DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-116-131

CC BY 4.0

Молекулярные эффекты пестицидов карбарила, хлорпирифоса, манкоцеба, тирама и пендиметалина в условно-нормальных клетках *in vitro*: генотоксичность, клоногенность и влияние на экспрессию генов, ассоциированных с канцерогенезом

Е.С. Лылова[1], В.Г. Попова[1], К.А. Зимин[1, 2], А.Ю. Букина[1], В.А. Нуртдинова[1], С.С. Шмаков[3], М.Г. Якубовская[1], К.И. Кирсанов[1, 4], В.П. Максимова[1]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;
[2]ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117513 Москва, ул. Островитянова, 1;
[3]ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12;
[4]ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Контакты: Варвара Павловна Максимова *lavarvar@gmail.com*

Введение. Злокачественные новообразования остаются одной из основных причин смертности в мире. В развитии данной патологии большую роль играет воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды, в том числе пестицидов. Несмотря на широкий спектр используемых в сельском хозяйстве пестицидов, их молекулярные эффекты и канцерогенный потенциал изучены лишь в отношении небольшого числа моделей, включая нормальные клетки человека.

Цель исследования – изучить молекулярные эффекты пестицидов карбарила, хлорпирифоса, манкоцеба, тирама и пендиметалина в условно-нормальных клетках HaCaT и MCF10A.

Материалы и методы. Нетоксичные концентрации пестицидов определяли с помощью МТТ-теста. Генотоксичность анализировали методом ДНК-комет. Пролиферативный потенциал оценивали с помощью клоногенного анализа, изменение экспрессии генов, ассоциированных с канцерогенезом, – с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Карбарил вызывал повреждение ДНК в клетках MCF10A, способствовал пролиферации клеток обеих линий в клоногенном тесте, а также приводил к активации генов биотрансформации (*AHR*, *GSTA4*) в клетках MCF10A, репрессии (*CYP1B1*, *GSTA4*) в клетках HaCaT и снижению экспрессии генов воспаления (*IL1a*, *IL1b*, *PTGES*, *IFNGR1*). Хлорпирифос не показал генотоксического эффекта и не влиял на клоногенность, но вызывал индукцию генов биотрансформации (*CYP1A1*, *CYP1B1*), воспаления (*IL1b*, *PTGES*) и генов *BCL2* и *DNMTs*. Манкоцеб и тирам не проявляли генотоксичности в клетках HaCaT и MCF10A, но активировали отдельные гены репарации (*ATR/ATM*). Тирам стимулировал пролиферацию клеток HaCaT в клоногенном тесте, а манкоцеб активировал экспрессию генов – регуляторов пролиферации (*CCND2*, *CCNE1*, *Ki-67*), но не влиял на рост колоний; оба фунгицида снижали экспрессию генов воспаления (*COX2*, *IL1a*, *IL1b*). Пендиметалин вызывал повреждение ДНК и активацию экспрессии генов репарации (*ATR*, *GADD45a*, *PCNA*) в клетках обеих линий, а также снижал экспрессию *GLUT3* в клетках HaCaT и индуцировал экспрессию генов *CYP1A1* в клетках HaCaT и *CYP1B1* – в клетках MCF10A.

Заключение. В ходе комплексной оценки влияния пестицидов на нормальные человеческие клетки выявлено, что пендиметалин, хлорпирифос и карбарил оказывают наибольшее проканцерогенное действие.

Ключевые слова: пестицид, канцерогенез, карбарил, хлорпирифос, манкоцеб, тирам, пендиметалин

Для цитирования: Лылова Е.С., Попова В.Г., Зимин К.А. и др. Молекулярные эффекты пестицидов карбарила, хлорпирифоса, манкоцеба, тирама и пендиметалина в условно-нормальных клетках *in vitro*: генотоксичность, клоногенность и влияние на экспрессию генов, ассоциированных с канцерогенезом. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(3):116–31.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-116-131

Molecular effects of the pesticides carbaryl, chlorpyrifos, mancozeb, thiram, and pendimethalin in conditionally normal cells *in vitro*: genotoxicity, clonogenicity and effects on the expression of genes associated with carcinogenesis

E.S. Lylova[1], V.G. Popova[1], K.A. Zimin[1, 2], A.Yu. Bukina[1], V.A. Nurtdinova[1], S.S. Shmakov[3], M.G. Yakubovskaya[1], K.I. Kirsanov[1, 4], V.P. Maksimova[1]

[1]N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;
[2]Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; Bld. 6, 1 Ostrovityanova St., Moscow 117513, Russia;
[3]Lomonosov Moscow State University, 27/1 Lomonosovsky Prospekt, Moscow 119192, Russia;
[4]Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia

Contacts: Varvara Pavlovna Maksimova *lavarvar@gmail.com*

Introduction. Cancer remains a major cause of mortality worldwide, with adverse environmental factors such as pesticides contributing significantly to its development. Despite the widespread use of various pesticides, the molecular mechanisms underlying their actions and carcinogenic potential have been studied for only a limited number of models, especially in normal human cells.

Aim. To study the molecular effects of pesticides carbaryl, chlorpyrifos, mancozeb, thiram, and pendimethalin in non-malignant HaCaT and MCF10A cells.

Materials and methods. Non-toxic concentrations of pesticides were determined using the MTT assay. Genotoxicity was analyzed by the comet assay. Proliferative potential was assessed by clonogenic assay. Changes in the expression of genes associated with carcinogenesis were evaluated by real-time polymerase chain reaction.

Results. Carbaryl caused DNA damage in MCF10A cells, promoted proliferation in both cell lines during clonogenic assay, as well as caused activation of biotransformation genes (*AHR*, *GSTA4*) in MCF10A cells, repression (*CYP1B1*, *GSTA4*) genes in HaCaT cells and lowered expression of inflammation genes (*IL1a*, *IL1b*, *PTGES*, *IFNGR1*). Chlorpyrifos did not have genotoxic effect and did not affect clonogenicity but caused induction of biotransformation (*CYP1A1*, *CYP1B1*), inflammation (*IL1b*, *PTGES*) genes, and genes *BCL2* and *DNMTs*. Mancozeb and thiram did not show genotoxicity in HaCaT and MCF10A cells but activated individual repair genes (*ATR/ATM*). Thiram stimulated HaCaT cell proliferation in clonogenic assay, and mancozeb activated expression of proliferation regulation genes (*CCND2*, *CCNE1*, *Ki-67*) but did not affect colony growth; both fungicides decreased expression of inflammation genes (*COX2*, *IL1a*, *IL1b*). Pendimethalin caused DNA damage and activation of repair genes (*ATR*, *GADD45a*, *PCNA*) in both cell lines, as well as decreased expression of *GLUT3* in HaCaT cells and induced expression of *CYP1A1* in HaCaT cells and *CYP1B1* in MCF10A cells.

Conclusion. In this study, we performed a comprehensive assessment of the effects of pesticides on normal human cells. Our results indicate that pendimethalin, chlorpyrifos, and carbaryl exert the most procarcinogenic effect.

Keywords: pesticide, carcinogenesis, carbaryl, chlorpyrifos, mancozeb, thiram, pendimethalin

For citation: Lylova E.S., Popova V.G., Zimin K.A. et al. Molecular effects of the pesticides carbaryl, chlorpyrifos, mancozeb, thiram, and pendimethalin in conditionally normal cells *in vitro*: genotoxicity, clonogenicity and effects on the expression of genes associated with carcinogenesis. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(3):116–31. (In Russ.).
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-116-131

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные новообразования (ЗНО) и ассоциированная с ними смертность представляют значительную проблему в современном обществе. В настоящее время в мире наблюдается повышение заболеваемости ЗНО, связанное как с совершенствованием диагностики и увеличением продолжительности жизни, так и с воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды, а также курением, ожирением и употреблением алкоголя [1]. По прогнозам Международного агентства по изучению рака (МАИР), к 2045 г. заболеваемость ЗНО может вырасти в 1,5 раза – до 35 млн случаев в год [2].

В начале XXI века глобальной проблемой стало воздействие стойких органических загрязнителей на природные экосистемы [3]. Высокая степень биоаккумуляции, способность распространяться на большие расстояния, а также негативное влияние на биоразнообразие стали причиной подписания в 2001 г. Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях, ограничивающей производство и применение ряда промышленных химикатов и нескольких пестицидов (таких как дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ), токсафен, гептахлор, альдрин и др.) [4]. С 2001 г. МАИР классифицировало как вероятные канцерогены (группа 2a) пестициды глифосат, малатион, тетрахлорвинфос, ДДТ, паратион и как возможные канцерогены (группа 2b) соединения паракват, перметрин, бифентрин и 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту [5].

В настоящее время в мире зарегистрированы более 800 активных соединений, используемых в составе

коммерческих пестицидов [6]. При этом классификация МАИР включает всего около 20 пестицидов, что составляет менее 2 % от общего количества используемых агентов. Это свидетельствует об ограниченности имеющихся данных по канцерогенности пестицидов.

С 2015 г. МАИР начало активно включать пестициды в списки приоритетных соединений для исследования канцерогенных эффектов. Актуальный перечень пестицидов с наиболее высоким приоритетом для исследований включает такие агенты, как карбарил, перметрин, циперметрин, малатион, фонофос, метилтетрапрол, проквиназид, манкоцеб, тирам, винклозолин, хлорпирифос, тебуконазол, тербуфос, хлордекон, алахлор, пендиметалин, бифенил, бифентрин, атразин и другие триазиновые пестициды, пиретрины и пиретроиды, этилендитиокарбаматы и неоникотиноидные пестициды [7]. Многие из перечисленных соединений относятся к группе 3 (агенты, не классифицируемые в отношении канцерогенности для человека из-за ограниченности данных), канцерогенность остальных соединений МАИР не оценивало.

В 2017 г. для адекватного анализа и интерпретации механистических данных при классификации ксенобиотиков по канцерогенности МАИР сформулированы 10 ключевых характеристик канцерогенного агента, включающих: 1) электрофильность соединения или его метаболитов; 2) генотоксичность; 3) способность изменять репарацию или вызывать геномную нестабильность; 4) способность вызывать изменения в эпигенетической регуляции транскрипции; 5) способность к индукции окислительного стресса; 6) способность вызывать хроническое воспаление; 7) способность оказывать иммуносупрессивную активность; 8) способность модулировать рецептор-опосредованные эффекты; 9) способность вызывать иммортализацию; 10) способность влиять на активность пролиферации клеток, их гибели и питания [8].

Для некоторых пестицидов из списка приоритетов МАИР на отдельных моделях *in vivo* и *in vitro* исследована их способность повреждать ДНК, вызывать оксидативный стресс, нарушая баланс между образованием активных форм кислорода (АФК) и антиоксидантной защитой, влиять на пролиферацию, а также на различные рецепторы [9–11]. Однако в опубликованных исследованиях представлены ограниченные данные о воздействии перечисленных пестицидов на нормальные клетки человека, что затрудняет понимание молекулярных эффектов и оценку риска развития ЗНО.

В этом исследовании основное внимание уделено 5 пестицидам, которые широко используются на территории России и стран Содружества Независимых Государств: карбарилу (Car), хлорпирифосу (CPF), манкоцебу (MZ), тираму (Thir) и пендиметалину (PM).

