

Егорова О.В., Аверьянова Н.С., Кара Л.А., Илюшина Н.А.

Сравнительная оценка генотоксических эффектов технических продуктов карбендазима в тесте Эймса и микроядерном тесте *in vivo*

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

Введение. Карбендазим — системный фунгицид из класса бензимидазолов, применяемый против широкого спектра заболеваний сельскохозяйственных культур. В тестах *in vitro* и *in vivo* показана способность карбендазима индуцировать возникновение хромосомных aberrаций и микроядер в клетках млекопитающих за счет влияния на процессы формирования веретена деления в клеточном цикле. В бактериальной тест-системе *Salmonella/микросомы* получены противоречивые данные, свидетельствующие как об отсутствии мутагенной активности карбендазима, так и о наличии позитивных эффектов. Неоднозначные результаты могут быть обусловлены влиянием примесей.

Цель исследования — сравнительное изучение генотоксичности разных технических продуктов карбендазима.

Материал и методы. Оценку генотоксичности карбендазима проводили с использованием метода обратных генных мутаций на 5 штаммах *Salmonella typhimurium* в условиях метаболической активации (+S9) и в её отсутствии (–S9), микроядерного теста на мышах линии CD-1. Тестировали два технических образца и аналитический стандарт карбендазима.

Ограничения исследования. Исследование ограничено тестированием мутагенной активности двух образцов технических продуктов карбендазима и одного образца его аналитического стандарта в тестах *in vivo* и *in vitro*.

Результаты. В тесте Эймса аналитический стандарт карбендазима не проявил мутагенной активности ($\pm S9$) ни на одном из штаммов. Наиболее выраженный мутагенный эффект наблюдали на штамме TA98 в случае тестирования одного из технических продуктов карбендазима, при этом число ревертантных колоний в максимальной концентрации в 5–7 раз превышало число спонтанных ревертантов в отрицательном контроле. В тесте Эймса позитивные эффекты технических продуктов карбендазима, вероятно опосредованы наличием примесей. В условиях *in vivo* все исследованные образцы индуцировали статистически значимое и зависимое от дозы образование микроядер в полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ) костного мозга мышей. Среднее значение частоты ПХЭ с микроядрами в максимальной дозе превышала этот показатель в отрицательном контроле в 21–24 раза.

Заключение. С учетом высокого содержания действующего вещества в исследованных образцах метод оценки обратных генных мутаций на бактериях является высокочувствительным тестом для оценки эквивалентности технических продуктов-дженериков карбендазима. Ввиду выраженного анеугенного действия карбендазима применение микроядерного теста в случае оценки эквивалентности технических продуктов оригинальному веществу является нецелесообразным.

Ключевые слова: генотоксичность; микроядерный тест *in vivo*; тест Эймса; пестициды; карбендазим

Соблюдение этических стандартов. Исследование с участием животных одобрено локальным этическим комитетом ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора.

Для цитирования: Егорова О.В., Аверьянова Н.С., Кара Л.А., Илюшина Н.А. Сравнительная оценка генотоксических эффектов технических продуктов карбендазима в тесте Эймса и микроядерном тесте *in vivo*. Токсикологический вестник. 2022; 30(5): 277-285. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2022-30-5-277-285>

Для корреспонденции: Егорова Ольга Валерьевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела генетической токсикологии, ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, г. Мытищи Московской области, Российская Федерация. E-mail: egorovaov@fferisman.ru

Участие авторов: Егорова О.В. – концепция и дизайн исследования, сбор материала и данных литературы, анализ результатов, написание текста; Аверьянова Н.С. – сбор данных литературы, сбор материала; Кара Л.А. – сбор материала, статистическая обработка; Илюшина Н.А. – концепция и дизайн исследования, сбор данных литературы, анализ результатов, написание текста. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 08 сентября 2022 / Принята в печать: 22 сентября 2022 / Опубликовано: 30 октября 2022

Egorova O.V., Averyanova N.S., Kara L.A., Ilyushina N.A.

Comparative evaluation of the genotoxicity of carbendazim technical grade active ingredients in the Ames test and micronucleus *in vivo* test

Federal Budgetary Establishment of Science “Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman” of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 141014, Mytishchi, Moscow region, Russia

Introduction. Carbendazim is a systemic benzimidazole fungicide used against a wide range of crop diseases. The ability of carbendazim to induce the incidence of chromosomal aberrations and micronuclei in mammalian cells by influencing the processes of mitotic spindle formation in the cell cycle have been shown in various *in vitro* and *in vivo* tests. Contradictory data were obtained in the bacterial test system *Salmonella*/microsomes, indicating both the absence and the presence of mutagenic activity of carbendazim. The discrepancy in the results may stem from the presence of impurities.

The aim of the study was a comparative evaluation of the genotoxicity of various technical products of carbendazim.

