

Егорова О.В., Илюшина Н.А.

# Стандартизация критериев для интерпретации результатов оценки мутагенности в teste Эймса

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

## РЕЗЮМЕ

**Введение.** В настоящее время для обоснования заключения о наличии или отсутствии мутагенной активности в teste Эймса используют различные комбинации критериев для интерпретации результатов. В некоторых случаях при наличии слабых эффектов, особенно при оценке мутагенности пестицидов-дженериков, которые могут содержать мутагенные примеси, возможны разные выводы, в зависимости от выбранных критериев.

**Материал и методы.** Для стандартизации критериев интерпретации результатов в teste Эймса использованы данные, полученные ранее при оценке мутагенной активности технических продуктов пестицидов. Исследования проводили согласно стандартному протоколу ОЭСР № 471 и ГОСТ 32376–2013 методом прямого внесения на чашку и в условиях предварительной инкубации.

**Результаты.** Проведена оценка применимости трех комбинаций критериев интерпретации результатов teste Эймса с использованием ранее полученных собственных экспериментальных данных. Установлено, что в качестве критериев биологической значимости результатов оценки мутагенности в teste Эймса целесообразно использовать не только консервативный подход, основанный на правиле кратности, но и проводить сопоставление с данными диапазонов исторического отрицательного лабораторного контроля.

**Ограничение исследования.** Исследование ограничено оценкой результатов экспериментов, полученных при использовании стандартного чашечного теста, но не теста во флюктуационном формате.

**Заключение.** Заключение о наличии мутагенной активности объекта испытания в teste Эймса может быть сделано при условии удовлетворения следующих критериев: наличие статистически значимого увеличения числа ревертантов на опытных чашках по сравнению с сопутствующим отрицательным контролем; наличие зависимости «концентрация–эффект»; среднее число ревертантов как минимум для одной из тестируемых концентраций в условиях метаболической активации или без неё должно превышать верхнюю границу распределения исторического отрицательного лабораторного контроля; число ревертантных колоний на чашках с добавлением объекта испытаний должно в 2 или более раз превышать число спонтанных ревертантных колоний в отрицательном контроле для штаммов TA97, TA98, TA100, TA102 и в 3 или более раз для TA1535; наличие воспроизводимых эффектов.

**Ключевые слова:** мутагенность; метод оценки обратных генных мутаций на бактериях (teste Эймса, teste-система *Salmonella*/микросомы); критерии интерпретации результатов; надлежащая лабораторная практика

**Соблюдение этических стандартов.** Исследование не требует одобрения комитета по биомедицинской этике или других документов.

**Для цитирования:** Егорова О.В., Илюшина Н.А. Стандартизация критериев для интерпретации результатов экспериментов по оценке мутагенности в teste Эймса. Токсикологический вестник. 2024; 32(5): 313–321. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2024-32-5-313-321>

**Для корреспонденции:** Егорова Ольга Валерьевна, e-mail: [egorova.ov@fnrg.ru](mailto:egorova.ov@fnrg.ru)

**Участие авторов:** Егорова О.В. – концепция и дизайн исследования, сбор и анализ данных литературы, написание текста; Илюшина Н.А. – концепция и дизайн исследования, написание текста. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

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

Olga V. Egorova, Nataliya A. Ilyushina

# Standardization of criteria for interpreting the results of mutagenicity assessment in the Ames test

Federal Budgetary Institution 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, Russian Federation

## ABSTRACT

**Introduction.** Currently, various combinations of criteria for interpreting the results are used to make a conclusion about the mutagenic activity in the Ames test. In some cases where weak effects are present, especially when evaluating the mutagenicity of generic pesticides that may contain mutagenic impurities, different conclusions are possible, depending on the criteria chosen.

**Material and methods.** To standardize the criteria for interpreting the results in the Ames test, data obtained earlier in the assessment of the mutagenic activity of technical pesticide products were used. The studies were carried out in accordance with the OECD Standard Protocol No. 471 and State Standard (Russian: ГОСТ) 32376–2013 by direct application to the plate and under pre-incubation conditions.

**Results.** The applicability of three combinations of criteria for interpretation of Ames test results was evaluated using our own previously obtained experimental data. It was established that as criteria of biological significance of the results of mutagenicity evaluation in the Ames test it is reasonable to use not only the conservative approach based on the fold increase rule, but also to compare them with the data of the ranges of historical negative laboratory control.

**Limitations.** The study is limited to evaluating the results of experiments obtained using the standard plate test, but not the fluctuation format.

**Conclusion.** A conclusion about the presence of mutagenic activity of the test item in the Ames test can be made if the following criteria are fulfilled: the presence of a statistically significant increase in the number of revertants on the plates with the test item compared to the concomitant negative control; the presence of a concentration-effect relationship; the mean number of revertants for at least one of the concentrations tested, with or without metabolic activation, must exceed the upper limit of the distribution of the historical negative laboratory control; the number of revertants on the plates with the test item must be 2 or more times compared to that one in the negative control for TA97, TA98, TA100, TA102 and 3 or more for TA1535; the reproducible effects.