Карбарил – карбаматный инсектицид, отнесенный МАИР к группе 3. С 2006 г. его применение ограничено в странах Европейского союза (ЕС) [12]. Эпидемиологические данные свидетельствуют об ассоциации воздействия Car с высоким риском развития множественной миеломы, меланомы, опухолей центральной нервной системы (ЦНС) и, возможно, неходжкинских лимфом [13–16]. В опытах *in vivo* канцерогенность этого агента выявлялась только в сочетании с промотором канцерогенеза 12-О-тетрадеканоилфорбол-13-ацетатом (TPA) [17]. Метаболиты Car ассоциированы с повреждением ДНК в сперме человека [18].

Хлорпирифос – фосфорорганический инсектицид, относящийся к группе 3 по классификации МАИР. Его применение ограничено в США и ЕС, но широко используется в странах Азии, включая Индию [19]. Сообщалось о высоком риске развития рака легкого у работников сельского хозяйства, интенсивно применявших CPF, а также об увеличении риска возникновения рака молочной железы у женщин, подвергавшихся воздействию этого агента [20, 21]. CPF оказывал эндокринно-дестабилизирующее действие *in vivo*, которое выражалось в повышении частоты возникновения доброкачественных новообразований, усилении экспрессии прогестерона, а также уменьшении уровня корепрессоров рецептора эстрогенов (ER). Метаболиты CPF могут взаимодействовать с ERα, связываясь аналогично природным лигандам [22, 23].

Манкоцеб и Thir – контактные фунгициды из группы дитиокарбаматов, ранее не оценивавшиеся в монографиях МАИР. Их применение ограничено в ЕС. Согласно эпидемиологическим данным, связи между воздействием MZ, Thir и риском развития неходжкинских лимфом или рака мочевого пузыря не обнаружено [24, 25]. Однако отмечена ассоциация между использованием MZ и высоким риском развития меланомы, опухолей ЦНС и хронического миелоидного лейкоза у фермеров [26–28].

Пендиметалин – гербицид из группы динитроанилинов, который ранее не оценивался МАИР [29]. Согласно эпидемиологическим данным, отмечено повышение риска развития рака прямой кишки и поджелудочной железы у фермеров, использующих этот агент [30, 31].

Цель исследования – изучение молекулярных эффектов пестицидов Car, CPF, MZ, Thir и пендиметалина на модели условно-нормальных человеческих клеток HaCaT и MCF10A, способности этих соединений вызывать повреждения ДНК, их влияния на способность клеток к колониобразованию и действия на экспрессию генов, ассоциированных с канцерогенезом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. В качестве моделей для исследования выбраны условно-нормальные клеточные линии HaCaT (линия иммортализованных кератиноцитов человека) и MCF10A (клетки доброкачественной кисты молочной железы), полученные из биоколлекции Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина.

Клетки HaCaT культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 50 ед/мл стрептомицина, 50 мкг/мл пенициллина, 2 мМ L-глутамина (все – «ПанЭко», Россия), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; Biosera, Франция) при 37 °C в присутствии 5 % CO_2. Клетки MCF10A культивировали в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 1 мМ L-глутамина, 50 ед/мл стрептомицина и 50 мкг/мл пенициллина, 5 % лошадиной сыворотки (Biowest, Франция), 20 нг/мл эпидермального фактора роста (ProSpec, Израиль), 10 мкг/мл инсулина («ПанЭко», Россия), 0,5 мг/мл гидрокортизона и 100 нг/мл холерного токсина (оба – Sigma-Aldrich, США).

Химические соединения. В исследовании использованы следующие соединения: Car (CAS: 63-25-2), CPF (CAS: 2921-88-2), MZ (CAS: 8018-01-7), Thir (CAS: 137-26-8), PM (CAS: 40487-42-1), 3-метилхолантрен (MCA) CAS: 56-49-5), TPA CAS: 16561-29-8) (все – Sigma-Aldrich, США). CPF, PM и MCA растворяли в ацетоне, Car и Thir – в метаноле, MZ и TPA – в диметилсульфоксиде (ДМСО). Рабочие растворы всех агентов готовили в ДМСО. Концентрация растворителей в среде составила 0,02 %, ДМСО – 0,2 %.

Определение нетоксичных концентраций с помощью МТТ-теста. Клетки высевали в 96-луночные планшеты (SPL Life Sciences, Корея) по 5×10^3 клеток в лунку, после прикрепления к подложке обрабатывали серийными разведениями пестицидов (50 мкМ – 24,4 нМ для MZ, CPF, PM и Car; 0,5 мкМ – 0,24 нМ для Thir). Через 72 ч добавляли 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (Alfa Aesar, Германия; конечная концентрация 250 мкг/мл), через 4 ч отбирали среду и растворяли кристаллы формазана в 100 мкл ДМСО («ПанЭко», Россия). Оптическую плотность раствора определяли с помощью Multiscan Sky (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 570 нм. Эксперимент проводили не менее 3 раз.

Анализ генотоксического действия пестицидов методом ДНК-комет. Клетки HaCaT высевали в 24-луночные планшеты (SPL Life Sciences, Корея) по 50×10^3 клеток в лунку, MCF10A – по 60×10^3 клеток в лунку, после прикрепления к подложке обрабатывали клетки пестицидами, а также растворителями в соответствующих концентрациях (отрицательный контроль). В качестве положительного контроля использовали H_2O_2 (0,08 %, 20 мин). Через 48 ч клетки снимали с подложки, промывали натрий-фосфатным буфером (PBS) («ПанЭко», Россия), растворяли в 0,7 % легкоплавкой агарозе (1:8 v/v; 37 °C; «ПанЭко», Россия) и наносили на слайд. После застывания агарозы осуществляли лизис клеток (1 ч, 4 °C), затем денатурирующую инкубацию в щелочном растворе (30 мин, 4 °C). Далее слайды промывали и проводили электрофорез в буфере TBE (30 мин, 1 В/см). По окончании электрофореза слайды промывали дистиллированной водой, инкубировали с охлажденным 70 % этанолом и окрашивали раствором красителя SYBR Gold (Invitrogen, США) в буфере TE («Евроген», Россия) с конечной концентрацией 1:10 000.

Анализ проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axio Observer (Carl Zeiss, Германия) при увеличении 100x. Количество поврежденной ДНК оценивали по моменту хвоста, представляющему произведение длины хвоста и количества мигрировавшей ДНК [32]. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Comet Score. Эксперимент проводили не менее 3 раз.

Анализ влияния пестицидов на способность клеток образовывать колонии. Клетки HaCaT и MCF10A высевали в чашки Петри (диаметр – 60 мм) (SPL Life Sciences, Корея) по 3×10^3 клеток. Через 24 ч клетки обрабатывали пестицидами и TPA. Далее каждые 72 ч проводили замену среды на свежую с обработкой исследуемыми агентами и растворителями в течение 12 дней. По завершении эксперимента колонии фиксировали метанолом и окрашивали 0,5 % раствором кристаллического фиолетового (Merck, Германия).

Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения ImageJ с плагином ColonyArea [33]. Эксперимент проводили не менее 3 раз.

Анализ влияния пестицидов на экспрессию генов, ассоциированных с канцерогенезом. Клетки HaCaT и MCF10A высевали в чашки Петри (диаметр = 60 мм) по 250×10^3 и 350×10^3 клеток соответственно. Через 24 ч клетки обрабатывали пестицидами, MCA, TPA и инкубировали 72 ч. Суммарную РНК экстрагировали с помощью реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) по протоколу производителя с последующей обработкой ДНКазой I («Синтол», Россия) и переосаждением. Далее проводили синтез комплементарной ДНК с использованием декануклеотидных праймеров Random со случайной последовательностью («Евроген», Россия) и MMLV-ревертазы («Евроген», Россия) на амплификаторе ТП4-ПЦР-01-Терцик («ДНК-технология», Россия) по следующему протоколу: 37 °C – 35 мин; 70 °C – 10 мин.

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени использовали амплификатор CFX Connect Real-Time PCR (Bio-Rad, США), в качестве регистрируемого сигнала выступала флуоресценция интеркалятора SYBR Green I («Евроген», Россия). Проводили 40 циклов ПЦР (15 с – 95 °C; 20 с – 58 °C; 25 с – 72 °C). Для анализа экспрессии генов использовали запатентованную панель праймеров, разработанную отделом химического канцерогенеза Научно-исследовательского института канцерогенеза Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина» в рамках выполнения кластерного проекта 121120100382-1.

В качестве контрольных генов сравнения использованы ген фактора элонгации 1 альфа 1 (elongation factor 1 alpha 1) *EF1A1* и ген рибосомального белка P0 (60S acidic ribosomal protein P0) *RPLP0*. Эксперимент проводили не менее 5 раз.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения MS Excel и GraphPad Prism 8.3.0. Для оценки нормальности распределения данных использовали критерий Шапиро–Уилка, для определения нетоксичных концентраций пестицидов в МТТ-тесте – метод нелинейной регрессии. В тесте ДНК-комет выбросы в наборах данных определяли с помощью правила межквартильного размаха, статистически значимые различия относительно отрицательного контроля – с использованием непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с тестом множественного сравнения Данна. В остальных экспериментах для поиска выбросов применяли метод ROUT (Q = 1 %).

В ходе анализа на клоногенность значимость статистических различий относительно отрицательного контроля оценивали с помощью однофакторного теста ANOVA с использованием апостериорного теста Шидака. Изменения уровней экспрессии исследуемых генов при действии пестицидов рассчитывали с применением метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [34]. Для оценки статистической значимости различий применяли двухфакторный тест ANOVA с использованием критерия Даннетта. Во всех экспериментах различия между группами считались значимыми при $p < 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние пестицидов сравнивали с действием индуктора канцерогенеза МСА и промотором канцерогенеза ТРА. МСА относится к группе 1 по классификации МАИР (доказана канцерогенность для людей) и широко используется для изучения химического канцерогенеза [35, 36]. ТРА не классифицирован МАИР, однако была показана его способность вызывать развитие опухолей в двухэтапной модели канцерогенеза через активацию протеинкиназы С [37, 38].

Определение нетоксичных концентраций. С помощью МТТ-теста определены максимальные нетоксичные концентрации пестицидов в клетках HaCaT и MCF10A (рис. 1).

Анализ генотоксичности пестицидов. На данном этапе исследования проведен анализ генотоксического действия пестицидов методом ДНК-комет. После обработки клеток HaCaT исследуемыми пестицидами не было зарегистрировано статистически значимого изменения момента хвоста комет относительно действия растворителей, его медианы не превышали $1{,}8 \times 10^{-2}$ (рис. 2, *а*).

В клетках MCF10A обнаружены значимое увеличение момента хвоста при действии PM ($p = 0{,}035$), а также тенденция к его увеличению для Car ($p = 0{,}054$) (см. рис. 2, *б*). Медиана момента хвоста (Q_1; Q_3) для PM составила $3{,}7 \times 10^{-5}$ (0; 0,019), что превысило значение для ацетона в 2 раза ($1{,}9 \times 10^{-5}$ (0; 0,002), по среднему значению – в 3 раза. При действии Car медиана (Q_1; Q_3) момента хвоста оказалась равной $2{,}4 \times 10^{-5}$ (0; 0,005), что превысило значение для метанола ($7{,}5 \times 10^{-6}$ (0; 0,0006)) в 3 раза, по среднему значению – в 2,5 раза. Отметим, что клетки HaCaT были менее чувствительны к действию положительного контроля (H_2O_2): медиана момента хвоста была меньше более чем в 20 раз.

