

## ТОКСИКОЛОГИЯ (профилактическая, клиническая, экологическая)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Мирошникова Д.И.<sup>1</sup>, Ракитский В.Н.<sup>2</sup>, Фомина М.А.<sup>3</sup>, Кирюшин В.А.<sup>1</sup>, Моталова Т.В.<sup>1</sup>

### Окислительное карбонилирование белков ткани печени под воздействием пестицида на основе глифосата в субхроническом эксперименте

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, 390026, Рязань, Россия;

<sup>2</sup>ФБУН «Федеральный научный центр гигиены имени Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Мытищи, Россия;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва, Россия

**Введение.** В настоящее время изучаются патогенетические механизмы действия на организм широко применяемых гербицидов на основе изопропиламинной соли (глифосата) и ведется поиск маркеров состояния здоровья, изменяющихся под воздействием этих веществ. В качестве маркеров окислительного стресса, вызванного гербицидным составом глифосата, могут использоваться карбонильные производные белков.

**Целью** данного исследования явилась оценка выраженности окислительного карбонилирования белков ткани печени под воздействием пестицида на основе глифосата в субхроническом эксперименте.

**Материал и методы.** Материалом для исследования явились субклеточные фракции гомогенатов ткани печени, полученные от 90 крыс Вистар, которым в течение 3 мес перорально вводили растворы глифосата в дозах 100 и 280 мг/кг. Выраженность окислительного карбонилирования белков определяли по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой.

**Результаты.** Получены статистически значимые изменения в содержании продуктов окислительного повреждения белков в субклеточных фракциях ткани печени на различных этапах эксперимента в группах исследования по сравнению с показателями контрольной группы.

**Заключение.** Изменения показателей карбонильного стресса и снижение значений показателя резервно-адаптационного потенциала свидетельствуют об истощении антиоксидантной защиты в клетках печени. Статистически значимое нарастание вторичных маркеров карбонильного стресса через 1 мес от начала затравки животных по сравнению с контролем при незначительном повышении этого показателя через 3 мес может свидетельствовать о запуске адаптационных механизмов, в том числе об индуцировании процессов протеолитической утилизации окисленных протеинов или дополнительного синтеза белка.

**Ключевые слова:** гербициды на основе глифосата; глифосат; окислительная модификация белков

**Для цитирования:** Мирошникова Д.И., Ракитский В.Н., Фомина М.А., Кирюшин В.А., Моталова Т.В. Окислительное карбонилирование белков ткани печени под воздействием пестицида на основе глифосата в субхроническом эксперименте. *Здравоохранение Российской Федерации*. 2020; 64(6): 351-357. <https://doi.org/10.46563/0044-197X-2020-64-6-351-357>

**Для корреспонденции:** Мирошникова Дарья Игоревна, аспирант кафедры профильных гигиенических дисциплин с курсом гигиены, эпидемиологии и организации госсанэпидслужбы ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, 390026, Рязань. E-mail: d.i.miroshnikova9@gmail.com

**Участие авторов:** Мирошникова Д.И., Фомина М.А. — концепция и дизайн исследования; Мирошникова Д.И., Фомина М.А. — сбор и обработка материала; Мирошникова Д.И. — статистическая обработка; Мирошникова Д.И., Ракитский В.А., Моталова Т.В. — написание текста; Ракитский В.А., Фомина М.А., Кирюшин В.А. — редактирование. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все авторы.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 30.04.2020

Принята в печать 12.05.2020

Опубликована 29.12.2020

Darya I. Miroshnikova<sup>1</sup>, Valerii N. Rakitskii<sup>2</sup>, Maria A. Fomina<sup>3</sup>, Valerii A. Kiryushin<sup>1</sup>, Tatiana V. Motalova<sup>1</sup>

### Oxidative carbonilation of liver tissue proteins under the influence of pesticide based on glyphosate in a subchronic experiment

<sup>1</sup>Ryazan State Medical University, Ryazan, 390026, Russia;

<sup>2</sup>F.F. Erisman Federal Scientific Center for Hygiene of the Federal Service for Supervision in Protection of the Rights of Consumer and Man Wellbeing, Mytishchi, 141014, Russia;

<sup>3</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, Russia

**Introduction.** Currently, the pathogenetic mechanisms of the action on the body of widely used glyphosate-based herbicides and the search for the markers of the health status that changes under the influence of these

herbicides remain open for study and discussion. Carbonyl derivatives of proteins can be used as the markers of oxidative stress caused by the herbicidal composition of the isopropylamine salt of glyphosate.

**The purpose of this study** was to assess the severity of oxidative carbonylation of liver tissue proteins under the influence of a glyphosate-based pesticide in a subchronic experiment.

**Material and methods.** The material for the study was subcellular fractions of liver tissue homogenates obtained from 90 Wistar rats, which were administered solutions of glyphosate isopropylamine salt at doses of 280 mg/kg and 100 mg/kg per os for 3 months. The severity of oxidative carbonylation of proteins was determined by the method of R.L. Levine modified by E.E. Dubinina.

**Results.** Statistically significant changes in the content of products of oxidative damage to proteins at various stages of the experiment in the study groups were obtained compared with the control group due to a significant increase in the products of oxidative damage to proteins in subcellular fractions of liver tissue.

**Conclusion.** The changes in carbonyl stress indices and the decrease in the reserve-adaptive potential indicate the depletion of antioxidant protection in the liver cells. A statistically significant increase in secondary markers of carbonyl stress after 1 month from the start of seeding of animals compared with the control with a slight increase in this index after 3 months may indicate the launch of adaptation mechanisms, including the induction of proteolytic utilization of oxidized proteins or additional protein synthesis.

