

Илюшина Н.А., Егорова О.В., Масальцев Г.В., Аверьянова Н.С.

## ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ТЕХНИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ ПЕСТИЦИДА – ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗОИЛЦИКЛОГЕКСАН-1,3-ДИОНА

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

**Введение.** В настоящее время в Российскую Федерацию поступает большой объём пестицидов-аналогов, которые производят после окончания срока патентной защиты оригинального действующего вещества. Для подтверждения их безопасности необходимо проведение токсиколого-гигиенической оценки, основанной на данных целого ряда испытаний, в том числе исследований мутагенности (генотоксичности).

**Материал и методы.** Проведено изучение генотоксической активности трёх произведённых на разных заводах технических продуктов действующего вещества пестицида, являющегося производным бензоилциклогексан-1,3-диона. Исследования осуществляли с использованием метода оценки обратных генных мутаций у бактерий (теста Эймса) и микроядерного теста *in vivo* на эритроцитах костного мозга мышей.

**Результаты.** В тесте Эймса выявлены статистически значимые и зависящие от дозы генотоксические эффекты трёх исследуемых образцов на штаммах бактерий *Salmonella typhimurium* TA97, TA102, TA100. При этом кратность увеличения числа ревертантов во всех случаях, за исключением штамма TA97, была меньше двух. Слабые, но биологически значимые эффекты обнаружены на культуре TA97 (кратность превышения уровня ревертантов  $\geq 2$  относительно отрицательного контроля). В микроядерном тесте статистически значимое повышение частоты полихроматофильных эритроцитов с микроядрами вызвали только два из трёх образцов. Один из образцов индуцировал значимый генотоксический эффект только при высокой дозе (2000 мг/кг м. т.), а другой (с наименьшим содержанием действующего вещества) – при всех уровнях доз. В обоих случаях выявлена линейная зависимость эффектов от дозы. При этом цитогенетические эффекты были низкими, на уровне верхней границы исторического отрицательного контроля в лаборатории.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о том, что способность исследованных технических продуктов производного бензоилциклогексан-1,3-диона индуцировать генные и хромосомные нарушения возрастает с уменьшением концентрации действующего вещества в технических продуктах, что может быть обусловлено увеличением доли примесей, обладающих мутагенной активностью. Таким образом, технические продукты пестицидов-аналогов не всегда эквивалентны оригинальным действующим веществам по своей биологической активности, что подтверждает необходимость проведения токсиколого-гигиенических испытаний, и, в частности, оценки генотоксичности всех пестицидов-дженериков, поступающих на рынок.

**Ключевые слова:** пестициды; генотоксичность; обратные генные мутации; микроядра; примеси.

**Для цитирования:** Илюшина Н.А., Егорова О.В., Масальцев Г.В., Аверьянова Н.С. Изучение генотоксичности технических продуктов пестицида - производного бензоилциклогексан-1,3-диона. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(6): 509-513. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-6-509-513>

**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. E-mail: [Ilyushina-na@mail.ru](mailto:Ilyushina-na@mail.ru)

Ilyushina N.A., Egorova O.V., Masaltsev G.V., Averianova N.S.

## STUDIES OF THE GENOTOXICITY OF TECHNICAL PRODUCTS OF THE BENZOYL CYCLOHEXANE-1,3-DIONE DERIVATIVE PESTICIDE

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

**Introduction.** Currently, a large number of pesticide analogues manufactured past the expiration date of the patent protection of the original active ingredients are imported in the Russian Federation. The toxicological-hygienic examinations based on numerous trials, including mutagenicity (genotoxicity) studies, is necessary to confirm their safety.

**Material and methods.** The study of the genotoxic activity of three technical products of the pesticide active ingredient, a benzoylcyclohexane-1,3-dione derivative, produced in the various factories was carried out. research was performed using the bacterial reverse mutation method (Ames test) and the *in vivo* mouse bone marrow micronucleus test.

