обеспечением (лаборатория экологического мониторинга и биоиндикации ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН). Как правило, на каждую экспериментальную точку анализировалось не менее 100 клеток (от 100 до 570 метафаз каждой культуры). Меньшее количество просмотренных метафазных пластинок (четыре культуры, обработанные паракватом; проанализировано от 28 до 63 клеток) свидетельствовало о недоступности большего количества материала для анализа. В общей сложности проанализированы 32 культуры (18 краткосрочных и 14 долгосрочных), 6607 метафаз.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программ WINPEPI (PEPI-for-Windows) и SPSS 20.0.0 общепринятыми статистическими методами. Значимость различий по цитогенетическим показателям между проанализированными совокупностями культур (обработанных паракватом и соответствующих им контрольных) оценивалась с помощью непараметрического критерия Вилкоксона, между группами 60- и 120-часовых экспонированных паракватом культур – с помощью непараметрического теста Манна–Уитни (в связи с разной численностью групп). Для каждого индивида оценивали различия по рассматриваемым показателям между совокупностями неэкспонированных клеток и клеток, подвергшихся воздействию параквата, с помощью точного критерия Фишера. В качестве аналога коэффициента корреляции между наличием хромосомных нарушений в клетке и перенесенным ею воздействием параквата (или продолжительностью культивирования) были рассчитаны индивидуальные значения показателя Cohen's w (омега Коэна (w)).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 и на рис. 1 представлены средние частоты аберраций хромосом в неэкспонированных и подвергшихся воздействию параквата *in vitro* лимфоцитах девяти обследованных доноров при различной продолжительности культивирования клеток крови. Как видно из табл. 1, в метафазах контрольных культур выявлены все типы хромосомных нарушений, за исключением хроматидных обменов, а преобладающими аберрациями во всем спектре являются хроматидные фрагменты. В целом средняя частота аберрантных клеток находится в пределах общепринятого спонтанного уровня (1.0–1.5%).

В 60-часовых культурах лимфоцитов (клетки 1–2-го митозов), подвергшихся воздействию параквата *in vitro*, средняя частота аберрантных клеток существенно (в 3.5 раза) превышает соответствующий контрольный уровень (p = 0.008). Наблюдаемый эффект обусловлен значимой индукцией этим оксидантом простых аберраций хроматидного (одиночные фрагменты) и хромосомного (парные фрагменты) типов (табл. 1). В 120-часовых культурах лимфоцитов (клетки 4–6-го митозов), подвергшихся воздействию параквата *in vitro*, средняя частота аберрантных метафаз значимо (в 5.5 раз) превышает соответствующий контрольный уровень (p = 0.018). Как и в отношении лимфоцитов 1–2-го митоза, эффект, регистрируемый в клетках 4–6-й генерации, обусловлен в первую очередь существенно повышенной в них частотой хроматидных одиночных фрагментов по сравнению с долгосрочными культурами неэкспонированных клеток (p = 0.018). Отмечена также явная тенденция к повышению в 120-часовых экспонированных паракватом культурах лимфоцитов уровня парных хромосомных фрагментов по сравнению с таковым показателем в соответствующем контроле (p = 0.068) (табл. 1).

Как видно из табл. 1, не выявлено различий между 60- и 120-часовыми неэкспонированными культурами клеток по уровню аберрантных клеток и аберраций хромосом всех типов. Напротив, долгосрочные культуры лимфоцитов, подвергшиеся воздействию параквата, демонстрируют значимо повышенный уровень аберрантных метафаз и одиночных хроматидных фрагментов по сравнению с краткосрочными экспонированными культурами (p = 0.001).

Следует отметить, что в обработанных паракватом культурах несколько чаще, чем в контроле, встречались изохроматидные фрагменты, разрывы

Таблица 1. Типы и средние частоты аберраций хромосом в неэкспонированных и подвергшихся воздействию параквата *in vitro* лимфоцитах человека

Культура лимфоцитов		Количество проанализированных метафаз	Аберрантные метафазы (частота, %)	Аберрации хроматидного типа (частота на 100 клеток)			Аберрации хромосомного типа (частота на 100 клеток)				
							простые			обменные	
Культивирование, ч	Воздействие			одиночные фрагменты	изохроматидные фрагменты	обмены	парные фрагменты	разрывы по центромере	делеции	транслокации + инверсии	дицентрики + кольца
60	контроль	2005	1.16 ± 0.30	1.03 ± 0.34	0.02 ± 0.02	0	0.17 ± 0.08	0	0.02 ± 0.02	0.06 ± 0.06	0
	паракват	1889	4.05 ± 0.55	3.32 ± 0.40	0.15 ± 0.10	0	1.09 ± 0.49	0.10 ± 0.07	0	0.02 ± 0.02	0
120	контроль	1759	1.70 ± 0.50	1.56 ± 0.38	0.04 ± 0.04	0	0.04 ± 0.04	0	0.04 ± 0.04	0	0.08 ± 0.08
	паракват	954	9.42 ± 1.23	8.92 ± 1.40	0.55 ± 0.47	0	1.98 ± 0.89	0.34 ± 0.22	0.23 ± 0.23	0.07 ± 0.07	0
Значимость различий между контрольными и обработанными паракватом культурами (60 ч)*			0.008	0.008	0.285	–	0.046	0.180	0.317	0.317	–
Значимость различий между контрольными и обработанными паракватом культурами (120 ч) *			0.018	0.018	0.285	–	0.068	0.109	0.655	0.317	0.317
Значимость различий между контрольными культурами (60 и 120 ч)**			0.340	0.288	0.783	–	0.295	–	0.783	0.378	0.257
Значимость различий между культурами, обработанными паракватом (60 и 120 ч)**			0.001	0.001	0.781	–	0.473	0.403	0.257	0.783	–

Примечание. * – непараметрический критерий Вилкоксона (*p*-value), ** – непараметрический критерий Манна–Уитни (*p*-value).

