

АННОТАЦИЯ

исследовательской работы на соискание степени
доктора философии (PhD) по образовательной программе «8D05104 - Генетика»
Гаршина Александра Андреевича

на тему: «Влияние воздействия хлорорганических пестицидов на генетический статус населения в Алматинской области»

Общая характеристика работы

Исследовательская работа посвящена изучению влияния пестицидного загрязнения на генетический статус и здоровье людей, проживающих в Алматинской области, длительное время подвергающихся воздействию пестицидного загрязнения.

Актуальность темы исследования

По результатам мониторинга 2011 года на территории области было обнаружено 64 заброшенных склада пестицидов, приблизительная оценка содержания бесхозных стойких органических загрязнителей (СОЗ) составила 6931,4 тонны). В связи с частной приватизацией земель осталась неизвестной информация о неутилизированных пестицидах, которые в течении 10 лет разлагались в почве, загрязняли растения и животных и могли влиять на население, проживающего на этих территориях.

Токсическое влияние этих пестицидов и продуктов их распада на здоровье человека давно подтверждено, и их использование запрещено. Опасность пестицидов также увеличивается, поскольку изначально нетоксичные соединения разлагаются в почве и образуют стойкие и токсичные метаболиты, которые затем могут накапливаться в пищевых продуктах. Принятые методы оценки рисков пестицидного загрязнения способны рассчитывать степень опасности для человека. Однако, поскольку эти методы используют среднестатистические данные по региону, а нормы потребления и индивидуальные особенности у каждого человека различны, для более полной оценки риска воздействия пестицидов возникла необходимость предложить другой подход, с учетом широкого спектра индивидуальных характеристик человека.

Цель исследования – оценить риск долговременного воздействия пестицидов на когортном и индивидуальном уровнях у жителей поселков Алматинской области Казахстана.

Задачи исследования:

1. Цитогенетический анализ населения, проживающего на загрязненных пестицидами территориях, сел Кызылкайрат, Бескайнар, Белбулак, Амангельды, Енбекши, Каракестек и Умбеталы.

2. Молекулярно-генетический анализ популяций человека на наличие полиморфизмов генов детоксикации ксенобиотиков (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1* и др.), репарации ДНК (*XRCC1*, *XRCC3*, *XPB* и др.) и антиоксидантной защиты (*SOD1*, *GCLC*, *GCLM*, *GPX4*, *NFE2L3* и др.).

3. Когортный анализ риска загрязнения пищевых продуктов для исследуемых деревень.

4. Корреляционный анализ для изучения влияния пестицидов на здоровье и генетический статус населения.

5. Разработка метода индивидуальной оценки риска длительного загрязнения окружающей среды пестицидами для генетического статуса населения и здоровья человека.

Объект исследования: Смешанная популяция людей Алматинской области (249 человек), длительное время подвергавшаяся воздействию хлорорганических пестицидов, проживая в селах Кызылкайнар, Бельбулак, Бескайнар, Амангельды, Енбекши, Каракестек, Умбетали. Для контрольной группы была отобрана когорта из 343 человека из территорий, не загрязненных пестицидами.

Предмет исследования: Генотоксический и токсический эффект длительного воздействия пестицидного загрязнения пищевой цепи человека.

Методы исследования: Выделение ДНК, полимеразная цепная реакция, гель-электрофорез, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, культивирование лимфоцитов периферической крови человека, анализ кариограммы рутинным методом, полногеномное микрочиповое генотипирование, биоинформатический анализ, ранговая корреляция Спирмена, анкетирование методом персонального опроса, метод расчета суточного потребления (EDI) для когортного анализа рисков, метод множественной регрессии для индивидуальных рисков.

Научная новизна исследования

Известно, что воздействие пестицидов связано с многочисленными вредными последствиями, наиболее частыми из которых являются нарушения репродуктивной функции и канцерогенез, реже проявления нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний и даже генетические повреждения и индукция хромосомных изменений.

В нескольких популяциях были выявлены хромосомные повреждения, связанные с воздействием пестицидов. Некоторые исследователи заметили значительные различия в частоте хромосомных aberrаций у исследуемых когорт по сравнению с контрольной группой, однако другие исследования не подтвердили такую связь. Эти противоречия могут быть связаны с тем, что нестабильные хромосомные aberrации устраняются в процессе пролиферации клеток. Мутагенное действие пестицидов, измеряемое по частоте нестабильных хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови, можно обнаружить только через 2–3 месяца после воздействия пестицидов, до деления клеток. Мы полагаем, что в некоторых случаях цитогенетического анализа популяций, хронически подвергавшихся воздействию пестицидов, исследователи не могли учесть разницу во времени между датой индивидуального потребления пестицидов и временем забора крови. Следовательно, уровень нестабильных хромосомных aberrаций не может использоваться в качестве надежного показателя риска для здоровья.

