

© ЕГОРОВА О.В., ИЛЮШИНА Н.А., 2022



Егорова О.В., Илюшина Н.А.

## Новые возможности теста Эймса при оценке мутагенности технических продуктов действующих веществ пестицидов

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

**Введение.** Тест Эймса — один из наиболее востребованных методов выявления мутагенности факторов среды. В ряде случаев его предлагают в качестве единственного и достаточного метода для первого этапа оценки эквивалентности технических продуктов (ТП) пестицидов оригинальным действующим веществам (ДВ). Ограничением метода является невозможность объективной оценки эквивалентности некоторых ТП, обладающих высокой цитотоксичностью, в частности сульфонилмочевин и триазолпиримидинов. С учётом механизма действия химических веществ указанных классов предложена модификация протокола стандартного чашечного теста Эймса для увеличения максимальной нецитотоксичной концентрации

**Материалы и методы.** Использовали 5 штаммов *Salmonella typhimurium* — TA97, TA98, TA100, TA1535, TA102. Модификация метода включала обогащение верхнего агара изолейцином (1–5 мМ).

**Результаты.** Максимальные нецитотоксичные концентрации тифенсульфурон-метила и флорасулама при использовании общепринятого протокола не превышали 0,05–0,125 мг/чашка. Обогащение среды изолейцином позволяло провести оценку мутагенной активности веществ вплоть до максимальной рекомендованной концентрации 5 мг/чашка. Число спонтанных ревертантных колоний находилось в пределах исторического контроля в лаборатории, полученного в стандартных условиях. Положительные контроли проявили выраженную мутагенную активность на всех штаммах в условиях метаболической активации и без неё ( $p \leq 0,05$ ).

**Ограничения исследования.** Исследование ограничено тестированием мутагенной активности ТП ДВ пестицидов — ингибиторов синтазы ацетогидроксикислот.

**Заключение.** Использование модифицированного протокола теста Эймса для исследования мутагенности ТП ДВ пестицидов из классов сульфонилмочевин и триазолпиримидинов путём обогащения среды изолейцином является более объективным способом оценки их мутагенности. Предложенный протокол расширяет возможности выявления опасных мутагенных примесей, которые присутствуют в ТП в небольших количествах, но при попадании в окружающую среду могут приводить к превышению уровня мутирования у живых организмов.

**Ключевые слова:** тест Эймса; мутагенность; сульфонилмочевины; триазолпиримидины

**Для цитирования:** Егорова О.В., Илюшина Н.А. Новые возможности теста Эймса при оценке мутагенности технических продуктов действующих веществ пестицидов. *Гигиена и санитария*. 2022; 101(11): 1386–1392. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-11-1386-1392> <https://elibrary.ru/tbitgr>

**Для корреспонденции:** Егорова Ольга Валерьевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отд. генетической токсикологии, ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, Мытищи. E-mail: [egorovaov@ferisman.ru](mailto:egorovaov@ferisman.ru)

**Участие авторов:** Егорова О.В. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста; Илюшина Н.А. — статистическая обработка материала, редактирование текста. *Все соавторы* — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила: 21.06.2022 / Принята к печати: 03.10.2022 / Опубликована: 30.11.2022

Olga V. Egorova, Natalia A. Ilyushina

## New possibilities of the Ames test for evaluation of mutagenicity of technical products of active ingredients of pesticides

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

**Introduction.** The Ames test is the one of the most popular methods for mutagenicity evaluation of environmental factors. In some cases, this method is suggested to be the only and sufficient assay for the first stage of the equivalence assessment of pesticide technical grade active ingredients (TGAIs) to the original products. A limitation of the Ames test is related to the impossibility of an objective equivalence assessment of some cytotoxic TGAIs, in particular, sulfonylureas, and triazolpyrimidines. Based on the mode of action of the pesticides belongs to these chemical classes, we suggested a modification of the plate incorporation method protocol of the Ames test to the increase of maximal non-cytotoxic concentration up to the 5 mg/plate recommended by regulatory documents.

**Materials and methods.** The five strains of *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA97, TA102 were used. The modification of the protocol included a supplementation of the top agar with isoleucine (1–5 mM).

**Results.** The maximum non-cytotoxic concentrations of thifensulfuron-methyl and florasulam using the standard top agar did not exceed 0.05–0.125 mg/plate. The enrichment of the top agar with isoleucine allowed evaluating the mutagenicity of the substances up to the maximal recommended concentration of 5.0 mg/plate. The number of spontaneous revertants was within the historical limits of the laboratory control obtained under standard conditions. Positive controls showed pronounced mutagenic effects in case of all strains with and without metabolic activation ( $p \leq 0.05$ ).