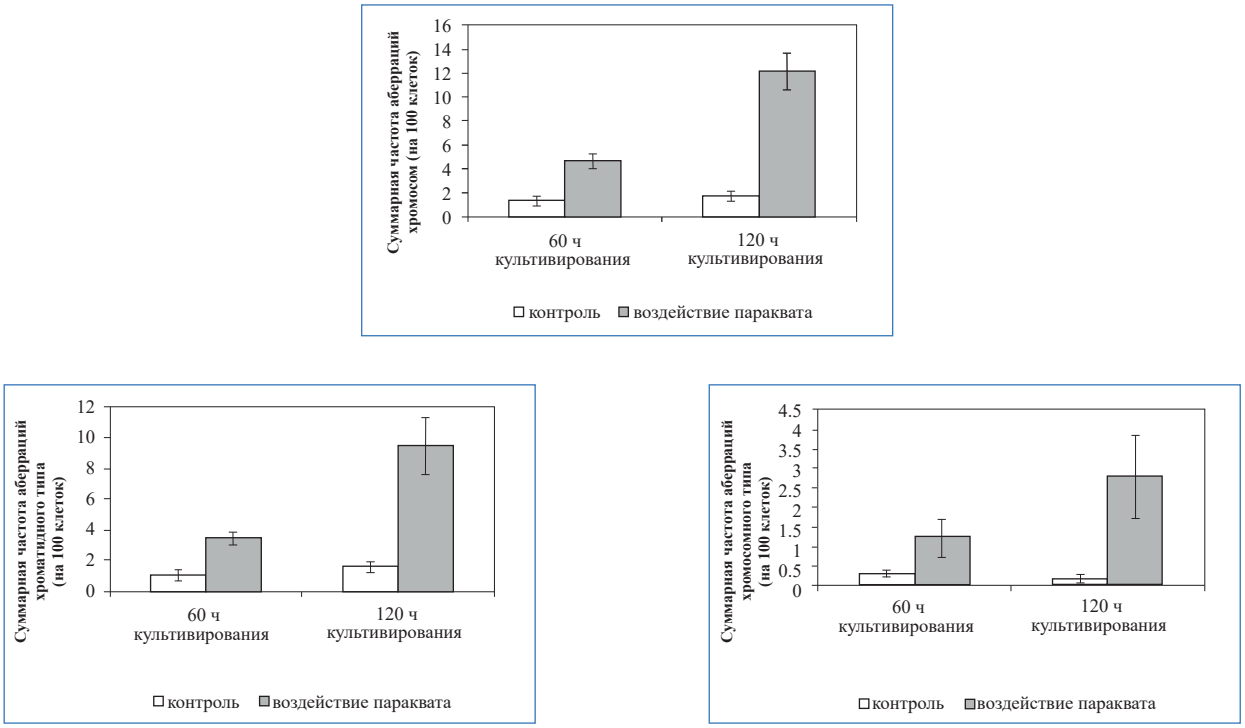


Рис. 1. Средние частоты аберраций хромосом в контрольных и подвергшихся воздействию параквата *in vitro* культурах лимфоцитов обследованных лиц.

по центромере, делеции (табл. 1). На рис. 1 представлены средние суммарные частоты хроматидных и хромосомных аберраций, а также средняя общая частота всех нарушений хромосом в краткосрочных и долгосрочных культурах лимфоцитов. Видно, что в отношении всех трех показателей наблюдается одинаковая направленность эффекта. А именно, уровень поврежденности генома в отдаленных потомках обработанных паракватом лимфоцитов выше, чем в самих клетках-мишенях. Так, отмечены значимые различия между 60- и 120-часовыми культурами клеток по суммарной частоте аберраций хроматидного типа и общему уровню всех аберраций хромосом ($p = 0.001$). Наблюдается и тенденция аналогичной направленности для аберраций хромосомного типа ($p = 0.217$).

В табл. 2 представлены показатели индивидуального ответа каждого из девяти индивидов на воздействие параквата *in vitro*. Анализ 60-часовых культур клеток крови показал следующее. Хотя для восьми из них отмечается явная тенденция к увеличению уровня аберраций хроматидного типа в лимфоцитах, подвергшихся воздействию параквата, по сравнению с таковым показателем в контроле, значимый эффект выявлен только для одного человека. Однако в отношении 120-часовых клеточных культур для большинства лиц (5 из 7 чел.) отмечаются значимые различия по частоте этих нарушений между неэкспонированными лимфоцитами и клетками, обработанными паракватом. При этом для двух человек наблюдалась такая же направленность эффекта, и рассматриваемые различия были близки к значимым ($p = 0.064$ и 0.062).

