

УДК 597.585.1.024.3:597–111.1

**Изменение ультраструктуры иммунокомпетентных  
клеток в почках, селезёнке и печени головешки-ротана  
*Perccottus glenii* под влиянием пестицида Раундап**

Е.А.Заботкина, В.К.Голованов, И.Л.Голованова

Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН  
(ФГБУН «ИБВВ им. И.Д.Папанина», п. Борок)  
E-mail: zabel@ibiw.yaroslavl.ru

Раундап (Roundup) является одним из наиболее широко применяемых в мире, в том числе в России, системных неселективных гербицидов. Действующим веществом в составе пестицида является глифосат (N-(фосфометил)-глицин,  $C_3H_8NO_5P$ ), который долгое время считали малотоксичным для животных гербицидом. В 2015 году глифосат отнесли к потенциально опасным канцерогенам. Выявлено, что у рыб Раундап вызывает повреждение митохондрий в клетках жабр, печени, почек, оксидативный стресс в тканях, гиалиновую дистрофию почек, повреждение генетического аппарата клеток, в том числе половых, увеличение уровня гематокрита, количества клеток красной и белой крови. Методом электронной микроскопии впервые исследовано действие сублетальной концентрации Раундапа (2 мкг/л) в течение 30 сут на ультраструктуру лейкоцитов иммунокомпетентных органов (почки, селезёнки и печени) молоди головешки-ротана — вида-вселенца в водоёмы бассейна Верхней Волги. Показано, что хроническое 30-и сут действие Раундапа в сублетальной концентрации 2 мкг/л, как и при остром действии больших концентраций, вызывает повреждение структуры митохондрий и накопление гранул гликогена в цитоплазме гранулоцитов. Впервые выявлено, что изменение количества и размеров специфических гранул в гранулоцитах (нейтрофилах и эозинофилах) происходит одновременно с появлением фагосом в цитоплазме клеток, что свидетельствует об усилении реакций неспецифического иммунитета. Расширение каналов шероховатого эндоплазматического ретикулума в плазматических клетках почек и селезёнки свидетельствует об усилении синтетической активности плазматических клеток.

**Ключевые слова:** Раундап, структура иммунокомпетентных клеток, головешка-ротан *Perccottus glenii*, почки, селезёнка, печень.

#### ВВЕДЕНИЕ

Раундап (Roundup) является одним из наиболее широко применяемых в мире, в т.ч. в России, системных неселективных гербицидов. В дозе 2–4 л/га он рекомендован для уничтожения однолетних и многолетних двудольных и злаковых сорняков зерновых и бахчевых культур, картофеля, сои и др., особенно генно-модифицированных растений (пшени-

цы, кукурузы, сахарной свёклы, сои и рапса) [Спиридонов и др., 2010]. В дозах 8–10 л/га пестицид применяется для уничтожения растительности оросительных каналов [Брежнев, 2004]. Действующим веществом в составе пестицида, который в России известен под торговыми названиями «Раундап», «Глифор», «Торнадо» и «Ураган», является глифосат (N-(фосфометил)-глицин,  $C_3H_8NO_5P$ ) [Бреж-

нев, 2004]. Период полураспада глифосата в почве составляет от 6 до 90 сут, в воде — 7–14 сут, в донных отложениях водоемов — до 120 сут [Giesy et al., 2000]. Токсическое действие глифосата обусловлено ингибированием 5-еноилпирувил-шикимат-3-фосфат-синтазы (EPSPS[2], КФ 2.5.1.19) растений, которая является компонентом шихиматного пути биосинтеза бензоидных ароматических соединений — предшественников трёх ароматических протеиногенных аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана), пара-аминобензоата, терпеноидных хинонов (убихинона, пластохинона, филлохинона), ряда других важных метаболитов, лигнинов и др. [Ефремов, Быкова, 2004]. Глифосат занимает в активном центре фермента место фосфоенолпирувата и блокирует его активность [Брежнев, 2004]. Животные не имеют ферментной системы шихиматного пути и получают эти аминокислоты и прочие компоненты с пищей. Долгое время глифосат считали малотоксичным для животных гербицидом, что подтверждается его высокой полуметальной дозой (LD50) — более 5000 мг/кг веса при внутреннем употреблении в экспериментах на крысах, более 10000 мг/кг для мышей и 3530 мг/кг для коз [Брежнев, 2004]. Для гидробионтов указанные дозы значительно ниже — для рыб значения LD<sub>50</sub>(96ч) варьируют от 2 до 55 мг/л в зависимости от вида, стадии жизненного цикла и условий эксперимента [Giesy et al., 2000; Голованова и др., 2011].