Materials and methods. The genotoxicity of carbendazim was studied using the plate incorporation version of the Ames test on 5 strains of *Salmonella typhimurium* in the presence and the absence of metabolic activation system (+S9/-S9) and in a micronucleus test in CD-1 mice. Two technical grade active ingredients (TGAI) and an analytical standard for carbendazim were tested.

Results. In the Ames test, the analytical standard of carbendazim possessed no mutagenic activity (\pm S9) on any of the strains. The most pronounced mutagenic effect was observed for the TGAI I in TA98 strain, the number of revertants at the maximum concentration was 5–7 times higher than that in the negative control. The positive effects of carbendazim TGAI in the Ames test are likely mediated by the presence of impurities. Under *in vivo* conditions, all tested TGAI of carbendazim induced a statistically significant and dose-dependent formation of micronuclei in polychromatic erythrocytes (PCE) of mouse bone marrow. The mean frequency of PCE with micronuclei at the maximum dose exceeded this rate in the negative control by 21–24 times.

Research limitations. The study is limited to testing the mutagenic activity of two samples of carbendazim technical products and one sample of its analytical standard in both *in vivo* and *in vitro* tests.

Conclusion. Taking into account the high content of the active substance in the tested TGAI, the bacterial reverse mutation test is a highly sensitive method for assessment of the equivalence of carbendazim generic products. The use of a micronucleus test for evaluating of the equivalence of carbendazim TGAI to the original substance is inappropriate due to the pronounced aneugenic effect.

Keywords: *genotoxicity; micronucleus in vivo test; the Ames test; impurities; carbendazim*

Compliance with ethical standards. The study involving animals was approved by the FBES “Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman” of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing.

For citation: Egorova O.V., Averyanova N.S. Kara L.A., Ilyushina N.A. Comparative evaluation of the genotoxicity of carbendazim technical grade active ingredients in the Ames test and micronucleus *in vivo* test. *Toksikologicheskiy vestnik (Toxicological Review)*. 2022; 30(5): 277-285. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2022-30-5-277-285> (in Russian)

For correspondence: Olga V. Egorova, PhD, senior researcher of the department of genetic toxicology, FBES “Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman” of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. E-mail: egorovaov@fferisman.ru

Information about authors:

Egorova O.V., <https://orcid.org/0000-0003-4748-8771>

Kara L.A., <https://orcid.org/0000-0002-4635-2496>

Averyanova N.S., <https://orcid.org/0000-0002-2973-8776>

Ilyushina N.A., <https://orcid.org/0000-0001-9122-9465>

Author contribution: Egorova O.V. – the concept and design of the study, collection and processing of material, writing a text; Averyanova N.S. – collection and processing of material; Kara L.A. – collection of material, statistical analysis; Ilyushina N.A. – the concept and design of the study, processing of material, writing a text. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Funding. The study was not sponsored.

Received: September 08, 2022 / Accepted: September 22, 2022 / Published: October 30, 2022

Введение

Карбендазим [N-(бензимидазол-2-ил)-О-метилкарбамат] – системный фунгицид из класса бензимидазолов, применяемый против актиномицетов (настоящая мучнистая роса, парша семечковых культур, септориоз), дейтеромицетов (фузариоз, склеротиниоз, серые гнили) и головневых грибов. Механизм действия карбендазима основан на его способности связываться с тубулином, что приводит к нарушению процессов образования веретена деления и расхождения хроматид при делении клетки в случае прорастания спор или конидий, а также формирования аппрессориев и роста мицелия [1].

Карбендазим отнесен ко 2-му классу опасности для человека (высоко опасное соединение) в связи с признаками репродуктивной токсичности и нарушениями протекания цикла беременности, а также тератогенными эффектами. По стойкости в почве карбендазим относится к 1-му классу опасности [2]. Также карбендазим является эндокринным дизраптором [3–4].

Генотоксичность карбендазима была изучена в целом ряде работ. В многочисленных тестах *in vitro* и *in vivo* показана способность карбендазима приводить к увеличению частоты хромосомных aberrаций и микроядер в клетках млекопитающих за счет влияния на процессы формирования веретена деления в клеточном цикле [5–7]. Согласно исследованиям, опубликованным в [8], беномил и карбендазим индуцируют образование микроядер в клетках костного мозга мышей главным образом за счет анеугенного механизма. Пороговые концентрации карбендазима, приводящие к индукции анеуплоидии, оценивают на уровне 0,2–0,6 мкл/мл (*in vitro*) и 50 мг/кг массы тела (м.т.) (NOAEL) [9–11]. Как было показано нами ранее, карбендазим нарушает процессы карิโอкинеза, цитокинеза и экстрюзии ядер при созревании эритроцитов в костном мозге млекопитающих, предложен общий механизм наблюдаемых явлений [12]. В бактериальной тест-системе *Salmonella/микросомы* получены противоречивые данные, свидетельствующие как об отсутствии мутагенной активности карбендазима, так и о наличии позитивных эффектов в высоких концентрациях на штаммах, чувствительных к агентам, вызывающим мутации по типу сдвига рамки считывания [11].

