

Профилактическая токсикология и гигиеническое нормирование

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Илюшина Н.А., Егорова О.В., Ревазова Ю.А.

ПРИМЕНИМОСТЬ ТЕСТА ЭЙМСА И МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА *IN VIVO* ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ТЕХНИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ ПЕСТИЦИДОВ ОРИГИНАЛЬНЫМ ДЕЙСТВУЮЩИМ ВЕЩЕСТВАМ

ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 141014, Московская область, Мытищи

Введение. Пестициды-аналоги могут отличаться по своим свойствам от оригинальных продуктов из-за повышенного уровня или изменённого состава примесей. Поэтому для обеспечения безопасного применения таких аналогов необходимо определить их эквивалентность по ряду критериев, включая мутагенность. В статье приведён сравнительный анализ результатов исследования генотоксичности-технических продуктов действующих веществ пестицидов в условиях *in vitro* и *in vivo* с целью оценки применимости таких методов для определения эквивалентности пестицидов-аналогов запатентованным продуктам.

Материал и методы. Исследована генотоксичность 99 технических продуктов пестицидов (59 наименований) методами *in vitro* (тест Эймса) и *in vivo* (микроядерный тест).

Результаты. В тесте Эймса мутагенные зависимости от дозы эффекты выявлены при исследовании технических продуктов мезотриона, диметоата и пендиметалина как в присутствии, так и в отсутствие системы метаболической активации. В тесте *in vivo* обнаружено повышение частоты образования микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей после введения шести технических продуктов: мезотриона, пиримифос-метила, диметоата, глифосата (2 продукта), изопротурона. Кроме того, регистрировали различные уровни генотоксических эффектов при действии технических продуктов одного и того же действующего вещества от разных производителей, что может быть обусловлено различиями в качественном и количественном составе примесей.

Заключение. Исследование показало, что тесты *in vitro* и *in vivo* не всегда дают совпадающие результаты при оценке генотоксичности. Поэтому использование только одного теста оценки обратных мутаций у бактерий может быть недостаточным для определения эквивалентности технических продуктов оригинальным действующим веществам. Для получения надёжных доказательств безопасного применения пестицидов-аналогов необходимо тестирование с использованием как минимум двух методов на разных тест-объектах.

Ключевые слова: пестициды, генотоксичность, эквивалентность, методы, обратные генные мутации, микроядерный тест.

Для цитирования: Илюшина Н.А., Егорова О.В., Ревазова Ю.А. Применимость теста Эймса и микроядерного теста *in vivo* для оценки эквивалентности технических продуктов пестицидов оригинальным действующим веществам. *Гигиена и санитария*. 2019; 98 (2): 219-224. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-2-219-224>

Для корреспонденции: Илюшина Наталья Алексеевна, канд. биол. наук, зав. отд. генетической токсикологии Института гигиены, токсикологии пестицидов и химической безопасности ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская область, Мытищи. E-mail: Ilyushina-na@mail.ru

Долевое участие авторов: Илюшина Н.А. – 60%; Егорова О.В. – 30%; Ревазова Ю.А. – 10%.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.06.2018

Принята к печати 06.02.2019

Ilyushina N.A., Egorova O.V., Revazova Yu.A.

APPLICABILITY OF THE AMES TEST AND MICRONUCLEUS TEST *IN VIVO* FOR THE EVALUATION OF THE EQUIVALENCE OF PESTICIDE TECHNICAL GRADE ACTIVE INGREDIENTS COMPARED TO ORIGINAL ACTIVE SUBSTANCES

F.F. Erisman Federal Scientific Center of Hygiene of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Mytishchi, 141014, Russian Federation

Introduction. Analogs of pesticides may differ from the original products in their properties because of the elevated level or the modified composition of the impurities. Therefore, it is necessary to determine the equivalence of such analogs using a number of criteria, including mutagenicity, to ensure their safety. The article compares the results of the research of genotoxic effects of technical grade active ingredients of pesticides *in vitro* and *in vivo* conditions to assess the applicability of such methods for equivalence determination of analogs of pesticides to patented products.

Material and methods. The genotoxicity of 99 technical grade active ingredients of pesticides (59 names) was studied *in vitro* (Ames test) and *in vivo*.

