

Изменение морфологических и биохимических параметров крови мелких млекопитающих под влиянием глифосата

С.Ю. Максимовских, к.с.-х.н., Б.И. Кудрин, к.м.н., О.М. Плотникова, д.б.н., ГКУ «Экофонд» Территориальный ГЭФ Курганской области

Глифосат (N-фосфометил-глицин) входит в качестве активного компонента в состав гербицидов неизбирательного действия, широко применяемых в настоящее время в сельском хозяйстве. В России получили распространение такие глифосатсодержащие препараты этой группы, как Раундап, Ураган, Торнадо и др. Активный компонент этих гербицидов – глифосат – при распаде в почве образует аминометилфосфовую кислоту – стойкое химическое соединение, относящееся к классу фосфонатов, появление которых в окружающей среде является признаком антропогенного загрязнения.

Гербицидная активность глифосата связана с ингибированием в организме растений фермента 5-энолпирувил-шикимат-3-фосфат-синтазы, участвующего в синтезе ароматических аминокислот, необходимых для синтеза белка [4]. У животных эти ароматические аминокислоты поступают с пищей. Отсутствие в организме млекопитающих биохимических путей, которые могли бы быть блокированы глифосатом, низкая всасываемость его через пищеварительный тракт (15–35%) и кожные покровы, а также высокие значения половинной летальной дозы, определённой для ряда экспериментальных животных, послужили основанием для первого производителя гербицида Раундап на основе глифосата – фирмы «Монсанто», а также некоторым исследователям объявить это вещество безвредным для животных и человека [4, 5].

Практика применения гербицидов различных товарных марок, созданных на основе глифосата, в сельскохозяйственном производстве выявила их острую и хроническую токсичность для млекопитающих, включая человека. Этот факт был объяснён токсичностью сопутствующих компонентов, прежде всего детергентов, добавляемых к глифосату для улучшения потребительских свойств гербицида [6]. Острая токсичность гербицидов на основе глифосата по показателю LD₅₀ при их пероральном введении лабораторным животным (крысы, мыши) варьирует в зависимости от формулы гербицида

и вида животных в пределах от 1000 до 5000 мг/кг [5]. В экспериментах на животных, подвергавшихся воздействию разных доз глифосатсодержащих гербицидов, обнаружен ряд отклонений физиологического, биохимического и морфологического характера [7–10]. Влияние на органы и системы млекопитающих самого глифосата, без добавок, входящих в формулу гербицида, изучено до настоящего времени недостаточно. Это, возможно, связано с его невысокой острой токсичностью.

Цель данной работы – изучение влияния глифосата на гематологические и биохимические параметры крови млекопитающих при однократном подкожном введении малой дозы токсиканта.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено на 60 белых лабораторных мышьях-самцах линии СВА, стандартизированных по массе, возрасту и условиям содержания. Все животные соответствовали категории конвенционально улучшенных, клинически здоровых. Масса мышей составляла 24,0–26,0 г. В экспериментах использовали растворы натриевой соли глифосата, получаемой из технического (85%) глифосата (производство КНР) путём его нейтрализации гидроксидом натрия. Подкожное введение нейтрального раствора токсиканта позволило избежать возникновения сильных болевых ощущений и стресса у животных.

Раствор глифосата в дозе 50 мг/кг вводили животным однократно подкожно в объёме 0,1 мл. Эта доза значительно ниже максимальной дозы глифосата, не вызывающей видимых изменений в организме (No Observed Effect Level-NOEL) – 500 мг/кг, которая установлена Агентством США по охране окружающей среды (US EPA) для мышей, систематически поедающих токсикант с пищей [10].

Подопытных животных умерщвляли по истечении 1, 2, 3 и 4 сут. методом декапитации и проводили макроскопическое исследование состояния их внутренних органов. Кровь собирали и использовали для проведения гематологических (подсчёт эритроцитов и лейкоцитов, определение лейкоцитарной формулы) и биохимических (определение активности щелочной фосфатазы – ЩФ, аланинаминотрансферазы – АЛТ, аспартатаминов-трансферазы – АСТ, холинэстеразы – ХЭ, а также содержания общего белка – ОБ, мочевины – МОЧ,

холестерина – ХЛ, общего фосфора) исследований. Контролем к проведённым экспериментам служили 12 животных, которым вводили внутримышечно по 0,1 мл физиологического раствора.

Подсчёт числа эритроцитов и лейкоцитов, приготовление мазков, с последующей окраской по Романовскому – Гимзе, подсчёт лейкоцитарной формулы проводили по общепринятым методикам [1]. Данные гематологических исследований обработаны методами вариационной статистики [2]. Достоверность различия значений среднего арифметического опытных серий и контроля определяли по t-критерию Стьюдента. Различие считали достоверным при $P < 0,05$. Определение содержания субстратов и активности ферментов проводили с помощью наборных методов фирмы «Вектор-Бест» (Новосибирск). Достоверность различия с контролем определяли методом непараметрической статистики по критерию Вилкоксона – Манна – Уитни [3]. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в биохимических исследованиях соответствовал $P < 0,05$.