На мутагенное действие пестицидов также может влиять экспрессия ряда генов, регулирующих метаболизм токсикантов и репарацию ДНК. Исследования выявляют значимые ассоциации мутаций и полиморфизмов генов, участвующих в репарации ДНК, детоксикации ксенобиотиков и антиоксидантной защите, с развитием ряда мультифакториальных заболеваний. Генетический полиморфизм этих генов может влиять на восприимчивость к воздействию пестицидов и служить детерминантой их токсичности. Генетический статус этих генов следует учитывать при оценке токсического воздействия пестицидов на группы населения, подвергающиеся в течение длительных периодов времени воздействию пестицидов из окружающей среды.

Принятые методы расчета рисков позволяют теоретически оценить краткосрочные и долгосрочные риски для здоровья населения, подвергшегося воздействию пестицидов, а также определить наиболее опасные группы пестицидов, однако они не учитывают индивидуальные переменные каждого человека, а оценивают только средние значения массы тела и потребления пищи среди населения. Поскольку нормы потребления и индивидуальные характеристики у каждого человека различны, для оценки риска воздействия пестицидов было важно оценить вклад наследственных факторов и факторов окружающей среды, а также пищевых привычек.

В данной работе впервые для молекулярно-эпидемиологического исследования когорты людей, длительное время подвергавшихся воздействию токсических веществ, была реализована индивидуальная оценка рисков воздействия пестицидов на здоровье и генетический статус. Данная оценка включает в себя множество факторов, выявленных в ходе опроса исследуемой группы.

Научная и практическая значимость

Результаты исследования предлагают методику более детального анализа потенциальных медицинских и генетических рисков загрязнения пестицидами для

населения на основе индивидуальных физиологических особенностей и образа жизни, включающих возраст, пол, вес, курение, употребление алкоголя и т. д.

Результаты исследования могут помочь усовершенствовать существующую методологию оценки риска различных загрязнителей с возможным учетом широкого спектра индивидуальных характеристик, оценкой угрозы токсикантов для здоровья и генетического статуса человека и выделением наиболее уязвимых групп населения.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Установлено, что уровень хромосомных aberrаций в изучаемых селах в селах Бельбулак ($3,00 \pm 0,33\%$), Кызылкайрат ($2,84 \pm 0,37\%$), Бескайнар ($1,88 \pm 0,23$), Амангельды ($1,96 \pm 0,27$), Каракастек ($1,56 \pm 0,25$), Енбекши ($3,04 \pm 0,33\%$) и Умбеталы ($1,60 \pm 0,25$) достоверно выше ($p < 0,0001$), чем в контрольном селе Таукаратурык ($0,85 \pm 0,12\%$). Природа хромосомных aberrаций указывает на химическую природу мутагенного воздействия.

2. Показано повышение частоты мутантных аллелей для генов *XRCCI Arg399Gln* (rs25487), *SOD1* (rs1041740, rs138002121), *CYP1A1* (rs17861084), *CYP2B6* (rs8192718), *CYP2D6* (rs186133763), *GSTP1* (rs1138272) и *GCLC* (rs12524550) в сравнении со средними значениями для населения столь же смешанного этнического происхождения. Частота редкого аллеля гена *GSTP1* (rs1871042) для исследуемой выборки также превышала средний показатель по популяции.

3. Определены краткосрочные и долгосрочные риски для здоровья обследуемых когорт, проживающих на территориях, загрязненных хлорорганическими пестицидами. Установлено, что наибольший риск связан с употреблением груш, огурцов, болгарского перца, молока и мяса, о чем свидетельствует высокое содержание пестицидов группы альдрин, эндосульфана и гептахлора и характеризуются высоким индексом опасности (индекс опасности от 3 до 20 и выше).

4. Корреляционный анализ, проведенный на основании данных о содержании пестицидов в продуктах питания, показал связь между частотой хромосомных aberrаций и содержанием пестицидов в продуктах питания. Анализ выявил потенциально опасные группы пестицидов в загрязненной продукции. По всем группам изученных пестицидов из продуктов растительного происхождения наиболее сильная прямая зависимость между частотой aberrаций и накоплением пестицидов характерно для груш, томатов и огурцов. Коэффициент корреляции превышал 0,9. Для продуктов животного происхождения такая зависимость наблюдалась только в образцах мяса (группа ДДТ и эндосульфана - $r = 0,84$ и группа альдрин $r = -0,89$; $r = -0,99$). Для яблок сильная корреляционная зависимость между частотой хромосомных aberrаций и накоплением пестицидов обнаружена в группе альдрин ($r = -0,94$) и умеренно значимая по группе ДДТ ($r = -0,69$). В образцах молока сильная корреляционная зависимость обнаружена в группе гексахлорбензена ($r = -0,99$).

