

Выпуск по материалам Международного Форума Научного совета Российской Федерации по экологии человека и гигиене окружающей среды «Современные методологические проблемы изучения, оценки и регламентирования факторов окружающей среды, влияющих на здоровье человека»

Проблемные статьи

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 614.7:632.95:575.224.4

Ракитский В.Н., Илюшина Н.А., Ревазова Ю.А.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В ОЦЕНКЕ МУТАГЕННОСТИ ПЕСТИЦИДОВ

ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Россия, Московская обл., г. Мытищи

Исследование потенциальной мутагенной активности пестицидов является важной составной частью их токсиколого-гигиенической оценки. В статье приведены международные и российские нормативные правовые документы, регламентирующие проведение таких исследований. Представлен перечень основных протоколов ОЭСР в области генетической токсикологии, в котором отражены действующие, вновь введенные и отменённые протоколы, а также пересмотренные версии существующих документов. В качестве примера рассмотрены основные изменения в протоколе изучения мутагенных свойств химических веществ в микроядерном тесте на эритроцитах млекопитающих in vivo. Приведен минимальный набор методов, позволяющих оценить индукцию первичных повреждений ДНК, генных, хромосомных и/или геномных мутаций при действии пестицидов. Отмечена необходимость оценки мутагенности для подтверждения эквивалентности действующих веществ пестицидов-дженериков и дальнейших исследований комбинированного действия пестицидных смесей.

Ключевые слова: мутагенность; пестициды; методы оценки.

Для цитирования: Ракитский В.Н., Илюшина Н.А., Ревазова Ю.А. Современные методические подходы в оценке мутагенности пестицидов. *Гигиена и санитария*. 2017; 96(11): 1017-1020. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-11-1017-1020>

Для корреспонденции: Илюшина Наталья Алексеевна, канд. биол. наук, зав. отделом генетической токсикологии ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора/ E-mail: Ilyushina-na@mail.ru

Rakitsky V.N., Ilyushina N.A., Revazova Yu.A.

MODERN APPROACHES TO THE ASSESSMENT OF PESTICIDE MUTAGENICITY

F.F. Erisman Federal Research Center of Hygiene, Russia 141014 Moscow region, Mytishi

Research on potential mutagenic pesticide activity is an important part of their toxicological and hygienic assessment. The present article provides international and Russian legal and normative documents, which regulate such investigations. There is presented a list of the principal Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) protocols in the field of genetic toxicology which reflect protocols in force, newly adopted and canceled protocols along with the revised versions of existing documents. As an example, major changes of the research protocol for mutagenic properties of chemical compounds in mammalian erythrocyte micronucleus test in vivo are reviewed. The article also provides the minimal set of methods required for the evaluation of the pesticide-induced initial DNA damage, gene, chromosome and/or genome mutations. The article notes the need for the mutagenic assessment of generic pesticides to verify the equivalence of active ingredients and carry out further studies of the combined actions of pesticide mixtures/

Key words: mutagenicity; pesticides; methods of the assessment/

For citation: Rakitsky V.N., Ilyushina N.A., Revazova Yu.A. Modern approaches to the assessment of pesticide mutagenicity. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2017; 96(11): 1017-1020. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-11-1017-1020>

For correspondence: Nataliya A. Ilyushina, MD, PhD, Head of the Department of Genetic Toxicology F.F. Erisman Federal Research Center of Hygiene, Mytishi, 141014, Russian Federation. E-mail: Ilyushina-na@mail.ru

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

Acknowledgment: The study had no sponsorship.

Received: 15 February 2017

Accepted: 05 July 2017

Пестициды являются биологически активными веществами и могут вызывать специфические отдалённые эффекты, среди которых особое место занимает потенциальная мутагенность [1]. Попадание в окружающую среду пестицидов, обладающих мутагенной активностью, может привести к увеличению частоты возникновения новых мутаций, росту генетического груза

в популяциях человека, выражающегося в увеличении наследственной патологии, частоты онкологических заболеваний, нарушении репродуктивных функций и к другим нежелательным отдалённым эффектам. Для предотвращения неблагоприятного действия пестицидов на здоровье населения они проходят обязательные регистрационные испытания и тщательную токсико-

Пересмотренные руководства ОЭСР в области генетической токсикологии [12]