В марте 2015 г. Международное агентство по изучению рака Всемирной организации здравоохранения, основываясь на эпидемиологических исследованиях и исследованиях на животных и клеточной ткани, обнародовало заключение, что глифосат является «возможным канцерогеном для человека» (категория опасности «2А»). Имеются свидетельства о его канцерогенности в отношении неходжкинской лимфомы человека, а также возникновения рака лабораторных крыс и мышей [Hardell et al., 2002; IARC Monograf, 2015].

У рыб Раундап и его действующее вещество — глифосат — вызывают повреждение митохондрий в клетках жабр, печени, почек, нарушение процессов окислительного фосфо-

рилирования, оксидативный стресс в тканях, гиалиновую дистрофию почек, повреждение генетического аппарата клеток, в т. ч. половых, увеличение уровня гематокрита, количества клеток красной и белой крови [Peixoto, 2005; Modesto et al., 2010; Narayashiki et al., 2013; Moreno et al., 2014; Braz-Mota et al., 2015].

Головешка-ротан является видом-вселенцем для водоёмов бассейна Верхней Волги. Его природный ареал расположен на Дальнем Востоке, в Китае и Северной Корее. Головешка-ротан быстро адаптируется к действию природных и антропогенных факторов, угнетает популяции аборигенных видов рыб. По температурным характеристикам (окончательно избираемой и верхней летальной температуре) он относится к наиболее теплолюбивым видам рыб, обитающим в пресных водоёмах России [Голованов, 2013]. Сведения о действии Раундапа на тонкую структуру лейкоцитов иммунокомпетентных органов головешки-ротана отсутствуют.

Цель работы — изучить хроническое действие сублетальной концентрации гербицида Раундап на тонкую структуру клеток лимфомиелоидной ткани иммунокомпетентных органов молоди головешки-ротана.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКИ

Объект исследования — молодь головешки-ротана *Percottus glenii* Dybowski, 1877 (масса  $3,1 \pm 0,2$  г, длина тела  $5,4 \pm 0,1$  см), отловленная в конце сентября в одном из прудов Ярославской области (Россия) при температуре воды 16 °С. Перед экспериментом рыб содержали в 200 л стеклянных аквариумах с дехлорированной водопроводной водой при постоянной аэрации и температуре воды  $15,5 \pm 1,0$  °С (рН 7,5–7,6, содержание кислорода 8,0–9,7 мг/л) при естественном фотопериоде в течение 1 мес. В период акклимации рыб кормили 1 раз в сутки личинками хирономид *Chironomus* sp. из расчёта 4% от общей массы тела.

После периода акклимации рыбы были распределены в четыре 135 л стеклянных аквариума по 25 экз. в каждом. Параметры качества воды во время эксперимента были аналогичны параметрам в период акклимации. Рыб контрольной группы поместили в 2 аквариума без добавления гербицида, рыб опытной группы — в 2 аквариума с водой, содержащей Ра-

ундап в концентрации 2 мкг/л (по глифосату). В работе использован коммерческий препарат гербицида, имеющий торговое название «Раундап» (произведён и расфасован ЗАО фирма «Август» (Россия) по лицензии фирмы «Монсанто Европа С.А.» (Бельгия)). Он хорошо растворим в воде, и содержит 360 г/л глифосата в качестве активного ингредиента, возможные инертные ингредиенты в аннотации не указаны. Концентрация Раундапа, использованная в этой работе, встречается в природных водах [Struger et al., 2008], соответствует 2 ПДК, установленным для воды рыбохозяйственных водоёмов России [Перечень..., 2010] и значительно ниже  $LC_{50}$  для рыб [Giesy et al., 2000]. Смену воды и раствора гербицида в аквариумах проводили 1 раз в 3 дня. В период эксперимента температуру в аквариумах поддерживали на том же уровне, что и в период акклимации при естественном фотопериоде.