Results. In the Ames test mutagenic dose-dependent effects were revealed in the study of technical products of me-sotrione, dimethoate, and pendimethalin both in the presence and in the absence of a metabolic activation system.

In the in vivo test, a statistically significant dose-dependent increase in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow was detected after administration of six technical products mesotrione, pyrimiphos-methyl, dimethoate, glyphosate (2 products), isoproturon. Furthermore, different levels of genotoxic effects were found with technical materials of the same active ingredient from various productions, probably due to differences in the qualitative and quantitative composition of impurities.

Conclusion. *The present study indicated that in vitro and in vivo tests do not always demonstrate the same results of the genotoxicity assessment. Therefore, the use of only one bacterial reverse mutation test may not be sufficient to determine the equivalence of technical grade active ingredients of pesticides to the original active substances. To obtain a reliable evidence for the safe use of analogs of pesticides, it is necessary to use at least two methods on different test objects.*

Key words: pesticides; genotoxicity; equivalency; methods; reverse gene mutations; micronucleus test.

For citation: Ilyushina N.A., Egorova O.V., Revazova Yu.A. Applicability of the Ames test and micronucleus test *in vivo* for the evaluation of the equivalence of pesticide technical grade active ingredients compared to original active substances. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2019; 98(2): 219-224. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-2-219-224>

For correspondence: Nataliya A. Ilyushina, PhD., Head of Genetic Toxicology Department of the Institution of Hygiene, Toxicology of Pesticides and Chemical Safety of the Federal Budgetary Establishment of Science «Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman» of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Mytishchi, 141014, Russian Federation. E-mail: Ilyushina-na@mail.ru

Information about the author:

Ilyushina N.A., <http://orcid.org/0000-0001-9122-9465>; Egorova O.V., <http://orcid.org/0000-0003-4748-8771>

Contribution: Ilyushina N.A. – 60%; Egorova O.V. – 30%; Revazova Yu.A. – 10%.

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received: 25 June 2018

Accepted: 06 February 2019

Введение

Большую долю на рынке химических средств защиты растений в Российской Федерации в настоящее время занимают пестициды-аналоги. После истечения срока патентной защиты оригинального действующего вещества его одновременно могут воспроизводить разные компании [1]. Несмотря на то что поступающие из новых источников технические продукты содержат одно то же действующее вещество, они могут отличаться по своим свойствам и активности из-за повышенного уровня или изменённого состава примесей. Поэтому для обеспечения безопасного применения таких аналогов необходимо оценить их эквивалентность оригинальным продуктам.

Алгоритм оценки эквивалентности пестицидов разработан и описан в международных документах [2–4]. В тех случаях, когда в технических продуктах обнаруживают новые примеси или когда превышены уровни примесей, имеющихся в оригинальном продукте, одним из важных показателей, учитываемых при принятии решения, является результат оценки генотоксической активности. Согласно рекомендациям ФАО/ВОЗ, уже на 1 этапе процедуры определения эквивалентности необходимо сопоставить профили мутагенности (на бактериях *in vitro*) для тестируемого технического продукта и оригинального действующего вещества. При этом сравнивают показатели по отдельным конечным точкам и общий результат теста, которые не должны быть хуже, чем в случае использования для сравнения продукта.

Согласно рекомендациям Европейской Комиссии, оценка мутагенного потенциала проводится при наличии новых/повышенных уровней примесей. Если содержание примесей больше 0,1%, но не превышает 1%, следует использовать тест Эймса (или другой тест, если SAR-анализ свидетельствует об особом механизме действия, например, о нарушении веретена деления в клетках). Если тест Эймса (или другой используемый тест) не даёт четкого отрицательного результата, требуется дополнительное тестирование генотоксичности *in vitro*. При этом важно, чтобы в исследовании была использована наибольшая возможная доза, чтобы адекватно оценить мутагенный потенциал примеси, присутствующей в техническом про-

дукте на низком уровне. В случаях, когда новая примесь или примесь, содержание которой превышено, присутствует на уровне > 1%, требуются исследования генотоксичности с использованием трёх тестов *in vitro*. Если все три теста не дают четкого отрицательного результата, проводят эксперименты *in vivo*. Так же, как и в тесте Эймса, во всех остальных исследованиях выбранный диапазон доз должен включать наибольшую возможную дозу, чтобы выявить эффекты примесей.