**Results.** Statistically significant and dose-dependent genotoxic effects of the test samples were observed in the strains of *Salmonella typhimurium* of TA 97, TA 102, TA 100. However, the increase in the number of revertants in the experiment versus the negative control was less than two in all cases, with the exception of strain TA 97. Weak but biologically significant outcomes were found in TA 97 culture (the increase in the number of revertants in comparison to spontaneous level was  $\geq 2$ ). In the micronucleus test only two of the three samples produced a statistically significant increase in the incidence of micronucleated polychromatophilic erythrocytes. One of the samples induced the significant genotoxic effect only at the high dose (2000 mg/kg b.w.), and another one (with the lowest active substance content) at all dose levels. In both cases, a linear dose-effect dependence was found. The cytogenetic effects were low, at the level of the upper limit of the laboratory's historical negative control.

**Conclusion.** The obtained data indicate that the ability of the tested technical products of the benzoylcyclohexane-1,3-dione derivative to induce the gene and chromosomal damages increases with decreasing concentration of the active ingredient in technical products, probably due to the enhancement of the genotoxic impurity level. Thus, the technical products of analogue pesticides are not always equivalent to the original active substances in terms of their biological

activity. That confirms the necessity for toxicological-hygienic testing, in particular genotoxicity assessments of all generic pesticides entering the market.

**Key words:** pesticides; genotoxicity; reverse gene mutations; micronuclei; impurities.

**For citation:** Ilyushina N.A., Egorova O.V., Masaltsev G.V., Averianova N.S. Studies of the genotoxicity of technical products of the benzoylcyclohexane-1,3-dione derivative pesticide. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2018; 97(6): 509-513. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-6-509-513>

**For correspondence:** Nataliya A. Ilyushina, PhD, Head of Genetic Toxicology Department of the Institution of Hygiene, Toxicology of Pesticides and Chemical Safety of the F.F. Erisman Federal Scientific Center of Hygiene of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 141014, Mytitschi, Russian Federation. E-mail: [Ilyushina-na@mail.ru](mailto:Ilyushina-na@mail.ru)

**Information about authors:**

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

Masaltsev G.V., <http://orcid.org/0000-0003-1539-1633>; Averianova N.C., <http://orcid.org/0000-0002-2973-8776>.

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

*Acknowledgment.* The study had no sponsorship.

Received: 15 March 2018

Accepted: 24 April 2018

## Введение

В настоящее время в Российскую Федерацию в основном из стран Азии возрастает поток пестицидов-аналогов (дженериков), которые производят после окончания срока патентной защиты оригинального действующего вещества [1, 2]. Все препараты на основе таких дженериков должны пройти испытания для подтверждения их эффективности и безопасности и должны быть зарегистрированы в установленном порядке [3–6].

Одним из важных критериев, учитываемых при регистрации химических средств защиты растений, является их генотоксичность, т. е. способность повреждать генетический материал в клетках живых организмов [7–9]. При разработке действующих веществ пестицидов новые молекулы подвергают тщательным испытаниям и не допускают к применению в случае выявления генетической опасности [10, 11]. Однако аналогичные технические продукты действующих веществ иногда содержат новые примеси, отсутствующие в оригинальном продукте, которые могут приводить к нарушению генетического материала в клетках и возникновению мутаций даже в небольших концентрациях [12, 13]. Для выявления генотоксической активности пестицидов используют несколько методов на разных тест-объектах [14]. Целью настоящей исследования была оценка потенциальной генотоксичности трёх разных технических продуктов действующего вещества пестицида, являющегося производным бензоилциклогексан-1,3-диона, в тесте *in vitro*, оценивающим обратные мутации на бактериях (в тесте Эймса), и в микроядерном тесте на эритроцитах костного мозга мышей *in vivo*.

## Материал и методы

Исследовали 3 технических продукта пестицида, являющегося производным бензоилциклогексан-1,3-диона, с содержанием действующего вещества согласно сертификатам анализов 98,80% (образец I), 98,15% (образец II) и 97,01% (образец III), соответственно.

Оценку обратных мутаций у бактерий проводили, используя стандартный чашечный тест (тест Эймса) без метаболической активации и в присутствии микросомной активирующей смеси (20–30%) [15–17]. В качестве тест-объектов использовали штаммы *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA1535, TA100 и TA102, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

Штаммы бактерий поддерживали на твёрдой LB-среде, хранили при температуре 4–6 °C и подвергали периодическому генетическому анализу [18, 19].