**Keywords:** mutagenicity; bacterial reverse mutation test (the Ames test, *Salmonella*/microsome assay); criteria for interpreting the results; good laboratory practice

**Compliance with ethical standards.** The study does not need the approval of the biomedical ethics committee or other documents.

**For citation:** Egorova O.V., Ilyushina N.A. Standardization of criteria for interpreting the results of mutagenicity assessment in the Ames test. *Toksikologicheskiy vestnik / Toxicological Review*. 2024; 32(5): 313–321. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2024-32-5-313-321>

**For correspondence:** Olga V. Egorova, e-mail: [egorova.ov@fnrg.ru](mailto:egorova.ov@fnrg.ru)

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

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

**Funding.** The study had no sponsorship.

Accepted: August 21, 2024 / Received: September 20, 2024 / Published: October 30, 2024

## Введение

В настоящее время при оценке мутагенного действия химических веществ на бактериях в тесте Эймса используют разные подходы к анализу полученных данных [1–6]. Руководство ОЭСР № 471 «Bacterial reverse mutation test» и иные нормативные документы<sup>1,2,3</sup> предоставляют минимум информации о подходах к интерпретации результатов и разграничении положительного или отрицательного эффектов, особенно с точки зрения оценки их биологической значимости. В качестве критериев наличия мутагенного эффекта может выступать «зависимое от концентрации увеличение числа колоний ревертантов и/или воспроизведенное увеличение числа колоний ревертантов на чашку при одной или нескольких концентрациях, как минимум, на одном штамме, с системой метаболической активации или без неё. При этом биологическая значимость результатов должна быть рассмотрена прежде всего» [7].

В качестве критериев биологической значимости может быть использовано классическое «правило кратности» и/или сравнение с суммарными данными исторического отрицательного лабораторного контроля. В последнем случае необходимо, чтобы как минимум для одной из тестируемых концентраций число индуцированных ревертантов превышало верхний предел распределения исторического отрицательного контроля [1–3, 5, 6, 8].

На практике для интерпретации результатов исследования и обоснования заключения о наличии или отсутствии мутагенной активности в teste Эймса выбирают разные подходы. При этом в случае явно выраженного мутагенного действия результаты трактуются однозначно, независимо от выбранного подхода. Однако довольно часто получают пограничные эффекты, например, при оценке мутагенности технических продуктов пестицидов, которые могут содержать опасные примеси в небольшом количестве. В таком случае, в зависимости от выбранных критериев, могут быть сделаны разные выводы.

<sup>1</sup> ГОСТ 32376–2013. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Метод оценки обратных мутаций на бактериях: утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. N 805-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32376–2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2014 г.: дата введения 2014-08-01.

<sup>2</sup> Руководство Р 1.2.3156–13. Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья человека. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. – 639 с.

<sup>3</sup> ГОСТ ISO 10993-3–2018 «Изделия медицинские. оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 3. Исследования генотоксичности, канцерогенности и токсического действия на репродуктивную функцию».

Корректное разграничение позитивного и негативного эффектов имеет большое значение при оценке эквивалентности пестицидов-дженериков оригинальным веществам по критерию «мутагенность». В Российской Федерации на рынке средств защиты растений подавляющее большинство действующих веществ пестицидов являются дженериками. В мировой практике в случае присутствия новых примесей или повышенного уровня известных релевантных примесей, содержание которых  $> 0,1\%$ , оценка мутагенности при определении эквивалентности воспроизведенного пестицида продукту оригинара является обязательной [9, 10].

Первый этап оценки эквивалентности основывается на исследованиях *in silico* и тестах *in vitro*, среди которых, как правило, используют тест Эймса [11, 12].

Учитывая вышеизложенное, крайне важно выработать унифицированные критерии для интерпретации данных экспериментов с целью четкого разграничения между мутагенным (биологически значимым) и немутагенным (биологически незначимым) эффектами в teste Эймса, что особенно актуально при оценке эквивалентности технических продуктов дженериков продуктам оригинара и последующей токсикологической оценке пестицидов.

Цель работы – стандартизация критериев интерпретации результатов экспериментов, полученных в teste Эймса.

## Материал и методы

Для стандартизации критериев интерпретации результатов в teste Эймса использованы данные, полученные ранее при оценке мутагенной активности технических продуктов пестицидов [13].

Исследования проводили согласно стандартному протоколу ОЭСР № 471 и ГОСТ 32376–2013 методом прямого внесения на чашку и в условиях предварительной инкубации [2]. В качестве отрицательного контроля использовали варианты с растворителем (диметилсульфоксид). Положительными контролями служили 2-аминоантрацен (10 мкг/чашка) в условиях метаболической активации или циклофосфамид (200 мкг/чашка), 2-нитрофлуорен (10 мкг/чашка, TA98), азид натрия (10 мкг/чашка, TA100 и TA1535), метилметансульфонат (10 мкг/чашка, TA102) и 9-аминоакридин (50 мкг/чашка, TA97) без метаболической активации.