Из литературы известно, что тест Эймса позволяет выявить 60–80% мутагенов, которые проявляют генотоксичность у млекопитающих [5, 6]. Поэтому некоторые мутагенные примеси можно не обнаружить при использовании только одного такого метода. Согласно общей стратегии оценки мутагенности пестицидов для получения надёжных результатов необходимо использовать несколько методов на разных тест-объектах [7–9].

Целью данного исследования было сравнение результатов анализа генотоксичности в тестах *in vitro* (тест Эймса) и *in vivo* (микроядерный тест на эритроцитах костного мозга мышей) различных технических продуктов действующих веществ пестицидов и оценка применимости таких методов для определения эквивалентности пестицидов-аналогов оригинальным продуктам.

Материал и методы

Проведено исследование 99 технических продуктов пестицидов-аналогов (59 разных наименований) в тестах *in vitro* и *in vivo*.

Оценку обратных мутаций у бактерий проводили, используя тест Эймса (стандартный чашечный метод) без метаболической активации и в присутствии микросомной активирующей смеси (20–30%) [10, 11]. В качестве тест-объектов использовали штаммы *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA1535, TA100 и TA102, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПИМ).

Штаммы бактерий поддерживали на твердой LB-среде, хранили при 4–6 °С и подвергали периодическому генетическому анализу.

Перед началом эксперимента бактерии высевали в

жидкую среду LB (15–20 мл) и инкубировали в термостате при $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ в течение 3–4 ч (при встряхивании 120–130 об/мин) до плотности приблизительно 10^9 /мл. Определение мутности суспензии проводили с помощью денситометра DEN-1B (BioSan, Латвия) и стандартов мутности 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 единиц Мак-Фарланда (Pro-Lab Diagnostics, США).

Для получения постмитохондриальной фракции печени крыс (S9, концентрация белка 20–22 мг/мл) печёночные оксигеназы индуцировали внутрибрюшинным введением раствора Арохлора 1254 (35 мг/кг) самцам белых крыс со средней массой 150–180 г ежедневно в течение пяти суток. Животных умерщвляли, используя CO_2 .

В качестве отрицательного контроля использовали варианты с растворителем. Положительными контролями служили 2-аминоантрацен, 2-нитрофлуорен, азид натрия, метилметансульфонат и 9-аминоакридин. Для каждого уровня доз испытываемых образцов использовали три повтора. Учёт числа ревертантных колоний осуществляли после инкубации бактерий в течение 48–72 ч при $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Мутагенную активность в тесте Эймса оценивали по кратности превышения среднего числа ревертантов на чашку в опытном варианте по сравнению с отрицательным контролем и наличием статистически значимого зависящего от дозы эффекта. В качестве критерия биологической значимости результатов использовали показатель кратности превышения среднего числа ревертантных колоний на чашку в опыте к контролю в 2 или более раз в случае штаммов TA97, TA98, TA100, TA102 и в 3 или более раз в случае TA1535 [12, 13].

Для оценки генотоксичности *in vivo* использовали микроядерный тест на эритроцитах костного мозга мышей линии CD-1 обоих полов [14, 15]. Животных получали из питомника Филиала «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства России.

Использовали по пять мышей на группу. Исследуемые образцы технических продуктов вводили внутривентриально в трёх дозах, отличающихся в 2–3 раза. Максимальная доза либо соответствовала МПД, максимальной переносимой дозе, определяемой в предварительном эксперименте, либо, в случае малотоксичных пестицидов, составляла 2000 мг/кг массы тела (максимальная доза согласно руководству OECD № 474). Пестициды вводили два раза с интервалом в 24 ч. Одновременно в качестве отрицательного контроля вводили наполнитель. В качестве положительного контроля использовали циклофосфамид, который вводили внутривентриально в дозе 40 мг/кг один раз одновременно со вторым введением исследуемых образцов. Животных умерщвляли методом цервикальной дислокации через 22 ч после второго введения.