**Keywords:** *glyphosate-based herbicides; glyphosate; oxidative modification of proteins*

**For citation:** Miroshnikova D.I., Rakitskii V.N., Fomina M.A., Kiryushin V.A., Motalova T.V. Oxidative carbonylation of liver tissue proteins under the influence of pesticide based on glyphosate in a subchronic experiment. *Zdravookhranenie Rossiiskoi Federatsii (Health Care of the Russian Federation)*. 2020; 64(6): 351-357. (In Russ.). <https://doi.org/10.46563/0044-197X-2020-64-6-351-357>

**For correspondence:** Darya I. Miroshnikova, MD, PhD-student of the Department of profile hygiene disciplines with a course of hygiene, epidemiology and organization of the state sanitary and epidemiological service, Ryazan State Medical University, Ryazan, 390026, Russia. E-mail: [d.i.miroshnikova9@gmail.com](mailto:d.i.miroshnikova9@gmail.com)

**Information about the authors:**

Miroshnikova D.I., <https://orcid.org/0000-0001-5648-6669>

Rakitskii V.N., <https://orcid.org/0000-0002-9959-6507>

Fomina M.A., <https://orcid.org/0000-0001-5550-0625>

Kiryushin V.A., <https://orcid.org/0000-0002-1258-9807>

Motalova T.V., <https://orcid.org/0000-0003-0316-5479>

**Contribution:** Miroshnikova D.I., Fomina M.A. — the concept and design of the research; Miroshnikova D.I., Fomina M.A. — collection and processing of material; Miroshnikova D.I. — statistical processing; Miroshnikova D.I., Rakitskii V.N., Motalova T.V. — writing the text; Rakitskii V.N., Fomina M.A., Kiryushin V.A. — editing. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article — all authors.

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

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

Received: April 30, 2020

Accepted: May 12, 2020

Published: December 29, 2020

## Введение

Вопрос о безопасности изопропиламинной соли (глифосата) и его коммерческих составов, применяемых как гербициды, остается спорным. Авторы некоторых обзоров приходят к выводу, что глифосат безопасен на уровнях ниже нормативно допустимых пределов [1–3]. Другие авторы утверждают, что длительное воздействие глифосата является причиной многих хронических заболеваний [4–8]. Обзоры, составленные независимыми исследователями на основе ряда экспериментальных данных, сообщают о токсических эффектах глифосата ниже нормативных пределов [9], а также о недостатках текущей оценки рисков, связанных с воздействием глифосата [10, 11].

Эффекты глифосата хорошо проявляются при оценке острой токсичности и нарастают со временем и в зависимости от дозы. Токсическое воздействие на печень крыс, изученное после введения глифосата в дозе 60 мг/кг массы тела в день в течение 2 лет в Европейском союзе, послужило основой для расчета приемлемого суточного потребления (0,3 мг/кг массы тела/сут) [12]. Тем не менее данные о рисках для здоровья, возникающих в результате воздействия глифосата при более низком, чем нормативно разрешенное, суточном потреблении, и допустимые уровни воздействия на человека в окружающей среде остаются предметом дискуссий [9]. Особенно интересным остается вопрос о роли глифосата в этиологии хронических заболеваний.

Изучается влияние глифосата на развитие дисбактериоза кишечника и его роль в ингибировании активности ферментов класса цитохрома P450 (CYP450) [4]. Утверж-

дение, что глифосат ингибирует детоксицирующую ферментную систему CYP450, основано на выводах исследований, проведенных на растениях или совместно с другими пестицидами. Однако даже если некоторые исследования показывают ингибирование CYP450 при высоких уровнях, соответствующих концентрациям сельскохозяйственного использования, они не имеют отношения к воздействию, которому обычно подвергаются люди (приблизительно 0,1–1,0 мкг/кг/сут) [9]. Наряду с этим представлены исследования на клеточных культурах, которые фактически показывают увеличение активности CYP450 [13]. Выявлено снижение уровня фермента CYP450 в печени крыс, подвергшихся воздействию препарата «Раундап» в питьевой воде при уровнях эквивалента глифосата, разрешенных для потребления человеком в США (0,7 мг/л) [14]. Исследователи пришли к выводу, что это снижение уровня CYP450 вызвано исключительно глифосатом, хотя «Раундап» содержит большой спектр вспомогательных адъювантов, которые сами по себе являются токсичными, из чего должно следовать, что коммерческие пестицидные составы являются более токсичными, чем один только указанный активный ингредиент [15–17].

Одним из проявлений токсического действия веществ традиционно считается развитие свободнорадикального окисления [18]. В настоящее время значимым маркером этого процесса являются окислительно модифицированные белки (ОМБ) [19].

**Цель работы:** оценить выраженность окислительного карбонилирования белков ткани печени лабораторных

животных под воздействием пестицида на основе глифосата в субхроническом токсикологическом эксперименте.

### Материал и методы

Объектом экспериментального исследования явились 90 конвенциональных крыс-самцов Вистар массой 160–180 г, из которых 30 вошли в группу контроля. Все эксперименты на животных выполнены в виварии ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России согласно Приказу МЗ РФ от 19.06.2003 № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Работа с животными проводилась согласно «Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985 г.) и приказу Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23.08.2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики».

Крысам через внутривенный зонд вводили растворы гербицида с содержанием 500 г/л глифосата. Заправка *per os* осуществлялась разово в утренние часы каждые 5 дней с двухдневным перерывом в течение 3 мес. Рабочие растворы готовили перед их непосредственным введением животным в дозах 100 и 280 мг/кг. Группы исследования были обозначены как Т1 ( $n = 30$ ) — животным вводили раствор в дозе 280 мг/кг, и Т2 ( $n = 30$ ) — доза составляла 100 мг/кг.