Перед началом эксперимента бактерии высевали в жидкую среду LB (15–20 мл) и инкубировали в термостате при 37 °C ± 2 в течение 3–4 час (при встряхивании 120–130 об/мин) до плотности приблизительно 10<sup>9</sup>/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 составила 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<sub>2</sub>.

В качестве отрицательного контроля использовали варианты с растворителем – диметилсульфоксидом (ДМСО). Положительными контролями служили 2-аминоантрацен, 2-нитрофлуорен, азид натрия, метилметансульфонат и 9-аминоакридин. В исследовании использовали 5 концентраций каждого образца технического продукта в диапазоне 0,05–5,0 мг на чашку с шагом приблизительно в половину log (010). Для каждого уровня доз испытываемых образцов использовали три повтора. Учёт числа ревертантных колоний осуществляли после инкубации бактерий в течение 48–72 часов при температуре 37 ± 2 °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 [18, 20].

Хромосомные нарушения выявляли с помощью микроядерного теста *in vivo* на эритроцитах костного мозга мышей линии CD-1 обоих полов [21]. Животных получали из питомника филиала «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России.

Использовали по 5 мышей на группу. Исследуемые образцы технических продуктов вводили внутривентрикулярно в 1%-ном крахмале в дозах 500, 1000 и 2000 мг/кг массы тела (максимальная доза, согласно руководству OECD, № 474) 2 раза с интервалом в 24 ч. Одновременно в качестве отрицательного контроля вводили наполнитель (1% крахмал). В качестве положительного контроля использовали циклофосфамид, который вводили внутривентрикулярно в дозе 40 мг/кг один раз, одновременно со вторым введением исследуемых образцов. Животных умерщвляли методом цервикальной дислокации через 22 часа после второго введения.

Костный мозг вымывали из бедренных костей эмбриональной сывороткой теленка и готовили по 2 микропрепарата костного мозга от каждого животного в соответствии с общепринятой методикой [22]. 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. Значения площадей под кривыми зависимости кратности превышения среднего числа ревертантов от дозы технических продуктов (AUC) определяли методом трапеций, используя MS Excel 2013 [23].

Обработку данных микроядерного теста осуществляли с помощью построения обобщённой лог-линейной модели для рас-

Таблица 1

Оценка мутагенной активности производного циклогексан-1,3-диона в тесте Эймса на культуре *S. typhimurium* B-5291 (TA97)

| Доза, мг/чашку                | Кратность превышения среднего числа ревертантов в опыте по отношению к контролю |      |
|-------------------------------|---|------|
|                               | +S9   | -S9  |
| <i>Образец I (98,8%)</i>      |   |      |
| 0,05                          | 0,8   | 1,0  |
| 0,125                         | 0,9   | 0,9  |
| 0,5                           | 1,0   | 1,1  |
| 1,25                          | 1,3   | 1,7  |
| 5,0                           | 2,5   | 2,9  |
| ДМСО                          | –   | –    |
| 9-аминоантрацен, 20 мкг/чашку | 5,2   | –    |
| 9-аминоакридин, 50 мкг/чашку  | –   | 18,0 |
| <i>Образец II (98,15%)</i>    |   |      |
| 0,05                          | 0,9   | 0,9  |
| 0,125                         | 1,0   | 1,1  |
| 0,5                           | 1,0   | 1,0  |
| 1,25                          | 1,3   | 1,3  |
| 5,0                           | 1,9   | 1,8  |
| ДМСО                          | –   | –    |
| 9-аминоантрацен, 10 мкг/чашку | 2,2   | –    |
| 9-аминоакридин, 25 мкг/чашку  | –   | 6,0  |
| <i>Образец III (97,01%)</i>   |   |      |
| 0,05                          | 1,1   | 1,0  |
| 0,16                          | 1,1   | 0,9  |
| 0,5                           | 1,4   | 1,1  |
| 1,6                           | 1,6   | 1,4  |
| 5,0                           | 2,0   | 1,7  |
| ДМСО                          | –   | –    |
| 9-аминоантрацен, 10 мкг/чашку | 3,2   | –    |
| 9-аминоакридин, 25 мкг/чашку  | –   | 2,9  |

пределения Пуассона [24]. Линейную зависимость эффектов от дозы проверяли методом Мантеля – Хензеля [25].