Костный мозг вымывали из бедренных костей эмбриональной сывороткой телёнка и готовили по 2 микропрепарата костного мозга от каждого животного в соответствии с общепринятой методикой [16]. Микропрепараты красили, используя набор Leucodif 200 (Erba Lachema s.r.o., CZ), независимо кодировали и исследовали микроскопически (микроскоп Nikon Eclipse Ci-L, Япония), подсчитывая по 4000 полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) в случае оценки частоты микроядер, а также определяли долю ПХЭ от общего числа эритроцитов, подсчитывая не менее 500 эритроцитов для каждого животного.

Статистическую обработку проводили с помощью программы SPSS Statistics v.22.0 (Корпорация IBM, Нью-Йорк, США). Для оценки результатов, полученных в тесте Эймса, использовали критерий Даннетта *t* и ранговый метод Спирмена.

Обработку данных микроядерного теста осуществляли с помощью построения обобщённой лог-линейной модели для распределения Пуассона [17]. Линейную зависимость эффектов от дозы проверяли методом Мантеля–Хензеля [18].

Результаты

При изучении технических продуктов действующих веществ пестицидов-аналогов в тесте Эймса мутагенные эффекты выявлены в случае исследования образцов технических продуктов мезотриона, диметоата и пендиметалина в условиях метаболической активации и без неё (см. таблицу, «+»).

Наблюдала статистически значимое зависимое от дозы увеличение числа ревертантов по сравнению с соответствующими отрицательными контролями при действии высоких доз технических продуктов: диметоата (образец 1) (1,25–5,0 мг/чашка) на штаммах TA100 и TA102; диметоата (образец 2) на штаммах TA97, TA100 и TA102 (1,6–5,0 мг/чашка) и пендиметалина на штаммах TA100, TA102, TA97 и TA98 (1,25–5,0 мг/чашка). Анализ генотоксической активности трёх технических продуктов мезотриона показал, что образец с наименьшим содержанием действующего вещества проявлял более высокую активность на большем количестве штаммов (TA1535 (+S9/-S9); TA97 (+S9); TA102 (-S9)), по сравнению с другими техническими продуктами.

Неопределённые результаты в тесте Эймса на штамме TA1535 получены при тестировании технических продуктов пиримифос-метила и одного из образцов хизалофоп-П-этила, высокие дозы которых индуцировали статистически значимое зависящее от дозы превышение числа ревертантов по сравнению со спонтанным фоном мутирования в отсутствие системы метаболической активации. Но при этом максимальная кратность превышения числа ревертантов составила 1,6 и 1,7, соответственно. Аналогичные эффекты наблюдали на штамме TA98 при тестировании оксифлуорена (+S9/-S9) в диапазоне концентраций 0,5–5,0 мг/чашка и азоксисторбина (+S9) в максимальной концентрации 5,0 мг на чашку. При этом кратность увеличения числа ревертантов не превышала 2.

В тестах *in vivo* обнаружено повышение частоты образования микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей при введении шести образцов технических продуктов, среди которых вещества из классов трикетонов (мезотрион), фосфорорганических соединений (пиримифос-метил), производных глицина (глифосат), производных фенилмочевины (изопротурон) (см. таблицу, «+»). В большинстве случаев наблюдаемые эффекты были статистически значимы только при высоких дозах, за исключением одного из технических продуктов мезотриона, вызывавшего значимое увеличение частоты образования микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей при всех исследованных дозах в диапазоне от 500 до 2000 мг/кг массы тела. Кроме того, была выявлена линейная зависимость генотоксического действия от дозы каждого из указанных технических продуктов.

При введении некоторых других технических продуктов (десмедифама, дикамбы, мезотриона, имазетапира, глифосата) также наблюдали линейные зависимости эффектов от дозы, хотя статистически значимого превышения частоты индукции микроядер не было обнаружено, и все значения находились в пределах границ распределения исторического отрицательного контроля (см. таблицу, «±»). Следует отметить, что даже при статистической значимости полученных результатов значения частоты ин-

