

Горенская О.В., Егорова О.В., Аверьянова Н.С., Котнова А.П., Илюшина Н.А.

Оценка цитотоксического и генотоксического действия ципродинила *in vitro*

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

РЕЗЮМЕ

Введение. Ципродинил – системный фунгицид широкого спектра действия из класса анилинопириимидинов. Имеющиеся в литературе данные о генотоксичности этого пестицида противоречивы.

Цель работы – изучить цитотоксические и генотоксические эффекты ципродинила.

Материал и методы. Мутационную активность ципродинила оценивали в тесте Эймса. Уровень фрагментации ДНК в лимфоцитах периферической крови определяли путём проведения щелочного гель-электрофореза отдельных клеток (метод ДНК-комет). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью счётчика клеток TC20 (BioRad). Для выяснения путей гибели клеток использовали автоматический флюоресцентный клеточный анализатор ADAMII LS (Nano Entek).

Результаты. Ципродинил оказывает цитотоксическое действие на клетки бактерий *S. typhimurium*, начиная с концентрации 1,6 мг/чашка в условиях метаболической активации и в концентрациях 0,5 мг/чашка и выше в отсутствие смеси S9. Мутагенного действия в тесте Эймса не обнаружено. Уровень разрывов ДНК лимфоцитов периферической крови (показатель «процент ДНК в хвосте комет» (%ДНКхв.)) возрастал по сравнению с контролем после культивирования в среде с ципродинилом в концентрации 100 мкг/мл в отсутствие метаболической активации. При этом от 70 до 95% клеток погибали путём апоптоза и некроза.

Ограничение исследования. Исследование ограничено оценкой цитотоксичности и генотоксичности ципродинила только в тестах *in vitro*.

Заключение. Ципродинил не оказывает генотоксического эффекта. Наблюдаемое повышение уровня разрывов ДНК лимфоцитов периферической крови в условиях *in vitro* в присутствии ципродинила является следствием общетоксического действия, которое может приводить к разрушению клеточных структур, высвобождению ферментов, в том числе эндонуклеаз, вызывающих разрывы ДНК.

Ключевые слова: ципродинил; метод ДНК-комет; апоптоз; некроз; лимфоциты человека; тест Эймса

Соблюдение этических стандартов. Исследование с участием добровольцев одобрено Этическим комитетом ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора (Протокол № 1 от 29.09.2020). Все участники дали информированное добровольное письменное согласие на участие в исследовании.

Для цитирования: Горенская О.В., Егорова О.В., Аверьянова Н.С., Котнова А.П., Илюшина Н.А. Оценка цитотоксического и генотоксического действия ципродинила *in vitro*. *Токсикологический вестник*. 2024; 32(6): 348–356. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2024-32-6-348-356>

Для корреспонденции: Илюшина Наталья Алексеевна, e-mail: ilyushina.na@fncg.ru

Участие авторов: Горенская О.В. – сбор и обработка материала, статистический анализ, написание текста; Егорова О.В. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, анализ результатов, написание текста; Аверьянова Н.С., Котнова А.П. – сбор материала; Илюшина Н.А. – концепция и дизайн исследования, анализ результатов, написание текста, редактирование. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Благодарность. Авторы выражают благодарность компании ООО «Биолайн» и лично Эдуарду Мингазову за возможность проведения исследования по оценке цитотоксических эффектов с помощью автоматического флюоресцентного клеточного анализатора ADAMII LS, Nano Entek, полученного по договору безвозмездной аренды.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Olga V. Gorenskaya, Olga V. Egorova, Natalia S. Averyanova, Alina P. Kotnova, Natalia A. Ilyushina

Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of cyprodinil *in vitro*

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. Cyprodinil is a broad-spectrum systemic fungicide of the anilinopyrimidine class. Available literature data on the genotoxicity of this pesticide are contradictory.

The aim of the work is to study the cytotoxic and genotoxic effects of cyprodinil.

Material and methods. The mutation activity of cyprodinil was assessed in the Ames test. The level of DNA fragmentation in peripheral blood lymphocytes was determined by conducting alkaline gel electrophoresis of individual cells (DNA comet assay). Cell viability was assessed using a TC20 cell counter (BioRad). The ADAMII LS automated fluorescent cell analyzer (Nano Entek) was used to determine the pathways of cell death.

