

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

Оценка мутагенной активности технического продукта *n*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина

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

Введение. Изучение генотоксичности технических продуктов пестицидов является одним из обязательных требований, предъявляемых при проведении их токсиколого-гигиенической оценки. В отношении некоторых пестицидов получают неоднозначные данные о наличии или отсутствии мутагенных свойств. Это может быть обусловлено использованием для тестирования различных технических продуктов действующих веществ пестицидов, имеющих неодинаковые профили релевантных примесей, среди которых могут быть и потенциально генотоксичные вещества.

Материал и методы. Исследовали технический продукт *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина в тесте оценки обратных генных мутаций у бактерий *Salmonella typhimurium* (тест Эймса) и в микроядерном тесте *in vivo* на эритроцитах костного мозга мышей линии CD-1.

Результаты. В тесте Эймса выявлены статистически значимые зависящие от дозы мутагенные эффекты технического продукта *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина на штаммах TA97 (+S9/-S9); TA100 (+S9/-S9); TA102 (+S9/-S9) и TA98 (+S9/-S9). При этом кратность превышения числа ревертантов в опыте по сравнению с соответствующим отрицательным контролем у всех штаммов за исключением варианта с TA98 в присутствии S9 была > 2. В микроядерном тесте исследуемый технический продукт не индуцировал статистически значимого повышения частоты индукции микроядер в полихроматофильных эритроцитах мышей ни в одной из исследуемых доз вплоть до 2000 мг/кг м.т. по сравнению с отрицательным контролем.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о необходимости тестирования в отношении потенциальной генотоксичности всех технических продуктов пестицидов, поступающих на рынок. При этом для получения надёжных результатов требуется использование по меньшей мере двух методов на разных тест-системах.

К л ю ч е в ы е с л о в а : пестициды; генотоксичность; релевантные примеси; обратные генные мутации; микроядерный тест.

Для цитирования: Егорова О.В., Илюшина Н.А., Аверьянова Н.С., Масальцев Г.В., Дмитричева О.О. Оценка мутагенной активности технического продукта *n*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина. Гигиена и санитария. 2020; 99(4): 418–424. DOI: <https://doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-4-418-424>

Для корреспонденции: Илюшина Наталья Алексеевна, кандидат биол. наук, зав. отделом генетической токсикологии Института гигиены, токсикологии пестицидов и химической безопасности ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора. E-mail: ilyushina-na@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: Егорова О.В. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка данных, анализ результатов, поиск литературы, написание текста; Илюшина Н.А. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация результатов, написание текста, редактирование; Аверьянова Н.С. — сбор и обработка данных; Масальцев Г.В. — сбор данных, статистическая обработка; Дмитричева О.О. — сбор данных. Все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Поступила: 29.10.2019
Принята к печати: 11.12.2019
Опубликована: 26.05.2020

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

Assessment of the mutagenicity of the technical product of pendimethalin

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. Evaluation of genotoxicity of the pesticide technical products is one of the mandatory requirements for their toxicological and hygienic assessment. The data about mutagenic property is ambiguous for some pesticides. This may be due to the use of various active ingredients of technical products of the pesticide for testing, as they may have different profiles of relevant impurities, some of which may be potentially genotoxic.

Material and methods. A technical product of *N*-(1-ethylpropyl)-2,6-dinitro-3,4-xylidine was tested using the bacterial reverse mutation method with *Salmonella typhimurium* (Ames test) and the *in vivo* mammalian micronucleus analysis in mouse bone marrow erythrocytes.

Results. Statistically significant dose-dependent mutagenic effects of the technical product of *N*-(1-ethylpropyl)-2,6-dinitro-3,4-xylidine were revealed for TA97 (+S9/-S9); TA100 (+S9/-S9); TA102 (+S9/-S9) and TA98 (+S9/-S9) strains. In all cases, the fold increase of the revertant numbers mediated by the tested substance compared with the concurrent negative control was > 2 except TA98 in the presence of S9. In the micronucleus test, the technical product did not induce a statistically significant increase in the frequency of the micronucleated polychromatophilic erythrocytes in CD-1 mouse bone marrow up to 2000 mg/kg bw.

Conclusion. The data suggest all technical products of pesticides entering the market should be tested for the potential genotoxicity. In such a case it is necessary to use at least two methods on different test systems for obtaining reliable results.

К е у о р д с : pesticides; genotoxicity; reverse gene mutations; micronuclei; relevant impurities.