Генотоксические эффекты параквата, хотя и менее выраженные, выявлены и по тесту аберраций хромосомного типа. Анализ 60-часовых клеточных культур продемонстрировал для пяти из девяти человек тенденцию к большей частоте этих цитогенетических нарушений в экспонированных лимфоцитах по сравнению с клетками, не обработанными паракватом, хотя значимых различий не отмечается. Однако для части индивидов (3 из 7 чел.) долговременное культивирование клеток привело к существенно повышенному уровню простых аберраций хромосомного типа в лимфоцитах, подвергшихся воздействию параквата, по сравнению с соответствующим контролем (p-value от 0.002 до 0.035) (табл. 2).

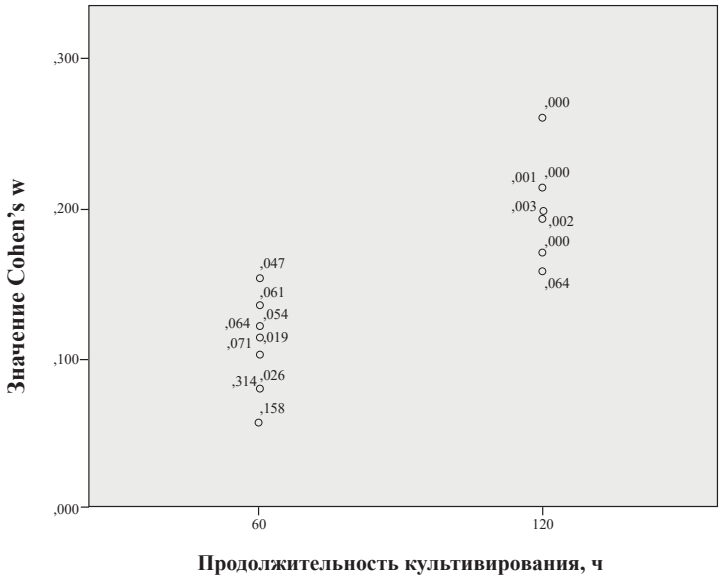
В итоге оценка суммарной частоты цитогенетических нарушений продемонстрировала значимые генотоксические эффекты параквата в 60-часовых культурах лимфоцитов у трех из девяти человек, в то время как долгосрочное культивирование привело к выраженной поврежденности генома почти у всех обследованных индивидуумов (табл. 2).

Очевидно, что дальнейший анализ индивидуальной чувствительности лимфоцитов к тестирующему воздействию параквата *in vitro* требовал

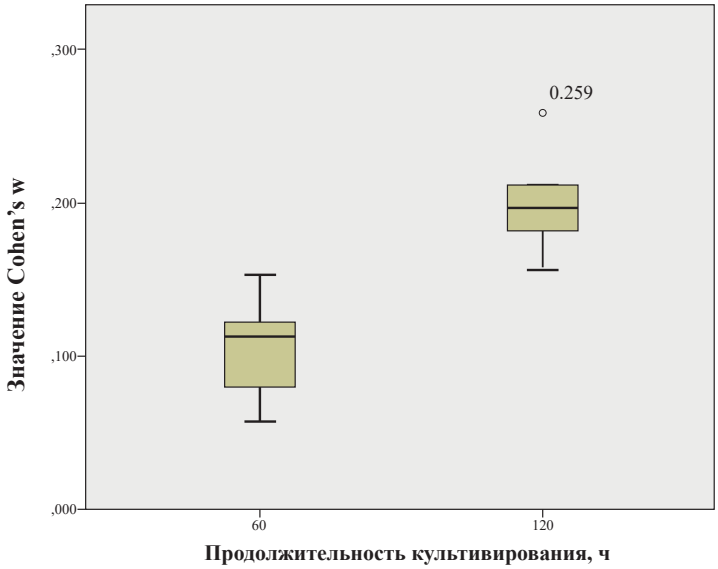
Таблица 2. Индивидуальные частоты аберраций хромосом, индуцированных при воздействии параквата *in vitro*, в лимфоцитах девяти обследованных лиц в зависимости от продолжительности культивирования клеток

Культура лимфоцитов		Тип аберраций	Суммарная частота аберраций (на 100 клеток) и значимость различий между культурами (*p*-value)*																	
Культивирование, ч	Воздействие		1		2		3		4		5		6		7		8		9	
60	К	хроматидные	0.59	0.576	0	0.081	0.5	0.064	0.51	0.054	0.5	0.34	1.5	0.338	0.5	**0.01**	2.22	0.093	3.16	0.324
	П		1.6		2.5		3.41		3.77		2.17		3.5		4.62		4.4		5.26	
120	К		–	–	–	–	0	**9.2E-6**	1.48	**0.014**	0.91	0.064	1.33	**0.017**	1.78	0.062	2.5	**1.7E-5**	3.14	**0.001**
	П		–		–		8.97		7.94		7.14		7.0		5.45		9.79		20.00	
60	К	хромосомные	0	0.424	0	–	0	–	0	–	0.5	0.091	0.5	0.215	0.50	0.215	0.22	0.217	0.53	0.465
	П		0.8		0		0		0		4.35		2.5		0.51		1.11		1.58	
120	К		–	–	–	–	0	0.073	0	**0.035**	0	–	0	**0.002**	0	**0.003**	0.25	0.062	0.86	1,000
	П		–		–		2.07		3.17		0		6.0		5.45		1.59		0	
60	К	хроматидные + хромосомные	0.59	0.314	0	0.081	0.5	0.064	0.51	0.054	1.00	**0.047**	2.00	0.071	1.00	**0.019**	2.44	**0.026**	3.68	0.158
	П		2.40		2.5		3.42		3.77		6.52		6.00		5.13		5.55		6.84	
120	К		–	–	–	–	0	**5.7E-7**	1.48	**0.001**	0.91	0.064	1.33	**3.2E-5**	1.78	**0.002**	2.75	**1.7E-6**	4.00	**0.003**
	П		–		–		11.03		11.11		7.14		13.00		10.91		11.38		20.00	