№	Название методики тестирования	Принят, год	Пересмотрен, год
<i>Без пересмотра с 1997 г.:</i>			
471	Bacterial Reverse Mutation Test	1984	1997
485	Mouse heritable translocation assay	1986	
486	Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells In Vivo	1997	
<i>Недавно пересмотренные:</i>			
473	<i>In vitro</i> mammalian chromosomal aberration test	1983	1997/2014/2016
474	Mammalian erythrocyte micronucleus test	1983	1997/2014/2016
475	Mammalian bone marrow chromosomal aberration test	1984	1997/2014/2016
476	<i>In vitro</i> mammalian cell gene mutation tests using the hprt or xprt genes	1984	1997/2015/2016
478	Rodent dominant lethal assay	1984	2015/2016
483	Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test	1986	1997/2015/2016
487	<i>In vitro</i> mammalian cell micronucleus test	2010	2014/2016
488	Transgenic rodent somatic and germ cell gene mutation assays	2011	2013 (в процессе пересмотра)
489	<i>In vivo</i> mammalian alkaline Comet assay	2014	2016

лого-гигиеническую экспертизу. При этом анализ мутагенной активности пестицидов является важнейшей составной частью их токсиколого-гигиенической оценки для установления класса опасности, прогнозирования возможных отдалённых эффектов и обеспечения надёжности разрабатываемых гигиенических нормативов и регламентов применения.

Оценка мутагенной активности регламентируется международными и российскими нормативными правовыми документами. Положения об обязательном тестировании мутагенности пестицидов включены в Международный кодекс поведения в области распределения и использования пестицидов: Руководство по регистрации пестицидов, ФАО/ВОЗ, 2010 г. [2], Руководство по контролю за качеством пестицидов, ФАО/ВОЗ, 2012 г. [3], Регламенты ЕС, нормативные акты Евразийского экономического союза [4] и другие. Разработаны руководства Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) №№ 471–490, определяющие порядок проведения необходимых исследований.

В нашей стране такие исследования проводятся в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации. В частности, Федеральный закон № 109-ФЗ «О безопасном обращении с пестицидами и агрохимикатами» (статьи 9, 16) [5] возлагает на разработчика (изготовителя, регистранта) препаратов ответственность за проведение в полном объеме исследований по выявлению токсикологических свойств пестицидов, их влияния на окружающую среду, разработку и обеспечение мер по безопасному обращению с ними. Во исполнение законодательства Российской Федерации приняты национальные подзаконные акты: приказ Роспотребнадзора от 01.08.2006 г. № 225 «О санитарно-эпидемиологической экспертизе пестицидов и агрохимикатов» [6], приказ Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 10.07.2007 г. № 357 «Об утверждении порядка государственной регистрации пестицидов и агрохимикатов» [7]; СанПин 1.2.2584–10 «Гигиенические требования к безопасности процессов испытаний, хранения, перевозки, реализации, применения, обезвреживания и утилизации пестицидов и агрохимикатов» [8]. Разработано и утверждено Руководство Р 1.2.3156–13 «Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья

человека» [9]. Приложение 6.8 указанного Руководства относится к генетической токсикологии и регламентирует выполнение исследований по оценке мутагенности в соответствии с международными требованиями.

В 2016 г. отечественными специалистами в области генетической токсикологии подготовлены и утверждены Методические указания № 1.2.3364–16 «Оценка мутагенной активности пестицидов» [10], в которых впервые представлена гармонизированная с международными требованиями комплексная система проверки генетической активности действующих веществ пестицидов, препаративных форм и их компонентов на этапе токсикологических исследований на различных тест-объектах в опытах *in vitro* и *in vivo*.

Указанные документы чётко определяют порядок проведения испытаний, ключевые требования к выбору количества объектов, уровней и схем введения доз, количества образцов, а также требования к методике их анализа, статистической обработке результатов и объёму информации, представляемой в отчёте. Всё это позволяет установить класс опасности по критерию «мутагенность» в соответствии с гигиенической классификацией пестицидов и разработать гигиенические нормативы содержания остаточных количеств действующих веществ пестицидов в объектах окружающей среды с учётом мутагенности для обеспечения безопасного обращения пестицидных препаратов.