For citation: Egorova O.V., Ilyushina N.A., Averianova N.S., Masaltsev G.V., Dmitricheva O.O. Assessment of the mutagenicity of the technical product of pendimethalin. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2020; 99(4): 418-424. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-4-418-424>

For correspondence: Nataliya A. Ilyushina, PhD., Head of Genetic Toxicology Department of Hygiene, Toxicology of Pesticides and Chemical Safety 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. E-mail: ilyushina-na@mail.ru

Information about the authors:

Averianova N.C., <https://orcid.org/0000-0002-2973-8776>; Dmitricheva O.O., <https://orcid.org/0000-0002-7177-579X>; Egorova O.V., <https://orcid.org/0000-0003-4748-8771>; Ilyushina N.A., <https://orcid.org/0000-0001-9122-9465>; Masaltsev G.V., <https://orcid.org/0000-0003-1539-1633>

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Contribution: Egorova O.V. – research concept and design, collection and processing of material, analysis of results, literature search, writing the text; Ilyushina N.A. – research concept and design, collection and processing of material, analysis and interpretation of results, writing the text, editing; Averianova N.S. – collection and processing of material; Masaltsev G.V. – collection of material, statistical processing; Dmitricheva O.O. – collection of material. Approval of the final version of the manuscript, responsibility for the integrity of all parts of the manuscript – all co-authors.

Received: October 29, 2020

Accepted: December 11, 2019

Published: May 26, 2020

Введение

К настоящему времени использование пестицидов в сельском хозяйстве прочно вошло в практику возделывания основных аграрных культур. В соответствии с действующим порядком государственной регистрации пестицидов и агрохимикатов изучение их мутагенной активности – одно из обязательных требований, предъявляемых при проведении токсиколого-гигиенической оценки [1–3].

Современные подходы к определению мутагенных свойств пестицида основаны главным образом на оценке отдельных действующих веществ в стандартных тестах, позволяющих выявить потенциал химического соединения к индукции мутаций разных типов [4–9].

Способность тестируемого технического продукта вызывать изменения генетического материала, несомненно, зависит не только от свойств самого действующего вещества, но и от генотоксического потенциала примесных соединений. Например, присутствие феназинов в виде примесей может обуславливать наличие мутагенной активности в технических продуктах беномила и карбендазима [10–12]. Образующиеся при производстве или хранении субстанций пестицидов N-нитрозосоединения также могут проявлять мутагенную и канцерогенную активность [13–15].

Различия в составе релевантных примесей технических продуктов одного и того же действующего вещества разных производителей могут опосредовать неодинаковые эффекты, наблюдаемые в тестах при оценке генотоксических свойств пестицидов [16, 17].

Ввиду вышесказанного присутствие релевантных примесей в техническом продукте, являющихся мутагенными, даже в том случае, когда каждая из примесей присутствует на допустимом уровне, затрудняет прогнозирование потенциальной опасности действующего вещества.

Например, результаты тестирования генотоксичности N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина *in vivo* и *in vitro*, опубликованные в научной литературе, не дают однозначного ответа о наличии или отсутствии мутагенных свойств у данного пестицида. В нескольких независимых исследованиях, а также в отчётах регуляторных ведомств (EPA, EFSA, JMPR) приводятся данные как об отсутствии мутагенного действия данного действующего вещества, так и наличия позитивных эффектов в ряде тестов [18–22].

N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидин (CAS № 40487-42-1) (III класс опасности ВОЗ) – предпосевный и предвсходовый гербицид селективного действия, применяемый для контроля практически всех однолетних сорных растений. Механизм действия N-(1-этилпропил)-2,6-

динитро-3,4-ксилидина основан на ингибировании роста и деления клеток в корневых меристемах чувствительных сорняков за счёт блокирования образования тубулина. В настоящее время на территории Российской Федерации зарегистрировано 7 препаративных форм на основе N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина, используемых в виде концентрата эмульсии или микрокапсулированной суспензии на посевах подсолнечника, лука репчатого, моркови, позднеспелых сортов капусты [23].

Оценка токсичности для водных организмов, биоаккумуляции и персистентности, опубликованная группой исследователей в 2017 г., показала, что N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидин быстро разлагается в почве, донных отложениях и водных системах, нетоксичен для гидробионтов, а также обладает низкой способностью к аккумуляции в пищевых звеньях. В то же время ввиду высокой летучести N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидин может переноситься на значительные расстояния [24].

В настоящем исследовании нами была проведена оценка генотоксичности N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина с использованием методов оценки генных мутаций на бактериях (*Salmonella*/микросомы) и учёта микроядер в клетках млекопитающих *in vivo*.

Материал и методы

Тестировали технический продукт N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина (кристаллический твёрдый порошок оранжево-жёлтого цвета без запаха) с содержанием действующего вещества 95,7%.