Примечание. *К – контроль, П – воздействие параквата, * – точный двусторонний тест Фишера, жирным шрифтом выделены значения $p < 0.05$.



а.



б.

Рис. 2. Индивидуальная чувствительность лимфоцитов обследованных доноров к воздействию параквата *in vitro*. а – приведены индивидуальные значения Cohen′s w, характеризующие выраженность эффекта. Показаны численные значения значимости (*p*-value) каждой корреляции; б – диаграмма размаха индивидуальных значений Cohen′s w (“ящик с усами”). Показаны: медиана 25 и 75%-ные процентили (нижняя и верхняя границы “ящика” соответственно), минимальное и максимальное значения, не являющиеся выбросом – концы “усов”, а также приведено численное экстремальное значение “выброс”, выходящее за пределы 1.5 длины “ящика”.

количественную оценку размера рассматриваемого генотоксического эффекта этого оксиданта (effect size) для каждого из обследованных лиц. С этой целью было рассчитано значение показателя омега Коэна (w) (Cohen′s w, аналог коэффициента корреляции). Как видно из рис. 2, а, при 60-часовой продолжительности культивирования клеток этот показатель для девяти обследованных доноров варьировал от 0.057 до 0.153, при этом для трех человек рассматриваемая сопряженность была значимой, а для четырех – близка к таковой. Долгосрочные эффекты, изученные для семи доноров, характеризовались более высокими значениями Cohen′s w (от 0.157 до 0.259), и почти все они были значимы.

Таблица 3. Индивидуальные показатели возрастающей динамики суммарной частоты аберраций хромосом в последовательных митозах обработанных паракватом лимфоцитов крови (сравнение 60- и 120-часовых клеточных культур)

№ донора	Размер эффекта “effect size”	
	Критерий Коэна (Cohen′s w)	*p*-value*
1	–	–
2	–	–
3	0.143	**0.033**
4	0.144	0.103
5	**0.012**	1,000
6	**0.026**	0.119
7	0.107	0.068
8	0.106	**3.2E-3**
9	0.109	**0.019**

Примечание. * – точный двусторонний тест Фишера, жирным шрифтом выделены значения $p < 0.05$.

На рис. 2, б представлена диаграмма размаха индивидуальных значений Cohen′s w (“ящик с усами”, или “box plot”), отражающая возрастающую динамику уровня поврежденности генома лимфоцитов по мере увеличения продолжительности их культивирования. Так, медианные значения рассматриваемого показателя в 60-часовых и 120-часовых культурах лимфоцитов составляют, соответственно, 0.113 и 0.198. Границы его квартильного размаха (нижняя и верхняя границы “ящика”) при краткосрочном культивировании составляют 0.078 и 0.1280, что существенно ниже таковых для 120-часовых клеточных культур – 0.170 и 0.213. Долговременная культура одного индивидуума характеризовалась экстремальным генотоксическим эффектом параквата, т. е. значением Cohen′s w, выходящим за пределы полуторной разницы между значениями верхнего и нижнего квартилей.

Существенно повышенный уровень цитогенетических нарушений в клетках 4–6-й генераций, по сравнению с таковым в 1–2-м митозах лимфоцитов, демонстрируют результаты оценки сопряженности между наличием хромосомных нарушений в обработанных паракватом клетках и продолжительностью их культивирования у семи индивидов (табл. 3). Как видно, очень низкое значение показателя Cohen′s w (0.012) наблюдается только у одного донора, у остальных шести человек значение Cohen′s w варьировало совсем в небольшом диапазоне: от 0.106 до 0.144. При этом для четырех лиц рассматриваемая сопряженность была значимой, а для двух – близка к таковой.