По истечении 30 сут по 6 экз. из контрольной и опытной групп были взяты для отбора проб головного и туловищного отдела почек, селезёнки и печени для электронно-микроскопического (ЭМ) исследования. Для ЭМ исследований кусочки тканей фиксировали в 2,5% растворе глутарового диальдегида на фосфатном буфере (рН7,2), затем постфиксировали 1% раствором тетраоксида осмия на том же буфере, обезвоживали в градиенте спиртов и заливали в смесь Аралдит-Эпон по стандартной методике [Миронов и др., 1994]. Из полученных образцов на ультратоме Nova приготавливали ультратонкие срезы, которые контрастировали 1% водными растворами уранилацетата и цитрата свинца, а затем просматривали при помощи электронного микроскопа Jem 1011 (Jeol, Япония) при 80kV в ЦКП «Электронная микроскопия». Для проведения измерений не менее 20 клеток каждого типа из всех органов обрабатывали в пакете программ Image Tool 3.0. В каждой клетке измеряли не менее 10 самых крупных гранул. Результаты подвергали статистической обработке при уровне достоверности  $p \leq 0.05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

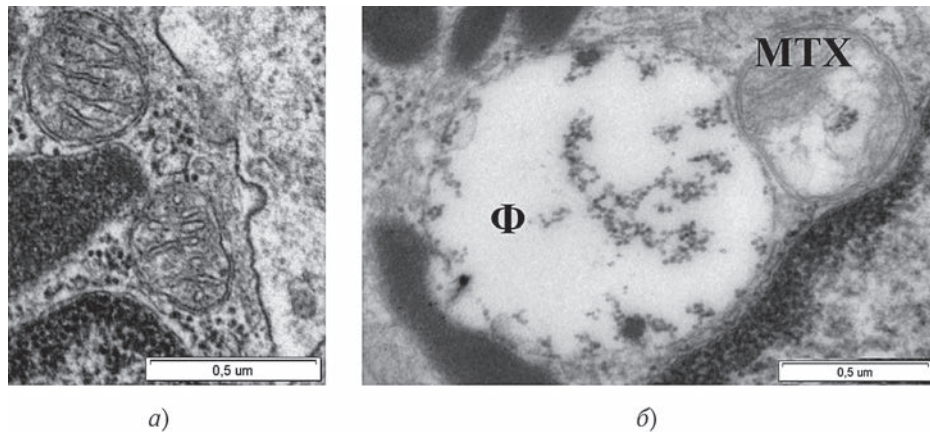
У головешки-ротана обеих исследованных групп в головном и туловищном отделах почек, селезёнке и печени обнаружены аграну-

лоциты (лимфоциты, плазматические клетки (кроме печени), макрофаги) и гранулоциты двух типов, которые идентифицировали как нейтрофилы и эозинофилы. В почках и селезёнке лейкоциты располагались в строме органа (в туловищном отделе почек — между нефронами), в печени — под эндотелиальной выстилкой синусоидов и вокруг кровеносных сосудов, окружая островки поджелудочной железы. Результаты исследования показали, что во всех исследованных органах рыб из 2-й группы структура клеток лимфо-миелоидной ткани претерпевала сходные изменения.

Митохондрии, как агранулоциты, так и гранулоциты во всех иммунокомпетентных органах имели одинаковые повреждения структуры: набухание органелл, просветление их матрикса и частичное растворение ламелл внутренней мембраны (рис. 1а, б). На рис. 1б хорошо заметна область с разрушенными ламеллами внутренней мембраны.

Ранее показано сходное повреждение ультраструктуры митохондрий в гепатоцитах карпа *Cyprinus carpio* L. после кратковременной экспозиции (0,5–1 час) в глифосате концентрацией 200–400 мг/мм<sup>3</sup> [Szarek et al., 2000] и в сперматоцитах гуппи (глазчатой пецилии) *Poecilia vivipara* Bloch & Schneider, 1801 при действии Раундапа в концентрации 130 и 700 мкг/л при 96-часовой экспозиции [Harayashiki et al., 2013].

Выявленные изменения свидетельствуют о нарушении процессов окислительного фосфорилирования, что подтверждается ингибированием *in vitro* и *in vivo* дыхательных ферментов и окислительного потенциала мембран клеток более, чем на 40% в митохондриях гепатоцитов крыс [Peixoto, 2005]. Одновременное с повреждением митохондрий уменьшение запасов гликогена в цитоплазме гепатоцитов [Szarek et al., 2000] вызывает переход на гликолитический путь метаболизма, который предполагает снижение синтеза АТФ или повышенные энергозатраты на её производство, а также клеточную гипоксию. Это предположение подтверждается данными С.Браз-Мота с соавторами [Braz-Mota et al., 2015] о повышении уровня гематокрита и концентрации гемоглобина в клетке без увеличения количества эритроцитов в крови,



**Рис. 1.** Структура митохондрий лейкоцитов головешки-ротана в контроле (а) и после воздействия Раундапа (б). МТХ — митохондрия, Ф — фагосома

которое авторы считают компенсаторной реакцией.