В качестве тест-объектов в исследовании использовали штаммы *Salmonella typhimurium* В-5291 (ТА97), В-5294 (ТА98), В-5303 (ТА1535), В-5300 (ТА100), В-5393 (ТА102), полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

При выделении, хранении и проверке генотипов культур руководствовались методикой, описанной в [25, 26].

Оценку обратных мутаций у бактерий проводили, используя стандартный чашечный тест (тест Эймса) без метаболической активации и в присутствии микросомной активированной смеси (20–30%) [27–29].

Перед началом эксперимента бактерии высевали в жидкую среду LB (15–20 мл) и инкубировали в термостате при $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 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-1В (BioSan, Латвия) и стандартов мутности 0,5; 1; 2; 3; 4 единиц Мак-Фарланда (Pro-Lab Diagnostics, США).

Оценка мутагенной активности N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина, 95,7% в тесте Эймса*

Доза, мг/чашку	TA97		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	Сред ± SD	Кратность	Сред ± SD	Кратность	Сред ± SD	Кратность	Сред ± SD	Кратность	Сред ± SD	Кратность
<i>В условиях метаболической активации</i>										
0,05	93 ± 6	1,1	40 ± 4	0,9	143 ± 22	1,0	153 ± 4	1,1	15 ± 5	0,8
0,125	152 ± 5	1,8	38 ± 4	0,9	160 ± 11	1,1	152 ± 24	1,1	12 ± 3	0,7
0,5	170 ± 7	2,0	48 ± 6	1,1	179 ± 11	1,2	231 ± 21	1,6	13 ± 3	0,7
1,25	198 ± 10	2,4	53 ± 6	1,2	248 ± 19	1,7	280 ± 35	1,9	13 ± 3	0,7
2,5	218 ± 21	2,6	66 ± 4	1,5	374 ± 34	2,6	359 ± 51	2,5	10 ± 3	0,6
5,0	222 ± 16	2,6	73 ± 7	1,7	810 ± 62	5,6	506 ± 33	3,5	9 ± 3	0,5
Отрицательный контроль	84 ± 9	—	44 ± 8	—	144 ± 11	—	145 ± 15	—	18 ± 3	—
Положительный контроль, 10 мкг/чашка	600 ± 67	7,0	482 ± 7	11,0	1968 ± 64	14,0	1292 ± 235	6,0	1282 ± 88	71,0
<i>Без метаболической активации</i>										
0,05	93 ± 9	1,2	50 ± 10	1,4	156 ± 13	1,1	151 ± 11	1,0	16 ± 5	0,7
0,125	118 ± 24	1,5	48 ± 12	1,4	131 ± 7	0,9	165 ± 19	1,1	16 ± 2	0,7
0,5	160 ± 5	2,1	50 ± 11	1,4	195 ± 18	1,3	257 ± 23	1,8	15 ± 5	0,7
1,25	186 ± 4	2,4	53 ± 2	1,5	240 ± 11	1,6	251 ± 11	1,7	16 ± 3	0,7
2,5	237 ± 34	3,1	69 ± 1	2,0	430 ± 50	2,9	415 ± 30	2,9	12 ± 3	0,6
5,0	288 ± 33	3,7	84 ± 9	2,4	537 ± 72	3,6	480 ± 32	3,3	11 ± 5	0,5
Отрицательный контроль	77 ± 8	—	35 ± 7	—	149 ± 10	—	145 ± 11	—	22 ± 2	—
Положительный контроль	9-аминоакридин, 20 мкг/чашка	2-нитрофлуарен, 10 мкг/чашка	Азид натрия, 10 мкг/чашка	Метилметансульфонат, 10 мкг/чашка	Азид натрия, 10 мкг/чашка	Метилметансульфонат, 10 мкг/чашка	Азид натрия, 10 мкг/чашка	Азид натрия, 10 мкг/чашка	Азид натрия, 10 мкг/чашка	Азид натрия, 10 мкг/чашка
	2171 ± 79	28,0	944 ± 70	27,0	982 ± 128	7,0	723 ± 41	5,0	1046 ± 132	48,0

Примечание. * – приведены данные одного из трёх независимых экспериментов.

Для получения постмитохондриальной фракции печени крыс (S9, концентрация белка 20–22 мг/мл) печёночные оксигеназы индуцировали однократным внутривентральным введением совола (300–350 мг/кг) самцам белых крыс со средней массой 150–180 г. Животных умерщвляли спустя 5 сут после введения индуктора, используя CO₂.