**Limitations.** Mutagenicity was evaluated only for TGAIs, which are acetohydroxyacid synthase inhibitors.

**Conclusion.** The application of the modified Ames test protocol for mutagenicity assessment of TGAIs from the classes of sulfonylureas and triazolpyrimidines under supplementation of the top agar with isoleucine is a more objective way to evaluate their mutagenicity. The proposed protocol expands the possibilities of revealing dangerous mutagenic impurities that may occur in TGAIs in the small quantities, and after entering the environment can cause the gain in the mutation level in living organisms.

**Keywords:** the Ames test; mutagenicity; sulfonylureas; triazolo pyrimidines

**For citation:** Egorova O.V., Ilyushina N.A. New possibilities of the Ames test for evaluation of mutagenicity of technical products of active ingredients of pesticides. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2022; 101(11): 1386–1392. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-11-1386-1392> <https://elibrary.ru/tbitgr> (In Russian)

**For correspondence:** Olga V. Egorova, MD, PhD, senior researcher of the department of genetic toxicology, 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: egorovaov@fferisman.ru

**Information about the authors:**

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

**Contribution:** Egorova O.V. – the concept and design of the study, the collection and processing of material, writing the text; Ilyushina N.A. – statistical processing of the material, text editing. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

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

**Acknowledgement.** The study had no sponsorship.

Received: June 21, 2022 / Accepted: October 3, 2022 / Published: November 30, 2022

## Введение

Во многих странах производство средств защиты растений основано на использовании пестицидов-дженериков, представляющих собой «копии» оригинальных действующих веществ [1]. Однако и в этом случае для обращения на рынке пестициды-дженерики должны пройти регистрацию – правовую процедуру, которую предвораляет оценка эквивалентности технического продукта действующего вещества (ДВ) регистрируемого пестицида техническому продукту ДВ фирмы-оригинатора.

Алгоритм оценки эквивалентности ДВ пестицидов представляет собой поэтапную процедуру, целью которой является определение соответствия химического состава продукта и его токсикологических характеристик оригинальному продукту, регистрационные испытания которого выполнены в полном объёме [2]. При выявлении в техническом продукте (ТП) новых примесей их потенциальную опасность прогнозируют, используя методы *in silico*. Кроме того, при наличии новых примесей или повышенных уровнях известных значимых примесей проводят анализ генотоксичности ТП, который главным образом основывается на исследованиях *in vitro*. Методы с использованием моделей на животных применяют в случае выявления позитивных или неопределённых результатов *in vitro* [3].

Тест на индукцию обратных генных мутаций – один из наиболее востребованных методов оценки мутагенности ввиду простоты исполнения и способности выявлять до 80% мутагенов [4]. В ряде стран тест Эймса предлагают в качестве единственного и достаточного метода для первого этапа оценки эквивалентности технических продуктов пестицидов. Существенным ограничением применимости метода является невозможность его использования для определения эквивалентности некоторых химических веществ [5–7]. Наличие цитотоксичности тестируемого вещества может привести как к ложнонегативным, так и к ложнопозитивным результатам. Ложнопозитивные результаты получают вследствие гибели большей части популяции внесённых бактерий. При этом оставшиеся микроорганизмы растут в условиях избытка гистидина с формированием многочисленных микроколоний ауксотрофных спонтанных ревертантов, что ошибочно может быть принято за картину позитивного ответа [8].

Ранее нами было показано, что некоторые ДВ пестицидов определённых химических классов цитотоксичны для штаммов *Salmonella typhimurium*. Например, в случае производных дитиокарбаматов (тирам, манкоцеб), триазолпиримидинов (флорасулам, пеноксилам и др.), сульфониломочевин (этаметсульфуронметил, метсульфуронметил и др.) максимальная нецитотоксичная доза не превышала 0,125–0,5 мг/чашка [9].

Следовательно, при подтверждении эквивалентности технических продуктов пестицидов оригинальным продуктам по критерию мутагенности наличие цитотоксичности ДВ не позволяет проводить тестирование при высоких концентрациях вплоть до максимальной (5 мг/чашка), рекомендованной нормативными документами. Учитывая, что примесные соединения в ТП пестицида присутствуют в небольших количествах, вероятность обнаружения мутаген-

ной активности, обусловленной наличием примесей, при снижении максимальных нецитотоксичных концентраций становится крайне низкой.

Известно, что механизм действия пестицидов, относящихся к классам сульфониломочевин и триазолпиримидинов, заключается в ингибировании синтазы ацетогидроксициклот (acetohydroxyacid synthase, AHAS), участвующей в синтезе разветвлённых аминокислот, что приводит к подавлению роста растений. Аналогичное действие пестицидов этих классов оказывают и на клетки микроорганизмов. На основании литературных данных о механизме действия данных пестицидов нами было сделано предположение, что обогащение среды разветвлёнными аминокислотами может привести к снятию цитотоксического действия указанных соединений на клетки индикаторных культур.

*Цель исследования* – модификация протокола проведения теста Эймса для оценки потенциальной мутагенности химических веществ из классов триазолпиримидинов и сульфониломочевин в диапазоне концентраций, рекомендованных нормативными документами [5, 6, 10, 11].