Препараты на основе данного действующего вещества не применяют в большинстве стран Европейского Союза и США в условиях сельского хозяйства [4]. С 2009 г. применение пестицидов на основе карбендазима в Российской Феде-

рации ограничено только зерновыми, сахарной свеклой и (при необходимости) семенными посевами (рапс, люпин, соя). В настоящее время в России зарегистрировано свыше 20 одно- и многокомпонентных препаратов на основе карбендазима [13]. При производстве препаративных форм, как правило, используют технические продукты пестицидов, произведенные после окончания срока патентной защиты оригинального действующего вещества (ДВ).

В рамках регистрационных испытаний пестициды-джереники проходят процедуру оценки эквивалентности технических продуктов (ТП) оригинальному ДВ.

В случае выявления новых примесных соединений или повышенных уровней известных релевантных примесей алгоритм оценки эквивалентности включает исследование генотоксичности ТП. На первых этапах изучения генотоксичности используют методы *in silico* и *in vitro*. В случае выявления позитивных или неопределенных результатов необходимы дополнительные исследования с помощью тестов *in vivo* [14].

Цель исследования – сравнительное изучение генотоксичности разных технических продуктов карбендазима.

Материал и методы

Использовали технические продукты карбендазима с содержанием действующего вещества 98,2% (ТП1) и 99,0% (ТП2), а также аналитический стандарт карбендазима (Sigma-Aldrich, 98,60%) в качестве образца для сравнения.

Оценку мутагенности карбендазима с использованием метода обратных генных мутаций проводили на 5 штаммах *Salmonella typhimurium* в диапазоне концентраций 0,05–5,0 мг/чашка в условиях метаболической активации (+S9) и без микросомной активирующей смеси (-S9) в стандартном чашечном тесте [15–16]. Индикаторные штаммы *S. typhimurium* В-5291 (ТА97), В-5294 (ТА98), В-5303 (ТА1535), В-5300 (ТА100), В-5393 (ТА102) получены из Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ). При выделении, хранении и проверке генотипов культур руководствовались методикой, описанной ранее [17].

Постмитохондриальная фракция печени самцов белых крыс со средней массой 150–180 г получена в условиях индукции соволом (300 мг/кг м.т.) при однократном внутрибрюшинном введении. Животных умерщвляли спустя 5 сут после введения индуктора, используя CO₂.

В качестве отрицательного контроля (ОК) использовали варианты с растворителями

(диметилсульфоксид (DMSO) или диметилформамид (DMFA)). Положительными контролями служили: в условиях метаболической активации 2-аминоантрацен (10 мкг/чашка); без метаболической активации: 2-нитрофлуорен (20 мкг/чашка, ТА98), азид натрия (20 мкг/чашка, ТА100 и ТА1535), метилметансульфонат (5 мкг/чашка, ТА102) и 9-аминоакридин (50 мкг/чашка, ТА97). Критерии позитивной мутагенной активности в тесте Эймса указаны в [18].

Животные получены из питомника Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Исследование с участием животных одобрено локальным этическим комитетом ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора.

Исследования *in vivo* в микроядерном тесте проводили на мышах линии CD-1 обоих полов согласно [19–20]. Использовали по 5 мышей на группу. Исследуемые образцы вводили внутривентрикулярно в виде суспензий в подсолнечном масле в дозах: ТП1 и аналитический стандарт карбендазима – 500; 1000 и 2000 мг/кг м.т., ТП2 – 62,5; 125; 250; 500; 1000 и 2000 мг/кг м.т. Костный мозг вымывали из бедренных костей эмбриональной сывороткой телёнка и готовили по 2 микропрепарата от каждого животного в соответствии с общепринятой методикой [21–22]. Микропрепараты окрашивали, используя набор «Leucodif 200», 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. Критерии позитивной мутагенной активности в микроядерном тесте указаны в [22].

Статистический анализ результатов исследования проводили с использованием программы SPSS Statistics v. 22.0 (IBM, Нью-Йорк, США). Для анализа результатов, полученных в тесте Эймса, применяли критерий Даннетта *t* и ранговый метод Спирмена (при $\alpha = 0,05$). Сравнения частоты ПХЭ с микроядрами в группах обработки осуществляли с помощью построения обобщенной лог-линейной модели для распределения Пуассона ($\alpha = 0,05$). Данные также были проверены на наличие зависимости частоты ПХЭ с микроядрами от дозы тестируемого вещества методом Мантеля–Хензеля.

Результаты

Установлено, что ни один из изученных образцов карбендазима не индуцировал обрат-

ные генные мутации у индикаторных культур ТА100, ТА102 и ТА1535 как в условиях метаболической активации, так и без неё, независимо от использованного растворителя (табл. 1). ТП1 карбендазима, но не ТП2, проявил мутагенную активность на штамме ТА98 в условиях метаболической активации: наблюдали воспроизводимый зависимый от дозы эффект, при этом число ревертантных колоний в максимальной концентрации в 5–7 раз превышало число спонтанных ревертантов в отрицательном контроле (DMFA или DMSO) (табл. 2).