ОБСУЖДЕНИЕ

Значимо повышенная средняя частота простых аберраций хроматидного (одиночные фрагменты) и хромосомного (парные фрагменты) типа, выявленная в настоящей работе в 60-часовых культурах (1–2-я клеточные генерации) экспонированных паракватом *in vitro* лимфоцитов девяти индивидуумов, свидетельствует о выраженных генотоксических эффектах этого соединения в примененных концентрациях (4×10^{-8} моль/л). В данном случае первичные повреждения ДНК в виде одно- и двунитевых разрывов, индуцированные при непосредственном воздействии параквата на клетки (поздняя G1-стадия первого митоза, 20-й час культивирования), закономерно реализуются в наблюдаемые нами конечные эффекты – структурные повреждения хромосом генома. Следует отметить, что несмотря на явную тенденцию к повышенному уровню цитогенетических нарушений в обработанных паракватом культурах лимфоцитов по сравнению с контролем, индивидуальный анализ значимости рассматриваемых различий показал ее отсутствие у большей части доноров. По-видимому, с целью демонстрации значимых индивидуальных генотоксических эффектов параквата в такой низкой концентрации требуется большее количество проанализированных метафаз (на человека), что в условиях данного эксперимента сделать не представлялось возможным.

Полученные нами данные согласуются с результатами единичных исследований, свидетельствующих о значимых дозозависимых гено-/цитотоксических эффектах параквата в краткосрочных культурах лимфоцитов человека (хромосомные аберрации, сестринские хроматидные обмены, микроядра, апоптоз) [9–11]. Следует отметить, что в этих работах использованные дозы параквата находились в диапазоне концентраций (10^{-4}–10^{-6} моль/л), сопряженных с существенным снижением

митотического индекса, и были в десятки-сотни раз выше использованных в настоящей работе.

Существенное возрастание уровня разрывов ДНК и окисленного гуанина (8-OG) показано в обработанных паракватом трансформированных клеточных линиях человека (HeLa и Hep G2) [12]. Индуцированные этим оксидантом аккумуляция 8-OG и, как следствие репликации замены GC на AT, наблюдались в клеточных линиях, подвергшихся CRISPR-Cas9 модификации для инактивации генов OGG1 и MUTYH – гликозилаз [13]. Воздействие параквата приводило к микросателлитным мутациям в клеточных линиях рака легких человека [14].

Те или иные вышеперечисленные повреждения генома, индуцированные паракватом, выявлены и в экспериментах *in vivo*. Так, при пероральном фракционированном его поступлении (через зонд, суммарные дозы 90–300 мг/кг) в организм крыс Wistar выявлены дозозависимое значимое увеличение уровня разрывов ДНК в лимфоцитах периферической крови и активация апоптоза [15]. В другом исследовании у швейцарских альбиносов-мышей, которые на протяжении 28 дней получали воду, содержащую паракват (суммарная доза 50–200 мг/кг), отмечены существенно повышенные частоты микроядер в клетках буккального эпителия, эритроцитах и лейкоцитах, клетках костного мозга с аберрациями хромосом, а также разрывов ДНК в лейкоцитах крови. Все эти изменения имели дозозависимый характер и сопровождались значимым снижением массы тела, печени, почек, что согласуется с результатами теста оценки гибели клеток [16]. Показана повышенная частота микроядер и аберраций хромосом в кончике корня лука репчатого *Allium cepa* L. как результат обработки семян паракватом (72 ч, 10–100 ppm). Эти изменения имели дозозависимый характер и сопровождались снижением длины корня, процента всхожести семян, привеса массы, анатомическими изменениями кончиков корней [17].

В настоящей работе не наблюдалось различий между 60- и 120-часовыми неэкспонированными культурами по всем рассмотренным цитогенетическим показателям. При этом долговременное культивирование лимфоцитов, подвергшихся кратковременному воздействию параквата, привело к значимо повышенным уровням аберрантных метафаз и одиночных хроматидных фрагментов по сравнению с таковыми, регистрируемыми в краткосрочных экспонированных культурах. Это также демонстрируют результаты анализа индивидуальных различий между уровнями цитогенетических нарушений в контрольных и обработанных паракватом культурах лимфоцитов обследованных лиц: для всех семи человек они были значимы или близки к этому, что не отмечалось при кратковременном культивировании клеток. Кроме того, результаты количественной оценки индивидуальной выраженности отдаленных генотоксических эффектов у семи обследованных индивидуумов характеризовались более высокими значениями Cohen's w по сравнению с таковыми, полученными для краткосрочных культур.

Однозначно в культурах, обработанных паракватом, имеет место редупликация хромосомных аберраций и их сохранение в последовательных клеточных генерациях. Это закономерно сопровождается трансформацией аберраций хроматидного типа в хромосомные перестройки (хроматидных фрагментов в парные хромосомные фрагменты), а также элиминацией части генетического материала с появлением делетированных хромосом в отдаленных потомках клеток, подвергшихся в начале культивирования кратковременному воздействию параквата.

С одной стороны, вышесказанным можно объяснить то, что в экспонированных культурах уровни простых аберраций (парные фрагменты, центромерные разрывы, делеции) и суммарная частота повреждений хромосомного типа были выше при 120-часовом культивировании лимфоцитов, чем при 60-часовом (на уровне тенденции). С другой стороны, прирост за несколько клеточных делений уровня хроматидных фрагментов многократно выше такового, наблюдаемого для аберраций хромосомного типа, что нельзя объяснить только редупликацией хромосомных повреждений в ряду последовательных клеточных делений. По-видимому, имеет место индукция “свежих” хроматидных фрагментов в потомках многократно поделившихся клеток, подвергшихся воздействию параквата. По феноменологии, это явление соответствует геномной нестабильности, индуцированной воздействием радиации или других генотоксических агентов [18].