С целью обоснования выбора критериев, используемых для формирования заключения о наличии или отсутствии мутагенной активности тестируемого технического продукта пестицида,

Таблица 1 / Table 1

**Перечень некоторых объектов испытания, для которых в teste Эймса выявлены положительные, отрицательные или неоднозначные мутагенные эффекты**

**The list of some test items for which positive, negative or equivocal mutagenic effects were revealed in the Ames test**

Химический класс	Технический продукт	Количество Объектов испытания	Эффекты <i>in vitro</i>
Трикетоны	2-(4-метилсульфонил-2-нитробензоил) циклогексан-1,3-дион	3	+ / + / +
Бензимидазолы*	N-(бензимидазолил-2)-O-метилкарбамат	2	± / +
Бензофураны	(+/-)-2-этокси-2,3-дигидро-3,3-диметилбензофуран-5-ил метансульфонат	5	± / - / - / - / +
Фосфорорганические соединения	O,O-диметил-S-(N-метилкарбамилметил)дитиофосфат	4	± / ± / + / +
	O-(3,5,6-трихлорпиридил-2)-O,O-диэтилтиофосфат	3	- / ± / ±
	O,O-диметил-O-(3-метил-4-нитрофенил)тиофосфат	1	+
Фенилпиразолы	5-амино-[2,6-дихлор-4-(трифторметил)фенил]-4-[(1R,S)-(трифторметил)сульфинил]-1Н-пиразол-3-карбонитрил	3	± / - / ±
Динитроанилины	N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидин	1	+
Арилоксифенокси-пропионаты	(R)-2-[4-(6-[хлоро-2-хиноксалинил]окси)фенокси]пропионовой кислоты этиловый эфир	3	- / ± / -
Дифениловые эфиры	α,α,α-трифторм-2-хлор-п-толил-4'-нитро-3'-этоксифениловый эфир	1	±
Метоксиакрилаты	Метил(E)-2-{2-[6-(2-цианофенокси)пиirimидин-4-илокси]фенил}-3-метоксиакрилат	1	±
Дитиокарbamаты	Тетраметилтиурамдисульфид	2	+ / +
Фталемиды	2-(трихлорметилсульфанил)-3 а,4,7,7 а-тетрагидроизоиндол-1,3-дион	1	+

*Примечание.* \* в каждом химическом классе приведены только те ТП пестицидов, для которых выявлены позитивные или неопределённые результаты. «-» – отсутствие мутагенного эффекта; «+» – наличие позитивного мутагенного эффекта; «±» – неопределённый результат (статистически значимый зависимый от дозы результат, но кратность превышения количества ревертантных колоний < 2 или в случае штамма TA1535 <3).

оценивали применимость разных комбинаций критериев позитивного ответа.

*Вариант 1:*

- наличие статистически значимого увеличения числа ревертантов на опытных чашках по сравнению с сопутствующим отрицательным контролем;
- наличие зависимости «концентрация – эффект»;
- среднее число ревертантов как минимум для одной из тестируемых концентраций в условиях метаболической активации или без неё должно превышать верхнюю границу распределения исторического отрицательного лабораторного контроля (ИОК);
- наличие воспроизводимых эффектов.

*Вариант 2:*

- наличие статистически значимого увеличения числа ревертантов на опытных чашках по сравнению с сопутствующим отрицательным контролем;
- наличие зависимости «концентрация – эффект»;
- число ревертантных колоний на чашках с добавлением объекта испытаний должно в 2 или

более раз превышать число спонтанных ревертантных колоний в отрицательном контроле для штаммов TA97, TA98, TA100, TA102 и в 3 или более раз для TA1535;

- наличие воспроизводимых эффектов.

*Вариант 3:*

- наличие статистически значимого увеличения числа ревертантов на опытных чашках по сравнению с сопутствующим отрицательным контролем;
- наличие зависимости «концентрация – эффект»;
- среднее число ревертантов как минимум для одной из тестируемых концентраций в условиях метаболической активации или без неё должно превышать верхнюю границу распределения ИОК;
- число ревертантных колоний на чашках с добавлением объекта испытаний должно в 2 или более раз превышать число спонтанных ревертантных колоний в отрицательном контроле для штаммов TA97, TA98, TA100, TA102 и в 3 или более раз для TA1535;
- наличие воспроизводимых эффектов.