Также наблюдали воспроизводимые, зависящие от дозы и статистически значимые эффекты на штамме ТА97 при тестировании обоих технических продуктов карбендазима, однако кратность увеличения числа ревертантов не превышала 1,8 раз. При этом наиболее выраженные эффекты были отмечены при использовании DMSO в качестве растворителя.

Аналитический стандарт карбендазима не проявил мутагенной активности в тесте Эймса, как в условиях метаболической активации, так и в ее отсутствии ни на одном из штаммов (табл. 3).

В микроядерном тесте оба технических продукта карбендазима и аналитический стандарт вызывали сопоставимые генотоксические эффекты. Выявлено зависимое от дозы и статистически значимое увеличение количества ПХЭ с микроядрами в костном мозге мышей, начиная с дозы 125 мг/кг м.т. (ТП2) и 500 мг/кг м.т. (ТП1 и аналитический стандарт) (табл. 4).

Обсуждение

Позитивная мутагенная активность ТП карбендазима в тесте обратных генных мутаций на бактериях была показана в ряде исследований. Положительные ответы чаще всего выявляли на штаммах *S. typhimurium*, несущих в генах гистидинового оперона мутации со сдвигом рамки считывания (ТА98 и ТА1537). Однако субстанции карбендазима с чистотой 99,5% и выше не обладали способностью к индукции точковых мутаций у штаммов *S. typhimurium* [11]. Sarrif и соавт. было показано, что наличие мутагенного эффекта при тестировании некоторых образцов карбендазима опосредовано наличием примесных соединений, таких как 2,3-диаминофеназин и 2-амино-3-гидроксифеназин, образующихся в процессе синтеза целевого соединения из фенилендиамин [23]. В результате модификации технологической схемы синтеза карбендазима с 1994 г. стали производить технические продукты, не содержащие примесей аминафеназинов [7].

Таблица 1 / Table 1

Оценка мутагенности ТП карбендазима в тесте Эймса на штаммах *S.typhurium* TA100, TA102, TA1535, Mean \pm SD
Mutagenicity of TGAI of carbendazim in the Ames test using *S.typhurium* TA100, TA102, TA1535, Mean \pm SD

Концентрация, мг/чашка	ТП1, TGAI I						ТП2, TGAI II					
	TA100		TA102		TA1535		TA100		TA102		TA1535	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
	Диметилсульфоксид (DMSO)											
DMSO	82±9	101±10	129±8	144±8	14±3	16±2	82±9	101±10	129±8	144±8	14±3	16±2
0,05	84±7	96±8	120±4	134±12	18±1	17±3	76±2	104±9	150±24	158±16	20±6	16±4
0,16	78±4	80±10	121±7	145±17	14±2	20±3	80±2	85±2	140±13	174±3	14±3	15±1
0,5	67±6	94±9	154±1	150±19	11±2	17±3	74±2	95±4	152±10	158±10	15±3	19±4
1,6	73±6	94±15	137±10	154±16	13±4	12±1	69±9	89±14	148±5	161±8	13±3	15±1
5,0	87±13	111±11	127±15	166±6	16±4	19±1	78±4	96±17	141±5	180±22	13±2	13±2
Положительный контроль	780±23	1744±50	2265±84	1803±6	1277±393	641±30	780±23	1744±50	2265±84	1803±6	1277±393	641±30
	Диметилформамид (DMFA)											
DMFA	90±8	105±14	159±16	169±8	14±3	12±2	90±8	105±14	159±16	169±8	14±3	12±2
0,05	99±7	99±7	130±8	159±17	12±3	12±2	108±11	112±11	145±9	157±7	16±3	14±4
0,16	104±11	104±11	134±19	137±6	17±3	14±5	100±8	110±8	145±8	177±15	14±1	15±4
0,5	106±3	106±3	133±9	158±10	11±4	16±2	90±10	110±8	156±18	168±8	22±5	18±2
1,6	92±10	92±10	132±10	147±5	14±4	15±6	89±10	108±3	132±13	147±10	14±4	11±0
5,0	100±5	100±5	123±11	147±8	15±5	17±3	78±12	115±6	137±12	171±8	16±3	12±3
Положительный контроль	859 ± 3	1382 ± 53	1799 ± 43	1215 ± 37	1420 ± 14	940±78	859±3	1382±53	1749±43	1215±37	1420±14	940±78

Примечание. Mean \pm SD – среднее число ревертантов на чашку \pm среднеквадратичное отклонение.