Анализ влияния пестицидов на способности клеток образовывать колонии. Далее с помощью клоногенного анализа была изучена способность пестицидов изменять пролиферативный потенциал клеток и оказывать трансформирующее действие. Изменение способности клеток к колониобразованию оценивали при постоянном действии пестицидов в течение 14 дней по проценту площади, взвешенному по интенсивности окрашивания колоний. Отмечено статистически значимое повышение данного показателя – в 1,4 и 2,6 раза при действии Car в клетках HaCaT (рис. 3, *а*) и MCF10A (см. рис. 3, *б*) соответственно, а также в 1,7 раза при действии Thir в клетках HaCaT.

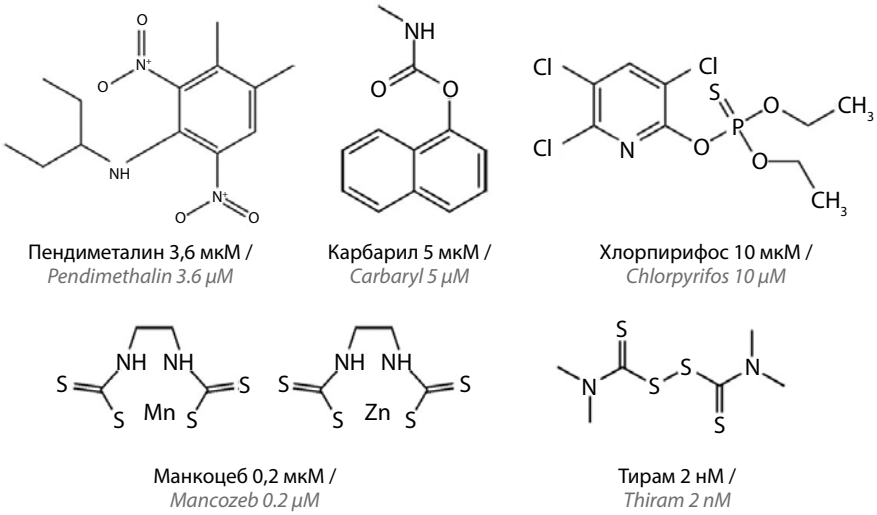

Рис. 1. *Химические формулы и максимальные концентрации пестицидов, анализируемых в исследовании*
Fig. 1. *Chemical formulas and maximal concentrations of pesticides analyzed in the study*

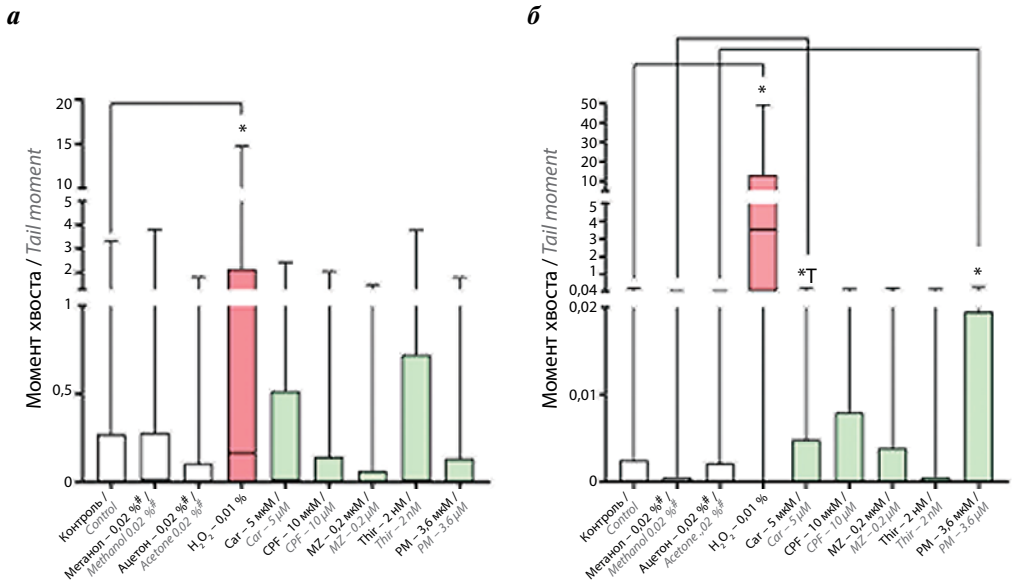

Рис. 2. *Результаты анализа генотоксического действия пестицидов на клетки HaCaT (а) и MCF10A (б). Экспозиция к агентам составила 48 ч. Результаты представлены как медиана (25-й квартиль; 75-й квартиль). Контроль – интактные клетки. # – рабочие стоки пестицидов и растворителей готовили в диметилсульфоксиде, концентрация в среде составила 0,2 %; * – различия статистически значимы относительно отрицательного контроля (по растворителю) (p <0,05); *T – тенденция к статистически значимому отличию от отрицательного контроля (растворителя) (p <0,05). Car – карбарил; CPF – хлорпирифос; MZ – манкоцеб; Thir – тирам; PM – пендиметалин*

Fig. 2. *Results of analysis of genotoxic effect of pesticides on HaCaT (a) and MCF10A (б) cells. Exposition time was 48 h. Results are presented as median (25th quartile; 75th quartile). Control is intact cells. # – working solutions of pesticides and solvents were prepared in dimethyl sulfoxide, concentration in the medium was 0.2 %; * – differences are statistically significant relative to negative control (solvent) (p <0.05); *T – trend towards statistically significant difference from negative control (solvent) (p <0.05). Car – carbaryl; CPF – chlorpyrifos; MZ – mancozeb; Thir – thiram; PM – pendimethalin*

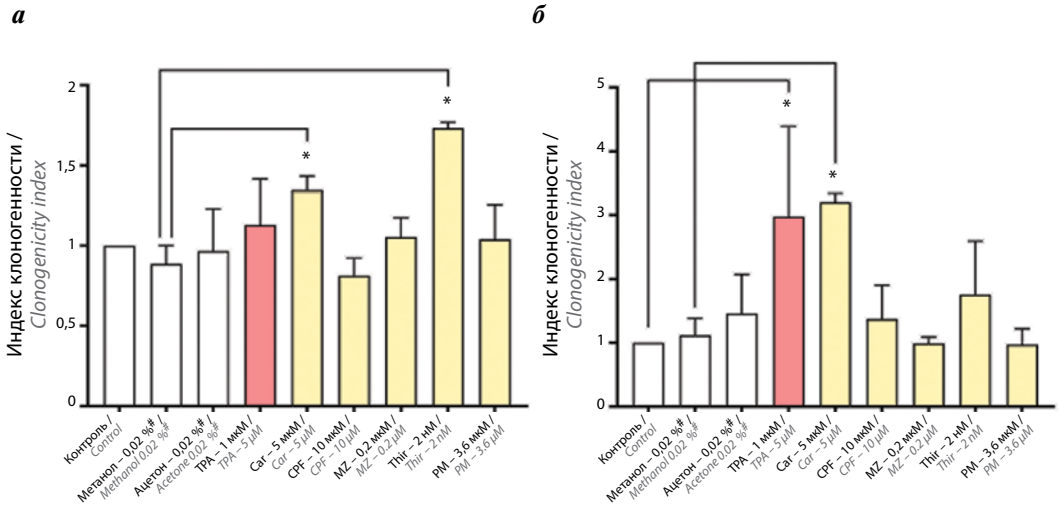

Рис. 3. *Результаты анализа влияния пестицидов на способность клеток HaCaT (а) и MCF10A (б) образовывать колонии. Экспозиция к агентам составила 14 дней. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Контроль – интактные клетки. # – рабочие стоки пестицидов и растворителей готовили в диметилсульфоксиде, концентрация в среде составила 0,2 %; * – различия статистически значимы относительно отрицательного контроля (по раствортелю) (p <0,05). Car – карбарил; CPF – хлорпирифос; MZ – манкоцеб; Thir – тирам; PM – пендиметалин; TPA – 12 -O-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат*

Fig. 3. *Results of analysis of the effect of pesticides on the ability of HaCaT (a) and MCF10A (б) cells to form colonies. Exposure time was 14 days. Results are presented as mean ± standard deviation. Control is intact cells. # – working solutions of pesticides and solvents were prepared in dimethyl sulfoxide, concentration in the medium was 0.2 %; * – differences are statistically significant relative to negative control (solvent) (p <0.05). Car – carbaryl; CPF – chlorpyrifos; MZ – mancozeb; Thir – thiram; PM – pendimethalin; TPA – 12 -O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*

Действие агентов сравнивали с промотором канцерогенеза TPA. Клетки HaCaT были менее чувствительны к действию TPA, в то время как в клетках MCF10A детектировано повышение числа и интенсивности колоний (в 3 раза).

Анализ влияния пестицидов на гены, ассоциированные с канцерогенезом. Влияние пестицидов оценивали по изменению уровня экспрессии генов биотрансформации, метаболизма, пролиферации, репарации, окислительного стресса, воспаления, апоптоза, инвазии и метастазирования, а также эпигенетической регуляции. Эффекты пестицидов сравнивали с действием индуктора и промотора канцерогенеза – 3-метилхолантрена (MCA) и TPA соответственно.

Биотрансформация и метаболизм. Канцероген MCA активировал экспрессию генов цитохрома P450 *CYP1A1* и *CYP1B1*, промотор канцерогенеза TPA не влиял на гены в HaCaT, но повышал уровень мРНК *CYP1B1* и *AHR* в MCF10A (рис. 4, *а*).

Пестициды CPF и PM действовали так же, как MCA, вызывая индукцию генов *CYP1A1* и *CYP1B1* в клетках HaCaT и MCF10A. Для Car зарегистрированы слабое понижение генов биотрансформации в клетках HaCaT и слабая активация – в клетках MCF10A. При действии MZ выявлено снижение экспрессии гена *CYP1A1* в HaCaT и повышение экспрессии гена *CYP1B1* в MCF10A. Клетки HaCaT реагировали на обработку канцерогенами снижением экспрессии генов метаболизма глюкозы *GLUT1*, *GLUT3*, *6PF2K*, *LDHA* и *MCT1* (см. рис. 4, *б*), в то время как в клетках MCF10A зарегистрировано повышение экспрессии генов *GLUT1* и *GLUT3*. Все исследуемые пестициды оказывали влияние на гены метаболизма глюкозы. В клетках HaCaT выявлено снижение экспрессии генов *GLUT3* и *MCT1* под действием PM и MZ соответственно, в клетках MCF10A Car ингибировал экспрессию *GLUT1*, а CPF, Thir и PM повышали уровень мРНК гена *GLUT3*.