5. Оценка отдельных индивидуальных показателей формулы индивидуальной оценки риска здоровью выявила, что наиболее значимыми факторами, оказывающими влияние на состояние здоровья являются избыток пестицидов в продуктах питания (33%, коэффициент влияния = 0,8601) и состояние системы детоксикации ксенобиотиков (26%, коэффициент влияния = 0,5485). Факторами, влияющими на риск мутаций, были уровень загрязнения пищевых продуктов пестицидами (29%, коэффициент влияния = 0,8569), курение (26%, коэффициент влияния = 0,9268) и функциональное состояние системы репарации ДНК (24%, коэффициент влияния = 1,1351).

Основные результаты исследований и выводы

1. Проведен цитогенетический анализ для 191 человека, из них 141 из пяти поселков Талгарского района (поселки поселки Бескайнар, Кызылкайрат, Амангельды, Бельбулак, Енбекши), и 50 из поселков Джамбылского района (поселки Каракастек и Умбеталы). Еще 50 человек из поселка Таукаратурык были взяты в качестве контроля. Показано достоверное превышение частот aberrаций в исследуемых населенных пунктах по сравнению с контролем. Для всех поселков характерно преобладание мутаций

хроматидного типа, что свидетельствует в пользу химической природы мутагенного воздействия.

2. В общей когорте изученные частоты аллелей генов, участвующих в биотрансформации хлорорганических пестицидов, находились на ожидаемых уровнях, характеризующих смешанные азиатско-европейские популяции. Повышенные частоты мутантных аллелей наблюдались для *XRCC1* Arg399Gln (rs25487), *SOD1* (rs1041740, rs138002121), *CYP1A1* (rs17861084), *CYP2B6* (rs8192718), *CYP2D6* (rs186133763), *GSTP1* (rs1138272), и *GCLC* (rs12524550) по сравнению со средними значениями для населения одинаково смешанного этнического происхождения. Частота редкого аллеля гена *GSTP1* (rs1871042) для исследуемой выборки также незначительно превышала средний показатель по популяции. Частота полиморфного варианта *GCLC* (rs524553) была ниже среднепопуляционной. Молекулярно-генетический анализ выявил повышенную частоту нефункциональных аллелей глутатион-S-трансфераз M1 и T1, что может оказывать влияние на снижение детоксикационных функций генов и состояние здоровья в обследуемой популяции.

3. В ходе персонального анкетирования был подробно опрошен 151 человек, каждый из которых проживал в непосредственной близости от складов пестицидов. От каждого из респондентов были получены данные об индивидуальных особенностях питания (количество и тип потребляемой в день пищи), а также информация о хронических заболеваниях, вредных привычках и источниках поступления продуктов питания. По данным исследования, пищевые привычки населения различаются в зависимости от деревни, что может затруднить расчет реальных рисков при использовании известных средних значений. Медицинский статус лиц оценивался с помощью как клинического осмотра, так и анкетирования. Преобладали сердечно-сосудистые заболевания (гипертония, ишемия, атеросклероз и др.) (38 человек, 25,17%). На втором месте по распространенности оказались хронические заболевания органов дыхания, выявленные у 10 респондентов (6,62%). У пяти человек в анамнезе были онкологические заболевания (3,31%), зарегистрированы единичные случаи заболеваний почек, щитовидной железы и сахарного диабета, а у девятнадцати человек (12,58%) были различные общие жалобы на здоровье.

4. Корреляционный анализ показал, что высокая частота хромосомных aberrаций (ХА) в лимфоцитах человека достоверно коррелирует с содержанием пестицидов группы ДДТ в яблоках, грушах, огурцах, помидорах и мясе. Пестициды группы гексахлорбензола показали высокую ассоциацию с индукцией ХА у населения, потребляющего яблоки, груши, томаты, огурцы, мясо и молоко. Пестицидов группы ГХГЦ в пищевых продуктах выявило корреляцию с индукцией ХА в лимфоцитах человека для яблок, груш, огурцов, помидоров, и болгарского перца. Установлена достоверная корреляция увеличения частоты ХА с содержанием пестицидов альдриновой группы в яблоках, грушах, помидорах, огурцах, мясе и в молоке. Содержание пестицидов эндосульфановой группы в пищевых продуктах выявило корреляцию с частотой ХА лимфоцитов человека для груш, огурцов, томатов и болгарского перца, а так же мяса из села Бескайнар. Наличие пестицидов группы гептахлора в пищевых продуктах выявило корреляцию с индукцией ХА в лимфоцитах человека для груш, яблок, помидоров и огурцов. По продуктам животного происхождения значимая умеренная корреляция группы гептахлора наблюдалась только для мяса из Амангельды и Кызылкайрата. Эти данные подчеркивают потенциальные связи между потреблением конкретных продуктов питания и присутствием определенных групп пестицидов, способствуя лучшему пониманию факторов, влияющих на хромосомные aberrации у исследуемой популяции.