## Результаты

При изучении потенциальной генотоксичности трёх технических продуктов пестицида-аналога, производного бензоилциклогексана-1,3-диона в тесте Эймса на бактериях, выявлены разные уровни эффектов в зависимости от штаммов.

При использовании бактерий штамма TA98 ни один из образцов не индуцировал генные мутации как в отсутствие, так и в присутствии системы метаболической активации.

Все исследуемые технические продукты вызывали статистически значимое зависимое от дозы превышение числа ревертантных колоний в случае тест-штамма TA102 по сравнению со спонтанным фоном мутирования. При этом наблюдаемый уровень превышения среднего числа ревертантов в максимальной дозе составил 1,5 (-S9) / 1,5 (+S9) для образцов I и III; и 1,9 (-S9) / 1,6 (+S9) для образца II.

В случае использования штаммов, позволяющих выявлять мутации типа замены пар оснований (TA100, TA1535), установлено, что образцы I и II индуцировали статистически значимое превышение числа ревертантов по сравнению с отрицательным контролем только в культуре TA100 при высоких дозах. Кратность превышения числа ревертантов при внесении исследуемых образцов в максимальной дозе 5 мг на чашку составила 1,5 (-S9) / 1,4 (+S9) для образца I и 1,7 (-S9) / 1,4 (+S9) – для образца II.

Экспозиция бактериальных клеток штамма TA97 с образцами трёх пестицидов приводила к индукции мутаций в данной культуре. При внесении максимальной дозы (5 мг/чашку) кратность увеличения количества ревертантов по сравнению

Таблица 2

Площади под кривыми (AUC) зависимости генотоксической активности образцов от дозы технических продуктов производного бензоилциклогексана-1,3-диона в тесте Эймса (кратность превышения количества ревертантных колоний (опыт/контроль) • доза (мг/чашку))

| Штаммы         | Образец I (98,8%) | Образец II (98,15%) | Образец III (97,01%) |
|----------------|-------------------|---------------------|----------------------|
| <b>TA1535:</b> |                   |                     |                      |
| +S9 AUC*       | 3,10              | 4,19                | <b>6,28</b>          |
| -S9 AUC        | 4,74              | 6,03                | <b>7,10</b>          |
| <b>TA97:</b>   |                   |                     |                      |
| +S9 AUC        | 8,30              | 7,36                | <b>8,57</b>          |
| -S9 AUC        | <b>9,78</b>       | 7,10                | 7,05                 |
| <b>TA102:</b>  |                   |                     |                      |
| +S9 AUC        | 5,88              | <b>7,38</b>         | 6,30                 |
| -S9 AUC        | 5,87              | 6,73                | <b>7,20</b>          |
| <b>TA100:</b>  |                   |                     |                      |
| +S9 AUC        | 6,38              | <b>6,70</b>         | 5,24                 |
| -S9 AUC        | 3,50              | <b>7,57</b>         | 5,22                 |

со спонтанным уровнем мутаций была в диапазоне 1,7–2,9, что свидетельствует о слабой мутагенности (табл. 1).

Было проведено сравнение площадей под кривыми зависимости кратности превышения среднего числа ревертантов от дозы технических продуктов для разных штаммов. Наибольшие площади под кривыми были получены для образца III на трёх штаммах (TA1535 в присутствии и в отсутствие S9; TA97 в присутствии S9; TA102 в отсутствие S9); для образца II на двух штаммах TA102 (в присутствии S9) и TA100 (в присутствии и в отсутствие S9), для образца I – на штамме TA97 только в отсутствие S9 (табл. 2).

Таким образом, в тесте Эймса установлено, что образец III с наименьшим содержанием действующего вещества (97,01%) проявлял более высокую активность на большем количестве штаммов по сравнению с другими техническими продуктами.

В микроядерном тесте обнаружено, что два из трёх тестируемых технических продуктов проявляли генотоксичность. Образец II вызывал статистически значимое повышение частоты индукции образования микроядер в ПХЭ только при высокой дозе (2000 мг/кг м. т.). Кроме того, выявлена линейная зависимость тестируемого показателя от дозы технического продукта. Образец III оказался более генотоксичным. Обнаружено, что он проявляет статистически значимую зависимость от дозы цитогенетическую активность при всех уровнях доз. В случае образца I не выявлено ни значимого повышения частоты ПХЭ с микроядрами, ни линейного тренда значений исследуемого показателя в зависимости от дозы (табл. 3, рисунок).