Сравнение генотоксических эффектов, оцениваемых в тестах *in vitro* и *in vivo*

Класс	Действующее вещество	Количество технических продуктов	Эффект	
			<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
Неоникотиноиды	Тиаметоксам	1	-	-
	Имидаклоприд	5	-/-/-/-	-/-/-/-
	Тиаклоприд	1	-	-
	Клотианидин	2	-/-	-/-
Триазолы	Тритиконазол	1	-	-
	Ципроконазол	1	-	-
	Флутриафол	3	-/-/-	-/-/-
	Тебуконазол	3	-/-/-	-/-/-
	Пропиконазол	1	-	-
	Дифеноконазол	2	-/-	-/-
	Прометрин	1	-	-
Триазины	Тербутилазин	2	-/-	-/-
	Метрибузин	1	-	-
Триазиноны	Мезотрион	3	+/+/+	+/±/-
Трикетоны	Флорасулам	1	-	-
Триазолпиримидины	Римсульфурон	1	-	-
	Метсульфуронметил	2	-/-	-/-
	Тифенсульфурон-метил	1	-	-
	Трибенурон-метил	2	-/-	-/-
	Этаметсульфуронметил	2	-/-	-/-
	Никосуфурон	2	-	-
	Хлорсульфурон	1	-	-
	Изопротурон	1	-	+
	Имазамокс	4	-/-/-/-	-/-/-/-
	Имазетапир	1	-	±
Имидазолы	Имазалил	2	-/-	-/-
	Тиабендазол	1	-	-
Бензимидазолы	Дикамба кислота	2	-/-	-/-
	Дикамба ДМА	1	-	±
Производные бензойной кислоты	Бентазон	2	-/-	-/-
	Десмедифам	2	-/-	-/±
Бензотиадиазиноны	Фенмедифам	2	-/-	-/-
	Этофумезат	2	-/-	-/±
Карбаматы	С-метолахлор	4	-/-/-/-	-/-/-/-
	Пропизахлор	1	-	-
Бензофураны	Пиримифос-метил	1	±	+
	Диметоат	2	+/+	-/+
	Фипронил	1	-	-
Хлорацетамиды	Дикват	3	-/-/-	-/-/-
	Мефенпир диэтил	1	-	-
Фосфорорганические соединения	Пендиметалин	1	+	-
	Дитианон	1	-	-
Производные пиридинкарбоновых кислот	Клопиралид	3	-/-/-	-/-/-
	Пиклорам	1	-	-
	2,4-Д кислота	1	-	-
Феноксикарбоновые кислоты	2-этилгексильный эфир 2,4-Д кислоты	1	-	-
	Хизалофоп-П-этил	2	-/±	-/-
	Феноксапроп-П-этил	1	-	-
Арилоксифеноксипропионаты	Биспирибак кислота	1	-	-
	Карбоксин	1	-	-
Пиримидинилоксибензойная кислота	Диметоморф	1	-	-
	Клетодим	1	-	-
Производные оксатиина	Флуазинам	1	-	-
	Хлороталонил	2	-/-	-/-
Амиды коричной кислоты	Дифлюфеникан	1	-	-
	Оксифлуорен	1	±	-
Циклодионгександион-оксимы	Циперметрин	1	-	-
	Альфа-циперметрин	1	-	-
Фенилпиридинамины	Азоксистробин	1	±	-
	Глифосат	4	-	+/+/±/-

Примечание. «-» – отсутствие эффекта; «+» – наличие значимого эффекта; «±» – неопределенный результат (в тесте Эймса – статистически значимый результат, но кратность превышения количества ревертантных колоний < 2; в микроядерном тесте – значимая зависимость от дозы, но нет статистически значимого отличия от отрицательного контроля).

дукции микроядер в полихроматофильных эритроцитах были на уровне или незначительно выходили за верхний предел исторического отрицательного контроля в лаборатории, что свидетельствует о низком уровне генотоксичности.

В исследовании выявлены различные уровни цитогенетических эффектов при действии разных технических продуктов одного и того же действующего вещества (мезотриона, глифосата, диметоата, хизалафоп-П-этила), что может быть обусловлено различиями в качественном и количественном составе примесей (см. таблицу).

Сопоставление эффектов, выявляемых в двух тестах, показало, что в большинстве случаев получены однонаправленные результаты. Совпадение результатов двух тестов наблюдали примерно в 80% случаев.