Отсутствие универсального метода, позволяющего однозначно оценить способность тестируемого соединения к индукции разных типов мутаций в зародышевых и соматических клетках, делает необходимым использование для оценки мутагенных свойств пестицидов комплекса методов, выполняемых на разных тест-объектах [11]. Поэтому в соответствии с действующим порядком государственной регистрации пестицидов предусмотрена оценка индукции первичных повреждений ДНК, генных, хромосомных и/или геномных мутаций. Для определения способности пестицидов индуцировать мутации разных типов необходимо использование комплекса методов, выполняемых на разных тест-объектах. В батарею тестов анализа мутагенности действующих веществ пестицидов и компонентов препаративных форм включены методы оценки индукции генных мутаций (тест Эймса), методы оценки цитогенетических повреждений (учёт хромосомных aberrаций или микроядер в клетках *in vivo* и/или *in vitro*) и методы оценки повреждений ДНК (*in vitro* и/или *in vivo*). Все предлагаемые методы в рамках каждого изучаемого типа генетических нарушений следует считать взаимозаменяемыми, что соответствует современным международным требованиям и подходам.

Следует отметить, что стандартные протоколы проведения исследований, равно как и набор необходимых методов оценки мутагенности периодически пересматриваются в соответствии с получением новых знаний и развитием технологий в этой области. В частности, в последние годы были отменены некоторые протоколы ОЭСР, ряд протоколов были пересмотрены и претерпели изменения, а также, в связи с появлением новых методов исследования, были введены новые протоколы (табл. 1 и 2).

Изменения в протоколах ОЭСР, относящихся к оценке мутагенной активности химических веществ, коснулись оценки квалификации испытательных лабораторий, исторических данных в отношении положительных и отрицательных контролей, выбора доз и схем введения животным, а также необходимого объёма получаемых данных (выборки) для статистического анализа. В частности, значительно был увеличен объём анализируемого материала в случае применения цитологических методов исследования в связи с высокой вероятностью получения ложно-отрицательных результатов при недостаточном объёме данных [13].

В качестве примера в табл. 3 приведено сравнение основных положений в версиях 1997 и 2014/2016 гг. Руководства ОЭСР № 474 «Микроядерный тест на эритроцитах млекопитающих *in vivo*».

Следует отметить, что в новых версиях протокола OECD № 474 более чётко сформулированы критерии оценки тестируемого вещества в отношении его мутагенных свойств. Так рекомендовано считать результат положительным (т.е. считать вещество мутагенным), если:

Таблица 2

Новые и отменённые руководства ОЭСР в области генетической токсикологии [12]

№	Название методики тестирования	Принят, год	Отменён, год
<i>Недавно введённые:</i>			
490	In vitro mammalian cell gene mutation tests using the thymidine kinase gene	2015	
<i>Архивные/отменённые:</i>			
472	Genetic Toxicology: Escherichia coli, Reverse Assay	1983	1997
477	Sex-Linked Recessive Lethal Test in Drosophila melanogaster	1984	2013
479	In Vitro Sister Chromatid Exchange assay in Mammalian Cells	1986	2013
480	Saccharomyces cerevisiae, Gene Mutation Assay	1986	2013
481	Saccharomyces cerevisiae, Mitotic Recombination Assay	1986	2013
482	DNA Damage and Repair, Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells In Vitro	1986	2013
484	Mouse Spot Test	1986	2013

а) по меньшей мере, в одной из групп обработки наблюдается статистически значимое повышение частоты ПХЭ с МЯ по сравнению с отрицательным контролем;

б) такое повышение частоты ПХЭ с МЯ является зависимым от дозы, по меньшей мере, в одной временной точке отбора образцов (на основании подходящего теста оценки тренда);

с) любой из указанных выше результатов находится вне границ распределения исторического отрицательного контроля.

Отрицательным считается результат в том случае, когда требования, указанные в пунктах (а–с), не выполняются.

В случае, когда не получен четко отрицательный или четко положительный результат и с целью установления биологической значимости результата (например, слабого или пограничного повышения) данные оценивает эксперт и/или проводятся дополнительные исследования. При этом можно проанализировать большее количество клеток или осуществить повторный эксперимент, используя модифицированные экспериментальные условия.

Согласно сложившейся практике оценка мутагенности пестицидов основана на определении мутагенных свойств отдельных действующих веществ пестицидов и компонентов, входящих в состав их препаративных форм. Обязательное тестирование на мутагенность проводится при первичном скрининге молекул действующих веществ. В случае действующих веществ (технических продуктов) – дженериков – предварительно проводится определение их эквивалентности оригинальным продуктам. Согласно «Руководству по разработке и применению спецификаций ФАО и ВОЗ для пестицидов» (2016 г.) [14] определение эквивалентности осуществляется поэтапно. Причем на первом этапе, наряду с оценкой химической эквивалентности необходимы данные оценки мутагенной активности *in vitro* в тесте на бактериях. В том случае, когда на первом этапе невозможно однозначно оценить эквивалентность, переходят ко второму этапу, на котором проводят токсикологические исследования, а именно определяют острую, дермальную и ингаляционную токсичность, раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки, сенсибилизирующее действие, а также, при необходимости, токсические эффекты при субхроническом и хроническом воздействии, генотоксичность, канцерогенность и т.д.