## Материалы и методы

Культуры штаммов *S. typhimurium* получены из НБЦ ВКПМ в лиофилизированном виде. Использована комбинация штаммов *S. typhimurium* В-5291 (ТА97); *S. typhimurium* В-5294 (ТА98); *S. typhimurium* В-5300 (ТА100); *S. typhimurium* В-5303 (ТА1535); *S. typhimurium* В-5393 (ТА102). При выделении, хранении и проверке генотипов культур руководствовались методикой, описанной в [4].

Тестировали технические продукты действующих веществ пестицидов: тифенсульфуронметил (97,4%) и флорасулам (98,1%). Использовали стандартный чашечный тест без метаболической активации и в присутствии микросомной активирующей смеси с содержанием 20–30% фракции S9 (15–22 мг/мл белка) [12]. В качестве отрицательного контроля использовали варианты с растворителем диметилсульфоксидом (DMSO). Положительными контролями служили 2-аминоантрацен, циклофосфамид, 2-нитрофлуорен, азид натрия, метилметансульфонат, митомицин С и 9-аминоакридин. Соединение рассматривали как цитотоксичное, если имело место снижение на 40% фона спонтанного мутирования [4]. Критерии оценки мутагенности описаны в [13].

Для снятия цитотоксического эффекта сульфониломочевин и триазолпиримидинов в отношении индикаторных штаммов *S. typhimurium* с учётом механизма действия в верхний полужидкий агар дополнительно с гистидином и биотином вводили изолейцин в концентрациях 1; 2 или 5 мМ, смешивая 90 мл среды с 10 мл раствора изолейцина с концентрацией 10; 20 или 50 мМ.

Статистическую обработку проводили с помощью программы SPSS Statistics v.22.0 (Корпорация IBM, Нью-Йорк, США). Для оценки результатов, полученных в тесте Эймса, использовали *t*-тест для независимых выборок (для сравнения двух групп), тест Даннетта (для трёх и более групп). Различия между группами считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

Таблица 1 / Table 1

Оценка мутагенности некоторых цитотоксичных пестицидов классов сульфонилмочевин и триазолпиримидинов с использованием штаммов *Salmonella typhimurium* без добавления изолейцина  
Mutagenicity assessment of some cytotoxic sulfonyleurea and triazole-pyrimidine herbicides using *Salmonella typhimurium* without isoleucine

Конц., мг/чашка Conc., mg/plate	TA97			TA98			TA100			TA102			TA1535					
	+S9		-S9	+S9		-S9	+S9		-S9	+S9		-S9	+S9		-S9			
	Mean±SD	ИП, % Red, %	ИП, % Red, %	Mean±SD	ИП, % Red, %	ИП, % Red, %	Mean±SD	ИП, % Red, %	ИП, % Red, %	Mean±SD	ИП, % Red, %	ИП, % Red, %	Mean±SD	ИП, % Red, %	ИП, % Red, %			
DMSO	151 ± 14	-	120 ± 9	-	19 ± 2	-	114 ± 15	-	103 ± 10	-	171 ± 15	-	150 ± 12	-	16 ± 3	-	17 ± 3	-
0.005	124 ± 10	18	101 ± 7	16	22 ± 3	12	117 ± 19	0	95 ± 15	8	159 ± 5	7	122 ± 6	19	16 ± 3	0	20 ± 6	0
0.0125	95 ± 8	37	89 ± 6	26	17 ± 2	20	115 ± 11	0	65 ± 6	37	147 ± 8	14	120 ± 11	20	13 ± 1	19	18 ± 3	0
0.05	17 ± 4	89	18 ± 4	85	11 ± 4	40	115 ± 5	0	31 ± 4	63	120 ± 18	30	75 ± 13	50	13 ± 3	19	17 ± 2	0
0.125	3 ± 2	98	2 ± 1	98	8 ± 3	36	109 ± 5	4	1 ± 1	99	124 ± 13	27	25 ± 9	83	14 ± 2	13	12 ± 4	40
0.5	0	100	1 ± 1	99	4 ± 2	80	17 ± 5	85	0	100	52 ± 7	70	7 ± 2	95	12 ± 3	25	7 ± 2	65
1.25	0	100	0	100	2 ± 1	100	1 ± 1	99	0	100	15 ± 5	91	0	100	6 ± 2	63	1 ± 1	95
ПК / PC	658 ± 45	0	752 ± 27	0	891 ± 27	0	1722 ± 60	0	1009 ± 4	0	1580 ± 52	0	1280 ± 30	0	620 ± 35	0	1101 ± 52	0
<b>Флорасулам (класс ТА10) / Florasulam (triazole-pyrimidines)</b>																		
DMSO	151 ± 14	-	120 ± 9	-	19 ± 2	-	74 ± 8	-	76 ± 5	-	171 ± 15	-	150 ± 12	-	16 ± 3	-	17 ± 3	-
0.005	105 ± 10	30	89 ± 10	26	16 ± 3	12	78 ± 8	0	72 ± 2	5	167 ± 9	2	123 ± 9	18	18 ± 2	0	20 ± 2	0
0.0125	63 ± 5	58	45 ± 6	63	13 ± 2	20	54 ± 9	27	61 ± 3	20	153 ± 12	11	95 ± 9	37	19 ± 3	0	18 ± 3	0
0.05	30 ± 9	80	27 ± 5	78	12 ± 2	52	49 ± 11	34	58 ± 2	23	85 ± 4	50	62 ± 11	59	15 ± 5	69	8 ± 3	53
0.125	15 ± 5	90	10 ± 3	92	5 ± 2	76	27 ± 2	64	22 ± 4	71	19 ± 3	89	29 ± 8	81	11 ± 2	31	2 ± 1	88
0.5	2 ± 2	99	0	100	1 ± 2	92	19 ± 4	74	10 ± 3	87	2 ± 2	99	12 ± 3	92	4 ± 2	75	1 ± 1	94
1.25	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
ПК / PC	658 ± 45	0	752 ± 27	0	891 ± 27	0	1952 ± 104	0	1213 ± 83	0	1580 ± 52	0	1280 ± 30	0	620 ± 35	0	1101 ± 52	0