В качестве отрицательного контроля использовали варианты с растворителем (DMCO). Положительными контролями служили 2-аминоантрацен, 2-нитрофлуорен, азид натрия, метилметансульфонат и 9-аминоакридин. В исследовании использовали 5–6 концентраций N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина в трёх повторах в диапазоне 0,05–5 мг на чашку с шагом приблизительно в половину log (√10). Учёт числа ревертантных колоний осуществляли после инкубации бактерий в течение 48–72 ч при 37 ± 2 °C. Мутагенную активность в тесте Эймса оценивали по кратности превышения среднего числа ревертантов на чашку в опытным 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 TA 97, TA 98, TA 100, TA 102 и в 3 или более раз в случае TA 1535 [30, 31].

Исследования *in vivo* проводили в микроядерном тесте на мышцах линии CD-1 обоих полов. Животных получали из питомника Филиала «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства России. Микроядерный тест на эритроцитах костного мозга мышей осуществляли согласно [32, 33].

Использовали по 5 мышей на группу. Исследуемый образец технического продукта вводили внутривентрально в дозах 500; 1000 и 2000 мг/кг м.т. Пестицид вводили два раза с

интервалом в 24 ч. Одновременно в качестве отрицательного контроля вводили 1% крахмал. В качестве положительного контроля использовали циклофосфамид, который вводили внутривентрально в дозе 40 мг/кг один раз, одновременно со вторым введением исследуемого образца. 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 [34]. 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 [35] и ранговый метод Спирмена.

Обработку данных микроядерного теста осуществляли с помощью построения обобщенной лог-линейной модели для распределения Пуассона [36]. Линейную зависимость эффектов от дозы проверяли методом Мантеля–Хензеля [37].

Результаты

Результаты оценки мутагенной активности технического продукта N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина в тесте Эймса приведены в табл. 1, 2 и на рисунке. Статистически значимые зависящие от дозы мутагенные эффекты

Таблица 2

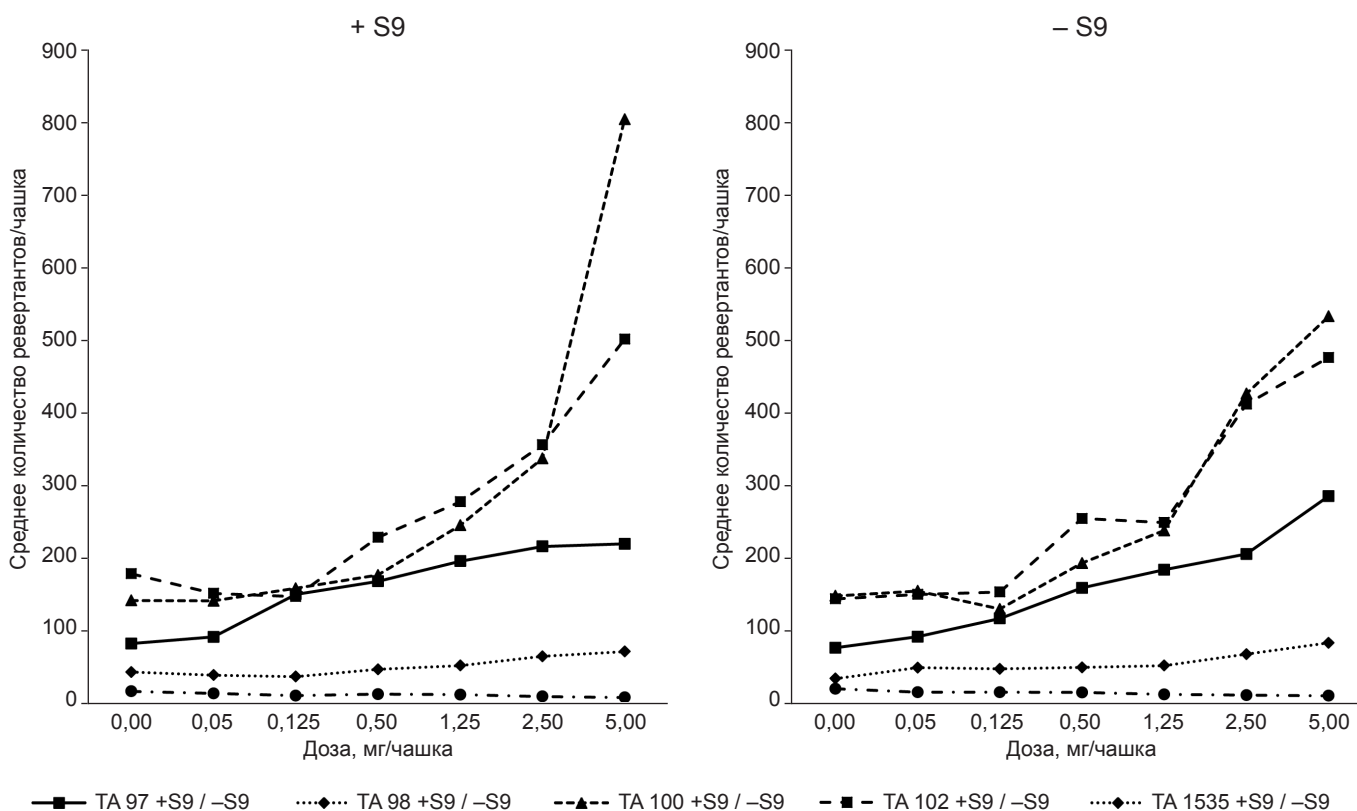
Статистический анализ мутагенной активности N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина, 95,7% в тесте Эймса