Однако пестицидные препараты, кроме действующих веществ, содержат целый ряд наполнителей (растворителей, эмульгаторов, ПАВ и др.) и примесей, комбинированное действие которых также может вызвать повреждение наследствен-

Таблица 3

Изменения в протоколе ОЭСР № 474 «Микроядерный тест на эритроцитах млекопитающих», введённые в 2014 и 2016 гг.

Год введения документа в действие	Показатель					анализ
	подтверждение квалификации лаборатории	исторические данные для контролей	негативный контроль в каждом опыте	использование положительных контролей	уровни доз	
1997	–	–	–	В каждом исследовании	3 уровня доз от МПД до нетоксичной или малотоксичной дозы	Визуализация микроядер с использованием микроскопа, анализа изображений, проточной цитометрии. Количество МЯ: 2000 ПХЭ на животное, доля ПХЭ: не менее 200 эритроцитов (костный мозг) или 1000 (кровь)
2014, 2016	Воспроизведение результатов для ПК (не менее 2 ПК, включая слабые ответы при низких дозах)	Установление диапазона и распределения данных по ПК и ОК (минимум 10, предпочтительно 20 экспериментов)	В 95% контрольных пределах распределения в исторической базе данных, полученных в лаборатории	Допускается использование образцов, полученных в отдельных экспериментах, проводимых периодически (6–18 мес)	Минимум 3 дозы, отличающиеся в 2–4 раза от МПД до нетоксичной или малотоксичной (могут требоваться дополнительные группы). В качестве МПД может быть выбрана доза, при которой значение доли ПХЭ от общего числа эритроцитов составляет от 20 до 50% от значения для ОК	Дополнено: 3) 3 обработки, отбор образцов не позже 24 ч после последнего введения, например, через 2–6 ч (при сочетании с ДНК-зондами) Количество МЯ: 4000 ПХЭ на животное. Доля ПХЭ: не менее 500 (костный мозг) или 2000 (кровь)

Примечание. ПК – положительный контроль; ОК – отрицательный контроль; ПХЭ – полихроматофильные эритроциты; МЯ – микроядра; МПД – максимальная переносимая доза.

ного материала в клетках. В Европейском союзе (ЕС) регистрация химических веществ, входящих в состав пестицидов и агрохимикатов, проводится в соответствии с Регламентом Европейского Парламента и Совета (ЕС) № 1907/2006 – REACH (правила регистрации, оценки, санкционирования и ограничения химических веществ [15].

В последнее время появляется все больше данных о мутагенном действии смесей действующих веществ пестицидов [16–19]. Поэтому вопрос о дополнительном исследовании препаративных форм, включающих в свой состав несколько действующих веществ, представляется крайне актуальным.

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

Долевое участие авторов. Ракицкий В.Н. – 20%, Илюшина Н.А. – 60%, Ревазова Ю.А. – 20%.

Литература (п.п. 12–14, 16–19 см. References)

1. Ракицкий В.Н., Турусов В.С. Мутагенная и канцерогенная активность химических соединений. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2005; (3): 7–9.
2. Международный кодекс поведения в области распределения и использования пестицидов. Руководство по регистрации пестицидов, ФАО/ВОЗ, 2010 г. Available at: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/Registration_2010_RUS.pdf.
3. Международный кодекс поведения в области распределения и использования пестицидов. Руководство по контролю за качеством пестицидов, ФАО/ВОЗ, 2012 г. Available at: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/Quality_2011_RUS.pdf
4. Законодательно-нормативные акты Европейского Союза (ЕС) в отношении пищевой промышленности. Available at: http://www.icc-iso.ru/upload/information_system_27/6/1/0/item_610/Zakonodatelno_normat_akt_y_ES.pdf.
5. Федеральный закон № 109 ФЗ «О безопасном обращении с пестицидами и агрохимикатами». М.; 1997.
6. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 225 «О санитарно-эпидемиологической экспертизе пестицидов и агрохимикатов». М.; 2006.
7. Приказ Минсельхоза Российской Федерации № 357 «Об утверждении порядка государственной регистрации пестицидов и агрохимикатов». М.; 2007.
8. СанПин 1.2.2584–10. «Гигиенические требования к безопасности процессов испытаний, хранения, перевозки, реализации, применения, обезвреживания и утилизации пестицидов и агрохимикатов». М.; 2010.
9. Руководство Р 1.2.3156–13. «Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья человека». М.; 2014.
10. Методические указания МУ № 1.2.3364–16 «Оценка мутагенной активности пестицидов». М.; 2016.
11. Ракицкий В.Н., Ревазова Ю.А., Илюшина Н.А. «Стратегия и тактика оценки мутагенности пестицидов». *Токсикологический вестник.* 2015; (5): 10–3.
15. Регламент ЕС № 1907/2006 Европейского парламента и Совета. Available at: <http://www.club-reach.ru/index?tid=633200010>