Таблица 2 / Table 2

**Пример результатов применимости разных комбинаций критериев определения положительного ответа в teste Эймса на модельном соединении**

**The list of some test items for which positive, negative or equivocal mutagenic effects were revealed in the Ames test**

Вариант	Критерии	Соединение 342-5		Вывод
		основной тест тестируемые концентрации: 0,05; 0,16; 0,5; 1,6; 5,0 мг/чашка	повторный тест тестируемые концентрации: 0,05; 0,5; 1,25; 2,5; 5,0 мг/чашка	
1	Наличие статистически значимых откликов	TA97, 1,6–5,0 мг/чашка, +S9 и 5,0 мг/чашка, -S9; TA100, 0,5–5,0 мг/чашка, ±S9; TA102, 0,5–5,0 мг/чашка, ±S9	TA97, 1,25–5,0 мг/чашка, -S9 и 2,5–5,0 мг/чашка, -S9; TA100, 2,5–5,0 мг/чашка, +S9 и 0,5–5,0 мг/чашка, -S9; TA102, 2,5–5,0 мг/чашка	<p><i>Основной тест:</i> +TA97 (+S9, -S9); +TA100 (+S9, -S9); +TA102 (+S9, -S9); <i>Повторный тест:</i> +TA97 (+S9, -S9); +TA100 (+S9, -S9); +TA102 (+S9, -S9) Позитивный мутагенный эффект (TA97, TA100 и TA102, ±S9)</p>
	Концентрация – эффект	+ (TA97, TA100, TA102)	+ (TA97, TA100, TA102)	
	Превышение верхней границы ИОК	TA97, TA100, TA102, ±S9, число ревертантов на чашках с объектом испытания превышает верхнюю границу ИОК	TA97, TA100, TA102, ±S9, число ревертантов на чашках с объектом испытания превышает верхнюю границу ИОК	
	Воспроизводимость	+	+	
2	Максимальная кратность	TA97, 1,9, +S9; TA97, 1,8, -S9 TA100, 1,9, +S9; TA100, 2,0, -S9; TA102, 1,9, +S9; TA102, 1,6, -S9	TA97, 1,7, +S9; TA97, 1,7, -S9 TA100, 1,7, +S9; TA100, 1,8, -S9; TA102, 1,7, +S9; TA102, 1,6, -S9	<p><i>Основной тест:</i> ±TA97 (+S9, -S9); ±TA100 (-S9), ±TA100 (+S9); ±TA102 (+S9, -S9) <i>Повторный тест:</i> ±TA97 (+S9, -S9); ±TA100 (+S9, -S9); ±TA102 (+S9, -S9) Позитивный мутагенный эффект (TA100, -S9)</p>
	Концентрация – эффект	+ (TA97, TA100, TA102)	+ (TA97, TA100, TA102)	
	Наличие статистически значимых откликов	TA97, 1,6–5,0 мг/чашка, +S9 и 5,0 мг/чашка, -S9; TA100, 0,5–5,0 мг/чашка, ±S9; TA102, 0,5–5,0 мг/чашка, ±S9	TA97, 1,25–5,0 мг/чашка, +S9 и 2,5–5,0 мг/чашка, -S9; TA100, 2,5–5,0 мг/чашка, +S9 и 0,5–5,0 мг/чашка, -S9; TA102, 2,5–5,0 мг/чашка, ±S9	
	Воспроизводимость	+	+	
3	Наличие статистически значимых откликов	TA97, 1,6–5,0 мг/чашка, +S9 и 5,0 мг/чашка, -S9; TA100, 0,5–5,0 мг/чашка, ±S9; TA102, 0,5–5,0 мг/чашка, ±S9	TA97, 1,25–5,0 мг/чашка, +S9 и 2,5–5,0 мг/чашка, -S9; TA100, 2,5–5,0 мг/чашка, +S9 и 0,5–5,0 мг/чашка, -S9; TA102, 2,5–5,0 мг/чашка, ±S9	<p><i>Основной тест:</i> ±TA97 (+S9, -S9); +TA100 (-S9), ±TA100 (+S9); ±TA102 (+S9, -S9); <i>Повторный тест:</i> ±TA97 (+S9); ±TA100 (+S9, -S9); ±TA102 (+S9, -S9) Позитивный мутагенный эффект (TA100, -S9)</p>
	Концентрация – эффект	+ (TA97, TA100, TA102)	+ (TA97, TA100, TA102)	
	Превышение верхней границы ИОК	TA97, TA100, TA102, ±S9, число ревертантов на чашках с объектом испытания превышает верхнюю границу ИОК	TA97, TA100, TA102, ±S9, число ревертантов на чашках с объектом испытания превышает верхнюю границу ИОК	
	Максимальная кратность	TA97, 1,9, +S9; TA97, 1,8, -S9 TA100, 1,9, +S9; TA100, 2,0, -S9; TA102, 1,9, +S9; TA102, 1,6, -S9	TA97, 1,7, +S9; TA97, 1,7, -S9 TA100, 1,7, +S9; TA100, 1,8, -S9; TA102, 1,7, +S9; TA102, 1,6, -S9	
	Воспроизводимость	+	+	

П р и м е ч а н и е . ИОК – исторический отрицательный лабораторный контроль; «-» – отсутствие мутагенного эффекта; «+» – наличие мутагенного эффекта ; «±» - неопределенный результат (не соответствие по 1-му критерию позитивного ответа, при соблюдении всех остальных).