Животных из эксперимента выводили поэтапно: через 2 нед, 1 и 3 мес от начала заправки в утренние часы путем эктаназии ( $\text{CO}_2$ ); за 12 ч до этого их лишали корма. На каждом этапе выводили по 10 особей каждой группы. После извлечения печени готовили навески ткани с использованием электронных весов «ViBRA AJH-220 CE» («Shinko»). Гомогенизацию ткани печени осуществляли в холодном 0,25 М растворе сахарозы в соотношении 1 : 10 на гомогенизаторе «Potter S» («Sartorius»). Субклеточные фракции гомогенатов получали в ходе последовательного центрифугирования: 15 мин при 800 g для удаления не полностью разрушенных клеток и ядер, 15 мин при 14 000 g — для удаления митохондрий и 30 мин при 20 000 g — для осаждения лизосом.

Для оценки выраженности ОМБ измеряли уровень карбонильных производных в полученных фракциях гомогенатов по методу R.L. Levine [20] в модификации Е.Е. Дубининой в спонтанном и металл-индуцированном вариантах [21] с регистрацией продуктов реакции на спектрофотометре «СФ-2000» (Россия) в диапазонах поглощений динитрофенилгидразонов (ДНФГ) [22]. Концентрацию белка определяли по методу Лоури набором НПЦ «Эко-сервис» (Россия) [23].

Для анализа полученных результатов, выраженных в единицах оптической плотности (ед. опт. пл.) на 1 г белка, использовали способ комплексной оценки содержания продуктов ОМБ [24]. На основании значений площадей под кривой спектра поглощения карбонильных производных определяли их общее содержание ( $S_0$ ), содержание первичных маркеров — альдегидных форм ДНФГ ( $S_A$ ) и вторичных маркеров — кетонных форм ДНФГ ( $S_K$ ) и резервно-адаптационный потенциал (РАП, %) [25–27]. РАП рассчитывали как разницу между принятым за 100%  $S_0$  в металл-индуцированном варианте и процентной долей в нем значения  $S_0$  спонтанного окисления [25, 28].

Статистическую обработку осуществляли с использованием программы Statistica 10.0. С помощью  $W$ -критерия Шапиро–Уилка проводили проверку нормальности распределения полученных значений, а для оценки статистической значимости различий величин применяли  $U$ -критерий Манна–Уитни; результаты представляли с использованием медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей ( $Q_1$  и  $Q_3$ ). Для всех проведенных анализов принят уровень значимости  $p < 0,05$ , при котором различия считали статистически значимыми.

### Результаты

В группе Т1 формировалось статистически значимое повышение  $S_0$  в цитоплазматической фракции ткани печени за счет повышения содержания альдегид- и кето-ДНФГ [24], через 2 нед, 1 и 3 мес от начала эксперимента (табл. 1). При этом РАП статистически значимо снижался в группе Т1 на всех этапах эксперимента (рис. 1).

Подобная тенденция наблюдалась в группе Т2 на всех стадиях наблюдения после заправки в дозе 56 мг/кг на фоне статистически значимого снижения РАП, за исключением значения через 3 мес от начала заправки.

Выявлены статистически значимые отличия  $S_A$  и  $S_K$  в группе Т1 по сравнению с группой Т2 спустя 1 и 3 мес, что нашло отражение и в значимом отличии  $S_0$ .

Выраженные изменения содержания продуктов ОМБ в митохондриальной фракции ткани печени наблюдались в группе Т1 через 2 нед за счет значимого повышения  $S_A$  и  $S_K$ , чего не было в группе Т2 (табл. 2). В группе Т1 спустя 1 мес от начала заправки наблюдалось статистически значимое нарастание  $S_0$  на фоне снижения РАП за счет статистически значимого повышения содержания  $S_K$  (рис. 2). Через 3 мес от начала эксперимента в группе Т1 сохранялся уровень  $S_0$  на фоне снижения зна-

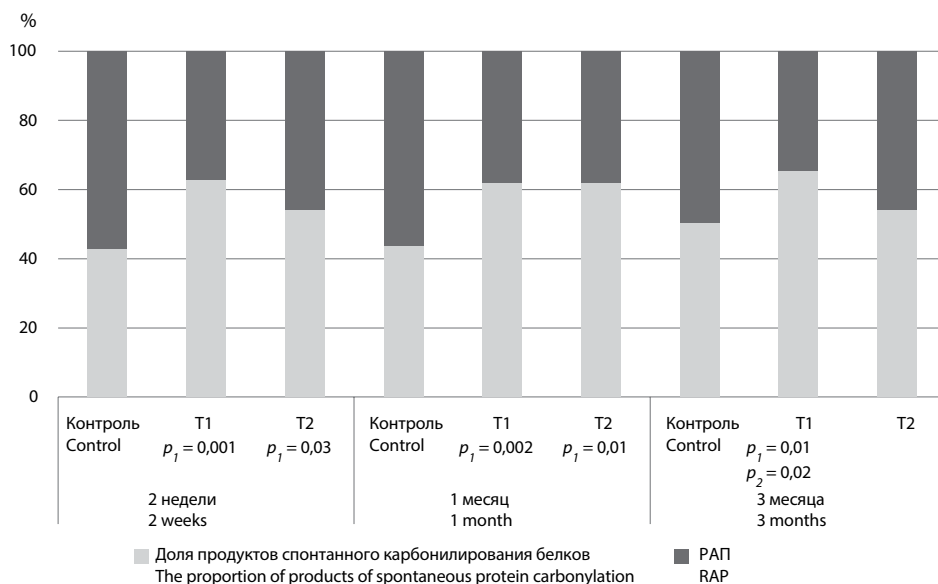


Рис. 1. Значения РАП в цитоплазматической фракции ткани печени, %.  $p_1$  — по сравнению с контрольной группой;  $p_2$  — с Т2.