Штамм	Доза (<i>p</i> относительно ОК)	TA97		TA98		TA100		TA102		TA1535	
		+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9
<i>p</i> (значимость) ≤ 0,05											
Тест Даннетта <i>t</i>	0,050	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,125	0,000	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,500	0,000	–	–	–	–	–	–	0,000	–	–
	1,250	0,000	0,034	–	–	0,012	0,014	0,003	0,000	–	–
	2,500	0,000	0,004	0,003	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	–	–
	5,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	–
Корреляция Спирмена (<i>p</i> положительной линейной зависимости повышения)		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	–	–

выявлены при использовании штаммов TA97 (+S9/-S9); TA100 (+S9/-S9); TA102 (+S9/-S9) и TA98 (+S9/-S9). При этом кратность превышения числа ревертантов в опыте по сравнению с соответствующим отрицательным контролем у всех штаммов за исключением варианта с TA98 в присутствии посмитохондриальной фракции печени крыс была > 2. Экспозиция N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина с клетками штамма TA1535 не приводила к индукции мутаций в данной культуре как в отсутствие, так и в присутствии системы метаболической активации. При этом наблюдали сни-

жение числа ревертантов TA1535 с кратностью 0,5–0,6 при внесении N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина в дозах 2,5–5 мг/чашку.

В микроядерном тесте исследуемый технический продукт N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина не вызывал подавления эритропоза. Среднее отношение количества ПХЭ к общему числу эритроцитов в костном мозге мышей даже при высокой дозе составляло $0,54 \pm 0,04$ (в отрицательном контроле – $0,53 \pm 0,03$). N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидин не индуцировал статистически



Среднее число ревертантных колоний на чашку в зависимости от дозы N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина.

значимого повышения частоты индукции микроядер в полихроматофильных эритроцитах мышей ни в одной из исследуемых доз вплоть до 2000 мг/кг м.т. (максимальная доза, согласно руководству OECD № 474) по сравнению с отрицательным контролем. Средняя частота ПХЭ с микроядрами у мышей, получавших 2000 мг *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина на килограмм массы тела, составляла $0,15 \pm 0,07\%$, тогда как в сопутствующем отрицательном контроле – $0,16 \pm 0,08$. Кроме того, частота образования микроядер не зависела от дозы технического продукта ($p = 0,728$).

Обсуждение

Согласно данным, опубликованным в отчёте Совместного совещания ФАО/ВОЗ по остаточным количествам пестицидов (JMPR) за 2016 г., *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидин и его 7 метаболитов, образующихся в почве, растениях, в организме лабораторных животных (крысы), не оказывают генотоксического действия [21].

Постоянным комитетом ЕС по пищевой цепи и здоровью животных (Standing Committee on the Food Chain and Animal Health) также опубликована информация об отсутствии генотоксичности *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина [18].

Агентством по защите окружающей среды США *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидин отнесён к группе С, потенциальных канцерогенов для человека, вследствие его способности индуцировать фоликулярную аденому щитовидной железы у крыс [20]. Суммарные объёмы использования *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина в США в 2012 г. оцениваются в 4,5–10 тыс. тонн [38], максимальная норма расхода на землях сельскохозяйственного назначения достигает 6,7 кг/га [24].

В отчёте, подготовленном Health Effects Division EPA USA, указывается, что *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидин может обладать потенциальной генотоксической активностью, поскольку в одном из 8 независимых исследований выявлен позитивный эффект с использованием теста Эймса в концентрациях *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина (92,2%, партия № AC3528-129-1) 50–5000 мкг на чашку.

Мутагенная активность *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина также была выявлена *in vitro* на клетках китайского хомячка в тесте учёта хромосомных aberrаций [20].