Анализ накопленных к настоящему времени данных позволяет говорить об общности механизмов индукции хронического оксидативного стресса, сопряженных с нарушением цепи переноса электронов в митохондриях и разобщением процессов окислительного фосфорилирования, в результате облучения и воздействия параквата [5, 19]. Поэтому последний принято рассматривать в качестве радиомиметика [6]. Имеются также экспериментальные данные, позволяющие полагать ассоциативную связь индукции такого отдаленного эффекта радиации, как геномная нестабильность с хроническим окислительным стрессом [19].

Таким образом, изученные в настоящей работе закономерности реализации цитогенетических нарушений в культурах экспонированных паракватом лимфоцитов человека указывают на геномную нестабильность, индуцированную окислительным стрессом в отдаленных потомках лимфоцитов

человека, подвергшихся воздействию этого генотоксиканта. На данном этапе работы, несмотря на крайне малочисленную выборку обследованных лиц, анализ диаграммы размаха выраженности индивидуальных генотоксических эффектов выявил одного человека, характеризующегося экстремально высоким показателем индуцированной паракватом поврежденности генома, регистрируемым в долговременной культуре лимфоцитов (значение Cohen′s w – 0.256). Мы склонны полагать, что этот индивид относится к группе повышенного риска по развитию неблагоприятных последствий при воздействии на организм факторов, индуцирующих хронический окислительный стресс.

В нашей выборке встречались индивиды, у которых обработанные паракватом клеточные культуры характеризовались малым количеством бласттрансформированных и делящихся клеток. Для одного индивида такие изменения были выявлены как в 60-, так и в 120-часовой культуре (табл. 2, 3; донор № 5), для двух других – только при долговременном культивировании лимфоцитов (табл. 2, 3; доноры № 4 и 9). Вероятно, опять же идет речь о высокой чувствительности клеток крови к воздействию параквата *in vitro*, что проявляется снижением их жизнеспособности: клетки с множественными повреждениями генома элиминируются, становясь недоступными для анализа. В первую очередь это характерно для длительных культур лимфоцитов. Так, отсутствие связи выраженности генотоксических эффектов с длительностью культивирования клеток у одного индивида (табл. 3, № 5), очевидно, объясняется малым количеством метафаз в экспонированных культурах, доступных для анализа (46 и 28 клеток для 60- и 120-часовых культур соответственно). По той же причине, несмотря на многократно повышенный уровень цитогенетических нарушений в культурах этого донора, обработанных паракватом, по сравнению с таковым в контроле, значимые различия не выявлены (табл. 2, № 5).

Касательно механизмов действия параквата известно, что в результате его попадания в клетку постоянно генерируемые свободные радикалы либо непосредственно повреждают клеточные структуры, либо запускают сложные механизмы ответа, приводящие к гено-/цитотоксическим эффектам. Так, показана роль продуктов паракват-индуцированного перекисного окисления липидов в активации цитоплазматических моно-(АДФ)-рибозилтрансфераз, а следовательно, моно-(АДФ)-рибозилирования – обратимой посттрансляционной модификации протеинов, играющей роль в сигналлинге, ДНК-репарации, апоптозе и т. д. На нескольких клеточных моделях показана ассоциативная связь селективной фосфолипидной пероксидации с индукцией апоптоза [4]. Выявлено, что индуцированные паракватом повреждения легочной ткани ассоциированы с множеством сигнальных клеточных путей: Nrf2/ARE, NF-ϰB, NLRP3 инфламмасомы, TLRs, PPAR-γ, MAPKs, AMPK, Rho/ROCK, PI3K/AKT/mTOR, TGF-β/Smad, Wnt/β-катенин [20]. Показано, что индуцированный паракватом оксидативный стресс приводит к повреждению митохондрий посредством Ca^{2+}-зависимой пермеабилизации их внутренней мембраны, т. е. открытием неспецифической циклоспорин А (ЦсА) – чувствительной митохондриальной поры. Это приводит к деполяризации внутренней мембраны, ингибированию окислительного фосфорилирования, набуханию матрикса этих органелл, разрыву внешней мембраны, выходу находящихся в межмембранном пространстве апоптогенных белков. Рассмотренный процесс – один из основных путей запуска гибели клеток по механизмам апоптоза [21, 22]. Имеются сведения, что актин селективно связывает паракват, в результате чего формируются супрамолекулярные структуры этого белка цитоскелета наряду с его деполимеризующимися очагами [23].

В эксперименте с рекомбинантной клеточной линией насекомых SF-9 показана способность параквата ингибировать процессинг мРНК человеческой Mn-зависимой (митохондриальной) супероксиддисмутазы (SOD2) [24]. В экспериментах *in vivo* показано, что паракват подавляет транскрипцию мРНК гена *FoxO3* в кардиомиоцитах, что, в свою очередь, приводит к снижению экспрессии локусов ключевых антиоксидантных ферментов – каталазы CAT и супероксиддисмутазы SOD2 [25]. Метод молекулярного докинга, примененный для оценки возможного взаимодействия параквата с гистоновыми белками, показал, что паракват имеет наибольшую способность к связыванию с гистоном H4, который, как известно, участвует в организации “бусинки на нитке” в структуре нуклеосомы. Последнее имеет важное значение в упаковке ДНК, формировании хромосом и стабильности генома [16].