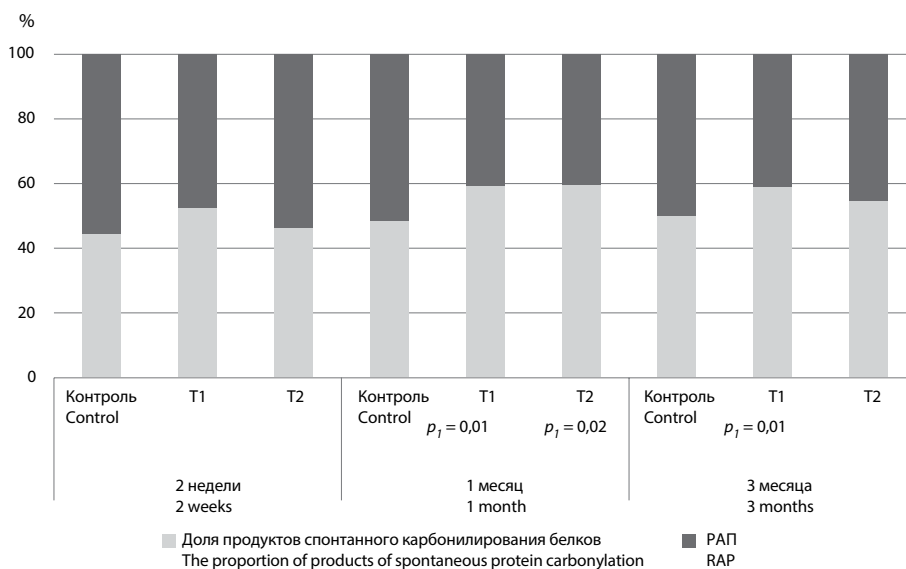
Fig. 1. Values of the reserve-adaptive potential index in liver cytoplasmic fraction, %.  $p_1$  in comparison with the control group,  $p_2$  — with T2.

**Таблица 1.** Результаты комплексной оценки ОМБ цитоплазматической фракции ткани печени (ед. опт. пл.) в экспериментальных и контрольных группах (Ме [Q1; Q3];  $n = 10$ )  
**Table 1.** The results of a comprehensive assessment of the oxidative modification of proteins of the cytoplasmic fraction of the liver tissue (optical-density units) in the experimental and control groups (Me [Q1; Q3];  $n = 10$ )

Срок исследования Time frames for the study	Показатель Index	Группа Group		
		Контроль Control	T1	T2
2 нед 2 weeks	$S_O$ Total S	2,99 [2,76; 3,68]	8,21 [6,9; 9,54] $p_1 = 0,0002$	6,76 [4,56; 8,41] $p_1 = 0,002$
	$S_A$ S of aldehyde forms of DNPH	2,42 [2; 2,64]	6,26 [5,01; 7,25] $p_1 = 0,0002$	5,1 [3,26; 6,54] $p_1 = 0,001$
	$S_K$ S of ketone forms of DNPH	0,85 [0,61; 1,05]	1,97 [1,84; 2,45] $p_1 = 0,0002$	1,56 [1,06; 1,98] $p_1 = 0,0300$
1 мес 1 month	$S_O$ Total S	2,99 [2,83; 3,56]	11,56 [10,22; 12,86] $p_1 = 0,0002$ $p_2 = 0,001$	6,2 [4,8; 7,4] $p_1 = 0,001$
	$S_A$ S of aldehyde forms of DNPH	2,4 [2,14; 2,78]	8,3 [6,98; 9,07] $p_1 = 0,0002$ $p_2 = 0,0004$	4,78 [3,53; 5,39] $p_1 = 0,002$
	$S_K$ S of ketone forms of DNPH	0,75 [0,49; 0,88]	3,16 [2,6; 4,03] $p_1 = 0,0002$ $p_2 = 0,0020$	1,57 [1,28; 1,96] $p_1 = 0,0002$
3 мес 3 months	$S_O$ Total S	3,67 [3,28; 4,08]	9,46 [6,33; 9,77] $p_1 = 0,0002$ $p_2 = 0,0300$	6,21 [4,44; 6,79] $p_1 = 0,0200$
	$S_A$ S of aldehyde forms of DNPH	2,67 [2,53; 3,06]	6,91 [4,94; 7,49] $p_1 = 0,0002$ $p_2 = 0,0100$	4,52 [3,22; 5,02] $p_1 = 0,0200$
	$S_K$ S of ketone forms of DNPH	0,96 [0,7; 1,05]	2,1 [1,23; 2,75] $p_1 = 0,0100$	1,63 [1,14; 1,99] $p_1 = 0,0050$

**Примечание.**  $p_1$  — по сравнению с контрольной группой;  $p_2$  — с T2.

**Note:**  $p_1$  in comparison with the control group,  $p_2$  — with T2.



**Рис. 2.** Значения РАП в митохондриальной фракции ткани печени, %.  
 $p_1$  — по сравнению с контрольной группой;  $p_2$  — с T2.

**Fig. 2.** Values of the reserve-adaptive potential index in liver mitochondrial fraction, %.  
 $p_1$  — statistically significant differences from the control group;  $p_2$  — statistically significant differences from study group 2 ( $p < 0.05$ ).

чения РАП за счет статистически значимых различий в содержании  $S_A$  по сравнению с контролем.

В группе T2 статистически значимое нарастание  $S_A$  и  $S_K$  наблюдалось только через 1 мес от начала эксперимента.

Следует отметить отличия в содержании ОМБ в митохондриальной фракции в группах T1 и T2 на всех этапах эксперимента ( $p < 0,05$ ), за исключением доли  $S_A$  через 1 мес.