N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидин в дозах 313–5000 мкг/чашку вызывал зависящее от дозы и статистически достоверное увеличение частоты генных мутаций по сравнению с соответствующими отрицательными контролями у штаммов TA100 (–S9), TA1535 (+S9) и TA98, TA1537 как в условиях метаболической активации, так и без неё. При этом с использованием метода учёта хромосомных aberrаций в клетках китайского хомячка не выявлено статистически значимого превышения доли клеток с aberrациями в опыте по сравнению с негативным контролем. Результаты микроядерного теста *in vivo* также свидетельствовали об отсутствии кластогенной активности *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина [22].

Методом ДНК-комет на клетках крови, печени и жабр аквариумной рыбки змеёголова пятнистого (*Channa punctata*) в работе [39] показан дозозависимый генотоксический эффект сублетальных концентраций *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина.

Обработка *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидином клеток корней бобов обыкновенных (*Vicia faba*) привела к увеличению процента делящихся клеток и числа клеток, несущих хромосомные aberrации. Анализ электролитического профиля белков экстракта листьев *V. faba* показал исчезновение трёх белков с молекулярными массами 265; 175 и 40 кДа [40].

Наличие мутагенной активности препаративной формы *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина также было выявлено в работе Dmitov B. и соавт. при использовании микроядерного теста *in vivo* в клетках костного мозга грызунов и растений. Оценка цитогенетической активности на клетках скерды (*Crepis capillaris* L.) в отличие от клеток костного мозга мышей не выявила способности препаративной формы на основе *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина индуцировать образование хромосомных aberrаций [41].

Как было показано на примере ДНК тимуса телёнка, *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидин, вероятно, способен к гидрофобным взаимодействиям с макромолекулами нуклеиновой кислоты путём интеркаляции в двойную нить ДНК между парой оснований Г-Ц [42].

Эпидемиологические исследования по оценке влияния воздействия *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина на развитие раковых заболеваний также не дают однозначного ответа. В работе [43] не выявлено чёткой взаимосвязи между экспозицией с *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидином и возникновением раковых заболеваний у операторов. В то же время Bonner M.R. и соавт. выявили слабую корреляцию между воздействием *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина и заболеваемостью раком лёгких [44].

Согласно данным, приведённым в литературе, минимальная чистота технического продукта *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина составляет 900 г/кг. К числу идентифицированных релевантных примесей, которые могут присутствовать в техническом материале и усиливать его мутагенный потенциал, относят 1,2-дихлорэтан, канцероген класса 1B, содержание которого регламентировано на уровне ≤ 1 г/кг, и нитрозо-*N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидин, содержание которого не должно превышать 45 мг/кг. *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидин также может содержать другие неидентифицированные примесью нитрозоамины с общим содержанием не выше 100 мг/кг [18–21].

Ранее нами было показано, что наблюдаемые различия в генотоксических эффектах технических продуктов производного бензоилциклогексан-1,3-диона и глифосата предположительно обусловлены различным содержанием примесных соединений, обладающих мутагенной активностью [16, 17].

Разная мутагенная активность технических продуктов *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина, выявленная в ряде исследований, также может быть связана с неодинаковым профилем релевантных примесей. Полное описание состава технического продукта может раскрыть технологическую схему его производственного процесса, поэтому информация о примесных соединениях, как правило, является конфиденциальной, доступной только для регуляторных ведомств. Поэтому провести детальное сравнение влияния состава релевантных примесей на мутагенную активность *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина, опираясь только на данные открытых литературных источников, не представлялось возможным.

Полученные разнонаправленные результаты оценки генотоксичности в тестах *in vitro* и *in vivo*, вероятно, опосредованы многообразием этапов метаболизма в многоклеточных организмах и/или способностью примесных соединений индуцировать мутации разных типов.

С учётом результатов исследования, полученных нами ранее [16, 17], а также принимая во внимание, что релевантные примеси в технических продуктах могут находиться в крайне низких концентрациях и их идентификация аналитическими методами не всегда осуществима, представляется необходимым тестирование всех технических продуктов пестицидов в отношении потенциальной генотоксичности с использованием не менее двух методов на разных тест-системах.