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: Позитивный контроль (ПК): в условиях метаболической активации – 2-аминоантрацен; без метаболической активации – азид натрия (TA100, TA1535); 9-аминоакридин (TA97); 2-нитрофлуорен (TA98); метилметансульфонат (TA102); ИП – цитотоксичность (уменьшение числа колоний на чашках с пестицидом по сравнению с отрицательным контролем, выраженная в %). Mean±SD – среднее число колоний на чашке ± среднеквадратичное отклонение (SD).

Note: Here and in Table 2–4: Positive control (PC): with metabolic activation – 2-aminoanthracene; without metabolic activation – sodium azide (TA100, TA1535), 2-nitrofluorene (TA98), 9-aminoacridine (TA97), methyl methane sulfonate (TA102); Red – Reduction (reduction of the number of revertants against the concurrent vehicle control in %). Mean±SD – Mean number colonies per plate ± standard deviation (SD).

Результаты

Ранее нами было обнаружено, что все тестируемые технические продукты пестицидов из класса сульфонилмочевин (хлорсульфурон, никосульфурон, метсульфурон-метил, этаметсульфурон-метил, тифенсульфурон-метил) и триазолпиримидинов (флорасулам, пеноксулам, флуметсулам) оказывают цитотоксическое действие на штаммы *S. typhimurium*, выражающееся в явном снижении числа ревертантов [9]. Поэтому при оптимизации протокола теста Эймса с учётом механизма действия соединений этих классов на метаболизм клеток микроорганизмов в качестве модельных соединений нами были использованы тифенсульфурон-метил (сульфонилмочевины) и флорасулам (триазолпиримидины). Полученные результаты подтвердили, что при оценке мутагенности с использованием классического состава среды максимальные нецитотоксичные концентрации этих технических продуктов не превышали 0,0125–0,125 мг/чашка для тифенсульфурон-метила и 0,005–0,05 мг/чашка в случае флорасулама (табл. 1).

В предварительном эксперименте оценивали возможность снятия цитотоксического действия сульфонилмочевин и триазолпиримидинов при обогащении верхнего агара 1 мМ лейцином, валином или изолейцином или их комбинацией с использованием индикаторных культур TA100 и TA1535 без метаболической активации. Введение в среду изолейцина или смеси трёх аминокислот, но не валина или лейцина по отдельности, снимало ингибирование роста штаммов высокими концентрациями тифенсульфурон-метила или флорасулама. Исходя из полученных результатов в дальнейших экспериментах оценивали возможность тестирования на мутагенность соединений из классов сульфонилмочевин и триазолпиримидинов вплоть до максимальной дозы 5 мг/чашка при обогащении среды изолейцином в разных концентрациях как в условиях метаболической активации, так и без неё (табл. 2, 3). Введение в состав верхнего агара изолейцина приводило к снятию цитотоксических эффектов тифенсульфурон-метила и флорасулама на индикаторные культуры: диапазон нецитотоксичных концентраций увеличился до 1,6–5 мг/чашка. При этом число спонтанных ревертантных колоний находилось в пределах исторического контроля в лаборатории, полученного при

Таблица 2 / Table 2

Оценка мутагенности некоторых цитотоксических пестицидов классов сульфонилмочевин и триазолиримидинов с использованием штаммов *Salmonella typhimurium* в присутствии 1 мМ изолейцина и 2 мМ изолейцина  
 Mutagenicity assessment of some cytotoxic sulfonylurea and triazole-pyrimidine herbicides using *Salmonella typhimurium* in the presence of 1 mM isoleucine and of 2 mM isoleucine