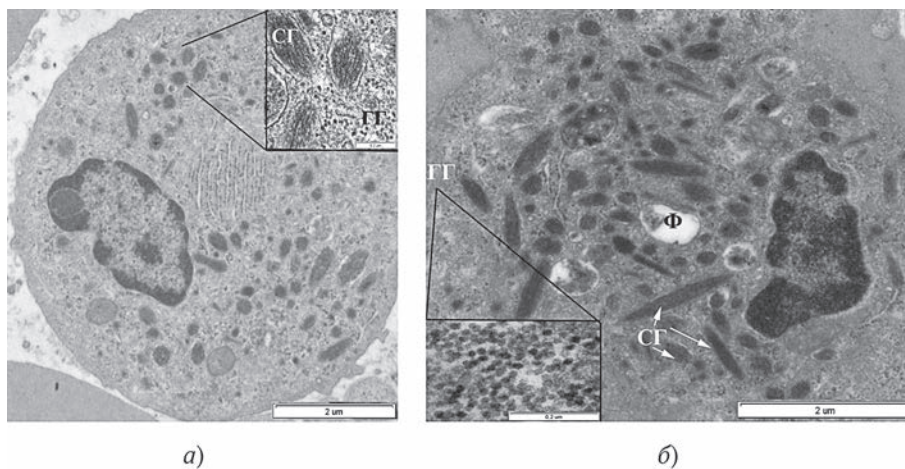
Среди агранулярных клеток отмечено также расширение каналов в плазматических клетках почек и селезёнки в группе опытных рыб по сравнению с контролем, что свидетельствует об усилении синтетической активности клеток. Так как основной функцией плазматических клеток считают синтез антител [Галактионов, 2005], по-видимому, Раундап опосредованно активизирует эти процессы и, возможно, провоцирует развитие аллергических реакций в организме рыб.

Макрофаги в исследованных органах встречались в виде одиночных клеток и в составе мелано-макрофагальных центров, имели подоб-

ную структуру у обеих групп рыб: цитоплазма клеток содержала большое количество крупных и мелких фагосом, гранулы пигментов.

Среди нейтрофилов отмечено достоверное увеличение количества и изменение размеров специфических гранул (появление крупных гранул >1 мкм в длину) в нейтрофилах, накопление гранул гликогена в периферических областях цитоплазмы клеток и появление фагосом с гетерогенным, разнородным по плотности содержимым (табл.; рис. 2 а, б).

Изменение количества и размеров гранул нейтрофилов отмечено ранее при действии ряда токсикантов [Лапирова, Заботкина, 2004], а изменение содержания гликогена в нейтрофилах — при иммунизации карпов [Балаба-



**Рис. 2.** Структура нейтрофилов головешки-ротана в контроле (а) и после экспозиции в Раундапе (б). Вставка на рис. 2а — специфические гранулы (СГ) и редкие гранулы гликогена (ГГ), вставка на рис. 2б — скопление гранул гликогена в цитоплазме (ГГ). Ф — фагосома

**Таблица.** Количество и размеры специфичных гранул и фагосом в нейтрофилах и эозинофилах почек, селезёнки и печени головешки-ротана в контроле и после экспозиции в Раундапе.