Results. Cyprodinil has a cytotoxic effect on *S. typhimurium* bacterial cells starting from a concentration of 1.6 mg/cup under metabolic activation conditions and at concentrations of 0.5 mg/cup and higher in the absence of the S9 mixture. No mutagenic effect was detected in the Ames test. The level of DNA breaks in peripheral blood lymphocytes (% Tail Intensity) increased compared to the control after their cultivation in a medium with cyprodinil at a concentration of 100 µg/ml in the absence of metabolic activation. In this case, 70 to 95% of the cells died by apoptosis and necrosis.

Limitations. The study is limited to *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity assessment of cyprodinil only.

Conclusion. Cyprodinil does not have a genotoxic effect. The observed increase in the level of DNA breaks in peripheral blood lymphocytes *in vitro* in the presence of cyprodinil is a consequence of the general toxic effect, which can lead to the destruction of cellular structures, the release of enzymes, including endonucleases, causing DNA breaks.

Keywords: cyprodinil; DNA-comet assay; apoptosis; necrosis; human lymphocytes; the Ames test

Compliance with ethical standards. The study was approved by the Ethics Committee of the Federal Scientific Centre of Hygiene named after F.F. Erisman, Rospotrebnadzor (Protocol No. 1, September 29, 2020). All participants gave informed voluntary written consent to participate in the study.

For citation: Gorenskaya O.V., Egorova O.V., Averyanova N.S., Kotnova A.P., Ilyushina N.A. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of cyprodinil *in vitro*. *Toxikologicheskii vestnik / Toxicological Review*. 2024; 32(6): 348–356. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2024-32-6-348-356>

For correspondence: Nataliya A. Ilyushina, e-mail: ilyushina.na@fncg.ru

Authors contribution: Gorenskaya O.V. – collecting and processing of data; statistical analysis; analysis of the results; writing the text; Egorova O.V. – concept and design of the study; collecting and processing of data; analysis of the results; writing the text; Averyanova N.S., Kotnova A.P. – the collection of data; Ilyushina N.A. – concept and design of the study; collecting and processing of data; analysis of the results; writing the text; editing. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to Bioline LLC and personally to Eduard Mingazov for the opportunity to conduct the study on the assessment of cytotoxic effects using the automatic fluorescent cell analyzer ADAMII LS, Nano Entek, obtained under a free lease agreement.

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

Funding. The study had no sponsorship.

Введение

Оценка генотоксичности химических веществ, в том числе пестицидов, является одним из важнейших компонентов их токсиколого-гигиенической характеристики и направлена на обеспечение генетической безопасности населения [1, 2].

Ципродинил – системный фунгицид широкого спектра действия из класса анилонопиридинов. Он широко используется в сельском хозяйстве во всем мире для борьбы с болезнями зерновых, плодовых семечковых и плодовых косточковых культур, винограда, овощей, ягод и декоративных растений.

Биологическое действие ципродинила основано на ингибировании биосинтеза метионина, секреции гидролитических ферментов, разрушающих клеточную стенку растений, и удлинения гифов грибов [3]. А. Mosbach и соавт. [4] предположили, что механизм действия анилонопиридиновых фунгицидов, в частности ципродинила, связан с нарушением экспрессии митохондриальных генов.

Ципродинил относится к малоопасным веществам с точки зрения острой пероральной и дермальной токсичности, не раздражает кожу и слизистые оболочки глаза, но может оказывать сенсibiliзирующее действие при контакте с кожей [5]. Предполагают, что ципродинил может быть эндокринным разрушителем [6].

В большинстве исследований генотоксичности ципродинила были получены отрицательные результаты, он не индуцировал генные мутации в клетках бактерий и клетках млекопитающих *in vitro*, не проявлял кластогенной активности в условиях *in vitro* и *in vivo* [7]. Однако в литературе имеются сведения о генотоксичности этого пестицида. Генотоксическое действие ципродинила выявлено на линии клеток HepG2 [8]. В экспериментах на *Danio rerio* [9] установлено снижение экспрессии ряда генов, повышение уровня разрывов ДНК при развитии рыбок в среде, содержащей ципродинил. Также было показано, что ципродинил изменял экспрессию генов, участвующих в нескольких сигнальных путях, включая окислительный стресс, в функционировании митохондрий, метаболизме липидов и лекарственных средств, регуляции клеточного цикла, а также генов, активируемых повреждением ДНК [10]. Нарушение работы генов системы антиоксидантной защиты и генов, участвующих в распознавании и репарации повреждений ДНК, может быть одной из причин повышения уровня предмутационных и мутационных событий в клетке.