Конц., мг/чашка Conc., mg/plate	ТА97 ВКПМ В-5291			ТА98 ВКПМ В-5294			ТА100 ВКПМ В-5300			ТА102 ВКПМ В-5393			ТА1535 ВКПМ В-5303		
	+S9		-S9	+S9		-S9	+S9		-S9	+S9		-S9	+S9		-S9
	Mean±SD	ИТ, % Red, %	ИТ, % Red, %	Mean±SD	ИТ, % Red, %	ИТ, % Red, %	Mean±SD	ИТ, % Red, %	ИТ, % Red, %	Mean±SD	ИТ, % Red, %	ИТ, % Red, %	Mean±SD	ИТ, % Red, %	ИТ, % Red, %
DMSO	145±11	-	45±6	-	107±5	-	95±14	-	104±12	-	92±9	-	17±3	-	16±2
0.05	134±14	8	39±2	13	23±2	15	96±9	10	89±7	6	107±12	0	95±3	0	15±2
0.16	128±3	11	43±6	4	32±8	0	99±2	7	85±12	10	98±14	6	108±6	0	18±6
0.5	140±13	3	35±3	22	21±1	22	94±6	12	82±10	13	99±12	5	86±3	0	15±1
1.6	132±24	9	37±3	18	22±3	19	93±10	13	95±7	0	101±4	3	81±4	11	14±3
5.0	135±5	7	40±4	11	21±4	22	80±6	25	85±8	10	89±13	14	91±13	1	12±4
ПК/РС	842±63	0	473±6	0	614±24	0	947±6	0	1256±5	0	1401±17	0	2171±148	0	784±154
<b>В присутствии 1 мМ изолейцина / In the presence of 1 mM isoleucine</b>															
<i>Тифенсульфурон-метил (класс СФМ) / Tifensulfuronmethyl (sulfonylureas)</i>															
DMSO	108±8	-	46±6	-	112±11	-	107±8	-	133±11	-	99±12	-	19±4	-	18±2
0.05	96±9	11	45±8	2	42±6	0	112±4	0	101±16	6	126±12	5	97±12	2	23±4
0.16	89±8	18	109±13	0	36±5	0	115±12	0	98±12	8	118±14	11	94±15	5	21±5
0.5	98±13	9	45±7	2	30±2	14	111±11	1	117±10	0	97±16	27	89±6	10	18±3
1.6	85±5	21	39±5	15	29±3	17	110±8	2	91±12	15	113±5	15	82±8	17	11±3
5.0	1±1	99	86±13	19	32±3	30	70±4	38	73±10	31	88±16	34	53±4	46	6±2
ПК/РС	876±87	0	777±60	0	710±78	0	568±176	0	1382±68	0	1031±62	0	1096±101	0	426±28
<i>Флорасулам (класс ТАИД) / Florasulam (triazole-pyrimidines)</i>															
DMSO	119±15	-	33±7	-	107±8	-	96±8	-	149±2	-	130±10	-	16±3	-	26±5
0.05	124±7	0	32±3	3	23±4	4	114±10	0	103±14	0	160±10	0	134±3	0	24±4
0.16	130±8	0	36±5	0	30±3	0	105±5	2	100±11	0	154±11	0	135±7	0	17±4
0.5	120±10	0	35±1	0	24±5	0	110±7	0	99±8	0	139±12	7	141±14	0	16±4
1.6	118±6	1	37±3	0	22±2	8	104±13	3	105±10	0	118±15	20	142±16	0	24±6
5.0	117±10	2	27±5	18	20±2	16	98±10	8	93±7	3	128±20	14	125±19	4	24±5
ПК/РС	988±203	0	453±62	0	1285±125	0	1420±31	0	1004±45	0	1888±19	0	1608±70	0	1390±19
<i>Флорасулам (класс ТАИД) / Florasulam (triazole-pyrimidines)</i>															
DMSO	119±15	-	33±7	-	107±8	-	96±8	-	149±2	-	130±10	-	16±3	-	26±5
0.05	116±8	3	35±5	0	23±6	4	111±7	0	91±7	5	156±15	0	133±9	0	19±6
0.16	129±10	0	38±3	0	23±2	4	105±13	2	107±12	0	148±12	1	141±5	0	24±3
0.5	118±9	1	31±4	6	16±4	33	114±10	0	99±5	0	137±8	8	122±3	5	18±4
1.6	122±11	0	27±4	18	14±6	42	100±10	7	85±14	11	104±10	30	107±7	18	17±6
5.0	80±14	33	23±4	30	6±3	75	64±5	40	8±4	92	63±13	58	31±5	76	4±2
ПК/РС	988±203	0	453±62	0	1285±125	0	1420±31	0	1004±45	0	1888±19	0	1608±70	0	1390±19