Литература

(пп. 5–15, 18–22, 24–28, 33, 35–44 см. в References)

- Федеральный закон от 19.07.1997 ФЗ № 109 «О безопасном обращении с пестицидами и агрохимикатами» (с изм. и дополн.).
- Приказ Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 10.07.2007 № 357 «Об утверждении Порядка государственной регистрации пестицидов и агрохимикатов» (с измен. и дополнен.).
- Решение Комиссии Таможенного союза от 10 ноября 2015 г. № 149 «О внесении изменений в Решение комиссии Таможенного союза от 28 мая 2010 г. № 299».
- Методические указания МУ-1.2.3365-16 от 04.07.2016 «Оценка мутагенной активности пестицидов». М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2016. 49 с.
- 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): 509–13. DOI: <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-6-509-13>.
- Илюшина Н.А., Аверьянова Н.С., Масальцев Г.В., Ревазова Ю.А. Сравнительное исследование генотоксической активности технических продуктов глифосата в микроядерном тесте *in vivo*. *Токсикологический вестник*. 2018; 151 (4): 24–8.
- Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешённых к применению на территории Российской Федерации, дата обращения 22.11.2018. URL: <http://mcx.ru/ministry/departments/departament-rasteniievodstva-mekhanizatsii-khimizatsii-i-zashchity-rastenyi/industry-information/info-gosudarstvennaya-usluga-pogosudarstvennoy-registratsii-pestitsidov-i-agrokhimikatov/>.
- 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 с.
- 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.
- Абилев С.К. Выявление и прогнозирование мутагенной активности химических соединений окружающей среды: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.; 2003. 50 с. URL: <http://abilev.narod.ru/publications.htm>.
- 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 с.
- Методические рекомендации. Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микроядерным методом. М.: Межведомственный научный совет по экологии человека и гигиене окружающей среды Российской Федерации; 2001. 22 с.

References

- The Federal law N 109-FZ of July 19, 1997 “On the safe handling of pesticides and agrochemicals”. (in Russian)
- The Order of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation N 357 of July 10, 2007 “On Approval of the Procedure for State Registration of Pesticides and Agrochemicals”. (in Russian)
- The decision of the Board of the Eurasian Economic Commission N 149 of November 10, 2015 “On Amendments to the Customs Union Commission Decision N 299” 28 May 2010”. (in Russian)
- 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 p. (in Russian)
- Parry J.M. Assessing the potential mutagenicity of pesticides. *Scand J Work Environ Health*. 2005; 31 Suppl 1: 123–8. Available at: http://www.sjweh.fi/show_abstract.php?abstract_id=908.
- Booth E.D., Rawlinson P.J., Maria Fagundes P., Leiner K.A. Regulatory requirements for genotoxicity assessment of plant protection product active ingredients, impurities, and metabolites. *Environ Mol Mutagen*. 2017; 58: 325–44. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.22084>.
- Dearfield K.L., Gollapudi B.B., Bemis J.C., Benz R.D., Douglas G.R., Elespuru R.K. et al. Next generation testing strategy for assessment of genotoxic damage: A conceptual framework and considerations. *Environ Mol Mutagen*. 2017; 58 (5): 264–83. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.22045>.
- Turkez H., Arslan M.E., Ozdemir O. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2017; 13 (10): 1089–98. DOI: <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1375097>.
- Kirkland D., Kasper P., Martus H.J., Müller L., van Benthem J., Madia F. et al. Updated recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2016; 795: 7–30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.10.006>.
- Watanabe T., Hanasaki Y., Hirayama T., Fukui S. Mutagenicity of nitro- and amino-substituted phenazines in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res*. 1989; 225 (3): 75–82.
- Ambrus A., Hamilton D.J., Kuiper H.A., Racke K.D. Significance of impurities in the safety evaluation of crop protection products (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem*. 2003; 75 (7): 937–73. <https://pdfs.semanticscholar.org/6612/f32b011da238a771309fbaa6e7965f503583.pdf>.
- Benomyl (AGP:CP/324). FAO specifications for plant protection products; 1995. <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/lpe/lpe-b/en/>.
- Fishbein L. Overview of potential mutagenic problems posed by some pesticides and their trace impurities. *Environ Health Perspect*. 1978; 27: 125–31. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.7827125>.
- Nitrosamines and Pesticides: A Special Report on the Occurrence of Nitrosamines as Terminal Residues Resulting From Agricultural Use of Certain Pesticides. *Pure Appl Chem*. 1980; 52 (2): 499–526. DOI: <https://doi.org/10.1351/pac198052020499>.
- Bontoyan W.R., Law M.W., Wright Jr D.P. Nitrosamines in agricultural and home-use pesticides. *J Agric Food Chem*. 1979; 27 (3): 631–5. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf60223a009>.
- Ilyushina N., Egorova O., Masaltsev G., Averianova N. Genotoxicity studies of technical products of benzoylecyclohexane-1,3-dione derivative pesticide. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2018; 97 (6): 509–13. DOI: <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-6-509-513>. (in Russian)
- Ilyushina N., Averianova N., Masaltsev G., Revazova YU. Comparative investigation of genotoxic activity of glyphosate technical products in the micronucleus test *in vivo*. *Toksikologicheskii vestnik*. 2018; 151 (4): 24–8. (in Russian)
- European commission directorate-general for health and food safety. Final Renewal report for the active substance PENDIMETHALIN finalised in the Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed at its meeting on 18 May 2017 in view of the renewal of the approval of PENDIMETHALIN as active substance in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009SANTE/11656/2016.
- California environmental protection agency. Summary of toxicology data. Pendimethalin. T15092.
- Health Effects Division EPA USA. Pendimethalin registration eligibility decision document. Review. 1997. 53 p.
- The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR). Pesticide residues in food 2016. FAO plant production and protection paper 229.
- Rue J.C., Kim K.-R. Evaluation of genetic toxicity of synthetic chemicals (VII) – a synthetic selective herbicide pendimethalin. *J Environ Toxicol*. 2013; 18 (2): 121–9.
- The State Catalogue of Pesticides and Agrochemicals Permitted for Application on the Territory of the Russian Federation, the date of reference 22.11.2018. (in Russian)
- 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: <https://doi.org/10.1080/10937404.2016.1222320>.
- 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>.
- Mortelmans K., Zeiger E. The Ames *Salmonella/microsome* mutagenicity assay. *Mutat Res*. 2000; 455: 29–60. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6).
- OECD, test 471:1997, IDT. Bacterial reverse mutation test.
- Maron D.M., Ames B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res*. 1983; 113: 173–215. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9).
- 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 p. (in Russian)
- Guidelines on short-term methods for detection of mutagenic and carcinogenic chemicals. A Co-Publishing of United Nations Environment Programme, International Labour Organization and World Health Organization. Moscow: Meditsina; 1989: 26–38. (in Russian)