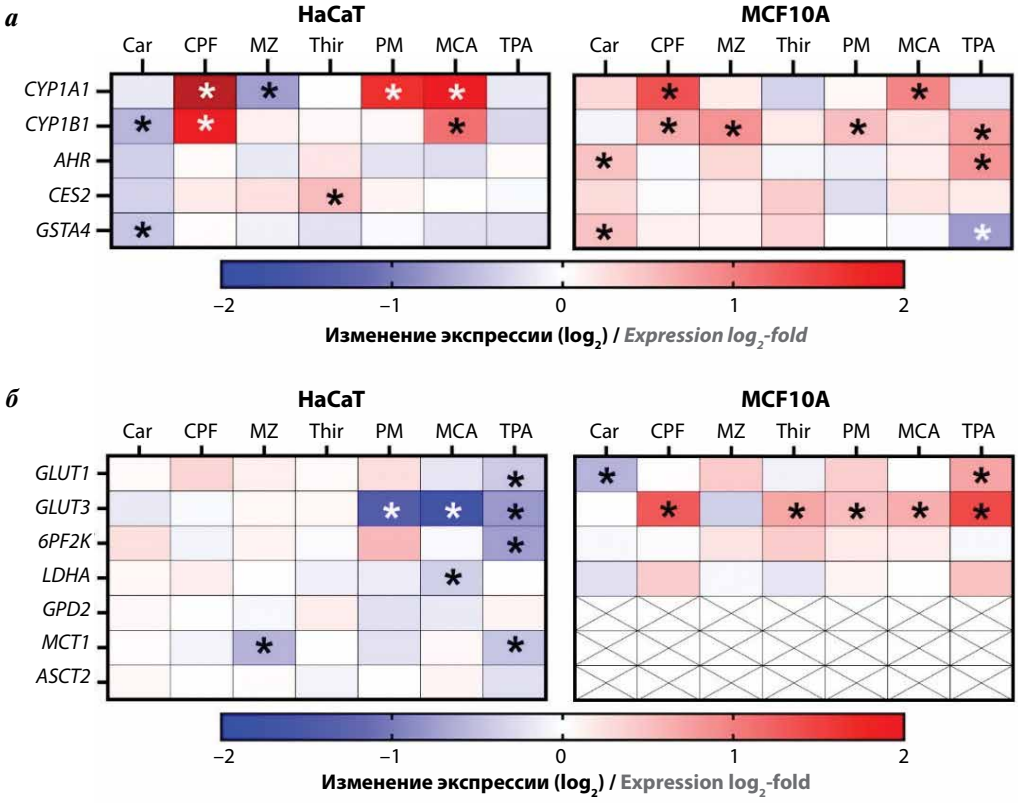

Рис. 4. *Результаты анализа влияния пестицидов, 3-метилхолантрена (MCA) и 12-O-тетрадеканоилфорбол-13-ацетата (TPA) на экспрессию генов, ассоциированных с биотрансформацией ксенобиотиков (а) и метаболизмом (б) в клетках HaCaT и MCF10A. Зачеркиванием обозначено, что экспрессию гена не оценивали. Экспозиция к агентам составила 72 ч. Результаты полимеразной цепной реакции в реальном времени выражены через* $\log_2$. ** – различия статистически значимы относительно отрицательного контроля (p <0,05). Car – карбарил; CPF – хлорпирифос; MZ – манкоцеб; Thir – тирам; PM – пендиметалин*

Fig. 4. *Results of analysis of the effect of pesticides, 3-methylcholanthrene (MCA) and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) on expression of genes associated with xenobiotic biotransformation (a) and metabolism (б) in HaCaT and MCF10A cells. Crossing out denotes that gene expression was not evaluated. Exposure time was 72 h. Results of real-time polymerase chain reaction are presented as* $\log_2$. ** – differences are statistically significant relative to negative control (p <0.05). Car – carbaryl; CPF – chlorpyrifos; MZ – mancozeb; Thir – thiram; PM – pendimethalin*

Пролиферация и репарация. Канцероген MCA вызывал индукцию генов пролиферации *CCND2*, *CCNE1*, *AURKA*, *FOSL1* и *MCM5* в клетках HaCaT и не влиял на экспрессию генов в клетках MCF10A, в свою очередь, TPA вызывал сильную индукцию генов пролиферации (*CCND1*, *CCND2*, *CCNE1*, *Ki*-67, *AURKA*, *FOSL1* и *FOXM1*) в клетках обеих линий (рис. 5, *а*).

Пестицид CPF вызывал слабое снижение экспрессии генов *CCND2*, *Ki-67* и индуцировал экспрессию гена *E2F4*. Для MZ показано повышение экспрессии генов *CCND2*, *CCNE1* и *Ki-67*, PM незначительно повышал экспрессию генов *CDK6* и *CCNE1* и снижал экспрессию гена *CCND1*. В клетках MCF10A детектирована слабая активация генов *CCND2* и *Ki-67* при действии Car и Thir соответственно.

Экспрессия генов репарации при действии исследуемых агентов различалась в клетках HaCaT и MCF10A. В клетках HaCaT MCA активировал экспрессию генов

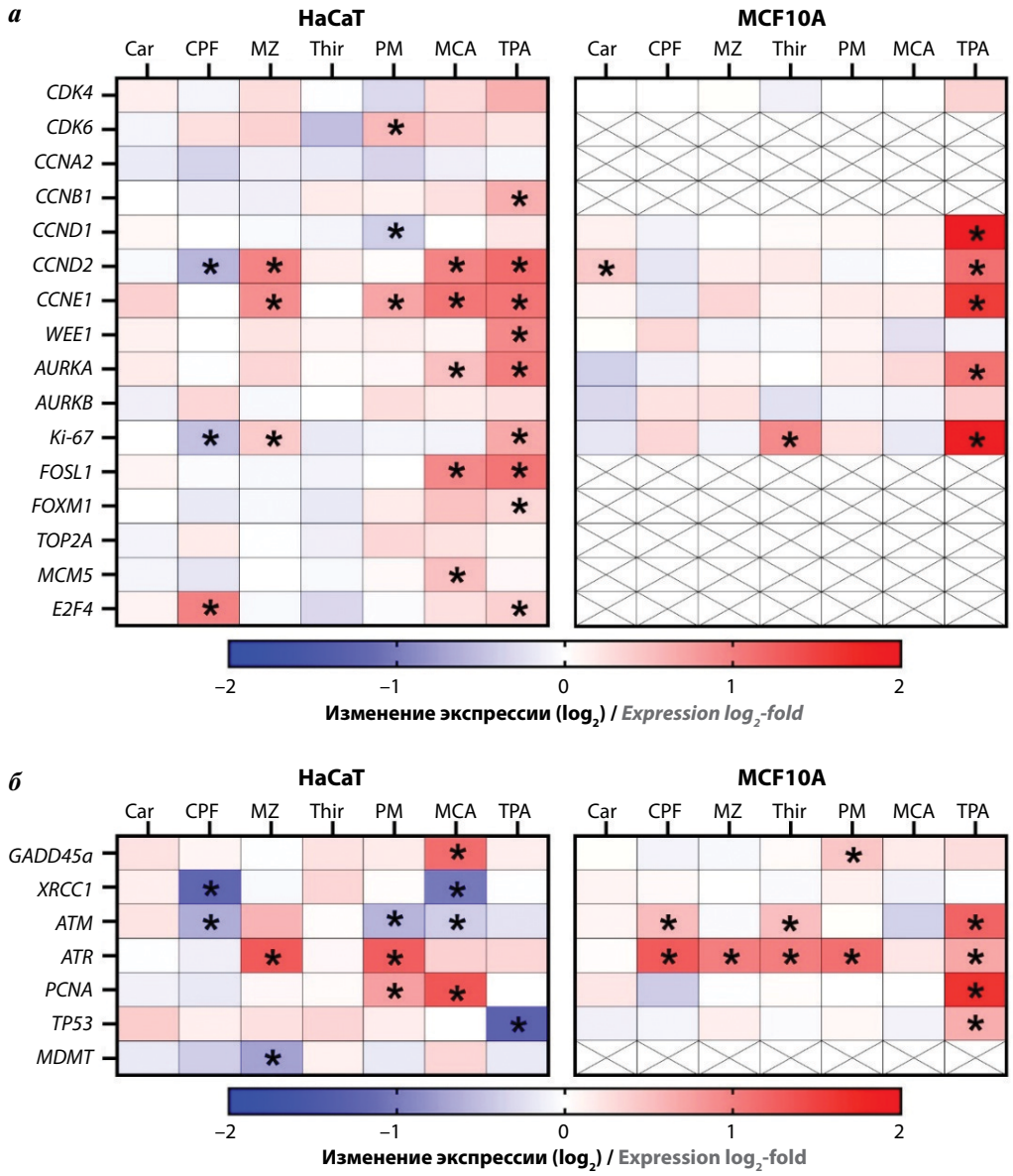

Рис. 5. *Результаты анализа влияния пестицидов, 3-метилхолантрена (MCA) и 12-O-тетрадеканоилфорбол-13-ацетата (TPA) на экспрессию генов, ассоциированных с пролиферацией (а) и репарацией (б) в клетках HaCaT и MCF10A. Зачеркиванием обозначено, что экспрессию гена не оценивали. Экспозиция к агентам составила 72 ч. Результаты полимеразной цепной реакции в реальном времени выражены через log2. * – различия статистически значимы относительно отрицательного контроля (p <0,05). Car – карбарил; CPF – хлорпирифос; MZ – манкоцеб; Thir – тирам; PM – пендиметалин*

Fig. 5. *Results of analysis of the effect of pesticides, 3-methylcholanthrene (MCA) and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) on expression of genes associated with proliferation (a) and repair (б) in HaCaT and MCF10A cells. Crossing out denotes that gene expression was not evaluated. Exposure time was 72 h. Results of real-time polymerase chain reaction are presented as log2. * – differences are statistically significant relative to negative control (p <0.05). Car – carbaryl; CPF – chlorpyrifos; MZ – mancozeb; Thir – thiram; PM – pendimethalin*

GADD45a и *PCNA* и подавлял экспрессию генов *XRCC1* и *ATM*, в клетках MCF10A наблюдалось отсутствие эффектов; TPA снижал экспрессию генов *TP53* в клетках HaCaT и активировал гены *ATM*, *ATR*, *PCNA* и *TP53* в клетках MCF10A (рис. 5, *б*). Пестициды CPF и PM в клетках HaCaT действовали так же, как и MCA: в первом случае происходила репрессия генов *XRCC1* и *ATM*, а во втором – подавление генов *ATM*, *ATR* и активация гена *PCNA*. MZ активировал ген *ATR* и снижал экспрессию гена *MGMT*. В клетках MCF10A агенты CPF, MZ, Thir и PM активировали ген *ATR*, PM также слабо повышал экспрессию гена *GADD45a*, а CPF и Thir – гена *ATM*. Пестицид Car не влиял на экспрессию генов репарации.