Результаты исследования. Поведение мышей после введения дозы 50 мг/кг глифосата не претерпело каких-либо изменений. Макроскопическое обследование внутренних органов животных, забитых через 1, 2, 3 и 4 сут. с начала эксперимента, также не выявило отклонений от нормы.

Гематологическое обследование позволило выявить определённые отклонения от контроля в исследуемых параметрах крови (табл.). Со стороны красной крови у животных через трое суток от начала эксперимента было обнаружено достоверное снижение числа эритроцитов. Со стороны белой крови отмечалось двухфазное изменение общего количества лейкоцитов. Вначале оно повышалось и по истечении двух суток от начала эксперимента становилось значимым. Затем повышение сменялось снижением, которое спустя четверо суток от начала эксперимента также становилось значимым. Анализ лейкоцитарной формулы и расчёт

абсолютного содержания в крови гранулоцитов и агранулоцитов показал, что выявленные изменения со стороны белой крови формируются за счёт лимфоидного ростка, знаменуя собой реакцию иммунной системы на введение глифосата. Абсолютное число лимфоцитов через двое суток после начала эксперимента было достоверно увеличено, а через четверо суток – достоверно снижено. Значимых количественных изменений со стороны гранулоцитов не выявлено.

Биохимическое исследование позволило обнаружить влияние глифосата на содержание в плазме крови общего фосфора и активность АЛТ (рис.). Повышение содержания общего фосфора по истечении 1, 2 и 3 сут. является логичным следствием введения в организм фосфорорганического токсиканта. Следует отметить, что через четверо суток после введения глифосата отличия в содержании этого метаболита в плазме крови были недостоверны, что может свидетельствовать о выведении основной части токсиканта из организма.

Понижение активности АЛТ, наблюдаемое на протяжении всего эксперимента, связано, вероятно, со снижением активности процесса обмена аминокислот и синтеза белков, что также подтверждается тенденцией к снижению активности ХЭ. Через сутки после введения глифосата отмечалось снижение активности ЩФ, что может быть следствием нарушения проницаемости мембран клеток печени и почек, синтезирующих этот фермент. Основанием для такого предположения является тенденция к повышению содержания мочевины и гипоферментемия ХЭ и АЛТ, являющихся энзимами печени.

Выводы. Подкожное введение малых доз глифосата млекопитающим приводило к гематологическим и биохимическим изменениям в организме подопытных животных. Наблюдались достоверные изменения со стороны общего числа эритроцитов и лейкоцитов, изменялась нормальная морфологическая картина крови. Биохимические изменения

Показатели крови мышей при однократном пероральном введении глифосата в дозе 50 мг/кг

| Время обследования, Число проб | Стат. показ. | Эр. | Лейк. | Н | Э | Л | М | Абс. Н. | Абс. Л. |
|--------------------------------|--------------|-------|--------|------|-----|-------|------|---------|---------|
| Контроль n=12 | X | 9,33 | 7,16 | 15,1 | 1,4 | 83,9 | 1,6 | 1,14 | 5,79 |
| | ±Sx | 0,21 | 0,66 | 2,6 | 0,5 | 2,2 | 0,4 | 0,22 | 0,56 |
| 1 сут. n=9 | X | 8,96 | 8,30 | 18,2 | 0,9 | 79,3 | 0,9 | 1,53 | 6,58 |
| | ±Sx | 0,80 | 0,53 | 4,5 | 0,5 | 4,3 | 0,4 | 0,42 | 0,55 |
| 2 сут. n=9 | X | 9,93 | 10,28* | 14,8 | 1,6 | 82,8 | 0,9 | 1,45 | 8,57* |
| | ±Sx | 0,59 | 1,00 | 2,0 | 0,7 | 2,2 | 0,4 | 0,21 | 0,95 |
| 3 сут. n=20 | X | 8,38* | 7,03 | 18,5 | 1,5 | 74,8* | 0,4* | 1,30 | 5,52 |
| | ±Sx | 0,37 | 0,97 | 3,2 | 0,5 | 3,0 | 0,3 | 0,27 | 0,83 |
| 4 сут. n=10 | X | 8,51 | 5,25* | 17,6 | 1,0 | 81,0 | 0,3* | 0,99 | 4,19* |
| | ±Sx | 0,38 | 0,47 | 3,1 | 0,5 | 2,9 | 0,3 | 0,25 | 0,32 |