31. Abilev S.K. Identification and prediction of mutagenic activity of chemical compounds of the environment. Autoabstract of Diss. Moscow; 2003. 50 p. <http://abilev.narod.ru/publications.htm>. (in Russian)
32. 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 Rospotrebnadzor; 2014. 639 p. (in Russian)
33. OECD Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test; 2014.
34. 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 p (in Russian)
35. Kirkland D.J. Statistical evaluation of mutagenicity test data: recommendations of the UK Environmental Mutagen Society. *Environ Health Perspect.* 1994; 102 (Suppl 1): 43–7.
36. McCullagh P., Nelder J.A. *Generalized linear models. CRC Monographs on Statistics & Applied Probability 37. Second Edition.* London, New York: Chapman and Hall; 1983. 261 p. DOI: <https://doi.org/10.1002/bimj.4710290217>.
37. 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. <http://www.biostathandbook.com/cmh.html>.
38. Atwood D., Paisley-Jones C. Pesticides Industry Sales and Usage 2008 – 2012 Market Estimates. U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC 2046; 2017.
39. Ahmad I., Ahmad M. Fresh water fish, *Channa punctatus*, as a model for pendimethalin genotoxicity testing: A new approach toward aquatic environmental contaminants. *Environ Toxicol.* 2016; 31 (11): 1520–9. DOI: <https://doi.org/HYPERLINK> “<https://doi.org/10.1002/tox.22156>”[10.1002/tox.22156](https://doi.org/10.1002/tox.22156).
40. Aboulila A.A., Belal E.B., Metwaly M.M., El-Ramady H.R. Degenotoxicity of Pendimethalin Contaminated Clay Soil by *Pseudomonas resinovorans* Using Anatomical, Cytogenetic and Biochemical Analysis in *Vicia faba* Plants. International. *Int J Curr Res Biosci Plant Biol.* 2016; 3 (2): 38–53. DOI: <http://dx.doi.org/10.20546/ijcrbp.2016.302.005>.
41. Dimitrov B.D., Gadeva P.G., Benova D.K., Bineva M.V. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. *Mutagenesis.* 2006; 21 (6): 375–82. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/gel044>.
42. Ahmad I., Ahmad A., Ahmad M. Binding properties of pendimethalin herbicide to DNA: multispectroscopic and molecular docking approaches. *Phys Chem Chem Phys.* 2016; 18 (9): 6476–85. DOI: <https://doi.org/10.1039/c5cp07351k>.
43. Hou L., Lee W.J., Rusiecki J., Hoppin J.A., Blair A., Bonner M.R. et al. Pendimethalin Exposure and Cancer Incidence Among Pesticide Applicators. *Epidemiology.* 2006; 17 (3): 302–7. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000201398.82658.50>.
44. Bonner M.R., Freeman L., Hoppin J.A., Koutros S., Sandler D.P., Lynch C.F. et al. Occupational Exposure to Pesticides and the Incidence of Lung Cancer in the Agricultural Health Study. *Environ Health Perspect.* 2017; 125 (4): 544–51. DOI: <https://doi.org/10.1289/EHP456>.