Несмотря на наличие вышеописанных статистически значимых различий ОМБ в динамике эксперимента, значение РАП статистически значимо отлично от контроля только через 1 мес от начала введения животным меньшей дозы препарата.

## Обсуждение

Полученные статистически значимые изменения содержания ОМБ в цитоплазматической и митохондриальной фракциях ткани печени в группах исследования при введении двух доз растворов глифосата по сравнению с контрольными наблюдениями в сочетании со снижением значений показателя РАП свидетельствуют об уменьшении доли не подвергшихся окислению белков в исследуемом материале за счет интенсификации процессов окислительного карбонилирования белков.

Нарастание продуктов карбонилирования белков в цитоплазматической фракции двух групп в динамике эксперимента является признаком внутриклеточного окислительного повреждения. Подобная картина обнаружена и в митохондриях, но преимущественно в группе T1.

Выявленные изменения следует трактовать как проявление карбонильного стресса, возникшего под воздействием глифосата. В качестве основных индукторов данного процесса могут выступать активные формы кислорода, увеличение свободного железа, продукты перекисного окисления липидов. В свою очередь клетки млекопитающих наделены обширными антиоксидантными защитными механизмами, которые противодействуют разрушительному действию этих факторов [29].

Ранее при изучении воздействия гербицида «Раундап», действующим веществом которого является глифосат, на показатели окислительного стресса при пероральном введении препарата животным [30] выявлено статистически значимое повышение уровня малонового диальдегида в

**Таблица 2.** Результаты комплексной оценки состояния ОМБ митохондриальной фракции ткани печени (ед. опт. пл.) в экспериментальных и контрольных группах (Ме [Q1; Q3];  $n = 10$ )

**Table 2.** The results of a comprehensive assessment of the state of oxidative modification of proteins in the mitochondrial fraction of liver tissue (optical-density units) in the experimental and control groups (Me [Q1; Q3],  $n = 10$ )

Срок исследования Time frames for the study	Показатель Index	Группа Group		
		контроль control	T1	T2
2 нед 2 weeks	$S_O$ Total S	1,4 [1,17; 3,69]	5,5 [4,12; 6,3] $p_1 = 0,0300$ $p_2 = 0,0400$	2,03 [1,4; 4,54]
	$S_A$ S of aldehyde forms of DNPH	1,1 [0,89; 2,48]	3,58 [2,86; 4,45] $p_1 = 0,0400$	1,5 [1,06; 3,06]
	$S_K$ S of ketone forms of DNPH	0,34 [0,27; 1,14]	1,48 [1,29; 1,73] $p_1 = 0,0100$ $p_2 = 0,0100$	0,49 [0,34; 0,89]
1 мес 1 month	$S_O$ Total S	3,65 [3,16; 4,06]	4,6 [4; 5,06] $p_1 = 0,0100$	3,88 [3,01; 4,82]
	$S_A$ S of aldehyde forms of DNPH	2,81 [2,5; 2,98]	2,66 [2,48; 2,9]	2,12 [1,5; 2,71] $p_1 = 0,0400$
	$S_K$ S of ketone forms of DNPH	0,84 [0,7; 0,95]	2,06 [1,64; 2,3] $p_1 = 0,0002$	1,86 [1,47; 2,32] $p_1 = 0,0003$
3 мес 3 months	$S_O$ Total S	2,48 [2,4; 2,6]	3,74 [3,28; 3,98] $p_1 = 0,0010$ $p_1 = 0,0010$	2,37 [2,09; 2,65]
	$S_A$ S of aldehyde forms of DNPH	1,59 [1,45; 1,67]	2,62 [2,39; 2,74] $p_1 = 0,0010$	1,39 [1,33; 1,74]
	$S_K$ S of ketone forms of DNPH	0,9 [0,82; 0,96]	1,1 [0,92; 1,18]	0,93 [0,79; 0,98]

**Примечание.**  $p_1$  — по сравнению с контрольной группой;  $p_2$  — с T2.

**Note.**  $p_1$  — statistically significant differences from the control group;  $p_2$  — statistically significant differences from study group 2 ( $p < 0.05$ ).  $S_A$  — area under the curve of the absorption spectra of aldehyde-dinitrophenylhydrazones;  $S_K$  is the area under the curve of the absorption spectra of keto-dinitrophenylhydrazones,  $S_O$  is the total level of carbonyl derivatives of proteins.

крови при значимом снижении содержания глутатиона, супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы, а также статистически незначимом повышении уровня глутатионтрансферазы.

Известно, что малоновый диальдегид является конечным продуктом перекисного окисления липидов, поэтому его содержание может быть использовано для косвенной оценки степени, в которой липидные мембраны клеток атакованы свободными радикалами [31]. Глутатион — самый распространенный небелковый тиол в организме, отвечает за внутриклеточную защиту от реакционно-способных промежуточных продуктов метаболизма — активных форм кислорода и других свободных радикалов [32]. Он играет главную роль в противодействии окислительному действию ксенобиотиков, в том числе гербицидов. При снижении его концентрации до 20% от исходного уровня усиливаются процессы перекисного окисления

липидов [33, 34]. Снижение уровня глутатиона в крови, следовательно, может быть ответственным за усиление ПОЛ мембран клеток. Подобные выводы об усилении процессов перекисного окисления липидов и снижении концентрации глутатиона под действием глифосата обнаружены и в других исследованиях [35].