Как видно из таблицы, один из пестицидов – пендиметалин – проявлял мутагенность в тесте Эймса, но не вызывал цитогенетических нарушений в клетках мышей *in vivo*. Тогда как изопротурон и глифосат вызывали слабые генотоксические эффекты только *in vivo* и не индуцировали генные мутации у бактерий.

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о том, что тест Эймса и микроядерный тест *in vivo*, использованные для оценки генотоксичности пестицидов-аналогов, дают достаточно хорошо совпадающие результаты (~80%), что подтверждает применимость бактериальной системы *in vitro* для скрининговых оценок потенциальной мутагенности. Однако некоторые пестициды из классов фосфорорганических соединений, производных динитроанилинов, фенилмочевины и глицина проявляли разную активность в условиях *in vivo* и *in vitro*, что свидетельствует о использовании только одного теста оценки обратных мутаций у бактерий (теста Эймса), что может быть недостаточным для определения эквивалентности технических продуктов оригинальным действующим веществам.

Различия в результатах, полученных в разных тестах, могут быть обусловлены не только тем, что условия *in vitro* не всегда воспроизводят все этапы метаболизма в многоклеточном организме, но и тем, что используемые методы позволяют регистрировать разные виды мутаций. В тесте Эймса можно выявить только генные мутации, тогда как микроядерный тест позволяет обнаружить хромосомные и геномные мутации. Таким образом, чтобы оценить весь спектр мутационных событий, к которым может приводить воздействие пестицидов, необходимо применение, по меньшей мере, двух указанных тестов (или других методов, позволяющих регистрировать аналогичные виды мутаций). Более того, в тех случаях, когда невозможно дать однозначного заключения о потенциальной мутагенной опасности пестицида (при разнонаправленных результатах двух тестов), целесообразно добавление ещё одного теста, например, можно оценивать повреждения ДНК в клетках млекопитающих *in vivo* методом ДНК-комет [19]. Такой метод можно сочетать с микроядерным тестом в одном эксперименте, чтобы не увеличивать количество используемых животных.

Чётко позитивные результаты были получены *in vitro* на бактериях при действии мезотриона, диметоата и пендиметалина и в микроядерном тесте *in vivo* при введении мышам мезотриона, пиримифос-метила, глифосата и изопротурона.

Полученные результаты согласуются с литературными данными. Так, в большинстве проведённых исследований с использованием теста Эймса глифосат не индуцировал генные мутации у бактерий, тогда как в некоторых иссле-

дованиях с использованием микроядерного теста *in vitro* и *in vivo*, проводимом на разных объектах, были получены положительные результаты [20–22].

Согласно данным, опубликованным в отчёте Совместного совещания ФАО/ВОЗ по остаточным количествам пестицидов, оригинальное действующее вещество пендиметалина не обладает генотоксичностью [23]. В то же время анализ литературы показал, пендиметалин вызывал зависящее от дозы и статистически достоверное увеличение частоты генных мутаций по сравнению с соответствующими отрицательными контролями у бактерий *S. typhimurium*, но не проявлял кластогенной активности в микроядерном тесте [24–26].

Изопротурон вызывал статистически значимые зависящие от дозы генотоксические эффекты в тестах по оценке хромосомных aberrаций и индукции микроядер, при этом в микроядерном тесте его эффект был значимым только на высокой дозе [27]. Однако он не индуцировал генные мутации у бактерий *S. typhimurium* и *E. coli* [28]. Следует отметить, что изопротурон при высоких дозах является цитотоксичным для бактериальных клеток, поэтому существует вероятность, что проявляемые признаки цитотоксичности технического продукта в тесте Эймса нивелируют генотоксические эффекты, регистрируемые в микроядерном тесте.

Что касается диметоата, то в ряде исследований 1980–1990 гг. были получены положительные результаты в тесте Эймса, главным образом на штамме TA100 [29].

Согласно отчёту Европейской комиссии, технические продукты мезотриона могут содержать мутагенные примеси, которые вызывают генотоксические эффекты даже при низкой концентрации (> 0,0002% масс.) [30].