Сопоставление содержания действующего вещества в разных технических продуктах и наблюдаемых эффектов в костном мозге мышей показало, что чем чище продукт, тем меньше его цитогенетическая активность.

Следует отметить, что все эффекты, отмеченные в микроядерном тесте, были низкими, и, несмотря на статистическую значимость в случае образцов технических продуктов II и III, значения частоты ПХЭ с микроядрами были только на уровне верхней границы исторического отрицательного контроля в лаборатории и составляли при высоких дозах у самок 0,19–0,20% (средние значения исторического контроля в лаборатории для самок  $0,09 \pm 0,05\%$  (минимум 0,00%, максимум 0,20%), у самцов – 0,18–0,25% (средние значения исторического контроля в лаборатории для самцов  $0,10 \pm 0,07\%$  (минимум 0,00%, максимум 0,22%)). Поэтому с биологической точки зрения обнаруженные эффекты мало значимы.

## Обсуждение

В тесте Эймса при использовании штаммов бактерий *S. typhimurium* TA102, TA97, TA100 наблюдали статистически значимое зависящее от дозы технических продуктов превышение числа ревертантов по сравнению с отрицательным контролем.



**95%-ные доверительные интервалы на основе профилевого правдоподобия для относительного значения средней частоты ПХЭ с микроядрами (опыт/отрицательный контроль) при действии разных доз исследуемых технических продуктов**

| Доза, мг/кг массы тела                          | 95% ДИ             |   |                     |   |                      |   |       |       |       |
|---|--------------------|---|---------------------|---|----------------------|---|-------|-------|-------|
|   | Образец I (98,80%) |   | Образец II (98,15%) |   | Образец III (97,01%) |   |       |       |       |
| 500   | 0,537              | 0,787   | 1,147               | 0,663   | 0,951                | 1,363   | 1,004 | 1,457 | 2,132 |
| 1000  | 0,450              | 0,672   | 0,995               | 0,713   | 1,016                | 1,449   | 1,363 | 1,935 | 2,783 |
| 2000  | 0,739              | 1,049   | 1,492               | 1,005   | 1,393                | 1,943   | 1,086 | 1,565 | 2,280 |
| Оценка линейного тренда методом Мантеля–Хензеля | Образец I (98,80%) |   | Образец II (342)    |   | Образец III (343)    |   |       |       |       |
|   | Значение           | Асимптотическая значимость <i>p</i> (двухсторонняя) | Значение            | Асимптотическая значимость <i>p</i> (двухсторонняя) | Значение             | Асимптотическая значимость <i>p</i> (двухсторонняя) |       |       |       |
|   | 0,004              | 0,951   | 4,350               | 0,037   | 7,312                | 0,007   |       |       |       |

При этом кратность увеличения числа ревертантов во всех случаях, за исключением штамма TA97, была меньше двух, что с биологической точки зрения считается незначимым. Слабые, но биологически значимые эффекты обнаружены только на бактериях штамма TA97 (кратность превышения уровня ревертантов  $\geq 2$  относительно отрицательного контроля). Однако статистические значимые и дозозависимые эффекты на других штаммах также могут свидетельствовать о наличии в технических продуктах небольших количеств мутагенных примесей, которые не дают высокой кратности превышения частоты обратных мутаций из-за их низкой концентрации.

Разная степень выраженности мутагенного эффекта в тесте Эймса, наблюдаемая на одном и том же штамме при исследовании разных технических продуктов, вероятно, может быть следствием неодинаковой чувствительности используемых штаммов к действию различных примесей в их составе.

При оценке биологической значимости генотоксического действия химических веществ с использованием бактериального теста Эймса обычно применяют такие критерии, как наличие дозовой зависимости и кратность превышения числа ревертантных колоний по сравнению с отрицательным контролем. При этом, если наличие дозовой зависимости единодушно принимается в качестве однозначного критерия для выявления положительного мутагенного эффекта, то в отношении применимости правила «кратности» не достигнуто полного согласия [26]. Так, пороговая величина превышения ревертантов для одного и того же штамма бактерий может отличаться. Например, для TA100, как показал анализ литературы, мутагенный эффект считался значимым, если кратность превышения ревертантов составляла 2 [15]; 1,8 [27] и даже 1,5 [19].