Супероксиддисмутазы считается первой и основной линией защиты от действия активных форм кислорода. Она превращает супероксидные радикалы в перекись водорода, которая разлагается каталазой до воды и кислорода. Супероксиддисмутазы и каталаза считаются основными антиоксидантными ферментами при окислительном стрессе, индуцированном ксенобиотиками. Прямое угнетение этих ферментов непосредственно глифосатом или в сочетании с другими токсикантами либо активное использование их из-за избытка образования свободных радикалов может быть причиной результирующего истощения антиоксидантных защитных сил. Следовательно, избыточное образование свободных радикалов может привести к снижению уровня супероксиддисмутазы, что, в свою очередь, отразится на активности каталазы.

Глутатионпероксидаза является селенсодержащим ферментом, который защищает биомембраны и другие клеточные компоненты от окислительного повреждения. Фермент катализирует восстановление различных органических соединений с использованием глутатиона [36].

Действие глутатионтрансферазы связывают с такими соединениями, как полициклические ароматические углеводороды, пестициды и др. [35, 37]. Каталитическая активность этого фермента помогает в выведении токсиканта из клеток и защищает ткани от окислительного стресса. Пониженный уровень глутатиона, как это наблюдается в исследовании воздействия гербицида «Раундап» на окислительные процессы в крови млекопитающих [30], предполагает снижение активности глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы.

Таким образом, можно утверждать, что угнетение ферментов, отвечающих за целостность клеточных мембран и протекание процессов детоксикации ксенобиотиков, сказывается на содержании индукторов окисления в различных субклеточных фракциях, вызывая обнаруженную в нашем исследовании интенсификацию процесса окислительного повреждения белков. При этом большая степень изменения показателей карбонильного стресса в цитоплазме клеток печени на всех этапах эксперимента в двух группах исследования может объясняться преимущественным истощением факторов антиоксидантной защиты в цитоплазме по сравнению с митохондриями, физиологически имеющими значительный антиоксидантный потенциал [38–41].

Данное предположение подтверждает выявленное статистически значимое нарастание уровня кето-ДНФГ по сравнению с контрольными значениями, что считается признаком глубоких окислительных повреждений [42].

Обнаруженное на этом фоне снижение значений показателя РАП также свидетельствует об истощении антиоксидантной защиты. Заслуживающим внимания является значимое нарастание уровня кето-ДНФГ через 1 мес от начала заправки животных по сравнению с контролем при незначительном повышении этого показателя через 3 мес. Это может свидетельствовать о запуске адаптационных механизмов, в том числе об индуцировании на данном этапе процессов протеолитической утилизации окисленных протеинов или дополнительного синтеза белка.

### Заключение

Установлены статистически значимые изменения содержания ОМБ в субклеточных фракциях ткани печени под влиянием глифосата.

Выявлено статистически значимое повышение уровня карбонильных производных по сравнению с контролем в цитоплазматической фракции на фоне статистически значимого снижения РАП на всех этапах субхронического эксперимента в группе Т1. В группе Т2 получены аналогичные результаты, за исключением значения РАП на этапе 3 мес, снижение которого оказалось статистически недостоверным.

Воздействие экспериментальных доз на процессы окисления в митохондриальной фракции нашло отражение в группе исследования Т1 через 2 нед за счет значимого повышения содержания первичных и вторичных маркеров окислительного карбонилирования белков, через 1 мес — за счет кето-ДНФГ, через 3 мес — за счет альдегид-ДНФГ, что сопровождалось значимым снижением РАП на этапах 1 и 3 мес. В группе Т2 статистически значимые изменения наблюдались при нарастании уровня продуктов карбонилирования стресса через 1 мес от начала заправки на фоне значимого снижения РАП.