Окислительный стресс, воспаление и апоптоз. Канцероген MCA не вызывал изменения экспрессии генов

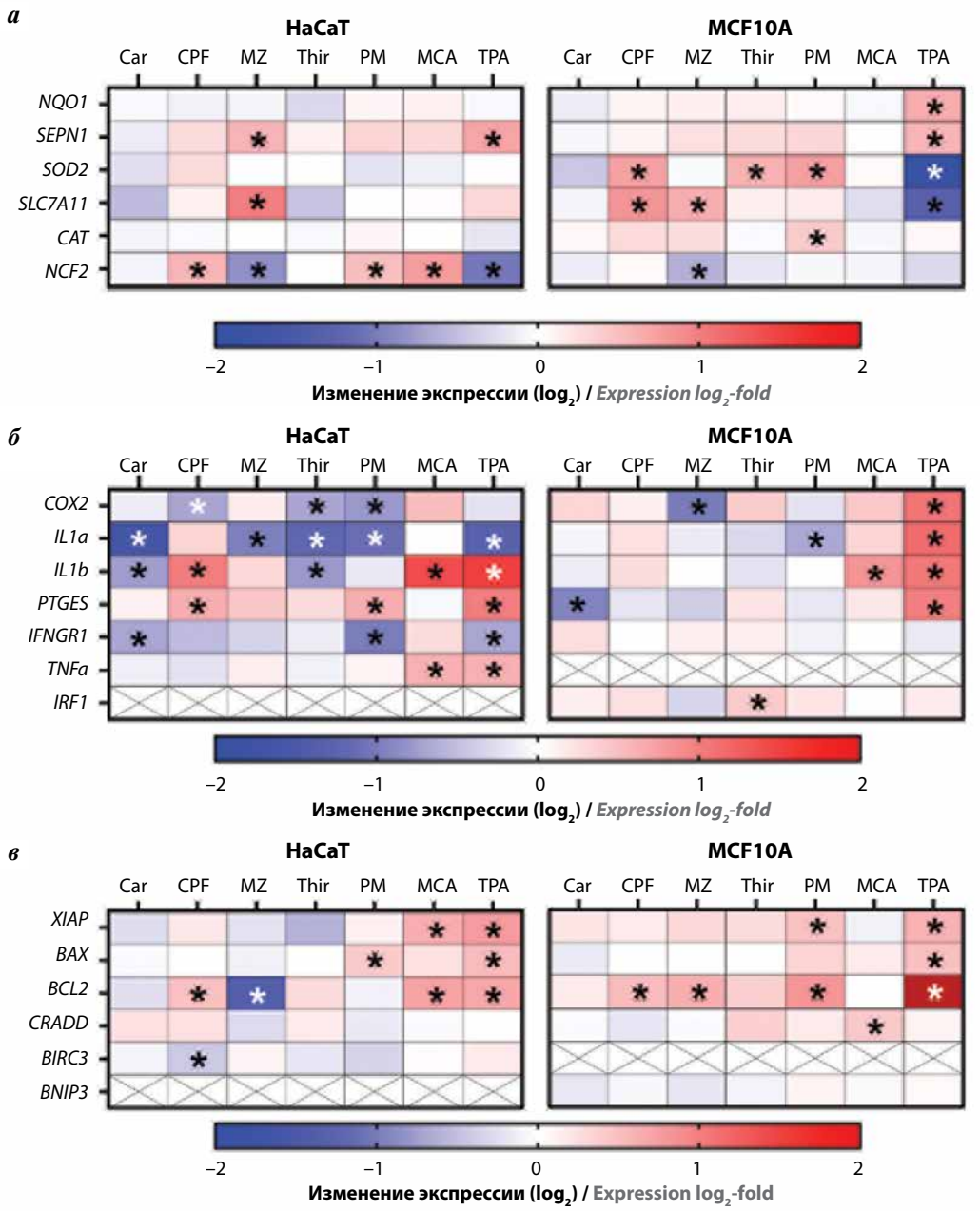

Рис. 6. *Результаты анализа влияния пестицидов, 3-метилхолантрена (MCA) и 12-O-тетрадеканоилфорбол-13-ацетата (TPA) на экспрессию генов, ассоциированных с окислительным стрессом (а), воспалением (б) и апоптозом (в) в клетках HaCaT и MCF10A. Зачеркиванием обозначено, что экспрессию гена не оценивали. Экспозиция к агентам составила 72 ч. Результаты полимеразной цепной реакции в реальном времени выражены через* log_2. ** – различия статистически значимы относительно отрицательного контроля (p <0,05). Car – карбарил; CPF – хлорпирифос; MZ – манкоцеб; Thir – тирам; PM – пендиметалин*

Fig. 6. *Results of analysis of the effect of pesticides, 3-methylcholanthrene (MCA) and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) on expression of genes associated with oxidative stress (a), inflammation (б) and apoptosis (в) in HaCaT and MCF10A cells. Crossing out denotes that gene expression was not evaluated. Exposure time was 72 h. Results of real-time polymerase chain reaction are presented as* log_2. ** – differences are statistically significant relative to negative control (p <0.05). Car – carbaryl; CPF – chlorpyrifos; MZ – mancozeb; Thir – thiram; PM – pendimethalin*

окислительного стресса, за исключением активации гена *NCF2*, необходимого для генерации супероксид-аниона (рис. 6, *а*).

В клетках HaCaT TPA вызывал подавление гена *NCF2* и активировал ген *SEPN1*, а в клетках MCF10A активировал антиоксидантные гены *NQO1* и *SEPN1* и снижал уровень экспрессии генов *SOD2* и *SLC7A11*. При действии CPF происходила активация гена *NCF2* в клетках HaCaT и *SOD2*, *SLC7A11* – в клетках MCF10A. Пестицид MZ активировал экспрессию генов *SEPN1* и *SLC7A11* и подавлял ген *NCF2* в обеих клеточных линиях. PM вызывал повышение уровня экспрессии *NCF2* в клетках HaCaT и активацию антиоксидантных генов *SOD2* и *CAT* в MCF10A.

Все исследуемые агенты влияли на экспрессию генов воспаления. При действии MCA отмечено повышение экспрессии генов *IL1b* и *TNFa* (см. рис. 6, *б*). В клетках HaCaT TPA активировал экспрессию генов *IL1b*, *PTGES* и *TNFa*, одновременно подавляя *IL1a* и *IFNGR1*, а в клетках MCF10A вызывал индукцию генов *COX2*, *IL1a*, *IL1b* и *PTGES*. Обработка Car вызывала снижение уровня экспрессии генов *IL1a*, *IL1b*, *IFNGR1* в HaCaT и гена *PTGES* в MCF10A. При действии CPF происходило повышение уровня экспрессии генов *PTGES* и *IL1b* и слабое снижение экспрессии гена *COX2* в клетках HaCaT. Пестицид MZ подавлял *IL1a* в клетках HaCaT и *COX2* в MCF10A, Thir ингибировал экспрессию генов *COX2*, *IL1a*, *IL1b* в клетках HaCaT и повышал уровень экспрессии гена *IRF1* в MCF10A. В клетках HaCaT агент PM действовал подобно TPA – подавлял экспрессию генов *COX2*, *IL1a* и *IFNGR1* и активировал ген *PTGES*, в клетках MCF10A – только подавлял экспрессию гена *IL1a*.

Канцероген MCA повышал уровень экспрессии антиапоптотических генов *XIAP* и *BCL2* в HaCaT и активировал проапоптотический ген *CRADD* в MCF10A (см. рис. 6, *в*). В свою очередь, TPA активировал экспрессию генов *XIAP* и *BCL2* и повышал уровень экспрессии проапоптотического гена *BAX*. Пестицид CPF активировал экспрессию *BCL2* в обеих линиях и подавлял ген ингибитора апоптоза *BIRC3* – в клетках HaCaT. Экспрессия гена *BCL2* была понижена в клетках HaCaT и повышена в MCF10A при действии MZ. Пестицид PM активировал *BAX* в линии HaCaT и *XIAP*, *BCL2* – в MCF10A.

Инвазия и метастазирование. В линии HaCaT MCA и TPA активировали экспрессию гена *CDH2*, а также снижали экспрессию гена *SERPINE1* (рис. 7).

В клетках MCF10A MCA вызывал снижение экспрессии гена *CDH2*, а TPA активировал гены *CDH1*, *CDH2*, *ROCK2* и *SERPINE1* и подавлял ген *MMP2*. Пестицид Car снижал уровень экспрессии генов *MMP2* и *SERPINE1* в клетках MCF10A, уменьшал экспрессию гена *ROCK2* в клетках HaCaT и повышал экспрессию в клетках MCF10A. При действии CPF происходила репрессия гена *SERPINE1* в линии HaCaT и активация гена *ROCK2* в MCF10A. MZ в клетках MCF10A повышал уровень экспрессии гена *CDH2* и снижал экспрессию гена *MMP2*. В клетках MCF10A Thir индуцировал экспрессию гена *ROCK2*. В клетках HaCaT PM вызывал слабую активацию гена *MMP2* и подавлял ген *SERPINE1*, в клетках MCF10A активировал *CDH2*.

Эпигенетическая регуляция транскрипции. При действии MCA на клетки HaCaT происходило слабое повышение экспрессии генов *HDAC2*, *BRD4* и *KAT5*, при этом в клетках MCF10A влияния этого агента зарегистрировано не было (рис. 8).

Промотор канцерогенеза TPA влиял на экспрессию генов эпигенетической регуляции только в клетках MCF10A: происходило повышение уровня мРНК генов *DNMT1*, *DNMT3b* и *BRD2* и подавление экспрес-

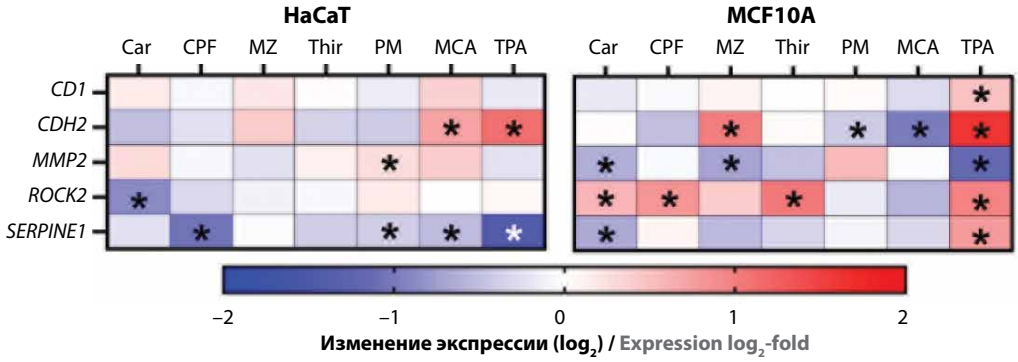

Рис. 7. *Результаты анализа влияния пестицидов, 3-метилхолантрена (MCA) и 12-O-тетрадеканоилфорбол-13-ацетата (TPA) на экспрессию генов, ассоциированных инвазией и метастазированием в клетках HaCaT и MCF10A. Экспозиция к агентам составила 72 ч. Результаты полимеразной цепной реакции в реальном времени, выражены через log_2. * – различия статистически значимы относительно отрицательного контроля (p <0,05). Car – карбарил; CPF – хлорпирифос; MZ – манкоцеб; Thir – тирам; PM – пендиметалин*

Fig. 7. *Results of analysis of the effect of pesticides, 3-methylcholanthrene (MCA) and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) on expression of genes associated with invasion and metastasis in HaCaT and MCF10A cells. Exposure time was 72 h. Results of real-time polymerase chain reaction are presented as log_2. * – differences are statistically significant relative to negative control (p <0.05). Car – carbaryl; CPF – chlorpyrifos; MZ – mancozeb; Thir – thiram; PM – pendimethalin*