Таблица 2 / Table 2

Оценка мутагенности ТП карбендазима в тесте Эймса на штаммах *S.typhimurium* TA97, TA98
Mutagenicity of TGAIs of carbendazim in the Ames test using *S.typhimurium* TA97, TA98

Концентрация, мг/чашка	ТП1; диметилсульфоксид (DMSO)													
	ТА 97						ТА 98							
	Эксперимент 1			Эксперимент 2			Эксперимент 1			Эксперимент 2				
	-S9	+S9		-S9	+S9		-S9	+S9		-S9	+S9			
Mean±SD	KP	Mean±SD	KP	Mean±SD	KP	Mean±SD	KP	Mean±SD	KP	Mean±SD	KP	Mean±SD	KP	
DMSO	102±12	-	131±7	-	144±8	-	21±3	-	37±6	-	31±3	-	36±7	-
0,05	106±12	1,0	128±14	1,0	179±8	1,0	21±3	1,0	50±2	1,4	27±7	0,9	42±10	1,1
0,16	112±6	1,1	146±16	1,1	170±4	1,2	19±1	0,9	69±3	1,9	27±3	0,9	41±6	1,1
0,5	99±5	1,0	168±2	1,3	167±7	1,2	21±1	1,0	83±12	2,2	24±5	0,8	53±9	1,5
1,6	88±15	0,9	176±11	1,3	185±9	1,3	22±5	1,0	120±12	3,2	23±3	0,7	78±5	2,2
5,0	104±7	1,0	228±24	1,7	204±14	1,4	23±3	1,1	226±20	6,1	22±9	0,7	172±11	4,8
Положительный контроль	1618±41	16,0	546±41	4,2	511±1	3,1	1234±66	59,0	857±25	23,0	364±42	12,0	1201±4	33,0
	ТП2; диметилсульфоксид (DMSO)													
DMSO	92±12	-	118±6	-	125±13	-	22±5	-	34±5	-	31±3	-	36±7	-
0,05	91±3	1,0	121±12	1,0	150±11	1,2	28±2	1,3	37±2	1,1	30±1	1,0	44±6	1,2
0,16	97±7	1,1	131±9	1,1	149±9	1,2	22±4	1,0	35±4	1,0	25±1	0,8	38±4	1,1
0,5	97±9	1,1	133±4	1,1	146±8	1,2	22±6	1,0	29±3	0,9	25±4	0,8	46±3	1,3
1,6	101±15	1,1	150±13	1,3	174±25	1,4	25±5	1,1	26±2	0,8	21±5	0,7	34±4	0,9
5,0	96±16	1,0	177±16	1,5	226±10	1,8	29±1	1,3	35±4	1,0	28±9	0,9	47±8	1,3
Положительный контроль	2103±112	34,0	981±152	8,0	1153±116	9,0	323±28	15,0	1404±82	41,0	364±42	12,0	1201±4	33,0
	ТП1; диметилформамид (DMFA)													
DMFA	72±3	-	100±8	-	157±7	-	21±6	1,0	29±4	1,0	20±3	-	38±6	-
0,05	85±11	1,2	99±1	1,0	158±13	1,0	20±8	1,0	33±3	1,1	17±2	0,9	36±4	1,0
0,16	83±12	1,2	100±19	1,0	170±5	1,1	17±2	0,8	43±10	1,5	22±2	1,1	54±5	1,4
0,5	80±15	1,1	111±12	1,1	170±7	1,1	20±1	1,0	52±18	1,8	22±1	1,1	75±7	2,0
1,6	76±4	1,0	119±1,2	1,2	193±9	1,2	25±7	1,2	79±4	2,7	18±3	0,9	136±11	3,6
5,0	65±12	0,9	155±9	1,6	250±21	1,6	23±9	1,1	151±10	5,2	22±2	1,1	270±35	7,1
Положительный контроль	367±63	5,0	756±30	7,6	511±1	3,3	186±14	8,9	1570±34	54,0	1234±66	62,0	857±25	23,0
	ТП2; диметилформамид (DMFA)													
DMFA	72±3	-	100±8	-	126±10	-	21±6	1,0	29±4	1,0	23±5	-	37±7	-
0,05	83±7	1,1	103±2	1,0	121±11	1,0	26±9	1,2	34±8	1,2	20±1	0,9	35±5	1,0
0,16	75±8	1,0	91±10	0,9	118±29	0,9	23±3	1,1	29±4	1,0	17±5	0,7	34±5	0,9
0,5	75±16	1,0	110±12	1,1	132±5	1,1	26±6	1,2	34±7	1,2	22±4	1,0	37±5	1,0
1,6	75±1	1,0	102±8	1,0	130±3	1,0	22±4	1,1	34±4	1,2	19±8	0,8	28±9	0,8
5,0	59±6	0,8	122±10	1,2	150±14	1,2	31±3	1,5	30±4	1,0	25±5	1,1	47±5	1,3
Положительный контроль	367±63	5,0	756±30	7,6	1131±5	12,0	447±5	3,5	1570±34	54,0	821±4	36,0	832±90	22,5

Примечание. Здесь и в табл. 3: Mean ± SD – среднее число ревертантов на чашку ± среднеквадратичное отклонение; KP – кратность.