В настоящей работе впервые использован гербицид паракват для индукции хронического оксидативного стресса в долгосрочных культурах лимфоцитов крови человека. Сравнение цитогенетических эффектов этого соединения, регистрируемых в 60- и 120-часовых клеточных культурах, показало наибольшую их выраженность при долговременном культивировании клеток. Полученные данные и их анализ свидетельствуют об индукции геномной нестабильности, преимущественно в виде хроматидных фрагментов, в отдаленных потомках лимфоцитов, подвергшихся кратковременному экспонированию. Показано, что чувствительность к действию параквата и выраженность его отсроченных эффектов имеют индивидуальный характер.

Полагаем, что продолжение таких исследований с охватом репрезентативного количества

индивидов и расширением спектра анализируемых показателей даст возможность разработать экспериментальную прогностическую модель, основанную на тестировании *in vitro* ответа клеток крови человека на воздействие факторов, ассоциированных с развитием окислительного стресса, и оценке индивидуальных рисков индукции отдаленных негативных последствий для здоровья.

Авторы выражают огромную благодарность старшему лаборанту лаборатории экологической генетики ИОГен РАН В.С. Лысенковой за помощь в анализе цитогенетических препаратов.

Работа частично выполнена в рамках темы Государственного задания Минобрнауки России “Механизмы генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека” (№ 122022600163-7), подтемы “Генотоксиканты и антигенотоксиканты окружающей среды: маркеры отдаленного воздействия и генетические риски развития широко распространенных заболеваний”.

Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБУ науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук 05.06.2023 г. (протокол № 3).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Зентов Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б.* Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. М: Наука, 2001, 343 с.
2. *Цейликман В.Э., Лукин А.А.* Влияние окислительного стресса на организм человека // Междун. научно-исслед. журн. 2022. Т. 117. № 3–1. С. 206–211. https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.117.3.037
3. *Rubfiaro A.S., Tsegay P.S., Lai Y. et al.* Scanning ion conductance microscopy study reveals the disruption of the integrity of the human cell membrane structure by oxidative DNA damage // ACS Appl. Bio Mater. 2021. V. 4. № 2. P. 1632–1639. https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01461
4. *Fukushima T., Tanaka K., Lim H., Moriyama M.* Mechanism of cytotoxicity of paraquat // Environ. Health Prev. Med. 2002. V. 7. № 3. P. 89–94. https://doi.org/10.1265/ehpm.2002.89
5. *Cocheté H.M., Murphy M.P.* Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. № 4. P. 1786–1798. https://doi.org/10.1074/jbc.M708597200
6. *Machigov E. A., Igonina E. V., Sviridova D. A. et al.* The genotoxic effect of the paraquat radiomimetic on *Escherichia coli* bacteria // Biol. Bulletin. 2023. V. 49. № 12. P. 2486–2494. https://doi.org/10.1134/s106235902212010x
7. WHO. Methods for the Analysis of Human Chromosome Aberrations / Eds. Buckton K.E., Evans H.J. WHO. Geneva, 1973. 72 p.
8. Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment: Technical reports series № 260. Vienna: Int. Atomic Energy, 1986. 69 p.
9. *Jovtchev G., Gateva S., Stergios M., Kulekova S.* Cytotoxic and genotoxic effects of paraquat in *Hordeum vulgare* and human lymphocytes in vitro // Environ. Toxicol. 2010. V. 25. № 3. P. 294–303. https://doi.org/10.1002/tox.20503
10. *Ribas G., Surrallés J., Carbonell E. et al.* Genotoxic evaluation of the herbicide paraquat in cultured human lymphocytes // Teratog. Carcinog. Mutagen. 1997. V. 17. № 6. P. 339–347.
11. *Gateva S., Kulekova S.* Chromosome aberrations and apoptosis induced by Paraquat corresponding with cell cycle delay in human lymphocytes in vitro // J. Environ. Prot. Ecol. 2008. V. 9. № 3. P. 627–633.
12. *Petrovská H., Dušinská M.* Oxidative DNA damage in human cells induced by paraquat // Altern. Lab. Anim. 1999. V. 27. № 3. P. 387–395. https://doi.org/10.1177/026119299902700314
13. *Tajai P., Fedeles B.I., Suriyo T. et al.* An engineered cell line lacking OGG1 and MUTYH glycosylases implicates the accumulation of genomic 8-oxoguanine as the basis for paraquat mutagenicity // Free Radic. Biol. Med. 2018. № 116. P. 64–72. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.035
14. *Zienolddiny S., Ryberg D., Haugen A.* Induction of microsatellite mutations by oxidative agents in human lung cancer cell lines // Carcinogenesis. 2000. V. 21. № 8. P. 1521–1526.
15. *Alizadeh S., Anani-Sarab G., Amiri H., Hashemi M.* Paraquat induced oxidative stress, DNA damage, and cytotoxicity in lymphocytes // Heliyon. 2022. V. 8. № 7. e09895. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09895
16. *Onur B., Çavuşoğlu K., Yalçin E., Acar A.* Paraquat toxicity in different cell types of Swiss albino mice // Sci. Rep. 2022. V. 12. № 1. P. 4818. https://doi.org/10.1038/s41598-022-08961-z
17. *Acar A., Çavuşoğlu K., Türkmen Z. et al.* The investigation of genotoxic, physiological and anatomical effects of paraquat herbicide on *Allium cepa* L. // Cytologia. 2015. V. 80. № 3. P. 343–351. https://doi.org/10.1508/cytologia.80.343
18. *Сусков И.И., Кузьмина Н.С., Сускова В.С. и др.* Проблема индуцированной геномной нестабильности

как основы повышенной заболеваемости у детей, подвергающихся низкоинтенсивному воздействию радиации в малых дозах // Радиац. биология. Радиоэкология. 2006. Т. 46. № 2. С. 167–177.