Таблица 3 / Table 3

Оценка мутагенности некоторых цитотоксичных пестицидов классов сульфонилмочевин и триазолпиримидинов с использованием штаммов *Salmonella typhimurium* в присутствии 5 мМ изолейцина

Assessment of mutagenicity of some cytotoxic sulfonyleurea and triazole-pyrimidine herbicides using *Salmonella typhimurium* in the presence of 5 mM isoleucine

Конц., мг/чашка Conc., mg/plate	ТА97 ВКПМ В-5291		ТА98 ВКПМ В-5294		ТА100 ВКПМ В-5300		ТА102 ВКПМ В-5393		ТА1535 ВКПМ В-5303							
	+S9		-S9		+S9		-S9		+S9							
	ИТ, % Red, %	Mean±SD	ИТ, % Red, %	Mean±SD	ИТ, % Red, %	Mean±SD	ИТ, % Red, %	Mean±SD	ИТ, % Red, %	Mean±SD						
<i>Тифенсульфурон-метил (класс СФМ) / Thifensulfuronmethyl (sulfonyleureas)</i>																
DMSO	131±8	—	107±9	—	25±5	—	112±7	—	134±6	—	121±13	—	18±3	—	19±4	—
0.05	140±9	0	103±7	4	22±2	4	105±8	6	86±13	0	131±4	0	18±2	—	15±4	21
0.16	133±10	0	112±10	0	23±5	0	117±5	0	91±8	0	140±14	0	16±3	11	21±2	0
0.5	124±4	5	115±15	0	24±5	0	115±7	0	89±9	0	135±11	0	19±3	0	18±5	5
1.6	102±7	22	104±16	3	27±1	8	109±10	3	84±11	0	124±8	7	21±3	0	18±3	5
5.0	80±6	39	121±8	0	22±3	16	95±11	15	86±9	3	133±14	1	17±2	0	17±2	11
ПК/РС	1019±47	0	1193±48	0	993±78	0	1670±18	0	860±50	0	1940±55	0	378±33	0	1120±36	0
<i>Флорасулам (класс ТАИ) / Florasulam (triazole-pyrimidines)</i>																
DMSO	131±8	—	107±9	—	25±5	—	112±7	—	134±6	—	121±13	—	18±3	—	19±4	—
0.05	126±9	4	112±5	0	22±4	12	121±9	0	88±4	4	129±5	4	21±4	0	15±5	21
0.16	129±10	2	108±2	0	22±5	12	106±11	5	101±16	0	138±17	0	22±2	0	17±2	11
0.5	145±10	0	114±3	0	20±2	20	105±9	5	93±7	0	117±11	13	16±2	11	18±5	5
1.6	136±21	0	87±10	19	14±5	44	85±8	24	75±14	18	106±11	20	12±4	33	7±4	63
5.0	124±10	5	4±2	96	8±4	68	98±6	13	16±4	83	28±12	79	4±2	78	3±2	84
ПК/РС	1019±47	0	1193±48	0	993±78	0	1670±18	0	860±50	0	1940±55	0	378±33	0	1120±36	0

использовании стандартного чашечного теста, а положительные контроли проявили выраженную мутагенную активность на всех штаммах в условиях метаболической активации и без неё ( $p \leq 0,05$ ).

Необходимо отметить, что оптимальные концентрации изолейцина в среде были различны в зависимости от индикаторной культуры. Например, в случае тестирования тифенсульфурон-метила наименьший цитотоксический эффект достигался при обогашении верхнего агара 5 мМ изолейцином в случае штаммов ТА98 и ТА102, 2–5 мМ в случае ТА100 и ТА1535. Для культуры ТА97 оптимальная концентрация для снятия ингибирующего эффекта тифенсульфурон-метила на рост микроорганизмов составила 1–2 мМ изолейцина в условиях метаболической активации S9 и 5 мМ в отсутствие S9. Аналогичные результаты были получены при тестировании производного триазолпиримидинов. Добавление 1 мМ аминокислоты позволило провести оценку мутагенности флорасулама при использовании максимальной концентрации соединения, предписанной нормативными документами, – 5 мг/чашка для культур ТА102 и ТА98 ( $\pm S9$ ). Для индикаторных штаммов ТА100 и ТА97 минимальные цитотоксические эффекты наблюдали при использовании 5 или 1 мМ изолейцина при отсутствии и в присутствии S9 соответственно.

Таким образом, модификация классического протокола теста Эймса путём обогашения полужидкой среды данной аминокислотой является приемлемым способом предотвращения цитотоксичности и позволяет провести исследование в диапазоне максимальных доз, рекомендованных нормативными документами.