Таблица 3 / Table 3

Оценка мутагенной активности аналитического стандарта карбендазима в тесте Эймса
Mutagenicity of the analytical standard of carbendazim in the Ames test

Концентрация, мг/чашка	TA 97		TA 98		TA 100		TA 102		TA 1535	
	Mean±SD	KP	Mean±SD	KP	Mean±SD	KP	Mean±SD	KP	Mean±SD	KP
	+S9									
DMFA	159±6	–	34±3	–	97±12	–	135±12	–	27±3	–
0,05	146±5	0,9	35±6	1,0	113±11	1,2	114±20	0,8	23±4	0,9
0,16	162±9	1,0	40±2	1,2	95±17	1,0	117±5	0,9	21±3	0,8
0,5	160±8	1,0	39±3	1,2	101±9	1,0	119±10	0,9	22±1	0,8
1,6	171±11	1,1	38±5	1,1	96±9	1,0	122±17	0,9	21±6	0,8
5,0	178±6	1,1	41±6	1,2	126±11	1,1	127±14	0,9	20±3	0,7
Положительный контроль	585±90	3,7	1210±202	35,6	1166±59	12,0	537±12	4,0	1050±41	38,9
	-S9									
DMFA	102±6	–	24±3	–	80±9	–	121±10	–	20±5	–
0,05	101±5	1,0	25±2	1,0	76±8	1,0	101±14	0,8	19±2	1,0
0,16	100±6	1,0	26±5	1,1	81±12	1,0	110±10	0,9	24±6	1,2
0,5	100±7	1,0	23±5	1,0	70±10	0,9	106±2	0,9	17±2	0,9
1,6	103±3	1,0	23±3	1,0	73±9	0,9	113±5	0,9	18±3	0,9
5,0	95±13	0,9	19±5	0,8	74±6	0,9	96±20	0,8	17±3	0,9
Положительный контроль	465±25	4,6	1225±78	51,0	408±11	5,1	1033±85	8,5	1936±40	96,8

Таблица 4 / Table 4

Результаты оценки генотоксичности различных образцов карбендазима *in vivo*
Results of genotoxicity assessment of carbendazim different samples *in vivo*

Объект испытания	Доза (мг/кг м.т.)		Линейная зависимость эффекта от дозы, значение <i>p</i>	95% контрольный предел частоты ПХЭ с микродрами (в случае карбендазима при высокой дозе)	95% доверительный интервал Вальда для среднего значения (в случае карбендазима при высокой дозе)
	в эксперименте	вызывающая статистически значимый эффект			
Исторический отрицательный контроль	–	–	–	0,00–0,20	[0,09; 0,11]
Исторический положительный контроль, циклофосфамид	40	40	–	1,37–2,20	[1,75; 1,81]
Карбендазим 98,2% (ТП1)	500,1000, 2000	≥ 500	0,000	1,79–2,71	[2,10; 2,39]
Карбендазим 99,0% (ТП2)	62,5, 125, 250, 500, 1000, 2000	≥ 125	0,000	1,63–2,76	[2,20; 2,63]
Карбендазим 98,62% (Sigma-Aldrich стандарт)	500,1000, 2000	≥ 500	0,000	1,82–2,61	[2,07; 2,36]

Исследования, выполненные в рамках данной работы, выявили способность ТП1 карбендазима индуцировать мутации со сдвигом рамки считывания в условиях метаболической активации. При этом наиболее выраженный мутагенный эффект наблюдали на штамме TA98.

При тестировании ТП2 на штамме TA97 наблюдали слабые, но воспроизводимые, зависящие от дозы, эффекты.

Отсутствие мутагенной активности при тестировании аналитического стандарта карбендазима позволяет предположить, что мутагенные эффекты, наблюдаемые на индикаторных культурах *Salmonella*, несущих мутации сдвига рамки считывания, опосредованы не самим действующим веществом, а наличием примесных соединений. Анализ результатов, полученных в тесте Эймса, может свидетельствовать о корреляции между чистотой технического продукта и его мутагенной активностью: наиболее выраженные эффекты наблюдали на ТП1 (с содержанием действующего вещества 98,2%).

Исходя из допущения, что данные ТП содержат только одну мутагенную примесь, можно полагать, что ее концентрация не превышает 0,05–0,1 мг/чашку, что говорит о высокой чувствительности индикаторных штаммов к данной группе соединений.

А.М. Sargif было показано, что без метаболической активации позитивные отклики при тестировании 2,3-диаминофеназина и 2-амино-3-гидроксифеназина наблюдали при концентрациях 5 и 10 мг/чашку, соответственно, тогда как в присутствии постмитохондриальной фракции печени крыс мутагенные эффекты выявляли, начиная с концентраций 0,025 и 0,05 мкг/чашка [23].