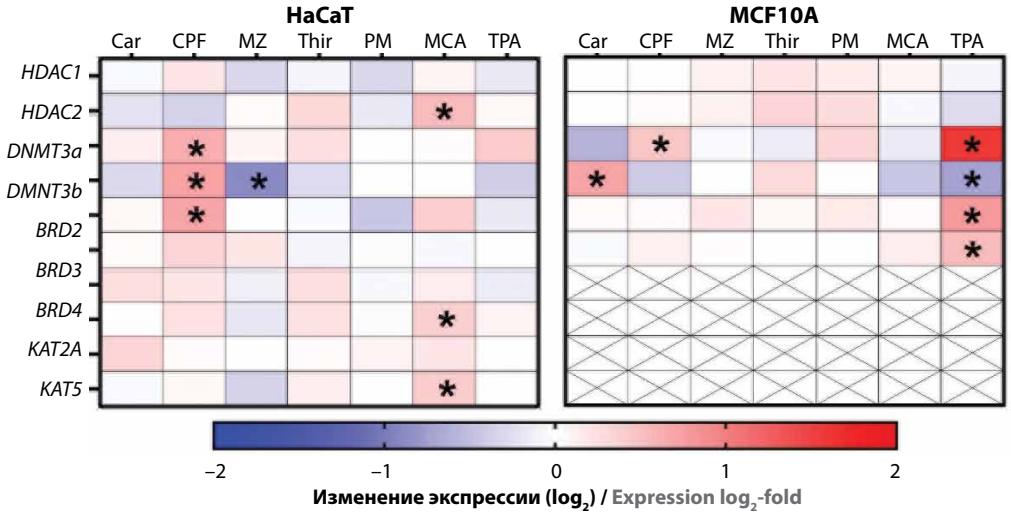

Рис. 8. *Результаты анализа влияния пестицидов, метилхолантрена (MCA) и 12-O-тетрадеканоилфорбол-13-ацетата (TPA) на экспрессию генов, ассоциированных с эпигенетической регуляцией транскрипции в клетках HaCaT и MCF10A. Зачеркиванием обозначено, что экспрессию гена не оценивали. Экспозиция к агентам составила 72 ч. Результаты полимеразной цепной реакции в реальном времени выражены через log_2. * – различия статистически значимы относительно отрицательного контроля, p <0,05. Car – карбарил; CPF – хлорпирифос; MZ – манкоцеб; Thir – тирам; PM – пендиметалин*

Fig. 8. *Results of analysis of the effect of pesticides, 3-methylcholanthrene (MCA) and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) on expression of genes associated with epigenetic transcription regulation in HaCaT and MCF10A cells. Crossing out denotes that gene expression was not evaluated. Exposure time was 72 h. Results of real-time polymerase chain reaction are presented as log_2. * – differences are statistically significant relative to negative control (p <0.05). Car – carbaryl; CPF – chlorpyrifos; MZ – mancozeb; Thir – thiram; PM – pendimethalin*

сии гена *DNMT3a*. Пестициды Car и CPF повышали экспрессию генов *DNMTs*: Car вызывал активацию гена *DNMT3a* в клетках MCF10A, CPF – активацию генов *DNMT1*, *DNMT3a* и *DNMT3b* в клетках HaCaT и гена *DNMT1* в клетках MCF10A. MZ приводил к репрессии гена *DNMT3a* в клетках HaCaT.

ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование посвящено анализу молекулярных эффектов пестицидов Car, CPF, Thir, MZ и PM, активно применяемых на территории России и стран СНГ.

В тесте ДНК-комет 5 мкМ Car при 48-часовой экспозиции вызывал небольшое повреждение ДНК в клетках MCF10A при отсутствии значимых эффектов на гены репарации. Будучи ароматическим углеводородом, Car активирует AhR-зависимый сигналинг [39, 40]. Мы отметили активацию генов биотрансформации *AHR* и *GSTA4* в клетках MCF10A и снижение экспрессии *CYP1B1* и *GSTA4* в HaCaT. При этом в исследовании N. Ledirac и соавт. выявили индукцию фермента CYP1A1 в клетках печени Hep2G и клетках HaCaT при действии 75 мкМ Car [41]. Низкая индукция биотрансформации в нашем исследовании связана, вероятно, с меньшей дозой инсектицида, а снижение экспрессии генов биотранформации в клетках HaCaT – с отрицательной обратной связью [42]. В клоногенном анализе длительное воздействие Car способствовало усилению пролиферации клеток HaCaT и MCF10A, увеличению числа и размера колоний. В то же время Car не вызывал значимых изменений экспрессии генов пролиферации. Q. Saquib и соавт. показали генотоксичность 1 мМ Car на HUVEC, а также повышение АФК и активацию апоптоза [43]. Однако в нашем исследовании экспрессия генов окислительного стресса и апоптоза не менялась. При этом отмечено снижение экспрессии гена – транспортера глюкозы *GLUT1*, что может свидетельствовать об оксидативном стрессе [44, 45]. Также было показано снижение экспрессии генов воспаления *IL1a*, *IL1b*, *PTGES*, *IFNGR1*, что соотносится с результатами исследования S.G. Jorsaraei и соавт. [46].

В настоящем исследовании CPF (10 мкМ) не вызывал повреждения ДНК в клетках HaCaT и MCF10A, но влиял на экспрессию генов репарации *XRCC1*, *ATM* и *ATR*. В литературе описаны повреждение ДНК лимфоцитов, а также активация генов эксцизионной репарации в клетках A549 после воздействия CPF [47, 48]. В нашем исследовании CPF слабо снижал экспрессию генов пролиферации (*CCND2*, *Ki-67*) и активировал ген *E2F4* в клетках HaCaT, но не влиял на клоногенность. Однако, согласно данным P. Balakrishnan и соавт., воздействие 4 мкМ CPF вызывает генотоксичность, а также увеличивает пролиферативную активность в эмбриональных клетках печени WRL-68 при схожем влиянии на гены репарации и пролиферации [49]. Также сообщалось, что низкие дозы CPF (0,05 мкМ) стимулируют пролиферацию клеток MCF7 и MDA-MB-231 [50]. Отсутствие эффекта на клетках MCF10A в нашем исследовании, скорее всего, связано с меньшей дозой, особенностями метаболизма клеток HaCaT, MCF10A и WRL-68, а также с низким уровнем

ER в MCF10A [51]. Влияние CPF как эндокринного дизраптора зависит от активности ER и не проявляется в ER-отрицательных клетках [52–54]. В ходе настоящего исследования подтверждена индукция генов *CYP1A1*, *CYP1B1*, что согласуется с данными о метаболизме CPF через активацию AhR и CYP [50, 55]. Кроме того, впервые выявлена активация гена *GLUT3* под действием этого агента, аналогично канцерогенным агентам MCA и TPA. Показано, что CPF вызывает оксидативный стресс и воспаление *in vitro* и *in vivo* [56, 57]. В нашем исследовании CPF активировал ген окислительного стресса *NCF2*, антиоксидантные гены *SOD2*, *SLC7A11*, а также гены воспаления *IL1b* и *PTGES*. Хроническое воздействие CPF снижает апоптоз в нормальных клетках печени [49]. В нашем исследовании также выявлено повышение экспрессии *BCL2* в клетках HaCaT и MCF10A. На моделях рака молочной железы показано усиление миграционного потенциала клеток при действии CPF [58]. В нашем исследовании детектировано влияние CPF на ген *ROCK2* в клетках MCF10A и ген *SERPINE1* в клетках HaCaT. P. Balakrishnan и соавт. выявили снижение экспрессии генов *DNMTs* при экспозиции CPF 24 ч [49]. Напротив, мы наблюдали слабую активацию генов *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b* после 72 ч обработки, что может свидетельствовать о компенсационном механизме. При этом ранее в рамках скрининга эпигенетической активности ксенобиотиков для CPF нами не было обнаружено интегральной эпигенетической активности в тест-системе HeLa TI (данные не опубликованы).

В клетках HaCaT и MCF10A не выявлено генотоксической активности при действии MZ и Thir. При этом MZ активировал экспрессию гена *ATR*, а Thir – генов *ATR* и *ATM*. Ранее сообщалось о генотоксичных эффектах MZ и Thir *in vitro* и *in vivo* [59, 60]. В клетках HeLa TI для Thir (2 мкМ) наблюдались усиление повреждения ДНК и изменение экспрессии генов репарации *DDB2*, *ERCC5*, *LIG4* и *ERCC3* [61]. Согласно данным литературы, MZ и Thir активируют ферменты CYP [62–65]. Результаты нашего исследования показали менее выраженные эффекты этих агентов: MZ оказывал слабое влияние на гены *CYP1A1* и *CYP1B1*, Thir – на ген *CES2*. В группе генов метаболизма фунгициды незначительно влияли на экспрессию *MCT1* (MZ) и *GLUT3* (Thir). В клетках HaCaT MZ активировал экспрессию генов пролиферации *CCND2*, *CCNE1* и *Ki-67*, однако в клоногенном анализе мы не наблюдали эффектов. В свою очередь, Thir стимулировал пролиферацию клеток HaCaT в клоногенном тесте, но в меньшей степени влиял на экспрессию генов, что может быть связано с кумулятивным эффектом. Ранее мы выявили, что Thir ингибирует рост колоний клеток HeLa TI в диапазоне концентраций 0,5–2 мкМ [61]. По данным K. Kumar и соавт., MZ индуцирует образование АФК, дисбаланс белков BCL-2 и апоптоз в клетках рака желудка при отсутствии токсичности в нормальных клетках [66]. В нашем исследовании MZ вызывал снижение экспрессии гена *NCF2* при повышении экспрессии генов *SEPN1* и *SLC7A11*, что соответствует запуску антиоксидантной защиты. Кроме того, происходило снижение уровня экспрессии генов воспаления *COX2*, *IL1a* и антиапоптотического гена *BCL2* в клетках HaCaT. При действии Thir происходила активация экспрессии антиоксидантного гена *SOD2* в MCF10A, а также снижение экспрессии генов воспаления *COX2*, *IL1a*, *IL1b*, при этом не наблюдалось влияния на экспрессию генов апоптоза. Полученные данные согласуются с результатами D. Kurpios-Piec и соавт. о противовоспалительном эффекте Thir [67]. Существенных изменений в экспрессии генов инвазии и метастазирования под действием этого агента не выявлено, однако в MCF10A наблюдалась активация генов *CDH2*, *ROCK2* и снижение экспрессии *MMP2*, аналогично эффекту TPA. Для MZ показано снижение экспрессии гена *DNMT3a* в клетках HaCaT; Thir не оказывал влияния на гены эпигенетической регуляции транскрипции в обеих клеточных линиях. При этом ранее на тест-системе HeLa TI продемонстрирована способность Thir реактивировать экспрессию эпигенетически репрессированного гена *GFP* [61].