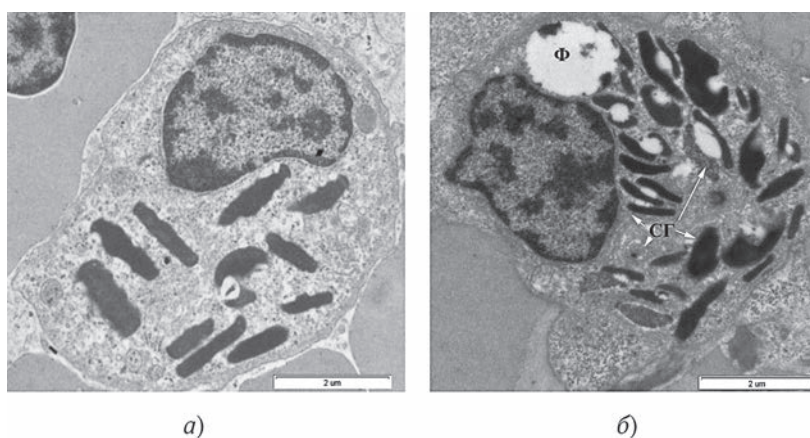
Тип клеток	Показатель	Контроль	Опыт
Нейтрофил	Количество специфичных гранул/клетку, п	$\frac{61,3 \pm 2,7}{46-71}$	$\frac{99,5 \pm 5,2^*}{78-127}$
	Размеры специфичных гранул, $h \times l$ , мкм	$\frac{0,20 \pm 0,01 \times 0,37 \pm 0,03}{0,11-0,29 \times 0,20-0,57}$	$\frac{0,18 \pm 0,01 \times 0,87 \pm 0,07^*}{0,14-0,22 \times 0,59-1,40}$
	Количество фагосом/клетку, п	0	$\frac{2,75 \pm 0,30}{1-3}$
	Размеры фагосом, $h \times l$ , мкм	—	$\frac{0,80 \pm 0,10 \times 1,05 \pm 0,15}{0,65-1,20 \times 0,72-1,35}$
эозинофил	Количество специфичных гранул/клетку, п	$\frac{10,36 \pm 0,78}{6-18}$	$\frac{21,00 \pm 1,48^*}{10-29}$
	Размеры специфичных гранул, $h \times l$ , мкм	$\frac{0,48 \pm 0,05 \times 1,27 \pm 0,07}{0,26-1,12 \times 0,51-1,71}$	$\frac{0,43 \pm 0,04 \times 1,29 \pm 0,09}{0,25-0,73 \times 0,67-1,82}$
	Количество фагосом/клетку	0	$\frac{2,00 \pm 0,20}{1-3}$
	Размеры фагосом, $h \times l$ , мкм	—	$\frac{0,87 \pm 0,10 \times 1,05 \pm 0,11}{0,42-1,49 \times 0,65-1,56}$

Примечание: в числителе —  $M \pm m$ , в знаменателе —  $\min-\max$ ; \* отмечены данные, достоверно отличающиеся при  $p \leq 0,05$

нова, Заботкина, 1988]. Если в нейтрофилах головешки-ротана зафиксировано увеличение количества гранул гликогена после длительной экспозиции в сублетальной концентрации Раундапа (рис. 2б), то в гепатоцитах карпа после кратковременной экспозиции в высоких концентрациях гербицида отмечено уменьшение количества гранул гликогена в гепатоцитах [Szarek et al., 2000]. Подобные изменения могут быть вызваны нарушениями в активности гликозидаз и углеводного обмена в организме рыб [Аминов и др., 2013].

Появление фагосом в цитоплазме нейтрофилов свидетельствует об активизации процессов фагоцитоза повреждённых элементов клеток и тканей, и отмечается также при действии других токсикантов у многих видов рыб [Заботкина, Микряков, 1996, 1997; Заботкина и др. 2009; Лапирова и др., 2009].

В эозинофилах рыб опытной группы также отмечены изменение количества специфичных гранул и появление фагосом в клетках (табл.; рис. 3 а, б), тогда как размеры гранул достоверно не изменились. Появление фагосом



**Рис. 3.** Структура эозинофила головешки-ротана в контроле (а) и после экспозиции в Раундапе (б). СГ — специфичные гранулы, Ф — фагосома

в цитоплазме гранулоцитов свидетельствует об активизации клеток в ответ на попадание в организм чужеродных веществ или частиц [Галактионов, 2005]. Считают, что активность этого типа клеток изменяется при паразитарной инфекции организма, при аутоиммунных процессах, либо аллергической реакции [Галактионов, 2005].

Вместе с тем, показано, что при действии глифосата или Раундапа усиливается активность антиоксидантных ферментов, в т. ч. в печени [Matviishyn et al., 2014].

Изменение количества, структуры и размеров специфичных гранул в гранулоцитах косвенно позволяет предположить изменение содержания в них ферментов, и, соответственно, влияния Раундапа на функциональную активность клеток. Специфичные гранулы содержат бактериостатические и бактерицидные вещества — лизоцим и щелочную фосфатазу, а мелкие округлые гранулы — миелопероксидазу [Хэм, Кормак, 1983]. Изменение содержания ферментов в гранулах гранулоцитов и проявление фагоцитарной активности клеток косвенно свидетельствует об усилении активности реакций неспецифического иммунитета.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, хроническое 30-и сут действие Раундапа в сублетальной концентрации 2 мкг/л вызывает повреждение структуры митохондрий и накопление гранул гликогена в цитоплазме гранулоцитов. Впервые выявлено, что изменение количества и структуры специфичных гранул в гранулоцитах (нейтрофилах и эозинофилах) происходит одновременно с появлением фагосом в цитоплазме клеток, что свидетельствует об усилении реакций неспецифического иммунитета. Расширение каналов шероховатого эндоплазматического ретикулаума в плазматических клетках почек и селезёнки свидетельствует об усилении синтетической активности плазматических клеток и, возможно, проявлении аллергических реакций в организме под действием гербицида.