Таблица 3 / Table 3

**Результаты оценки применимости разных комбинаций критериев позитивного ответа для интерпретации результатов, полученных в teste Эймса.**

**The results of evaluating the applicability of different combinations of positive response criteria for interpreting the results obtained in the Ames test**

Технический продукт	S9	Вариант 1					Вариант 2					Вариант 3				
		TA97	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA97	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA97	TA98	TA100	TA102	TA1535
Соединение 342-5	+S9	+/+	-	+/+	+/+	-	±/±	-	±/±	±/±	-	±/±	-	±/±	±/±	-
	-S9	+/+	-	+/+	+/+	-	±/±	-	+/±	±/±	-	±/±	-	+/±	±/±	-
Соединение 208-5	+S9	+/+	-	±/+	±/+	-	+/+	-	±/±	±/+	-	+/+	-	±/±	±/+	-
	-S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Соединение 277-6	+S9	+/+	+/+	-	-	-	±/±	+/+	-	-	-	±/±	+/+	-	-	-
	-S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Соединение 342-7	+S9	+/+	-	-	±/-	-	±/±	-	-	±/-	-	±/±	-	-	±/-	-
	-S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Соединение 233-9	+S9	-	+/+	±/±	±/±	+/+	-	+/+	±/±	±/±	+/+	-	+/+	±/±	±/±	+/+
	-S9	-	+/+	±/±	±/±	+/+	-	+/+	±/±	±/±	+/+	-	+/+	±/±	±/±	+/+
Соединение 234-5	+S9	-	-	+/+	+/±	-	-	-	±/±	+/±	-	-	-	±/±	+/±	-
	-S9	-	-	+/+	±/±	-	-	-	±/±	±/±	-	-	-	±/±	±/±	-
Соединение 166-9	+S9	-	-	+/+	±/+	-	-	-	±/±	±/±	-	-	-	±/±	±/±	-
	-S9	-	-	+/+	±/±	-	-	-	±/±	±/±	-	-	-	±/±	±/±	-
Соединение 232-9	+S9	-	-	+/+	+/+	-	-	-	+/+	+/+	-	-	-	+/+	+/+	-
	-S9	-	-	+/+	+/+	-	-	-	+/+	+/+	-	-	-	+/+	+/+	-
Соединение 302-6	+S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-S9	±/-	-	+/+	±/-	-	±/-	-	±/±	±/-	-	±/-	-	±/±	±/-	-
Соединение 229-2	+S9	-	-	±/+	±/+	-	-	-	±/±	±/+	-	-	-	±/±	±/+	-
	-S9	-	-	±/+	±/+	-	-	-	±/±	±/±	-	-	-	±/±	±/±	-
Соединение 002-7	+S9	±/±	-	+/+	-	-	±/±	-	±/±	-	-	±/±	-	±/±	-	-
	-S9	-	-	±/-	-	-	-	-	±/-	-	-	-	-	±/-	-	-
Соединение 001-2	+S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-S9	±/±	±/±	-	-	+/±	+/±	-	-	-	-	±/±	±/±	-	-	-
Соединение 012-3	+S9	-	-	±/±	-	±/±	-	-	+/±	-	+/+	-	-	±/±	-	±/±
	-S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. «-» – отсутствие мутагенного эффекта; ; «+» – наличие мутагенного эффекта; ; «±» – неопределенный результат.

Если результаты исследования не соответствовали вышеупомянутым критериям, считали, что вещество не является мутагеном в данном тесте. При наличии несоответствия по 1-му критерию положительного ответа, при соблюдении всех остальных результат считали неопределенным.

Статистическую обработку проводили, используя критерий Даннетта  $t$  и ранговый метод Спирмена (при  $\alpha = 0,05$ ) с помощью компьютерной программы SPSS Statistics v. 22. Также использовали Microsoft Excel 2013 для описательной статистики.

## Результаты

Тестирование на мутагенность 222 технических продуктов пестицидов разных химических классов с помощью метода оценки обратных генных мутаций на бактериях показало, что большинства экспериментов позволяют однозначно трактовать полученные результаты о наличии или отсутствии мутагенной активности объекта испытаний с использованием классического правила кратности (вариант 2).

Однако при использовании правила кратности в случае нескольких технических продуктов

пестицидов (ТП) из классов бензимидазолов (1 ТП из 8 протестированных), бензофуранов (1 ТП из 5), фосфорорганических соединений (4 ТП из 11), фенилпиразолов (2 ТП из 3), арилоксифеноксипропионатов (1 ТП из 9), метоксиакрилатов (1 ТП из 1) и дифениловых эфиров (1 ТП из 1) были получены неоднозначные (сомнительные) результаты: наблюдали статистически значимые зависимые от дозы эффекты, но кратность превышения числа ревертантов на экспериментальных чашках по сравнению с сопутствующим отрицательным контролем была < 2 (1,5–1,9) для штаммов TA97, TA98, TA100, TA102 или < 3 (2,4–2,8) в случае штамма TA1535 (табл. 1).