Полученные в данном исследовании результаты, а именно выявленные низкие уровни мутагенной активности технических продуктов на бактериях и цитогенетических эффектов на млекопитающих, а также тот факт, что в большинстве случаев они наблюдались только при высоких дозах, можно предположить, что генотоксичность технических продуктов обусловлена действием не самих действующих веществ, а примесей, содержание которых в исследуемых образцах было низким. Разные уровни эффектов технических продуктов одного и того же действующего вещества при одинаковых дозах также свидетельствуют в пользу предположения о вкладе примесей в генотоксичность технических продуктов.

Заключение

Проведённые исследования показали, что пестициды-аналоги могут обладать слабой генотоксической активностью, которая в большинстве случаев может быть обусловлена присутствием примесей. При этом технические продукты одного и того же действующего вещества могут проявлять разную активность, и профили такой активности могут отличаться от профилей, полученных для оригинальных действующих веществ пестицидов.

В тестах *in vitro* и *in vivo*, используемых для оценки генотоксичности, не всегда можно получить однонаправленные результаты, поскольку системы *in vitro* (особенно на бактериальных клетках) не могут полно отражать все этапы метаболизма в многоклеточном организме. Кроме того, тест Эймса позволяет регистрировать генные мутации, хромосомные и геномные поражения при этом оценить невозможно. Поэтому использование только одного метода оценки обратных мутаций у бактерий (теста Эймса) может быть недостаточным для определения эквивалентности технических продуктов. Для получения надёжных доказательств безопасного применения пести-

цидов-аналогов необходимо тестирование генотоксичности с использованием, по меньшей мере, двух методов на разных тест-объектах, позволяющих оценить весь спектр мутационных событий.

Литература

(пп. 2–4, 6, 9–12, 14, 17–30 см. в References)

1. Папцов А.Г., Попова А.Г. Мировой рынок средств химической защиты растений и тенденции его развития. *Агропродовольственная политика России*. 2013; 11 (23): 104-7.
5. Абилов С.К. Выявление и прогнозирование мутагенной активности химических соединений окружающей среды. Автореферат диссертации д.б.н., Москва 2003. Доступно на: <http://earthpapers.net/vyyavlenie-i-prognozirovanie-mutagennoy-aktivnosti-himicheskikh-soedineniy-okruzhayushchey-sredy-1>
7. Ракитский В.Н., Ревазова Ю.А., Илюшина Н.А. Стратегия и тактика оценки мутагенности пестицидов. *Токсикологический вестник*. 2015; 134 (5): 10-3.
8. Абилов С.К., Глазер В.М., Асланян М.М. *Основы мутагенеза и генотоксикологии. Лекции: учебное пособие*. М.; СПб: Нестор-История, 2012 г. - 148 С.
13. *Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ*. Совместное издание Программы ООН по окружающей среде, Международной организации труда и Всемирной организации здравоохранения. М.: Медицина, 1989: 26-38.
15. Методическими указания. Оценка мутагенной активности пестицидов (МУ-1.2.3364-16). М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2016.
16. Методические рекомендации. Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микроядерным методом. Межведомственный научный совет по экологии человека и гигиене окружающей среды Российской Федерации, Москва, 2001.

References

1. Paptsov A.G., Popova A.G. The world market of chemical plant protection products and tendencies of its development. *Agroprodovol'stvennaya politika Rossii*. 2013; 11 (23): 104-7. (in Russian).
2. *Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides*. First edition - third revision March 2016. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246192/1/WHO-HTM-NTD-WHOPES-2016.4-eng.pdf>
3. Guidance Document on the Assessment of the Equivalence of Technical Materials of Substances regulated under Regulation (EC) No 1107/2009. Available at: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_guidance_equivalence-chem-substances_en.pdf
4. Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products, and the Environment. Interim guidance on a strategy for genotoxicity testing and mutagenic hazard assessment of impurities in chemical substances. 2012. COM/12/S2. 10 P. <https://www.gov.uk/government/publications/genotoxicity-assessment-of-impurities-in-chemical-substances>.
5. Abilev S.K. Identification and prediction of mutagenic activity of chemical compounds of the environment. Abstract for the degree of Doctor of Biological Sciences. Moscow, 2003: 50 p. Available at: <http://earthpapers.net/vyyavlenie-i-prognozirovanie-mutagennoy-aktivnosti-himicheskikh-soedineniy-okruzhayushchey-sredy-1> (in Russian).
6. D. Kirkland, L. Reeve, D. Gatehouse, P. Vanparys. A core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and in vivo genotoxins. *Mutat Res*. 2011 Mar 18; 721 (1): 27-73. doi: 10.1016/j.mrgentox.2010.12.015.
7. Rakitskii V.N., Revazova Yu.A., Ilyushina N.A. Strategy and tactics of the pesticide mutagenicity assessment. *Toksikologicheskij vestnik*. 2015; 134 (5): 10-3. (in Russian).
8. Abilev S.K., Glaser V.M., Aslanian M.M. *Fundamentals of mutagenesis and genotoxicology*. The lecture: schoolbook. M., St. Petersburg: Nestor-History. 2012, 148 p. (in Russian).