Результаты настоящего исследования продемонстрировали способность PM вызывать повреждение ДНК в клетках MCF10A при отсутствии эффекта в клетках HaCaT, а также активировать гены репарации *ATR* и *PCNA*. По данным литературы, PM вызывал разрывы ДНК, а также способствовал образованию микроядер в первичных лимфоцитах человека и клетках HUVEC [43, 68, 69]. Результаты клоногенного анализа показали отсутствие цитотоксического или пролиферативного действий при длительной экспозиции PM, в то же время зарегистрировано слабое влияние PM на экспрессию генов пролиферации. В данной работе впервые показана способность PM активировать экспрессию генов *CYP1A1* и *CYP1B1* в клетках человека. Отметим также снижение уровня экспрессии гена *GLUT3* в клетках HaCaT. Для PM показана индукция окислительного стресса на модели *in vivo* и *in vitro* [69, 70]. В нашем исследовании при действии PM выявлена индукция экспрессии антиоксидантных генов *CAT* и *SOD2* в клетках MCF10A, в то время как в клетках HaCaT повышалась экспрессия гена *NCF2*, ассоциированного с продуцированием АФК. Также PM значительно снижал экспрессию провоспалительных генов *COX2*, *IL1a* и *IFNGR1* в клетках HaCaT, что соотносится с данными литературы [70]. В клетках HaCaT происходила активация экспрессии проапоптотического гена *BAX*, а в клетках MCF10A – антиапоптотических генов *XIAP* и *BCL2*. Также выявлено, что PM оказывает как про-, так и антиапоптотическое действие [71–73]. Влияние этого агента на инвазию и метастазирование ранее не изучалось. В данном исследовании показано слабое действие PM на гены *CDH2*, *MMP2* и *SERPINE1*. PM не изменял экспрессию генов

эпигенетических ферментов, что согласуется с полученными ранее результатами об отсутствии эпигенетической активности PM в тест-системе HeLa TI (данные не опубликованы).

Таким образом, выявлена пропролиферативная активность Car и Thir в клоногенном тесте при долгосрочном воздействии, при кратковременном воздействии их влияние на молекулярные процессы оказалось незначительным. Следует отметить, что в других моделях *in vitro* Thir значительно воздействовал на эпигенетическую активность и пролиферацию, что обусловливает необходимость его дальнейшего исследования. Несмотря на отсутствие повреждения ДНК при действии CPF, профиль экспрессии генов биотрансформации, метаболизма, репарации, окислительного стресса и инвазии при его действии схож с эффектом индуктора и промотора канцерогенеза – MCA и TPA соответственно, что говорит о потенциальной опасности данного пестицида и необходимости дальнейшего анализа его механизма действия. Особое внимание привлекает влияние CPF на гены *DNMTs*, указывающее на его способность модифицировать эпигенетическую регуляцию транскрипции. Гербицид PM также проявил сходный с MCA и TPA профиль воздействия на экспрессию генов, связанных с биотрансформацией, метаболизмом, окислительным стрессом и апоптозом. По этому агенту в литературе имеется ограниченное количество механистических и экспериментальных данных, что указывает на необходимость дальнейшего исследования его воздействий. Для MZ показано отсутствие генотоксического эффекта и влияния на клоногенность клеток, однако он воздействовал на отдельные гены процессов пролиферации, репарации, воспаления, апоптоза и инвазии. Влияние MZ на экспрессию гена *DNMT3a* демонстрирует необходимость анализа его эпигенетических свойств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данного исследования впервые изучена способность пестицидов Car, Thir, MZ и PM влиять на клоногенный потенциал нормальных клеток, а также проведена интегральная оценка влияния агентов на процессы канцерогенеза на транскрипционном уровне. Выявлено, что наибольшее воздействие на процессы, ассоциированные с канцерогенезом, оказывали PM, CPF и Car.

Одним из важных аспектов является наблюдаемая вариабельность чувствительности различных клеточных моделей к воздействию пестицидов. Анализ данных литературы и результатов наших экспериментов показал, что в оценке канцерогенного потенциала необходимо использовать как нормальные, так и опухолевые клетки. Это обусловлено тем, что опухолевые клетки, по всей видимости, обладают повышенными метаболической активностью и чувствительностью к ксенобиотикам. Для полноценной и адекватной оценки канцерогенного риска требуются дальнейшие исследования с накоплением механистических данных по действию указанных пестицидов на дополнительных клеточных моделях и дальнейший комплексный анализ молекулярных механизмов их действия.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. World Health Organization. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. Available at: https://www.who.int/ru/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services
2. Cancer Tomorrow – IARC. Estimated number of new cases from 2022 to 2050, Both sexes, age [0–85+]. Available at: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?years=2050
3. Wan N.F., Fu L., Dainese M. et al. Pesticides have negative effects on non-target organisms. Nat Commun 2025;16(1):1360. DOI: 10.1038/s41467-025-56732-x
4. Stockholm Convention. The 12 initial POPs under the Stockholm Convention. Available at: https://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/The12initialPOPs/tabid/296
5. IARC. Agents classified by the IARC Monographs, Volumes 1–139. 2025. Available at: https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/
6. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. 2019. Available at: https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/50b79369-9249-4486-ac07-9098d07df60a/content
7. IARC. Report of the Advisory Group to Recommend Priorities for the IARC Monographs during 2025–2029. 2024. Available at: https://www.iarc.who.int/news-events/advisory-group-recommendations-on-priorities-for-the-iarc-monographs-during-2025-2029/
8. Smith M.T., Guyton K.Z., Gibbons C.F. et al. Key Characteristics of carcinogens as a basis for organizing data on mechanisms of carcinogenesis. Environ Health Perspect 2016;124(6):713–21. DOI: 10.1289/ehp.1509912
9. Ataei M., Abdollahi M. A systematic review of mechanistic studies on the relationship between pesticide exposure and cancer induction. Toxicol Appl Pharmacol 2022;456:116280. DOI: 10.1016/j.taap.2022.116280
10. Shekhar C., Khosya R., Thakur K. et al. A systematic review of pesticide exposure, associated risks, and long-term human health impacts. Toxicol Rep 2024;13:101840. DOI: 10.1016/j.toxrep.2024.101840
11. Sule R.O., Condon L., Gomes A.V. A Common Feature of Pesticides: Oxidative Stress-The Role of Oxidative Stress in Pesticide-Induced Toxicity. Oxid Med Cell Longev. 2022;2022:5563759. DOI: 10.1155/2022/5563759
12. Gunasekara A.S., Rubin A.L., Goh K.S. et al. Environmental fate and toxicology of carbaryl. Rev Environ Contam Toxicol. 2008;196:95-121. DOI: 10.1007/978-0-387-78444-1_4
13. De Roos A.J., Schinasi L.H., Miligi L. et al. Occupational insecticide exposure and risk of non-Hodgkin lymphoma: A pooled case-control study from the InterLymph Consortium. Int J Cancer 2021;149(10):1768-86. DOI: 10.1002/ijc.33740
14. Presutti R., Harris S.A., Kachuri L. et al. Pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in men: An analysis of the North

American Pooled Project. Int J Cancer 2016;139(8):1703–14. DOI: 10.1002/ijc.30218
15. Koutros S., Harris S.A., Spinelli J.J. et al. Non-Hodgkin lymphoma risk and organophosphate and carbamate insecticide use in the north American pooled project. Environ Int 2019;127:199–205. DOI: 10.1016/j.envint.2019.03.018
16. Erickson P.A., Andreotti G., Remigio R.V. et al. Carbaryl use and incident cancer in the Agricultural Health Study: an updated analysis. Int J Hyg Environ Health 2025;268:114615. DOI: 10.1016/j.ijheh.2025.114615
17. Shukla Y., Antony M., Mehrotra N.K. Carcinogenic and cocarcinogenic studies with carbaryl following topical exposure in mice. Cancer Lett 1992;62(2):133–40. DOI: 10.1016/0304-3835(92)90183-v
18. Meeker J.D., Singh N.P., Ryan L. et al. Urinary levels of insecticide metabolites and DNA damage in human sperm. Hum Reprod 2004;19(11):2573–80. DOI: 10.1093/humrep/deh444
19. Nandi N.K., Vyas A., Akhtar M.J., Kumar B. The growing concern of chlorpyrifos exposures on human and environmental health. Pestic Biochem Physiol 2022;185:105138. DOI: 10.1016/j.pestbp.2022.105138
20. Lee W.J., Blair A., Hoppin J.A. et al. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agricultural Health Study. J Natl Cancer Inst 2004;96(23):1781–9. DOI: 10.1093/jnci/djh324
21. Tayour C., Ritz B., Langholz B. et al. A case-control study of breast cancer risk and ambient exposure to pesticides. Environ Epidemiol 2019;3(5):e070. DOI: 10.1097/EE9.0000000000000070
22. Ventura C., Nieto M.R., Bourguignon N. et al. Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. J Steroid Biochem Mol Biol 2016;156:1–9. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2015.10.010
23. Hazarika J., Ganguly M., Borgohain G. et al. Endocrine disruption: molecular interactions of chlorpyrifos and its degradation products with estrogen receptor. Structural Chemistry 2020;31:2011–21. DOI: 10.1007/s11224-020-01562-4
24. Leon M.E., Schinasi L.H., Lebailly P. et al. Pesticide use and risk of non-Hodgkin lymphoid malignancies in agricultural cohorts from France, Norway and the USA: a pooled analysis from the AGRICOH consortium. Int J Epidemiol 2019;48(5):1519–35. DOI: 10.1093/ije/dyz017
25. Koutros S., Silverman D.T., Alavanja M.C. et al. Occupational exposure to pesticides and bladder cancer risk. Int J Epidemiol 2016;45(3):792–805. DOI: 10.1093/ije/dyv195
26. Dennis L.K., Lynch C.F., Sandler D.P., Alavanja M.C. Pesticide use and cutaneous melanoma in pesticide applicators in the agricultural heath study. Environ Health Perspect 2010;118(6):812–7. DOI: 10.1289/ehp.0901518
27. Piel C., Pouchieu C., Carles C. et al. Agricultural exposures to carbamate herbicides and fungicides and central nervous system tumour incidence in the cohort AGRICAN. Environ Int 2019;130:104876. DOI: 10.1016/j.envint.2019.05.070
28. Mills P.K., Yang R., Riordan D. Lymphohematopoietic cancers in the United Farm Workers of America (UFW), 1988–2001. Cancer Causes Control 2005;16(7):823–30. DOI: 10.1007/s10552-005-2703-2
29. Vighi M., Matthies M., Solomon K.R. Critical assessment of pendimethalin in terms of persistence, bioaccumulation, toxicity, and potential for long-range transport. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 2017;20(1):1–21. DOI: 10.1080/10937404.2016.1222320
30. Hou L., Lee W.J., Rusiecki J. et al. Pendimethalin exposure and cancer incidence among pesticide applicators. Epidemiology 2006;17(3):302–7. DOI: 10.1097/01.ede.0000201398.82658.50
31. Andreotti G., Freeman L.E., Hou L. et al. Agricultural pesticide use and pancreatic cancer risk in the Agricultural Health Study Cohort. Int J Cancer 2009;124(10):2495–500. DOI: 10.1002/ijc.24185
32. Walsh K.D., Kato T.A. Alkaline comet assay to detect DNA damage. Methods Mol Biol 2023;2519:65–72. DOI: 10.1007/978-1-0716-2433-3_7
33. Guzman C., Bagga M., Kaur A. et al. ColonyArea: an ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. PLoS One 2014;9(3):e92444. DOI: 10.1371/journal.pone.0092444
34. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 2001;25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
35. IARC. Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. 1973. Available at: https://publications.iarc.who.int/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Certain-Polycyclic-Aromatic-Hydrocarbons-And-Heterocyclic-Compounds-1973
36. Robles H. Methylcholanthrene, 3-. Available at: https://www.researchgate.net/publication/304034151_Methylcholanthrene_3-
37. Kawabe M., Urano K., Suguro M. et al. Tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in an ultra-short-term skin carcinogenesis bioassay using rasH2 mice. Vet Pathol 2013;50(5):903–8. DOI: 10.1177/0300985813486811
38. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. Nature 1984;308(5961):693–8. DOI: 10.1038/308693a0
39. Denison M.S., Phelan D., Winter G.M., Ziccardi M.H. Carbaryl, a carbamate insecticide, is a ligand for the hepatic Ah (dioxin) receptor. Toxicol Appl Pharmacol 1998;152(2):406–14. DOI: 10.1006/taap.1998.9999
40. Larigot L., Juricek L., Dairou J., Coumoul X. AhR signaling pathways and regulatory functions. Biochim Open 2018;7:1–9. DOI: 10.1016/j.biopen.2018.05.001
41. Ledirac N., Delescluse C., de Sousa G. et al. Carbaryl induces CYP1A1 gene expression in HepG2 and HaCaT cells but is not a ligand of the human hepatic Ah receptor. Toxicol Appl Pharmacol 1997;144(1):177–82. DOI: 10.1006/taap.1997.8120
42. Honkakoski P., Negishi M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. Biochem J 2000;347(Pt 2):321–37. DOI: 10.1042/0264-6021:3470321
43. Saquib Q., Siddiqui M.A., Ansari S.M. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of methomyl, carbaryl, metalaxyl, and pendimethalin in human umbilical vein endothelial cells. J Appl Toxicol 2021;41(5):832–46. DOI: 10.1002/jat.4139
44. Fernandes R., Hosoya K., Pereira P. Reactive oxygen species downregulate glucose transport system in retinal endothelial cells. Am J Physiol Cell Physiol 2011;300(4):C927–36. DOI: 10.1152/ajpcell.00140.2010
45. Chen Y., Joo J., Chu J.M. et al. Downregulation of the glucose transporter GLUT 1 in the cerebral microvasculature contributes to postoperative neurocognitive disorders in aged mice. J Neuroinflammation 2023;20(1):237. DOI: 10.1186/s12974-023-02905-8
46. Jorsaraei S.G., Maliji G., Azadmehr A. et al. Immunotoxicity effects of carbaryl *in vivo* and *in vitro*. Environ Toxicol Pharmacol 2014;38(3):838–44. DOI: 10.1016/j.etap.2014.09.004
47. Seher Karsli S.Y., Esra F. İncedere düzdağ, Türkan yurdun. Assessment of genotoxic effects of organophosphate and carbamate pesticides by comet assay. İstanbul J Pharm 2022;52(2):136–42. DOI: 10.26650/IstanbulJPharm.2022.1057224
48. Thakur S., Dhiman M., Mantha A.K. APE1 modulates cellular responses to organophosphate pesticide-induced oxidative damage in non-small cell lung carcinoma A549 cells. Mol Cell Biochem 2018;441(1–2):201–16. DOI: 10.1007/s11010-017-3186-7
49. Balakrishnan P., Thirunavukarasu K., Tamizhmani P. Toxicological impact of chronic chlorpyrifos exposure: DNA damage and