Учитывая сложность сопоставления мутагенных эффектов нескольких исследуемых образцов, обладающих слабой активностью в тесте Эймса, по кратности эффекта в отдельных

точках, а также небольшие различия в используемых концентрациях технических продуктов (см. табл. 1), было решено использовать интегральный показатель – площади под кривыми зависимости (AUC) кратности превышения среднего числа ревертантов от дозы технических продуктов для разных штаммов. Оказалось, что образец III с наименьшим содержанием действующего вещества (97,01%) и, следовательно, содержащий больше примесей, проявлял более высокую активность на большем количестве штаммов в разных условиях ( $\pm S9$ ), по сравнению с другими техническими продуктами.

В микроядерном тесте на эритроцитах костного мозга мышей исследуемые образцы также проявляли разную активность. Сопоставление содержания действующего вещества в технических продуктах (на основании сертификатов анализа) и наблюдаемых цитогенетических эффектов, показало, что степень генотоксичности повышается с уменьшением содержания действующего вещества, производного бензоилциклогексан-1,3-диона, и вероятно, с увеличением содержания примесей, поэтому разные уровни наблюдаемых цитогенетических эффектов могут быть следствием воздействия на действующего вещества как такового, а генотоксичных примесей, присутствующих в технических продуктах в разных концентрациях.

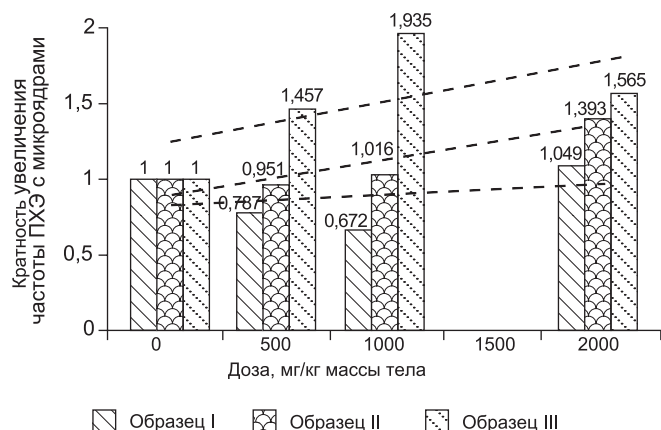
Таким образом, проведенные исследования показали, что технические продукты исследуемого производного бензоилциклогексан-1,3-диона могут обладать слабой генотоксической активностью. Наблюдаемые в эксперименте различия в генотоксических эффектах исследуемых технических продуктов предположительно обусловлены наличием в них разных уровней примесей, обладающих мутагенной активностью. Причём содержание примесей невысоко, поэтому обнаруженные генотоксические эффекты биологически мало значимы. Следовательно, исследуемые технические продукты можно отнести только к третьему классу опасности по критерию «мутагенность» [28].

Согласно литературным данным [29, 30], исследуемое производное бензоилциклогексан-1,3-диона не обладает генотоксичностью. Однако технические продукты могут содержать в качестве релевантных примесей:

- 1,2-дихлорэтан, известный канцероген, содержание которого в техническом продукте не должно превышать 1 г/кг;
- 1-циан-6-(метилсульфонил)-7-нитро-9Н-ксантен-9-он, мутагенная активность которого была выявлена в тесте Эймса в отсутствие и в присутствии системы метаболической активации; содержание данной примеси в продукте регламентировано на уровне не более 2 мг/кг;
- 6-(метилсульфонил)-9-оксо-9Н-ксантен-1-карбонитрил, показавший позитивный ответ в тесте Эймса в отсутствие метаболической активации и содержание которого не должно превышать 2 г/кг.

Для подтверждения вклада примесей в генотоксичность исследованных нами технических продуктов необходим полный химический анализ их состава и изучение влияния отдельных компонентов на наследственные структуры *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, технические продукты пестицидов-аналогов могут быть не в полной мере эквивалентными оригинальным действующим веществам по своей биологической активности, что подтверждает необходимость проведения токсиколого-гигиенических исследований, и, в частности, изучения генотоксич-



Зависимость частоты индукции микроядер в ПХЭ от дозы технических продуктов производного бензоилциклогексан-1,3-диона разной чистоты в образцах: I (98,80%), II (98,15%) и III (97,01%).