Авторы выражают искреннюю признательность сотрудникам ЦКП «Электронная микроскопия» Института биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН за помощь в обработке материалов.

### ЛИТЕРАТУРА

- Аминов А.И., Голованова И.Л., Филиппов А.А. 2013. Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз в организме беспозвоночных животных и молоди рыб // Биология внутренних вод. № 4. С. 82–88.
- Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. 1988. Ультраструктура клеток иммунной системы карпа *Cyprinus carpio* L. в норме и при иммунизации // Цитология. Т. 30. № 6. С. 657–661.
- Брежнев В.И. 2004. Механизированный способ борьбы с сорной растительностью на открытых мелиоративных каналах гербицидом Раундап. Автореф. дисс. ... канд. техн. наук. Новочеркасск. 24 с.
- Галактионов В.Г. 2005. Эволюционная иммунология. М.: ИКЦ. 407 с.
- Голованов В.К. 2013. Температурные критерии жизнедеятельности пресноводных рыб. М.: Полиграфплюс. 300 с.
- Голованова И.Л., Филиппов А.А., Аминов А.И. 2011. Влияние гербицида Раундап *in vitro* на активность карбогидраз молоди рыб // Токсикологический вестник. № 5. С. 31–35.
- Ефремов И.В., Быкова Л.А. 2004. Разработка методики оценки влияния гербицидов на фотосинтетический аппарат растительных тканей // Вестник Оренбургского государственного университета. № 1. С. 126–129.
- Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Назарова Е.А. 2009. Влияние ионов кадмия на некоторые морфофункциональные и иммунофизиологические показатели сеголеток речного окуня *Perca fluviatilis* L. (Perciformes, Percidae) // Вопросы ихтиологии. Т. 49. № 1. С. 117–124.
- Заботкина Е.А., Микряков В.Р. 1996. Влияние карбофоса на иммунокомпетентные клетки и структуру селезёнки карпа // Цитология. Т. 38. № 4–5. С. 551–554.
- Заботкина Е.А., Микряков В.Р. 1997. Реакция иммунокомпетентных клеток печени карпа на воздействие карбофоса // Доклады РАН. Т. 352. № 4. С. 562–564.
- Лапирова Т.Б., Заботкина Е.А. 2004. Влияние пестицидов на иммунофизиологическое состояние рыб // Успехи современной биологии. Т. 124. № 4. С. 361–368.
- Лапирова Т.Б., Заботкина Е.А., Балабанова Л.В., Назарова Е.А. 2009. Сравнительный анализ иммунофизиологических механизмов реагирования молоди осетра сибирского и карпа обыкновенного на действие кадмия // Вопросы рыболовства. Т. 10. № 1(37). С. 81–91.