### Обсуждение

Наличие цитотоксичности для индикаторных культур создаёт серьёзные трудности при оценке эквивалентности технического продукта пестицида по критерию «мутагенность». У специалистов нет единого мнения относительно выбора метода, однако зачастую предпочтение отдаётся именно тесту на индукцию обратных генных мутаций вследствие небольших временных и материальных затрат, а также возможности использования стандартного оборудования микробиологической лаборатории. Аналогичная ситуация имеет место при тестировании лекарственных средств. Ранее было показано, что при тестировании фармакологических субстанций в максимальной дозе (5 мг/чашка), определённой руководящим документом ОЭСР № 471, концентрация, при которой может быть выявлено большинство мутагенных примесей, составляет 250 мкг/чашка [14].

Цитотоксичность сульфонилмочевин и триазолпиримидинов в отношении индикаторных штаммов *S. typhimurium* не позволяет оценить с использованием одного из самых востребованных методов *in vitro* их потенциальную мутагенность, обусловленную наличием примесей, присутствующих, как правило, в небольших количествах. Это является серьёзным препятствием в случае

тестирования ТП ДВ пестицидов для оценки их эквивалентности оригинальным продуктам, так как вероятность обнаружения мутагенных примесей становится крайне низкой.

В основе цитотоксичности пестицидов, относящихся к классам сульфонилмочевин и триазолпиримидинов, для микробных клеткок лежит ингибирование АНАС, которая катализирует первую реакцию биосинтеза разветвлённых аминокислот: конденсацию двух молекул пирувата (конечные продукты – лейцин и валин) или пирувата с  $\alpha$ -кетобутиратом (конечный продукт – изолейцин) [15]. У бактерий найдено три изофермента синтеза, близких по структуре, но отличающихся по субстратной специфичности, механизмам регуляции экспрессии и ингибированию конечным продуктом, которое играет главную роль в физиологическом контроле этого пути метаболизма. Наиболее изученными являются изоферменты энтеробактерий, среди которых встречаются виды, характеризующиеся наличием как трёх, так и двух изоформ АНАС [16].

У *S. typhimurium* LT2 показано наличие двух активностей АНАС – I и II типов. Отсутствие АНАС III обусловлено наличием мутации, которая приводит к преждевременной остановке синтеза каталитической субъединицы. Типичная структура изоферментов АНАС энтеробактерий представлена большой (около 60 кДа) и малой субъединицами (10–18 кДа) в составе тетрамера  $\alpha_2\beta_2$ . При этом большие субъединицы выполняют каталитическую функцию, а малые субъединицы регулируют активность целого фермента путём индукции его каталитически компетентной конформации и стабилизации переходного состояния [15].

Ещё одним ключевым белком регуляции биосинтеза разветвлённых аминокислот является треониндеаминаза, которая катализирует пиридоксальфосфат-зависимую дегидратацию и дезаминирование треонина до 2-кетобутирата. Помимо треонина, являющегося субстратом этого фермента, треониндеаминаза может специфически связывать изолейцин и валин, которые являются соответственно её ингибитором или активатором. При ингибировании или отсутствии активности АНАС II, которая использует 2-кетобутират, происходит его накопление, что приводит к подавлению роста клеток бактерий. Описаны мутантные штаммы *S. typhimurium*, дефектные по генам *ackA* и *pta* и характеризующиеся гиперчувствительностью к 2-кетобутирату, если у них блокирована функция АНАС [17].

Мы наблюдали, что внесение изолейцина, который является аллостерическим ингибитором треониндеаминазы, снимает подавление роста исходных индикаторных культур тифенсульфурон-метилом и флорасуламом, вероятнее всего, за счёт предотвращения накопления 2-кетобутирата, который чрезвычайно токсичен для клеток бактерий. При этом потребность клеток в изолейцине восполняется за счёт экзогенной аминокислоты.

## Заключение

Использование теста Эймса, модифицированного путём обогащения среды изолейцином, является более объективным способом оценки мутагенности ТП действующих веществ пестицидов из классов сульфонилмочевин и триазолпиримидинов. Предложенный протокол расширяет возможности выявления опасных мутагенных примесей, которые присутствуют в ТП в небольших количествах, но при попадании в окружающую среду могут приводить к превышению спонтанного уровня мутирования у живых организмов. Если максимальные нецитотоксичные концентрации в случае применения исходной среды для тифенсульфурон-метила и флорасулама не превышали 0,05–0,125 мг/чашка, то обогащение среды изолейцином позволяло провести оценку мутагенной активности соединения вплоть до максимальной дозы 5 мг/чашка, рекомендованной нормативными документами.

Исходя из механизма цитотоксического действия сульфонилмочевин и триазолпиримидинов на клетки микроорганизмов можно предположить, что культивирование бактерий в присутствии изолейцина позволяет снять токсический эффект 2-кетобутирата за счёт ингибирования активности треониндеаминазы.