References

1. Rakitskiy V.N., Turusov V.S. Mutagenic and carcinogenic activity of chemical compounds. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2005; (3): 7–9. (in Russian)

2. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticide. Guidelines for the Registration of Pesticides, FAO/WHO, 2010. Available at: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/Registration_2010_RUS.pdf (in Russian)
3. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticide. Guidelines for Quality Control of Pesticides. FAO/WHO, 2012. Available at: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/Quality_2011_RUS.pdf (in Russian)
4. Legislative and normative acts of the European Union (EU) with regard to the food industry. Available at: http://www.icc-iso.ru/upload/information_system_27/6/1/0/item_610/Zakonodatelno_normat_akt_y_ES.pdf (in Russian)
5. Federal Law № 109 FZ «On the Safe Management of Pesticides and Agrochemicals». Moscow; 1997. (in Russian)
6. Order of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare № 225 «On Sanitary and Epidemiological Expertise of Pesticides and Agrochemicals». Moscow; 2006. (in Russian)
7. Order of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation № 357 «On approval of the procedure for state registration of pesticides and agrochemicals». Moscow; 2007. (in Russian)
8. SanPiN 1.2.2584–10. «Hygienic requirements for safety of the process of testing, storage, transportation, sale, use, disposal and recycling of pesticides and agrochemicals». Moscow; 2010.
9. Guidance R 1.2.3156–13. «Evaluation of the toxicity and hazards of chemical substances and their mixtures for human health». Moscow; 2014. (in Russian)
10. Methodology guidelines MU № 1.2.3364–16. «Assessment of mutagenic activity of pesticides». Moscow; 2016. (in Russian)
11. Rakitskiy V.N., Revazova Yu.A., Ilyushina N.A. Strategy and Tactics of the Pesticide Mutagenicity Assessment. *Toksikologicheskii vestnik.* 2015; (5): 10–3. (in Russian)
12. Guidance Document on Revision to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines. Genetic Toxicology Guidance Document. Available at: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/Genetic%20Toxicology%20Guidance%20Document%20Aug%202015%202015.pdf>
13. Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity. Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198. Paris: OECD Publishing; 2014.
14. Manual on development and use of FAG and WHO specifications for pesticides, Geneva and Rome, March 2016. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246192/1/WHO-HTML-NTD-WHOPES-2016.4-eng.pdf>
15. Regulation of the EU № 1907/2006 of the European Parliament and of the Council. Available at: <http://www.club-reach.ru/index?tid=633200010> (in Russian)
16. Ramos-Chavez L.A., Sordo M., Calderon-Aranda E., Castaneda-Saucedo E., Ostrosky-Wegman P., Moreno-Godinez M.E. A permethrin/allevethrin mixture induces genotoxicity and cytotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2015; 78(10): 7–14.
17. Karabay N.U., Oguz M.G. Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. *Genet. Mol. Res.* 2005; 4(4): 653–62.
18. Saleem U., Ejaz S., Ashraf M., Omer M.O., Altaf I., Batool Z., et al. Mutagenic and cytotoxic potential of Endosulfan and Lambda-cyhalothrin – in vitro study describing individual and combined effects of pesticides. *J. Environ. Sci. (China).* 2014; 26(7): 1471–9.
19. Graillot V., Takakura N., Hegarat L.L., Fessard V., Audebert M., Cravedi J.P. Genotoxicity of pesticide mixtures present in the diet of the French population. *Environ. Mol. Mutagen.* 2012; 53(3): 173–84.