Генотоксические эффекты карбендазима в микроядерном тесте изучены на различных тест-системах как *in vivo* (мыши, крысы, хомячки), так и *in vitro* на культурах клеток млекопитающих, включая человека. Анализ генотоксичности карбендазима в микроядерном тесте *in vivo* в дозах от 50 мг/кг м.т. до 5000 мг/кг м.т. показал, что

позитивные эффекты наблюдали, как правило, в дозах 500 мг/кг м.т. В ряде случаев, например, на крысах Sprague–Dawley в незрелых сперматидях наблюдали статистически значимое увеличение доли клеток с микроядрами, начиная с дозы 50 мг/кг м.т., но отсутствовала зависимость доза–ответ. Аналогичным образом, у SPF мышей Swiss в эпителиальных клетках кишечных крипт выявили независимое от дозы небольшое, но статистически значимое увеличение частоты микроядер после введения карбендазима. В этом же исследовании были получены отрицательные результаты на клетках костного мозга мышей [10].

Исследования, выполненные нами, показали, что не только ТП карбендазима, но и его аналитический стандарт, индуцировали зависимое от дозы увеличение частоты ПХЭ с микроядрами. Выявленные в условиях *in vivo* сходные позитивные эффекты всех образцов карбендазима с чистотой 98,2–99,0% свидетельствуют о высоком уровне генотоксичности самого ДВ. На фоне такой высокой активности ДВ вклад примесей в генотоксическую активность ТП карбендазима с помощью микроядерного теста оценить невозможно.

Заключение

Проведенное исследование генотоксической активности фунгицида карбендазима показало, что в тесте Эймса позитивные эффекты опосредованы наличием примесных соединений. С учётом высокого содержания действующего вещества в исследованных образцах метод оценки обратных генных мутаций на бактериях является высокочувствительным тестом для оценки эквивалентности технических продуктов-дженериков карбендазима. В условиях *in vivo* все исследованные образцы данного действующего вещества индуцировали статистически значимое и зависимое от дозы образование микроядер в ПХЭ костного мозга мышей. Ввиду выраженного анеугенного действия карбендазима применение микроядерного теста в случае оценки эквивалентности технических продуктов оригинальному веществу является нецелесообразным.

ЛИТЕРАТУРА

(п.п. 1, 10, 11, 15, 18, 19, 23 см. References)

- Ракитский В.Н., ред. *Токсиколого-гигиеническая характеристика пестицидов и первая помощь при отравлении*. Справочник. М.: Агрорус; 2011.
- Илюшина Н.А. Цитогенетические эффекты карбендазима в клетках костного мозга мышей. *Генетика*. 2020; 56(10): 1150–60. <https://doi.org/10.31857/S001667582009009X>
- Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов по состоянию на 9 июня 2022 г. [Электронный ресурс]. 2022. URL: <https://mcx.gov.ru/ministry/departments/departament-rasteniievodstva-mekhanizatsii-khimizatsii-i-zashchity-rasteniy/industry-information/info-gosudarstvennaya-usluga-po-gosudarstvennoy-registratsii-pestitsidov-i-agrokhimikatov/>
- Илюшина Н.А. Оценка эквивалентности технических продуктов пестицидов-аналогов оригинальным действующим веществам по критерию «мутагенность». *Экологическая генетика*. 2019; 17(2): 101–12. <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.
- 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.
- ГОСТ 34660-2020. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Микроядерный анализ на эритроцитах млекопитающих.
- Методические указания МУ-1.2.3364-16 от 04.07.2016 Оценка мутагенной активности пестицидов».
- Методические рекомендации МР 1.2.0264-21 Оценка генотоксичности химических веществ в микроядерном тесте *in vivo* на эритроцитах костного мозга млекопитающих.