На основании полученных результатов для проведения рутинных экспериментов по оценке мутагенности в тесте Эймса соединений из классов триазолпиримидинов и сульфонилмочевин достаточно использовать минимальную концентрацию изолейцина в среде 1 мМ. В последующих исследованиях нами будет изучено влияние обогащённой изолейцином среды на цитотоксичность других производных триазолпиримидинов и сульфонилмочевин для индикаторных культур *S. typhimurium*.

## Литература

(п.п. 1, 3–5, 7–9, 13–17 см. References)

- Илюшина Н.А. Оценка эквивалентности технических продуктов пестицидов-аналогов оригинальным действующим веществам по критерию «мутагенность». *Экологическая генетика*. 2019; 17(2): 101–112. <https://doi.org/10.17816/ecogen172101-112>
- ГОСТ 32376-2013. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Метод оценки обратных мутаций на бактериях. М.; 2013.
- Методические указания МУ-1.2.3364–16. Оценка мутагенной активности пестицидов. М.; 2016.
- Руководство Р 1.2.3156–13. Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья человека. М.; 2014.
- Егорова О.В., Демидова Ю.В., Илюшина Н.А. Оценка экспериментальных условий, влияющих на уровень спонтанных мутаций штаммов *Salmonella*, используемых в тесте Эймса. *Гигиена и санитария*. 2021; 100(7): 736–43. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-7-736-743>

## References

- Nishimoto R. Global trends in the crop protection industry. *J. Pestic. Sci.* 2019; 44(3): 141–7. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D19-101>
- Ilyushina N.A. Assessment of the equivalence of technical materials of analogous pesticides to original active substances on the basis of “mutagenicity” criterion. *Ekologicheskaya genetika*. 2019; 17(2): 101–112. <https://doi.org/10.17816/ecogen172101-112> (in Russian)
- FAO/WHO. Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides. Geneva: WHO Press; 2016. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246192/WHO-HTM-NTD-WHOPE-2016.4-eng.pdf?sequence=1>
- Hamel A., Roy M., Proudlock R. The bacterial reverse mutation test. Chapter 4. In: Proudlock R., ed. *Genetic Toxicology Testing. A Laboratory Manual*. Academic Press; 2016: 79–138.
- OECD. Test №471. Bacterial reverse mutation test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. Paris: OECD Publishing; 2020. <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>
- GOST 32376-2013. Testing methods for the effects of chemical products on the human body. Method of evaluation of reverse mutations in bacteria. Moscow; 2013. (in Russian)
- Friederich U., Molko F., Hofmann V., Scossa D., Hann D., Würgler F.E., et al. Limitations of the *Salmonella*/mammalian microsome assay (Ames test) to determine occupational exposure to cytostatic drugs. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1986; 22(5): 567–75. [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(86\)90045-3](https://doi.org/10.1016/0277-5379(86)90045-3)
- Levy D.D., Hakura A., Elespuru R.K., Escobar P.A., Kato M., Lott J., et al. Demonstrating laboratory proficiency in bacterial mutagenicity assays for regulatory submission. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2018; 848: 403075. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.07.005>
- Ilyushina N.A., Egorova O.V., Rakitskii V.N. Limitations of pesticide genotoxicity testing using the bacterial in vitro method. *Toxicol. In Vitro*. 2019; 57: 110–6. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.02.018>
- Methodological guidelines MU-1.2.3364–16. Evaluation of the mutagenic activity of pesticides. Moscow; 2016. (in Russian)

11. Manual R 1.2.3156–13. Assessment of the toxicity and danger of chemicals and their mixtures for human health. Moscow; 2014. (in Russian)
12. Egorova O.V., Demidova Yu.V., Ilyushina N.A. Assessment of experimental conditions affecting spontaneous mutation level of *Salmonella* strains used in the Ames test. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2021; 100(7): 736–43. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-7-736-743> (in Russian)
13. Egorova O.V., Ilyushina N.A., Rakitskii V.N. Mutagenicity evaluation of pesticide analogs using standard and 6-well miniaturized bacterial reverse mutation tests. *Toxicol. In Vitro*. 2020; 69: 105006. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.105006>
14. Kenyon M.O., Cheung J.R., Dobo K.L., Ku W.W. An evaluation of the sensitivity of the Ames assay to discern low-level mutagenic impurities. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2007; 48(1): 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2007.01.006>
15. Gedi V., Yoon M.Y. Bacterial acetohydroxyacid synthase and its inhibitors—a summary of their structure, biological activity and current status. *FEBS J.* 2012; 279(6): 946–63. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08505.x>
16. Duggleby R.G., Pang S.S. Acetohydroxyacid synthase. *J. Biochem. Molecul. Biol.* 2000; 33(1): 1–36.
17. LaRossa R.A., Van Dyk T.K., Smulski D.R. Toxic accumulation of alpha-ketobutyrate caused by inhibition of the branched-chain amino acid biosynthetic enzyme acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 1987; 169(4): 1372–8. <https://doi.org/10.1128/jb.169.4.1372-1378.1987>