I, II и III – условные обозначения образцов разных технических продуктов производного бензоилциклогексан-1,3-диона.

ности всех пестицидов-дженериков, поступающих на рынок, чтобы не допустить попадания в среду обитания веществ, опасных для наследственных структур в клетках растений, животных и человека.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.  
**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Л и т е р а т у р а

(см. References пп. 10-13, 15, 16, 18, 19, 21, 23-26, 29, 30)

1. Бирюкова Т. Что думают о дженериках в Европе. Новый аграрный журнал. 2011; 2(2). <http://www.newagro.info/articles/002-что-думают-о-дженериках-в-европе/>
2. Захаренко В.А. Рынок пестицидов России и перспективы его развития. Защита и карантин растений. 2014; 11: 3-6. <https://cyberleninka.ru/article/n/rynok-pestitsidov-v-rossii-i-perspektivy-ego-razvitiya>.
3. Федеральный закон от 19.07.1997 ФЗ №109 «О безопасном обращении с пестицидами и агрохимикатами» (с изм. и дополн.)
4. Приказ Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 10.07.2007 N 357 «Об утверждении Порядка государственной регистрации пестицидов и агрохимикатов» (с изм. и дополн.)
5. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 1 августа 2006 г. №225 «О санитарно-эпидемиологической экспертизе пестицидов и агрохимикатов».
6. Решение Комиссии Таможенного союза от 10 ноября 2015 г. №149 «О внесении изменений в Решение комиссии Таможенного союза от 28 мая 2010 г. №299».
7. Руководство Р 1.2.3156-13. Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья человека. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014: 639.
8. Методические указания МУ-1.2.3365-16 от 04.07.2016 «Оценка мутагенной активности пестицидов». М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2016: 49.
9. Илюшина Н.А., Егорова О.В., Масальцев Г.В., Аверьянова Н.С., Ревазова Ю.А. Мутагенность и канцерогенность пестицидов, опасность для здоровья человека. Систематический обзор. *Журнал «Здравоохранение РФ»*. 2017; 61(2): 96-102. doi: 10.18821/0044-197X-2017-61-2-96-102.
14. Ракитский В.Н., Ревазова Ю.А., Илюшина Н.А. Стратегия и тактика оценки мутагенности пестицидов. *Токсикологический вестник*. 2015; 134 (5): 10-3.
17. Методическое указание «Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем». М.: Межведомственный научно-технический совет по комплексным проблемам охраны окружающей среды и рациональному использованию природных ресурсов при государственном комитете по науке и технике, 1985: 36.
20. 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.
22. Методические рекомендации. Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микродверным методом. М.: Межведомственный научный совет по экологии человека и гигиене окружающей среды Российской Федерации, 2001: 22.
27. Абилев С.К. Выявление и прогнозирование мутагенной активности химических соединений окружающей среды. Автореферат на соискание ученой степени доктора биологических наук. Москва; 2003: 50. <http://abilev.narod.ru/publications.htm>
28. СанПиН 1.2.2584-10 «Гигиенические требования к безопасности процессов испытаний, хранения, перевозки, реализации, применения, обезвреживания и утилизации пестицидов и агрохимикатов».