- Мионов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Мионов В.А. 1994. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб: Наука. 400 с.
- Перечень рыбохозяйственных нормативов: предельно допустимые концентрации (ПДК) и ориентировочно безопасные уровни воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение // Приказ Федерального агентства рыболовству от 20 января 2010 № 25.
- Спиридонов Ю.Я., Ларина Г.Е., Протасова Л.Д., Абубикеров В.А., Жариков М.Г. 2010. Многолетнее применение обще истребительного гербицида раундап в центральном регионе Нечерноземья // Агрехимия. № 2. С. 29–36.
- Хэм А., Кормак Д. 1983. Гистология. Т. 2. М.: Мир. 256 с. [Ham A.W., Cormack D.H. Histology. 1979. 8 ed. Philadelphia: Lippincott. 966 p.]
- Braz-Mota S., Sadauskas-Henriquez H., Duarte R.M., Vala A.L., Almeida-Vala V.M.F. 2015. Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum* // Chemosphere. Vol. 135. P. 53–60.
- Giesy J.P., Dobson S., Solomon K.R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide // Review of Environmental and Contamination Toxicology. Vol. 167. P. 35–120.
- Harayashiki C.A.Y., Varela J.A.S., de Souza M.A.A., da Costa L.C., Primeld E.G., Bianchinib A., Corcinie C.D. 2013. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water // Aquatic Toxicology. Vol. 142–143. P. 176–184.
- Hardell L., Eriksson M., Nordstrom M. 2002. Exposure to Pesticides as risk factor for Non-Hodgkin's Lymphoma A and hairy cell leukemia: pooled analysis of two Swedish Case-Control Studies // Leukemia Lymphoma. Vol. 43. № 5. P. 1043–1049.
- IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization (March 20, 2015).
- Matviishyn T.M., Kubrak O.I., Husak V.V., Storey K.B., Lushchak V.I. 2014. Tissue-specific induction of oxidative stress in goldfish by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Mild in brain and moderate in liver and kidney // Environmental Toxicology and Pharmacology. Vol. 37. Iss. 2. P. 861–869.
- Modesto K.A., Martinez C.B.R. 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity // Chemosphere. Vol. 81. P. 781–787.
- Moreno N.C., Sofia S.H., Martinez C.B.R. 2014. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus* // Environmental Toxicology and Pharmacology. Vol. 37. Iss. 1. P. 448–454.
- Peixoto M. 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation // Chemosphere. Vol. 61. Iss. 8. P. 1115–1122.
- Struger J., Thompson D., Staznik B., Martin P., McDaniel T., Marvin C. 2008. Occurrence of Glyphosate in Surface Waters of Southern Ontario // Bulletin of Environmental and Contamination Toxicology. Vol. 80. Iss. 4. P. 378–384.
- Szarek J., Siwicki A., Andrzejewska A., Terech-Majewska E., Banaszkiwicz T. 2000. Effects of the herbicide Roundup TM on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*) // Marine Environmental Research. Vol. 50. Iss. 1–5. P. 263–266.

## REFERENCES

- Aminov A.I., Golovanova I.L., Filippov A.A. 2013. Vliyanie gerbicide Raundap na aktivnost' glikozidaz v organizme bespozvonochnykh zhivotnykh i molodi ryb [Effect of Roundup herbicide on glycosides activity in the organisms of invertebrates and young fish] // Biologiya vnutrennikh vod. № 4. S. 82–88.
- Balabanova L.V., Zobotkina E.A. 1988. Ul'trastruktura kletok immunoj sistemy karpa *Cyprinus carpio* L. v norme i pri immunizacii [The ultrastructure of the immune system cells of the carp *Cyprinus carpio* L. in health and after immunization] // Citologiya. T. 30. № 6. S. 657–661.
- Brezhnev V.I. 2004. Mekhanizirovannyj sposob bor'by s sornoj rastitel'nost'yu na otkrytykh meliorativnykh kanalakh gerbicide Raundap [Mechanized method of controlling weeds in the open drainage canals by herbicide Roundup]. Avtoref. diss. ... kand. tekhn. nauk. Novocherkassk. 24 s.
- Galaktionov V.G. 2005. Ehvolucionnaya immunologiya [Evolutionary immunology]. M.: IKC. 407 s.
- Golovanov V.K. 2013. Temperaturnye kriterii zhiznedeyatel'nosti presnovodnykh ryb [The temperature criteria of the life in freshwater fish]. M.: Poligraf-plyus. 300 s.
- Golovanova I.L., Filippov A.A., Aminov A.I. 2011. Vliyanie gerbicide Raundap *in vitro* na aktivnost' karbogidraz molodi ryb [The *in vitro* effect of Roundup herbicide on carbohydrases activity of juvenile fish] // Toksikologicheskij vestnik. № 5. S. 31–35.
- Efremov I.V., Bykova L.A. 2004. Razrabotka metodiki ocenki vliyaniya gerbicide na fotosinteticheskij apparat rastitel'nykh tkanej [The development of methodology for assessing the effect of herbicides on the