### ЛИТЕРАТУРА

- Kier L.D., Kirkland D.J. Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. *Crit. Rev. Toxicol.* 2013; 43(4): 283–315. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.770820>
- Kier LD. Review of genotoxicity biomonitoring studies of glyphosate-based formulations. *Crit. Rev. Toxicol.* 2015; 45(3): 209–18. <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1010194>
- Mink P.J., Mandel J.S., Scourman B.K., Lundin J.I. Epidemiologic studies of glyphosate and cancer: a review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2012; 63(3): 440–52. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.05.012>
- Samsel A., Seneff S. Glyphosate's suppression of cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: pathways to modern diseases. *Entropy.* 2013; 15(4): 1416–63. <https://doi.org/10.3390/e15041416>
- Samsel A., Seneff S. Glyphosate, pathways to modern diseases II: celiac sprue and gluten intolerance. *Interdiscip. Toxicol.* 2013; 6(4): 159–84. <https://doi.org/10.2478/intox-2013-0026>
- Samsel A., Seneff S. Glyphosate, pathways to modern diseases III: manganese, neurological diseases, and associated pathologies. *Surg. Neurol. Int.* 2015; 6: 45. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.153876>
- Samsel A., Seneff S. Glyphosate, pathways to modern diseases IV: cancer and related pathologies. *J. Biol. Phys. Chem.* 2015; 15: 121–59. <https://doi.org/10.4024/11SA15R.jbpc.15.03>
- Samsel A., Seneff S. Glyphosate pathways to modern diseases V: amino acid analogue of glycine in diverse proteins. *J. Biol. Phys. Chem.* 2016; 16: 9–49. <https://doi.org/10.4024/03SA16A.jbpc.16.01>
- Mesnage R., Defarge N., Spiroux de Vendômois J., Séralini G.E. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem. Toxicol.* 2015; 84: 133–53. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>
- Myers J.P., Antoniou M.N., Blumberg B., Carroll L., Colborn T., Everett L.G., et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ. Health.* 2016; 15(1): 19. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>
- Vandenberg L.N., Blumberg B., Antoniou M.N., Benbrook C.M., Carroll L., Colborn T., et al. Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? *J. Epidemiol. Community Health.* 2017; 71(6): 613–8. <https://doi.org/10.1136/jech-2016-208463>
- Report No: 6511/VI/99-final. Health & Consumer Protection Directorate-General, Directorate E – Food Safety: Plant Health, Animal Health and Welfare, International Questions, E1 – Plant Health, Review Report for the Active Substance Glyphosate. European Commission; 2002.
- Gasnier C., Benachour N., Clair E., Travert C., Langlois F., Laurant C., et al. Dig1 protects against cell death provoked by glyphosate-based herbicides in human liver cell lines. *J. Occup. Med. Toxicol.* 2010; 5: 29. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-5-29>
- Larsen K., Najle R., Lifschitz A., Maté M.L., Lanusse C., Virkel G.L. Effects of sublethal exposure to a glyphosate-based herbicide formulation on metabolic activities of different xenobiotic-metabolizing enzymes in rats. *Int. J. Toxicol.* 2014; 33(4): 307–18. <https://doi.org/10.1177/1091581814540481>
- Mesnage R., Defarge N., Spiroux de Vendômois J., Séralini G.E. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *BioMed Res. Int.* 2014; 2014: 179691. <https://doi.org/10.1155/2014/179691>
- Mesnage R., Bernay B., Séralini G.E. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology.* 2013; 313(2–3): 122–8. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.006>
- Мирошникова Д.И., Киришин В.А., Моталова Т.В. Вопросы применения гербицидов на основе глифосата. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2018; 6(2): 318–25.
- Луцкий М.А., Куксова Т.В., Смелянец М.А., Лушникова Ю.П. Свободнорадикальное окисление липидов и белков – универсальный процесс жизнедеятельности организма. *Успехи современного естествознания.* 2014; (12): 24–8.
- Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Клюев Д.А., Бакенова Р.А., Култанов Б.Ж., Танкибаева Н.А. и др. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования. *Фундаментальные исследования.* 2010; (1): 74–8.
- Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 464–78. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-h)
- Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов Г.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения. *Вопросы медицинской химии.* 1995; 41(1): 24–6.
- Jones L.A., Holmes J.C., Seligman R.B. Spectrophotometric studies of some 2,4-dinitrophenylhydrazones. *Anal. Chem.* 1956; 28(2): 191–8.
- Lowry O.H., eds. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1): 265–75.
- Фомина М.А., Абаленихина Ю.В., Фомина Н.В., Терентьев А.А. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях. Патент RU № 2524667 С1; 2014.
- Ильичева А.С., Фомина М.А. Состояние окислительного карбонилирования белков мышечных тканей при выраженной гипергомоцистеинемии. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова.* 2015; 23(1): 45–51.
- Арапова А.И. Лизосомальный цистеиновый протеолиз мышечных тканей в условиях изменения синтеза оксида азота: Автореф. ... дисс. канд. мед. наук. Рязань; 2017.
- Абаленихина Ю.В., Фомина М.А. Окислительная модификация белков и активность катепсина Н тимочитов крыс в условиях in vitro модулирования синтеза оксида азота (II). *Казанский медицинский журнал.* 2014; 95(4): 553–7.
- Мирошникова Д.И., Киришин В.А., Прохоров Н.И., Фомина М.А., Моталова Т.В., Большаков А.М. Выраженность эндогенной интоксикации и окислительного стресса в крови работников, контактирующих с производными глицина. *Гигиена и санитария.* 2019; 98(8): 851–6. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-8>
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford Clarendon press; 1989: 188–276.
- Dar M.A., Sultana Mudasar, Mir A.H., Bhat M.A., Wani T.A., Haq Zulfqaru. Sub-acute oral toxicity of Roundup and ammonium nitrate with special reference to oxidative stress indices in wistar rats. *Indian J. Anim. Res.* 2018; 52(408): 405–8. <https://doi.org/10.18805/ijar.v0iOF.7826>
- Raina R., Verma P.K., Pankaj N.K., Vinay Kant. Ameliorative effect of  $\alpha$ -tocopherol on cypermethrin induced oxidative stress and lipid peroxidation in Wistar rats. *Int. J. Med. Sci.* 2009; 1(9): 396–9.
- Anderson M.E., Luo J.L. Glutathione therapy, from prodrugs to genes. *Semin. Liver Dis.* 1998; 18(4): 415–24. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1007174>
- Younes M., Seigers C.P. Mechanistic aspects of enhanced lipid peroxidation following glutathione depletion in vivo. *Chem. Biol. Interact.* 1981; 34(3): 257–66. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(81\)90098-3](https://doi.org/10.1016/0009-2797(81)90098-3)
- Park D.V., Piotrowski J.K. Glutathione. Its role in detoxification of reactive oxygen species and environment chemicals. *Toxicology.* 1996; 4: 1–13.
- Luschak O.V., Kubrak O.I., Storey J.M., Luschak V.I. Low toxic herbicide induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere.* 2009; 76(7): 932–7. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.045>
- Liu J., Luo G. Glutathione Peroxidase. In: Whitaker J.R., Voragen A.G.J., Wong D.W.S., ed. *Handbook of Food Enzymology. Volume I.* New York; 2003: 413–5.
- Ortiz-Ordóñez E., Uria-Galicia E., Ruiz-Picos R.A., Duran A.G.S., Trejo Y.H. Effect of yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity and histological damage in gills and liver of the freshwater fish