## References

1. Biryukova T. What do they think about generics in Europe. New agricultural journal [Novui agrarnui shrynal]. 2011; 2(2). <http://www.newagro.info/articles/002-что-думают-о-дженериках-в-европе/>
2. Zacharenko V.A. Pesticide market in Russia and prospects for its development. Plant protection and quarantine. *Zashita i quarantine rastenii*. 2014; 11: 3-6. <https://cyberleninka.ru/article/n/rynok-pestitsidov-v-rossii-i-perspektivy-ego-razvitiya>.
3. The Federal law no. 109-FZ of July 19, 1997 «On the safe handling of pesticides and agrochemicals».
4. The Order of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation no 357 of July 10, 2007 «On Approval of the Procedure for State Registration of Pesticides and Agrochemicals».
5. The Order of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being N 225 of August 1, 2006 «On the sanitary-epidemiological expert examination of pesticides and agrochemicals».
6. The decision of the Board of the Eurasian Economic Commission N 149 of November 10, 2015 «On Amendments to the Customs Union Commission Decision №299 d.d. 28 May 2010».
7. Guidelines on Assessment of the toxicity and hazards of chemicals and their mixtures for human health (P 1.2.3156-13). Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rosпотребнадзор; 2014: 639. (in Russian)
8. Methodological instructive regulations MI-1.2.3365-16 from 04.07.2016 «Assessment of mutagenic activity of pesticides». Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rosпотребнадзор; 2016: 49. (in Russian)
9. Ilyushina N.A., Egorova O.V., Masaltsev G.V., Averianova N.S., Revazova Y.A. The mutagenicity and carcinogenicity of pesticides, and hazards for human health: A systematic review. Health care of Russian Federation. *Zdravoochranenie Rossiiskoi Federacii*. 2017; 61(2): 96-102. doi: 10.18821/0044-197X-2017-61-2-96-102
10. Kirkland D, Zeiger E, Madia F, Gooderham N, Kasper P, Lynch A, et al. Can in vitro mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or in vivo genotoxic activity? I. Reports of individual databases presented at an EURL EC/VAM Workshop. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014; 775-6: 55-68. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.10.005.
11. Ewan D, Booth, Paul J. Rawlinson, Priscila Maria Fagundes, Kevin A. Leiner. Regulatory requirements for genotoxicity assessment of plant protection product active ingredients, impurities, and metabolites. *Environ. Mol. Mutagen*. 2017; 58: 325-44.
12. Manual on development and use of FAO and WHO Specifications for Pesticides, 228. Rome; 2016.
13. 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>.
14. Rakitskii V.N., Revazova Yu.A., Ilyushina N.A. Strategy and tactics of the pesticide mutagenicity assessment. *Toxicological Review*. 2015; 134 (5): 10-3.
15. OECD, test 471:1997, IDT. Bacterial reverse mutation test.
16. Maron D.M., Ames B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*. 1983; 113: 173-215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
17. Methodological instructive regulation «Methods for the primary detection of genetic activity of environmental pollutants using bacterial test systems», Moscow, Interdepartmental Scientific and Technical Council on Complex Problems of Environmental Protection and Rational Use of Natural Resources under the State Committee for Science and Technology. 1985: 33. (in Russian).
18. 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.
19. Hamel A., Roy M., Proudlock R. The bacterial reverse mutation test. Chapter 4. In Proudlock R. ed. *Genetic Toxicology Testing. A Laboratory Manual*: 2016: 79-138. <https://www.sciencedirect.com/science/book/9780128007648>
20. 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. М.: Meditsina; 1989: 26-38. (in Russian).
21. OECD Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, 2014.
22. 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: 22. (in Russian)
23. Bouckaert R.R. Efficient AUC Learning Curve Calculation. In: Sattar A., Kang V.N., eds. *Advances in Artificial Intelligence*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2006: 181-91. [https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F11941439\\_22](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F11941439_22).
24. 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. doi.org/10.1002/bimj.4710290217
25. 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>
26. Gatehouse D., Haworth S., Cebula T., Gocke E., Kier L., Matsushima T., Melcion C., Nohmi T., Ohta T., Venitt S., Zeiger E. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutat Res*. 1994 Jun; 312 (3): 217-33. doi.org/10.1016/0165-1161(94)90037-X.
27. 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. <http://abilev.narod.ru/publications.htm>
28. SanPin 1.2.2584-10 «Hygienic requirements to safety of the processes of tests, storages, transportations, implementations, applications, neutralizations and utilization of pesticides and agrochemicals». (in Russian)
29. EU Pesticides database. Available at <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/>.
30. IUPAC. Global availability of information on agrochemicals. Available at: [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:cmneVKubtuMJ:https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/442.htm%2B6-\(methylsulfonyl\)-9-oxo-9H-xanthen-1-carbonitrile+mesotrion&num=1&newwindow=1&hl=ru&prmd=ivns&strip=1&vwsrc=0](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:cmneVKubtuMJ:https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/442.htm%2B6-(methylsulfonyl)-9-oxo-9H-xanthen-1-carbonitrile+mesotrion&num=1&newwindow=1&hl=ru&prmd=ivns&strip=1&vwsrc=0)