В качестве примера в табл. 2 приведены результаты применения разных комбинаций критериев определения положительного ответа в teste Эймса для одного из объектов испытания.

В табл. 3 суммированы результаты формирования общего заключения при применении каждой комбинации критериев позитивного ответа для 13 исследованных технических продуктов действующих веществ пестицидов.

При использовании комбинации критериев положительного ответа, основанной на сопоставлении с данными исторического отрицательного контроля, из 13 тестируемых объектов испытаний для 11 (84,6%) был сделан вывод о наличии мутагенной активности. В случае использования подхода, включающего правило кратности, положительный эффект был обнаружен для 9 (69,2%) объектов испытания. При этом 4 вещества (соединения 342-7, 166-9, 302-6, 002-7) в соответствии с первым вариантом следует оценить как положительные, а в соответствии со вторым вариантом — как не обладающие мутагенной активностью. Два других объекта испытания (соединения 001-2 и 012-3), наоборот, оцениваются как мутагенные в соответствии со вторым вариантом и как не мутагенные в соответствии с первым подходом.

При использовании подхода, учитывающего как кратность, так и результаты сопоставления с историческим лабораторным отрицательным контролем (вариант 3), положительный ответ (мутагенная активность) был выявлен в случае 7 (53,8%) объектов испытаний.

## Обсуждение

Тест Эймса широко применяют для оценки мутагенности факторов окружающей среды. Метод позволяет выявить до 70–80% мутагенов, которые проявляют генотоксичность у млекопитающих [14–15]. Согласно [14] тест Эймса харак-

теризуется относительно высокой чувствительностью (доля истинно положительных результатов), но низкой специфичностью (доля истинно отрицательных результатов).

Особые сложности в трактовке результатов, полученных в teste Эймса, возникают в случае слабых мутагенных эффектов, хотя выявление таких эффектов имеет большое значение, например, при оценке эквивалентности дженериков оригинальным веществом [11].

Проведенное исследование показало, что заключение о наличии или отсутствии мутагенного действия вещества может зависеть от выбранных критериев экспертной оценки. Согласно нормативно-методическим документам [7] и Р 1.2.3156–13 следует оценивать не только статистическую, но и биологическую значимость результатов исследования. В качестве критерия биологической значимости может выступать кратность превышения числа ревертантов после экспозиции по сравнению с сопутствующим отрицательным контролем, и/или может быть выбрано сопоставление диапазона распределения полученных результатов с распределением данных исторического отрицательного контроля в лаборатории [1–5, 8].

Преимущество консервативного подхода, основанного на правиле кратности и заложенного в процедуре, описанной проф. Б. Эймсом и соавт., заключается в простоте применения. Недостатком является то, что данный подход не отражает реальные биологические процессы, поскольку при наличии мутагенной активности у тестируемого вещества не всегда происходит кратное увеличение числа ревертантов на чашках с объектом испытания. Данные среднего числа ревертантных колоний в зависимости от штамма колеблются в диапазоне от 3 (TA1535) до 400 (TA102). По этой причине для штаммов с низким числом спонтанных ревертантов (<10–20) за точку отсечения принимают 2,5–3-кратное увеличение индуцированных мутантов по сравнению с отрицательным контролем. Для штаммов с высоким числом спонтанных ревертантов (>50–100) за точку отсечения принимают 1,8–2,2-кратное увеличение числа индуцированных мутантов по сравнению с отрицательным контролем [3, 8, 16]. Но даже при использовании такого подхода нельзя исключить вероятность получения ложноположительных или ложноотрицательных ответов.

При формировании заключения о наличии или отсутствии мутагенности объекта испытания в качестве критерия биологической значимости также можно использовать результаты сравнения с диапазонами исторического отрицательного контроля. Поэтому в лаборатории, проводящей

исследования с помощью теста Эймса, крайне важно контролировать факторы, которые могут оказывать влияние на уровень спонтанного мутагенов индикаторных культур. Ранее нами было показано, что в качестве факторов, приводящих к колебаниям уровня мутаций у тест-штаммов, могут выступать: наличие S9, объём селективной среды и марка желирующего агента [17].

В работе D.D. Levy и соавт. описаны существующие подходы к интерпретации данных теста Эймса, а также усилия консультативной группы экспертов Международного совещания по оценке генотоксической активности (The International Workshops on Genotoxicity Testing) по выработке единых критериев. Несмотря на то, что не удалось достичь консенсуса по данному вопросу, так как у членов рабочей группы были разные мнения относительно наиболее подходящего подхода, при наличии сомнительных результатов рекомендовано использовать дополнительные критерии позитивного ответа, например, сопоставление с данными исторического лабораторного контроля [5].