- Goodea atripinnis. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2011; 61(3): 443–52. <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9648-0>
38. Venditti P., Di Stefano L., Di Meo S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*. 2013; 13(2): 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.01.008>
39. Quinlan C.L., Treberg J.R., Brand M.D. Mechanisms of free radical production and their relationship to the aging process. In: *The Handbook of the Biology of Aging*. New-York: Academic Press; 2011: 45–59. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378638-8.00003-8>
40. Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S., Hoppel C.L., Lesnefsky E.J. Production of reactive oxygen species by mitochondria. Central role of Complex III. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(38): 36027–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.m304854200>
41. Murphy M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 2009; 417(1): 1–13. <https://doi.org/10.1042/bj20081386>
42. Губский Ю.И., Балан Г.М., Губский Ю.И., Беленичев И.Ф., Левинский Е.Л., Коваленко С.И. и др. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы). *Современные проблемы токсикологии*. 2005; 8(3): 20–7.
18. Lutskiy M.A., Kuksova T.V., Smelyanets M.A., Lushnikova Yu.P. Lipid and protein free-radical oxidation as a universal vital process of the organism. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2014; (12): 24–8. (in Russian)
19. Muravleva L.E., Molotov-Luchanskiy V.B., Klyuev D.A., Bakenov R.A., Kultanov B.Zh., Tankibaeva N.A., et al. Protein oxidative modification: problems and research prospects. *undamental'nye issledovaniya*. 2010; (1): 74–8. (in Russian)
20. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 464–78. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-h)
21. Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Khodov D.A., Porotov G.E. Oxidative modification of human serum proteins, method of its determination. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1995; 41(1): 24–6. (in Russian)
22. Jones L.A., Holmes J.C., Seligman R.B. Spectrophotometric studies of some 2,4-dinitrophenylhydrazones. *Anal. Chem.* 1956; 28(2): 191–8.
23. Lowry O.H., eds. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1): 265–75.
24. Fomina M.A., Abalenikhina Yu.V., Fomina N.V., Terent'ev A.A. Method of complex assessment of product content of oxidative modification of proteins in tissues and biological fluids. Patent RU № 2524667 S1; 2014. (in Russian)
25. Il'icheva A.S., Fomina M.A. Oxidative carbonylation of proteins in muscle tissues with pronounced hyperhomocysteinemia. *Rossiyskiy mediko-biologicheskiy vestnik imeni akademika I.P. Pavlova*. 2015; 23(1): 45–51. (in Russian)
26. Arapova A.I. *Lysosomal cysteine proteolysis of muscle tissue in the face of changes in the synthesis of nitric oxide*: Diss. Ryazan'; 2017. (in Russian)
27. Abalenikhina Yu.V., Fomina M.A. Protein oxidative modification and cathepsin h activity in rats' thymocytes at nitrogen oxide (II) synthesis modulation in vitro. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2014; 95(4): 553–7. (in Russian)
28. Miroshnikova D.I., Kiryushin V.A., Prokhorov N.I., Fomina M.A., Motalova T.V., Bol'shakov A.M. The severity of endogenous intoxication and oxidative stress in the blood of workers in contact with glycine derivatives. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2019; 98(8): 851–6. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-8> (in Russian)
29. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Clarendon press; 1989: 188–276.
30. Dar M.A., Sultana Mudasar, Mir A.H., Bhat M.A., Wani T.A., Haq Zulfqar. Sub-acute oral toxicity of Roundup and ammonium nitrate with special reference to oxidative stress indices in wistar rats. *Indian J. Anim. Res.* 2018; 52(408): 405–8. <https://doi.org/10.18805/ijar.v0i0F.7826>
31. Raina R., Verma P.K., Pankaj N.K., Vinay Kant. Ameliorative effect of  $\alpha$ -tocopherol on cypermethrin induced oxidative stress and lipid peroxidation in Wistar rats. *Int. J. Med. Sci.* 2009; 1(9): 396–9.
32. Anderson M.E., Luo J.L. Glutathione therapy, from prodrugs to genes. *Semin. Liver Dis.* 1998; 18(4): 415–24. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1007174>
33. Younes M., Seigers C.P. Mechanistic aspects of enhanced lipid peroxidation following glutathione depletion in vivo. *Chem. Biol. Interact.* 1981; 34(3): 257–66. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(81\)90098-3](https://doi.org/10.1016/0009-2797(81)90098-3)
34. Park D.V., Piotrowski J.K. Glutathione. Its role in detoxification of reactive oxygen species and environment chemicals. *Toxicology*. 1996; 4: 1–13.
35. Luschak O.V., Kubrak O.L., Storey J.M., Luschak V.I. Low toxic herbicide induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*. 2009; 76(7): 932–7. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.045>
36. Liu J., Luo G. Glutathione Peroxidase. In: Whitaker J.R., Voragen A.G.J., Wong D.W.S., ed. *Handbook of Food Enzymology. Volume I*. New York; 2003: 413–5.
37. Ortiz-Ordóñez E., Uria-Galicia E., Ruiz-Picos R.A., Duran A.G.S., Trejo Y.H. Effect of yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity and histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2011; 61(3): 443–52. <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9648-0>
38. Venditti P., Di Stefano L., Di Meo S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*. 2013; 13(2): 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.01.008>
39. Quinlan C.L., Treberg J.R., Brand M.D. Mechanisms of free radical production and their relationship to the aging process. In: *The Handbook of the Biology of Aging*. New-York: Academic Press; 2011: 45–59. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378638-8.00003-8>
40. Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S., Hoppel C.L., Lesnefsky E.J. Production of reactive oxygen species by mitochondria. Central role of Complex III. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(38): 36027–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.m304854200>
41. Murphy M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 2009; 417(1): 1–13. <https://doi.org/10.1042/bj20081386>
42. Gubskiy Yu.I., Balan G.M., Gubskiy Yu.I., Belenichev I.F., Levitskiy E.L., Kovalenko S.I., et al. Toxicological consequences of oxidative modification of proteins in various pathological conditions (literature review). *Sovremennyye problemy toksikologii*. 2005; 8(3): 20–7. (in Russian)

## REFERENCES