epigenetic alterations induces neoplastic transformation of liver cells. Biochem Biophys Res Commun 2025;746:151287. DOI: 10.1016/j.bbrc.2025.151287
50. Moyano P., Garcia J., Garcia J.M. et al. Chlorpyrifos-induced cell proliferation in human breast cancer cell lines differentially mediated by estrogen and aryl hydrocarbon receptors and KIAA1363 enzyme after 24 h and 14 days exposure. Chemosphere 2020;251:126426. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126426
51. Hevir N., Trost N., Debeljak N., Rizner T.L. Expression of estrogen and progesterone receptors and estrogen metabolizing enzymes in different breast cancer cell lines. Chem Biol Interact 2011; 191(1–3):206–16. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.12.013
52. Lasagna M., Ventura C., Hielpos M.S. et al. Endocrine disruptor chlorpyrifos promotes migration, invasion, and stemness phenotype in 3D cultures of breast cancer cells and induces a wide range of pathways involved in cancer progression. Environ Res 2022;204(Pt A):111989. DOI: 10.1016/j.envres.2021.111989
53. Moyano P., Garcia J.M., Garcia J. et al. Chlorpyrifos induces cell proliferation in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, through cholinergic and Wnt/beta-catenin signaling disruption, AChE-R upregulation and oxidative stress generation after single and repeated treatment. Food Chem Toxicol 2021;152:112241. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112241
54. Ventura C., Nunez M., Miret N. et al. Differential mechanisms of action are involved in chlorpyrifos effects in estrogen-dependent or -independent breast cancer cells exposed to low or high concentrations of the pesticide. Toxicol Lett 2012;213(2):184–93. DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.06.017
55. Croom E.L., Wallace A.D., Hodgson E. Human variation in CYP-specific chlorpyrifos metabolism. Toxicology 2010;276(3):184–91. DOI: 10.1016/j.tox.2010.08.005
56. Montanari C., Franco-Campos F., Taroncher M. et al. Chlorpyrifos induces cytotoxicity via oxidative stress and mitochondrial dysfunction in HepG2 cells. Food Chem Toxicol 2024;192:114933. DOI: 10.1016/j.fct.2024.114933
57. Radhey S. Verma A.M., Nalini Srivastava. *In vivo* chlorpyrifos induced oxidative stress: Attenuation by antioxidant vitamins. Pesticide Biochemistry and Physiology 2007;88(2):191–6. DOI: 10.1016/j.pestbp.2006.11.002
58. Lasagna M., Hielpos M.S., Ventura C. et al. Chlorpyrifos subthreshold exposure induces epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. Ecotoxicol Environ Saf 2020;205:111312. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111312
59. Yahia D., El-Amir Y.O., Rushdi M. Mancozeb fungicide-induced genotoxic effects, metabolic alterations, and histological changes in the colon and liver of Sprague Dawley rats. Toxicol Ind Health 2019;35(4):265–76. DOI: 10.1177/0748233719834150
60. Pienkowska M., Zielenska M. Genotoxic effects of thiram evaluated by sister-chromatid exchanges in human lymphocytes. Mutat Res 1990;245(2):119–23. DOI: 10.1016/0165-7992(90)90010-h
61. Maksimova V., Bukina A., Khayrieva G. et al. Thiram effects on HeLa TI cells. Proceedings 2024;102(1):35. DOI: 10.3390/proceedings2024102035
62. Lori G., Tassinari R., Narciso L. et al. Toxicological Comparison of mancozeb and zoxamide fungicides at environmentally relevant concentrations by an *in vitro* approach. Int J Environ Res Public Health 2021;18(16):8591. DOI: 10.3390/ijerph18168591
63. Bhaskar R., Mishra A., Mohanty B. Effects of mancozeb and imidacloprid pesticides on activities of steroid biosynthetic enzymes cytochromes P450. J Kalash Sci 2014;2:1–6.
64. Dalvi P.S., Wilder-Ofie T., Mares B. et al. Toxicologic implications of the metabolism of thiram, dimethyldithiocarbamate and carbon disulfide mediated by hepatic cytochrome P450 isozymes in rats. Pesticide Biochemi Physiol 2002;74(2):85–90.
65. Dalvi P.S., Wilder-Ofie T., Mares B. et al. Effect of cytochrome P450 inducers on the metabolism and toxicity of thiram in rats. Vet Hum Toxicol 2002;44(6):331–3.
66. Kumar K., Sabarwal A., Singh R.P. Mancozeb selectively induces mitochondrial-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cells through ROS generation. Mitochondrion 2019;48:1–10. DOI: 10.1016/j.mito.2018.06.003
67. Kurpios-Piec D., Grosicka-Maciag E., Wozniak K. et al. Thiram activates NF-kappaB and enhances ICAM-1 expression in human microvascular endothelial HMEC-1 cells. Pestic Biochem Physiol 2015;118:82–9. DOI: 10.1016/j.pestbp.2014.12.003
68. Sarigol Kilic Z., Aydin S., Undeger Bucurgat U., Basaran N. *In vitro* genotoxicity assessment of dinitroaniline herbicides pendimethalin and trifluralin. Food Chem Toxicol 2018;113:90–8. DOI: 10.1016/j.fct.2018.01.034
69. Ansari S.M., Saquib Q., Attia S.M. et al. Pendimethalin induces oxidative stress, DNA damage, and mitochondrial dysfunction to trigger apoptosis in human lymphocytes and rat bone-marrow cells. Histochem Cell Biol 2018;149(2):127–41. DOI: 10.1007/s00418-017-1622-0
70. Ahmad M.I., Zafeer M.F., Javed M., Ahmad M. Pendimethalin-induced oxidative stress, DNA damage and activation of anti-inflammatory and apoptotic markers in male rats. Sci Rep 2018;8(1):17139. DOI: 10.1038/s41598-018-35484-3
71. Lee H.S., Amarakoon D., Tamia G. et al. Pendimethalin induces apoptotic cell death through activating ER stress-mediated mitochondrial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells. Food Chem Toxicol 2022;168:113370. DOI: 10.1016/j.fct.2022.113370
72. Ham J., Lim W., Song G. Pendimethalin induces apoptosis in testicular cells via hampering ER-mitochondrial function and autophagy. Environ Pollut 2021;278:116835. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.116835
73. Sarigol-Kilic Z., Undeger-Bucurgat U. The Apoptotic and Anti-apoptotic Effects of Pendimethalin and Trifluralin on A549 Cells In Vitro. Turk J Pharm Sci 2018;15(3):364–9. DOI: 10.4274/tjps.94695

Вклад авторов

Е.С. Лылова: получение данных для анализа, анализ данных, написание текста статьи, подготовка иллюстративного материала;
В.Г. Попова: анализ данных, подготовка иллюстративного материала;
К.А. Зимин, А.Ю. Букина, В.А. Нуртдинова, С.С. Шмаков: получение данных для анализа;
М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов: анализ данных, редактирование;
В.П. Максимова: разработка дизайна исследования, анализ данных, подготовка иллюстративного материала, редактирование.

Authors' contributions

E.S. Lylova: obtaining data for analysis, data analysis, article writing, preparation of illustrative material;
V.G. Popova: data analysis, preparation of illustrative material;
K.A. Zimin, A.Yu. Bukina, V.A. Nurtdinova, S.S. Shmakov: obtaining data for analysis;
M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov: data analysis, editing;
V.P. Maksimova: research design development, data analysis preparation of illustrative material, editing.

ORCID авторов / ORCID authors
Е.С. Лылова / E.S. Lylova: https://orcid.org/0000-0001-6388-1624
К.А. Зимин / K.A. Zimin: https://orcid.org/0009-0008-7714-114X
А.Ю. Букина / A.Yu. Bukina: https://orcid.org/0000-0002-0963-3432
В.Г. Попова / V.G. Popova: https://orcid.org/0000-0002-7301-605X
В.А. Нуртдинова / V.A. Nurtdinova: https://orcid.org/0009-0001-2694-3387
С.С. Шмаков / S.S. Shmakov: https://orcid.org/0009-0001-7152-7083
М.Г. Якубовская / M.G. Yakubovskaya: https://orcid.org/0000-0002-9710-8178
К.И. Кирсанов / K.I. Kirsanov: https://orcid.org/0000-0002-8599-6833
В.П. Максимова / V.P. Maksimova: https://orcid.org/0000-0003-0896-2952

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00541).
Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 23-25-00541).

Статья поступила: 12.12.2024. **Принята к публикации:** 07.08.2025. **Опубликована онлайн:** 06.10.2025.
Article submitted: 12.12.2024. **Accepted for publication:** 07.08.2025. **Published online:** 06.10.2025.