Полученные нами результаты оценки разных подходов к интерпретации экспериментальных данных подтверждают целесообразность применения и показателя кратности, и сопоставления с диапазоном ИОК (вариант 3) в качестве критерия биологической значимости наблюдаемых эффектов. Определение кратности превышения числа ревертантов по сравнению со спонтанным фоном имеет важное значение для оценки уровня наблюдаемого эффекта. Но в случае небольшого превышения показателя кратности, принятого в качестве предела отсечения, абсолютные значения могут не выходить за рамки ИОК и быть обусловлены не воздействием тестируемого вещества, а другими факторами и случайными процессами, т.е. будет получен ложноположительный результат. Возможна и обратная ситуация с получением ложноотрицательного результата. С другой стороны, диапазон ИОК в лаборатории не является величиной постоянной и может быть скорректирован при получении новых данных.

Таким образом, исходя из результатов, полученных в ходе настоящего исследования на 13 модельных объектах испытания, можно сделать вывод, что при выборе в качестве критериев биологической значимости только кратности или только сопоставления с диапазонами исторического отрицательного лабораторного контроля можно получить более высокую долю ложноположительных и/или ложноотрицательных результатов.

Использование комбинированного подхода (вариант 3), включающего как правило кратности, так и сопоставление с данными диапазона

исторического лабораторного контроля, позволяет снизить долю ложноположительных и ложноотрицательных результатов, что, несомненно, способствует повышению качества исследований и унификации протоколов экспериментов в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики.

**Ограничение исследования.** Исследование ограничено оценкой результатов экспериментов, полученных при использовании стандартного чашечного теста, но не теста во флюктуационном формате.

## Заключение

В настоящее время для обоснования заключения о наличии или отсутствии мутагенной активности в teste Эймса используют различные комбинации критериев для интерпретации результатов. В некоторых случаях при наличии слабых эффектов, особенно при оценке мутагенности пестицидов-дженериков, которые могут содержать мутагенные примеси, возможны разные выводы, в зависимости от выбранных критериев.

Проведена оценка применимости трёх комбинаций критериев интерпретации результатов теста Эймса с использованием ранее полученных собственных экспериментальных данных.

Установлено, что в качестве критериев биологической значимости результатов оценки мутагенности в teste Эймса целесообразно использовать не только консервативный подход, основанный на правиле кратности, но и проводить сопоставление с данными диапазонов исторического отрицательного лабораторного контроля.

Заключение о наличии мутагенной активности объекта испытания в teste Эймса может быть сделано при условии удовлетворения следующих критериев:

- наличие статистически значимого увеличения числа ревертантов на опытных чашках по сравнению с сопутствующим отрицательным контролем;
- наличие зависимости «концентрация – эффект»;
- среднее число ревертантов как минимум для одной из тестируемых концентраций в условиях метаболической активации или без неё должно превышать верхнюю границу распределения исторического отрицательного лабораторного контроля;
- число ревертантных колоний на чашках с добавлением объекта испытаний должно в 2 или более раз превышать число спонтанных ревертантных колоний в отрицательном контроле для штаммов TA97, TA98, TA100, TA102 и в 3 или более раз для TA1535;
- наличие воспроизводимых эффектов.

## ЛИТЕРАТУРА

(пп. 1, 4–10, 12, 15 см. в References)

2. Фонштейн Л.М., Абильев С.К., Бобринев Е.В. и др. *Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем: методические указания*. М.: 1985.
3. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Совместное издание Программы ООН по окружающей среде, Международной организации труда и Всемирной организации здравоохранения. М.: Медицина; 1989.
11. Илюшина Н.А. Оценка эквивалентности технических продуктов пестицидов аналогам оригинальным действующим веществам по критерию «мутагенность». *Экологическая генетика*. 2019; 17(2): 101–12.
13. Илюшина Н.А., Егорова О.В., Ревазова Ю.А. Применимость теста Эймса и микронуклеарного теста *in vivo* для оценки эквивалентности технических продуктов пестицидов оригинальным действующим веществам. *Гигиена и санитария*. 2019; 98(2): 219–24.
14. Абильев С.К., Глазер В.М. *Мутагенез с основами генотоксикологии: учебное пособие*. М.; СПб: Нестор-История; 2015: 304.
16. Абильев С.К. Выявление и прогнозирование мутагенной активности химических соединений окружающей среды: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.: 2003.
17. Егорова О.В., Демидова Ю.В., Илюшина Н.А. Оценка экспериментальных условий, влияющих на уровень спонтанных мутаций штаммов *Salmonella*, используемых в teste Эймса. *Гигиена и санитария*. 2021; 100(7): 736–43. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-7-736-743>