5. Когортный анализ краткосрочных (острой реакции) и долгосрочных (хронических последствий) рисков установил, что наибольший риск связан с употреблением груш, огурцов, болгарского перца, молока и мяса, поскольку в этих продуктах обнаружено недопустимо высокое содержание пестицидов группы альдрин (НҚ > 20%, НІ > 20), эндосульфана (НҚ = 4%; НІ = 3-15) и гептахлора (НҚ = 4%; НІ = 3-15). В селе Енбекши

коэффициент опасности превышает 20%, особенно в болгарском перце и молоке, что указывает на высокий долгосрочный риск воздействия пестицидов.

6. Предложен вариант расчета индивидуальных показателей оценки риска с учетом широкого спектра его индивидуальных характеристик, включая расчет степени превышения фактического суточного потребления (EDI) по сравнению с допустимым суточным потреблением (ADI) конкретного типа пестицидов для каждого индивида. Оценка отдельных индивидуальных показателей формулы индивидуальной оценки риска для здоровья выявила, что наиболее влиятельными факторами на состояние здоровья являются избыток пестицидов в продуктах питания (коэффициент влияния = 0,8601) и состояние системы детоксикации ксенобиотиков (коэффициент влияния = 0,5485). Т-тест подтверждает значимость избытка как пестицидов, так и тяжелых металлов при расчете рисков для здоровья ($T_3 = 2,562 (>2,263)$, $T_4 = 2,962 (>2,263)$). Наиболее значимыми факторами, влияющими на риск мутации, были уровень загрязнения пищевых продуктов пестицидами (коэффициент влияния = 0,8569), курение (коэффициент влияния = 0,9268) и функциональное состояние системы репарации ДНК (коэффициент влияния = 1,1351). Однако достоверность состояния фактора генов репарации ДНК не подтверждена ($T_5 = 1,905 (<2,693)$), тогда как фактор загрязнения пестицидами подтвержден ($T_2 = 3,028 (>2,693)$).

Личный вклад автора

Автор непосредственно участвовал на всех этапах исследования: формирование цели и задач, разработка проекта, сбор биоматериала, выделение ДНК, проведение индивидуального опроса населения, определение однонуклеотидных полиморфизмов, формирование базы данных, статистическая обработка данных, интерпретация полученных результатов и формулирование выводов, разработка метода индивидуальной оценки рисков, концептуализация, подготовка и написание научных статей и тезисов в отечественных и зарубежных изданиях.

Связь с планом основных научных работ

Исследование выполнено в рамках проектов BR05236379 “Комплексная оценка воздействия неутраченных и запрещенных к использованию пестицидов на генетический статус и здоровье населения Алматинской области” и AP09260631 “Изучение полиморфизма генов антиоксидантной защиты и иммунного ответа у людей длительное время подвергавшихся пестицидному загрязнению”.

Апробация работы

Результаты исследования были представлены на научных конференциях:

1. The 46th FEBS Congress “The Biochemistry Global Summit” (Лиссабон, Португалия, 9-14 июля 2022 г.)
2. The 47th FEBS Congress “Together in bioscience for a better future” (Тур, Франция, 8-12 июля 2023 г.)
3. BIO Web of Conferences “International Scientific Forum “Modern Trends in Sustainable Development of Biological Sciences” (Алматы, Казахстан, 27-28 марта 2024 г.)

Основные результаты исследования ежегодно представлялись на научных семинарах лаборатории молекулярной генетики Института генетики и физиологии (ИГФ), а также представлены на межлабораторном семинаре Института генетики и физиологии. Результаты диссертационной работы включены в ежегодные отчеты о НИР по проекту ПЦФ BR05236379 (2018–2020 гг.) и грантовому проекту AP09260631 (2021–2023 гг.)

Публикации

По теме исследования опубликовано 10 научных работ, в том числе: 3 статьи в научных изданиях, входящих в 1-2 квартили по импакт-фактору в базе Web of Science; 3 статьи в отечественных журналах, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования, 3 тезиса для международных конференций, и 1 методическое пособие.