- photosynthetic apparatus of plant tissues] // Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta. № 1. S. 126–129.
- Zabotkina E.A., Lapirova T.B., Nazarova E.A. 2009. Vliyanie ionov kadmiya na nekotorye morfofunkcional'nye i immunofiziologicheskie pokazateli segoletok rechnogo okunya *Perca fluviatilis* L. (Perciformes, Percidae) [Influence of cadmium ions on some morphofunctional and immune-physiological parameters of perch (*Perca fluviatilis*, Perciformes, Percidae) underyearlings] // Voprosy ikhtiologii. T. 49. № 1. S. 117–124.
- Zabotkina E.A., Mikryakov V.R. 1996. Vliyanie karbofosa na immunokompetentnye kletki i strukturu selezhenki karpa [The effect of malathion on immunocompetent cells and spleen structure of carp] // Citologiya. T. 38. № 4–5. S. 551–554.
- Zabotkina E.A., Mikryakov V.R. 1997. Reakciya immunokompetentnykh kletok pecheni karpa na vozdeystvie karbofosa [The reaction of carp liver immune cells to the effects of malathion] // Doklady RAN. T. 352. № 4. S. 562–564.
- Lapirova T.B., Zabotkina E.A. 2004. Vliyanie pesticidov na immunofiziologicheskoe sostoyanie ryb [Effects of pesticides on the immunophysical status in fish] // Uspekhi sovremennoj biologii. T. 124. № 4. S. 361–368.
- Lapirova T.B., Zabotkina E.A., Balabanova L.V., Nazarova E.A. 2009. Sravnitel'nyj analiz immunofiziologicheskikh mekhanizmov reagirovaniya molodi osetra sibirskogo i karpa obyknovennogo na deystvie kadmiya [The comparative analysis of immunophysiological mechanisms response on the influence of cadmium with the yearlings of Siberian sturgeon and carp] // Voprosy rybolovstva. T. 10. № 1(37). S. 81–91.
- Mironov A.A., Komissarchik YA.YU., Mironov V.A. 1994. Metody ehlektronnoj mikroskopii v biologii i medicine [The methods of electron microscopy in biology and medicine]. SPb: Nauka. 400 s.
- Perechen' rybohozyajstvennykh normativov: predel'no dopustimye koncentracii (PDK) i orientirovochno bezopasnye urovni vozdeystviya (OBUV) vrednykh veshchestv dlya vody vodnykh ob'ektov, imeyushchih rybokhozyajstvennoe znachenie [The list of fishery regulations: maximum permissible concentration (MPC) and the estimated safe exposure levels (TSEL) of pollutants to the water of water bodies of fishery significance] // Prikaz Federal'nogo agentstva rybolovstvu ot 20 yanvarya 2010 № 25.
- Spiridonov Yu.Ya., Larina G.E., Protasova L.D., Abubikerov V.A., Zharikov M.G. 2010. Mnogoletnee primeneniye obshche istrebitel'nogo gerbicida raundap v central'nom regione Nechernozem'ya [Long-term use of general action herbicide Roundup in the Nechernozemie central region] // Agrohimiya. № 2. S. 29–36.

Поступила в редакцию 13.04.16 г.  
Принята после рецензии 20.07.16 г.



## The changes of the immunocompetent cells ultrastructure in the kidney, spleen and liver in Amur sleeper *Perccottus glenii* at the influence of pesticide Roundup

*E.A.Zabotkina, Golovanov V.K., Golovanova I.L.*

I.D. Papanin' Institute for Biology of Inland Waters RAS, Borok

Roundup (Roundup) is one of the most widely used in the world systemic non-selective herbicide, including the Russian. The active ingredient in the pesticide is glyphosate (N- (phosphonomethyl) glycine,  $C_3H_8NO_5P$ ), which has long been considered low-toxic herbicide for animals. In 2015, glyphosate was attributed to the potentially dangerous carcinogens. It was found, the Roundup causes the mitochondria damage in gills, liver and kidney cells, the tissue oxidative stress, the kidney hyaline degeneration, the damage of the cell genetic apparatus, including germ cells, the increase in the hematocrit level, the number of red and white blood cells in fish. By electron microscopy the effect of sublethal concentration of Roundup ( $2 \mu g/l$ ) was investigated for the first time on the leukocytes ultrastructure of immunocompetent organs (kidney, spleen and liver) of young Amur sleeper — the invasive species in the ponds of the Upper Volga basin. It has been shown that the Roundup act in sublethal concentration ( $2 \mu g/l$ ) at chronic 30-day effect as higher concentrations at acute action and lead to the damage of mitochondrial structure and the accumulation of glycogen granules in the granulocytes cytoplasm. The change in the number and size of specific granules in granulocytes (neutrophils and eosinophils) and occurred simultaneously with the appearance of phagosomes in the cytoplasm of cells were first revealed. It indicates an increase in non-specific immunity reactions. The expansion of the rough endoplasmic reticulum channels in the plasma cells of the spleen and kidney indicates an increase of synthetic activity of plasma cells.

**Key words:** Roundup, the ultrastructure of immunocompetent cells, Amur sleeper *Perccottus glenii*, kidney, spleen, liver.