9. Gireesh H. Kamath and K.S. Rao. Genotoxicity guidelines recommended by International conference of harmonization (ICH). In: Dhawan A. and Bajpayee M. (eds) *Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols, Methods Mol Biol*. 2013; 1044: 431-58. doi: 10.1007/978-1-62703-529-3_24.
10. OECD, test 471:1997, IDT. Bacterial reverse mutation test.
11. Maron D.M., Bruce N. Ames. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, 113 (1983) 173-215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
12. Mortelmans K., Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*. 2000; 455: 29-60. doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6.
13. *Guidelines on short-term methods for detection of mutagenic and cancerogenic chemicals*. A Co-Publishing of United Nations Environment Programme, International Labour Organization and World Health Organization. M.: Meditsina, 1989: 26-38. (in Russian).
14. OECD Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, 2014.
15. Methodological guidelines. Assessment of mutagenic activity of pesticides (MU-1.2.3364-16). M. Federal Center of Hygiene and Epidemiology of Rosпотребнадзор: 2016 (in Russian).
16. Guidelines. Assessment of mutagenic activity of environmental factors in cells of different mammalian organs using the micronucleus method. Moscow: Interdepartmental Scientific Council on Human Ecology and Environmental Hygiene of the Russian Federation 2001. (in Russian).
17. McCullagh P., Nelder J.A. Generalized linear models. CRC Monographs on Statistics & Applied Probability 37. Second Edition. Chapman and Hall: London, New York, 1983: 261 p. doi.org/10.1002/bimj.4710290217
18. McDonald J.H. Cochran-Mantel-Haenszel test for repeated tests of independence. *Handbook of Biological Statistics* (3rd ed.). Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland. 2014: 94-100 p. <http://www.biostathandbook.com/cmh.html>
19. Guideline OECD № 489 «In vivo Mammalian Alkaline Comet Assay», 2014.
20. FAO Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides. Glyphosate. N-(phosphonomethyl)glycine. Available at: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Glypho_2014.pdf
21. Kier L., Kirkland D. Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. *Crit Rev Toxicol*. 2013 Apr; 43 (4): 283-315.
22. IARC Monographs Volume 112: Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization (March 20, 2015).
23. FAO Plant Production and Protection Paper. 229. Pesticide residues in food 2016. The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues report 2016. World Health Organization Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
24. Rue J.C., Kim K.-R. Evaluation of genetic toxicity of synthetic chemicals (VII) – a synthetic selective herbicide pendimethalin. *J. Environ. Toxicol*. 2003;18 (2): 121-9.
25. EPA USA. Pendimethalin. Human Health Risk Assessment for the Proposed Food Uses of the Herbicide on Artichoke, Globe, Asparagus, Brassica Head and Stem Vegetables, Subgroup 5A; and Grape (PP#6E7129). 2007. 34 p.
26. Health Effects Division EPA USA. Pendimethalin registration eligibility decision document. Review. 53 p.
27. Behera BC1, Bhunya SP. Genotoxic effect of isoproturon (herbicide) as revealed by three mammalian in vivo mutagenic bioassays. *Indian J Exp Biol*. 1990 Sep; 28 (9): 862-7.
28. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. Isoproturon. Sanco /849/2002. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.ViewReview&id=68>
29. Watson M. Dimethoate. Pesticides Safety Directorate. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, United Kingdom. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v96pr05.htm>
30. Review report for the active substance mesotrione. SANCO/1416/2001 – Final, April 2003 <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.ViewReview&id=350>.