## REFERENCES

1. Maron D, Ames B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research Environ. Mutagen.* 1983; 113(3–4): 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
2. Fonstein L.M., Abilev S.K., Bobrinev E.B., et al. *Methods of primary detection of the genetic activity of environmental pollutants using bacterial test systems: guidelines [Metody pervichnogo vyvleniya geneticheskoy aktivnosti zagraznitelej sredy s pomoshch'yu bakterial'nyh test-sistem: metodicheskie ukazaniya]*. Moscow; 1985. (in Russian)
3. Guidelines on short-term methods for detection of mutagenic and cancerogenic chemicals. A Co-Publishing of United Nations Environment Programme, International Labour Organization and World Health Organization [Rukovodstvo po kratkosrochnym testam dlya vyvleniya mutagennih i kancerogenih himicheskikh veshchestv. Sovmestnoe izdanie Programmy OON po okruzhayushchej srede, Mezhdunarodnoj organizacii truda i Vsemirnoj organizacii zdorovoohraneniya]. Moscow: Meditsina; 1989: 26–38. (in Russian)
4. Nicolette J., Dakoulas E., Pant K., et al. A comparison of 24 chemicals in the six-well bacterial reverse mutation assay to the standard 100-mm Petri plate bacterial reverse mutation assay in two laboratories. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2018; 100: 134–60. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.10.005>
5. Levy D.D., Zeiger E., Escobar P.A., et al. Recommended criteria for the evaluation of bacterial mutagenicity data (Ames test). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2019; (848): 403074. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.07.004>
6. Schoeny R., Cross K.P., DeMarini D.M., et al. Revisiting the bacterial mutagenicity assays: Report by a workgroup of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2020; 849: 503137. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503137>
7. OECD Test 471: 2020, IDT. Bacterial reverse mutation test.
8. Hamel A., Roy M., Proudlock R. The bacterial reverse mutation test. Chapter 4. In *Genetic Toxicology Testing. A Laboratory Manual*. 2016
9. Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides First edition – third revision March 2016. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246192/1/WHO-HTM-NTD-WHOPES-2016.4-eng.pdf>
10. Guidance Document on the Assessment of the Equivalence of Technical Materials of Substances regulated under Regulation (EC) No 1107/2009. SANCO/10597/2003-rev. 10.1, 13 July 2012. Available at: [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides\\_guidance\\_equivalence-chem-substances\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_guidance_equivalence-chem-substances_en.pdf)
11. 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): 101–12. <https://doi.org/10.17816/ecogen172101-112>
12. Overview of China's new pesticide regulations. 2020. [Electronic resource]. URL: <https://agrochemical.chemlinked.com/agropedia/overview-chinas-new-pesticide-regulations> (дата обращения: 27.06.2024)
13. Ilyushina N.A., Egorova O.V., Revazova Yu.A. Applicability of the Ames test and micronucleus test in vivo for the evaluation of the equivalence of pesticide technical grade active ingredients compared to original active substances. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2019; 98(2): 219–24. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-2-219-224> (In Russian)
14. Abilev S.K., Glazer V.M. *Mutagenesis with the Basics of Genotoxicology: A Textbook [Mutagenez s osnovami genotoksikologii: uchebnoe posobie]*. Moscow; St. Petersburg: Nestor-History; 2015. (In Russian)
15. Kirkland D., Reeve L., Gatehouse D., Vanparparys P. A core *in vitro* genotoxicity battery comprising the Ames test plus the *in vitro* micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and *in vivo* genotoxins. *Mutat Res.* 2011; 18; 721(1): 27–73. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.12.015>
16. Abilev S.K. *Identification and prediction of mutagenic activity of chemical compounds of the environment*. Diss. Moscow; 2003. (in Russian)
17. 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 Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2021; 100(7): 736–743. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-7-736-743> (In Russian)

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Егорова Ольга Валерьевна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская область, г. Мытищи, Российская Федерация. E-mail: egorova.ov@fnrg.ru

**Илюшина Наталья Алексеевна**, доктор биологических наук, заведующая отделом генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская область, г. Мытищи, Российская Федерация. E-mail: ilushina.na@fnrg.ru

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Olga V. Egorova**, PhD of Biological Sciences, Leading Researcher of the Dept. of Genetic Toxicology of the Institute of Hygiene, Toxicology of Pesticides and Chemical Safety of the Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman of the Federal Service for Supervision in Protection of the Rights of Consumer and Human Well-being, Mytishchi, 141014, Russian Federation. <https://orcid.org/0000-0003-4748-8771> E-mail: egorova.ov@fnrg.ru

**Natalya A. Ilyushina**, PhD, DSci., Head of the Dept. of Genetic Toxicology of the Institute of Hygiene, Toxicology of Pesticides and Chemical Safety of the Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman of the Federal Service for Supervision in Protection of the Rights of Consumer and Human Well-being, Mytishchi, 141014, Russian Federation. <https://orcid.org/0000-0001-9122-9465> E-mail: ilushina.na@fnrg.ru