Примечание: Эр. – эритроциты (млн/мкл); Лейк. – лейкоциты (тыс/мкл); п – палочкоядерные нейтрофилы (%); Н – нейтрофилы (%); Э – эозинофилы (%); Л – лимфоциты (%); М – моноциты(%); Абс. Л. – абсолютное число лимфоцитов (тыс/мкл); Абс. Н. – абсолютное число нейтрофилов (тыс/мкл); Стат. показ. – статистический показатель; n – величина выборки (число проб); * – Значения, достоверно ($p < 0,05$) отличающиеся от контроля

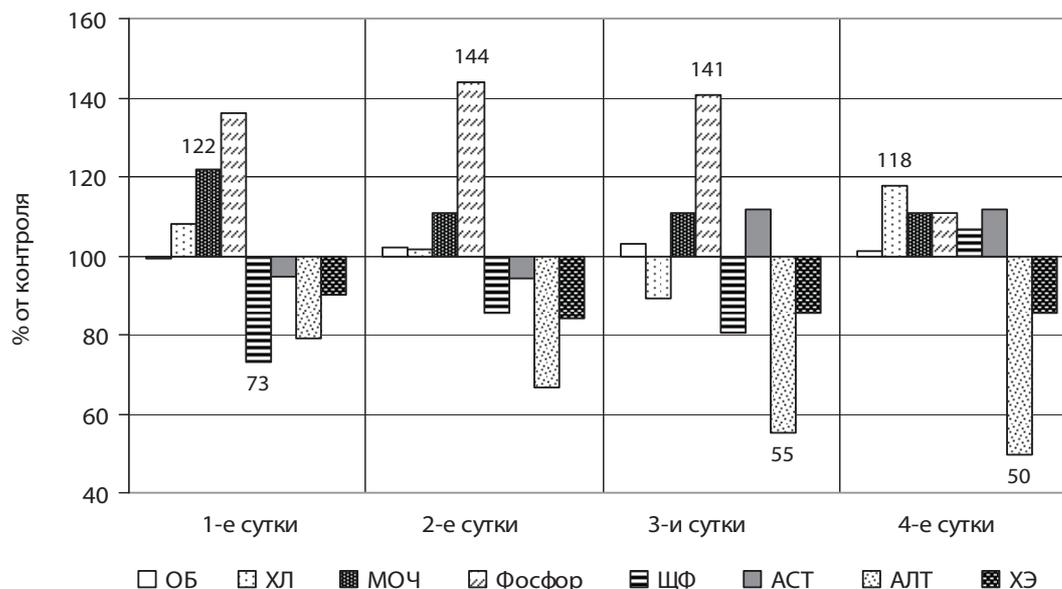


Рис. – Изменение активности ферментов и содержания субстратов в плазме крови в зависимости от времени после введения глифосата в дозе 50 мг/кг массы тела животного, % относительно контрольной гр.: о оси абсцисс – срок окончания эксперимента после введения глифосата в сутках. Цифрами указаны значения отклонений от нормы (в %) в случае достоверности ($P < 0,05$) различий

проявлялись в сдвиге равновесных состояний метаболизма в организме мышей и в снижении активности ряда ферментов печени.

Указанные изменения параметров крови обнаруживались спустя сутки после инъекции токсиканта и проявлялись на протяжении всего срока эксперимента. Выраженная реакция со стороны лимфоидного ростка белой крови при отсутствии реакции со стороны миелоидного свидетельствовали о том, что глифосат уже при однократном подкожном введении в малой дозе вызывал существенные сдвиги в системе гуморального иммунитета.

Таким образом, однократное воздействие малых доз глифосата вызывает у млекопитающих в течение первых суток инкорпорации определённые негативные изменения в обмене веществ и в функционировании физиологических механизмов.

Литература

1. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник. М.: «Медицина», 1987.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: «Высшая школа», 1973.

3. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л.: «Медицина», 1973.
4. Williams G.M., Kroes R., Munro I.C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2000. Apr. 31(2 Pt 1):117–165.
5. Backgrounder: Glyphosate and standard toxicology studies. 2002 [Электронный ресурс]. URL: http://www.monsanto.com/products/documents/glyphosate-background-materials/gly_tox101_bkg.pdf.
6. Bradberry S.M., Proudfoot A.T., Vale J.A. Glyphosate poisoning. //Toxicol. Rev. 2004; v. 23 No 3, P. 159–167.
7. Benachour N., Seralini G.-E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells // Chem. Res. Toxicol. 2009, v. 22, P. 97–105.
8. Pieniazek D., Bukowska B., Duda W. Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. // Pesticide Biochemistry and Physiology 2004, v. 79, No 2. P. 58–63.
9. Richard S., Moslemi S., Sipahutar H., Benachour N., and Seralini G.-E. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. // Environ Health Perspect. 2005 June; v. 113, No 6. P. 716–720.
10. Jasper R., Locatelli G.O., Pilati C., Locatelli C. Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup // Interdiscip Toxicol. 2012; v. 5, No 3, P. 133–140.