REFERENCES

1. Davide L.C., and Flach W. Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimetabolic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* 1977; 72(1): 174–93. <https://doi.org/10.1083/jcb.72.1.174>
2. Rakitskiy V.N., ed. *Toxicological and Hygienic Characteristics of Pesticides and the First Aid in Case of Poisoning. Handbook [Токсиколого-гигиеническая характеристика пестицидов I первая помощь при отравлении. Справочник]*. Moscow: Agrorus; 2011. (in Russian)
3. Lu S.Y., Liao J.W., Kuo M.L., Wang S.C., Hwang J.S., Ueng T.H. Endocrine-disrupting activity in carbendazim-induced reproductive and developmental toxicity in rats. *J Toxicol Environ Health A*. 2004; 67(19): 1501–15. <https://doi.org/10.1080/15287390490486833>
4. Rama E.M., Bortolan S., Vieira M.L., Gerardin D.C., Moreira E.G. Reproductive and possible hormonal effects of carbendazim. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2014; 69(3): 476–86. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.05.016>
5. EFSA. Reasoned opinion on the toxicological properties and maximum residue levels (MRLs) for the benzimidazole substances carbendazim and thiophanate-methyl. *EFSA Journal*. 2021; 19(7): 6773. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6773>
6. McCarroll N.E., Protzel A., Ioannou Y., Frank Stack H.F., Jackson M.A., Waters M.D., Dearfield K.L. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals: III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. *Mutat Res*. 2002; 512(1): 1–35. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(02\)00026-1.6](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(02)00026-1.6)
7. The MAK-Collection Part I, MAK Value Documentations DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Carbendazim (methyl benzimidazol-2-yl carbamate). 2014: 1-12.
8. Sarrif A.M., Bentley K.S., Fu L.J., O'Neil R.M., Reynolds V.L., Stahl R.G. Evaluation of benomyl and carbendazim in the vivo aneuploidy/micronucleus assay in BDF1 mouse bone marrow. *Mutation Research / Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*. 1994; 310(1): 143-9. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90018-3)
9. Department of Health. 1996 Report of the Committees on Toxicity, Mutagenicity, Carcinogenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. Threshold for Aneuploidy Inducing Chemicals Studies on Benomyl: and Carbendazim, 42-4.
10. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Human health risk assessment of carbendazim, 2009; 1-143. <https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/14531-carbendazim-prf-vol2.pdf>
11. The Health Canada Pest Management Regulatory Agency. Proposed Registration Decision PRD2011-04. Carbendazim. 2011: 1-64. ISSN: 1925-0878 (print). https://publications.gc.ca/collections/collection_2011/sc-hc/H113-9-2011-4-eng.pdf
12. Ilyushina N.A. Cytogenetic effects of carbendazim on mouse bone marrow cells. *Russian Journal of Genetics*. 2020; 56(10): 1193-1202. <https://doi.org/10.31857/S001667582009009X> (in Russian)
13. State catalog of pesticides and agrochemicals on June 9, 2022 [Electronic resource]. 2022. URL: <https://mcx.gov.ru/ministry/departments/departament-rastenievodstva-mekhanizatsii-khimizatsii-i-zashchity-rasteniy/industry-information/info-gosudarstvennaya-usluga-po-gosudarstvennoy-registratsii-pestitsidov-i-agrokhimikatov/>
14. Ilyushina N.A. Evaluation of the equivalence of technical products of pesticide analogues to the original active substances according to the criterion of "mutagenicity". *Ecological genetics*. 2019; 17(2): 101–12. <https://doi.org/10.17816/ecogen172101-112> (in Russian)
15. OECD Test No. 471: Bacterial reverse mutation test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. 2020. Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/97892>
16. GOST 32376-2013. Testing of chemicals of human hazard. Bacterial reverse mutation test. Moscow; 2013 (in Russian)
17. Egorova O.V., Demidova U.V., Ilyushina N.A. Assessment of experimental conditions affecting spontaneous mutation level of *Salmonella* strains used in the Ames test. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation)*. 2021; 100(7): 736–43. (in Russian)
18. Egorova O.V., Ilyushina N.A., Rakitskiy V.N. Mutagenicity evaluation of pesticide analogs using standard and 6-well miniaturized bacterial reverse mutation tests. *Toxicology in Vitro*. 2020; 69: 105006.
19. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. OECD Test TG 474 / OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD; 2016: 21.
20. MU 1.2.3364-16 от 04.07.2016 Assessment of mutagenic activity of pesticides. Moscow; 2016 (in Russian)
21. GOST 34660-2020. Methods of testing the impact of chemical products on the human body. Micronucleus analysis on the erythrocytes of mammals. Moscow; 2020. (in Russian)
22. MR 1.2.0264-21 Assessment of the genotoxicity of chemicals in micronucleus test *in vivo* on mammalian bone marrow erythrocytes. Moscow; 2021. (in Russian)
23. Sarrif A.M., Arce G.T., Krahn D.F., O'Neil R.M., Reynolds V.L. Evaluation of carbendazim for gene mutations in the *Salmonella*/Ames plate-incorporation assay: the role of aminophenazine impurities. *Mutat Res*. 1994; 321(1-2): 43–56. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(94\)90119](https://doi.org/10.1016/0165-1218(94)90119)

ОБ АВТОРАХ:

Егорова Ольга Валерьевна (Egorova Olga Valerevna), кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела генетической токсикологии, ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, г. Мытищи Московской области, Российская Федерация. E-mail: egorovaov@fferisman.ru

Аверьянова Наталья Сергеевна (Averyanova Natalia Sergeevna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, г. Мытищи Московской области, Российская Федерация. E-mail: averianovans@fferisman.ru

Кара Лилия Александровна (Kara Liliya Alexandrovna), младший научный сотрудник отдела генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, г. Мытищи Московской области, Российская Федерация. E-mail: karala@fferisman.ru

Илюшина Наталия Алексеевна (Ilyushina Natalya Alexandrovna), доктор биол. наук, заведующая отделом генетической токсикологии, ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, г. Мытищи Московской области, Российская Федерация. E-mail: iliushinana@fferisman.ru