19. *Szumiel I.* Ionizing radiation-induced oxidative stress, epigenetic changes and genomic instability: The pivotal role of mitochondria // Int. J. Radiat. Biol. 2015. V. 91. № 1. P. 1–12. https://doi.org/10.3109/09553002.2014.934929
20. *Liu X., Yang H., Liu Z.* Signaling pathways involved in paraquat-induced pulmonary toxicity: Molecular mechanisms and potential therapeutic drugs // Int. Immunopharmacol. 2022. V. 113 (Pt A). https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109301.
21. *Costantini P., Petronilli V., Colonna R., Bernardi P.* On the effects of paraquat on isolated mitochondria. Evidence that paraquat causes opening of the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore synergistically with nitric oxide // Toxicology. 1995. V. 99. № 1–2. P. 77–88. https://doi.org/10.1016/0300-483x(94)02997-9
22. *Coluccino G., Muraca V.P., Corazza A., Lippe G.* Cyclophilin D in mitochondrial dysfunction: A key player in neurodegeneration? // Biomolecules. 2023. V. 13. № 8. P. 1265. https://doi.org/10.3390/biom13081265
23. *Milzani A., Dalledonne I., Vailati G., Colombo R.* Paraquat induces actin assembly in depolymerizing conditions // FASEB J. 1997. V. 11. № 4. P. 261–270. https://doi.org/10.1096/fasebj.11.4.9068615
24. *Wright G., Reichenbecher V., Green T. et al.* Paraquat inhibits the processing of human manganese-dependent superoxide dismutase by SF-9 insect cell mitochondria // Exp. Cell Res. 1997. V. 234. № 1. P. 78–84. https://doi.org/10.1006/excr.1997.3579
25. *Chang Z.S., Xia J.B., Wu H.Y. et al.* Forkhead box O3 protects the heart against paraquat-induced aging-associated phenotypes by upregulating the expression of antioxidant enzymes // Aging Cell. 2019. V. 18. № 5. https://doi.org/10.1111/acel.12990.

Cytogenetic Effects in Cultures of Human Lymphocytes Exposed to the Herbicide Paraquat

N. S. Kuzmina[1, 2, *], K. G. Ordzhonikidze[1, 3], N. Sh. Lapteva[1], I. N. Kogarko[2], V. V. Petushkova[2], S. K. Abilev[1], A. V. Rubanovich[1]

[1]*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*
[2]*Semyonov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Science, Moscow, 119991 Russia*
[3]*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Science, Moscow, 119991 Russia*
**e-mail: nin-kuzmin@yandex.ru*

We conducted the experiments of the short-term (1 hour) testing effect of the herbicide paraquat, one of the strongest inducer of oxidative stress, on cultured blood cells (late G1 stage of the first mitosis, 4×10^{-8} mol/l) of 9 healthy donors. In 60-hour (short-term) and 120-hour (long-term) lymphocyte cultures exposed to paraquat *in vitro*, the average frequencies of aberrant cells were 4.05 ± 0.55 and 9.42 ± 1.23%, respectively, which significantly exceeds the corresponding control levels: 1.16 ± 0.30 and 1.70 ± 0.50% ($p = 0.008$ and $p = 0.018$, respectively). The observed genotoxic effects are primarily due to the induction of simple chromatid aberrations (single fragments), the levels of which were 3.32 ± 0.40 and 8.92 ± 1.40 per 100 cells as a result of short-term and long-term lymphocyte cultivation, respectively (in comparison with 1.03 ± 0.34 and 1.56 ± 0.38 per 100 cells in the corresponding control). The frequencies of paired chromosomal fragments in cell cultures of both types also significantly (or on the trend level) exceeded the control frequencies ($p = 0.046$ and $p = 0.068$ for 60- and 120-hour cultures, respectively). No differences were found between 60- and 120-hour unexposed cell cultures in the level of aberrant cells and chromosome aberrations of all types. In contrast, long-term lymphocyte cultures exposed to paraquat demonstrated significantly increased levels of aberrant metaphases and single chromatid fragments compared to short-term exposed cultures ($p = 0.001$). Long-term effects were shown to be characterized by higher individual values of Cohen's omega (w) – from 0.157 to 0.259, compared to those for 60-hour cultures – 0.057 to 0.153. The obtained data indicate the induction of genomic instability in distant descendants of human lymphocytes exposed to short-term paraquat at the beginning of cultivation, and its individual nature.

Keywords: oxidative stress, herbicide paraquat, human lymphocyte cultures, genome instability, long-term effects.