Таким образом, имеющиеся в литературе данные о генотоксичности ципродинила противоречивы.

Цель работы – изучить цитотоксические и генотоксические эффекты ципродинила.

Материал и методы

Тест Эймса проводили согласно стандартному протоколу ОЭСР № 471 и ГОСТ 32376–2013* методом прямого внесения на чашку (основной тест) и в условиях предварительной инкубации (повторный тест) в присутствии и в отсутствие системы метаболической активации. Тестировали технический продукт ципродинила (CAS 121552-61-2, чистота 98,2%) в концентрациях 0,05; 0,16, 0,5, 1,6 и 5,0 мг/чашка. Содержание постмитохондриальной фракции печени крыс (S9) составляло 20%. В качестве отрицательного контроля использовали варианты с растворителем (диметилсульфоксид). В условиях метаболической активации положительными контролями служили: 2-аминоантрацен (10 мкг/чашка), без метаболической активации: 2-нитрофлуорен (ТА98), азид натрия (ТА100 и ТА1535), метилметансульфонат (ТА102), 10 мкг/чашка, и 9-аминоакридин (ТА97), 50 мкг/чашка. Для каждой концентрации объекта испытаний и позитивных контролей использовали 3 повтора, для отрицательных контролей – 4–5 (\pm S9).

Оценку уровня повреждения ДНК проводили на лимфоцитах периферической крови шести доноров в возрасте 27–40 лет, которые дали информированное добровольное письменное согласие на участие. Исследование одобрено Этическим комитетом ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора (Протокол № 1 от 29.09.2020).

Лимфоциты выделяли из периферической крови доноров с помощью стандартного метода седиментации в градиенте плотности фикола. Клетки инкубировали в среде RPMI-1640 с 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 1% глутамина, 2% пенициллин/стрептомицина (НПК «ПанЭко», Россия) в течение 3 ч при 37 °С в присутствии (20%) и в отсутствие постмитохондриальной фракции печени крыс (S9), полученной, как описано в [11]. Оценку общего количества клеток и их жизнеспособность в рутинных экспериментах проводили с помощью счётчика клеток TC20 (BioRad) при окрашивании трипановым синим. Концентрация жизнеспособных лимфо-

Межгосударственный стандарт ГОСТ 32376–2013 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Метод оценки обратных мутаций на бактериях. М.: Стандартиформ; 2019.

цитов в среде составила $1,8-2,9 \cdot 10^6$ клеток/мл. Ципродинил вносили в культуральную среду в концентрациях 0, 5,0; 10,0; 25; 50 и 100 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля использовали ДМСО (1%, $\pm S_9$). Позитивным контролем служил метилметансульфонат ($-S_9$, 1,4 мкг/мл).

Уровень фрагментации ДНК в лимфоцитах периферической крови определяли путем проведения щелочного гель-электрофореза отдельных клеток (метод ДНК-комет). Для каждого донора готовили по 24 микропрепарата: по 4 микропрепарата для каждого варианта эксперимента и контроля. Электрофорез проводили в щелочном буфере (рН 13) при силе тока 300 мА, напряжении 17В (0,7 В/см), длительности 30 мин. Микропрепараты окрашивали красителем SYBR Green I в ТЕ-буфере. На каждом микропрепарате анализировали не менее 100 комет. Уровень поврежденный ДНК по показателю «%ДНК в хвосте комет» (%ДНКхв.) оценивали микроскопически в режиме эпи-флюоресценции с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ni-U и программного обеспечения Comet Assay IV (Perceptive Instruments Ltd., Великобритания).

Формы гибели лимфоцитов периферической крови при действии ципродинила оценивали на клетках одного донора с помощью автоматического флюоресцентного клеточного анализатора ADAM II LS (Nano Entek) и набора реагентов для определения апоптоза (Apoptosis Detection Kit) согласно протоколу производителя. Исследования проводили в трех повторах. Лимфоциты культивировали с ципродинилом в концентрации 10, 50 и 100 мкг/мл в течение 15 мин.

В тесте Эймса среднее число колоний ревертантов на чашку и стандартное отклонение рассчитывали с помощью статистических функций в программе Microsoft Excel. Проверка приемлемости тест-системы (сравнение числа ревертантных колоний на чашках отрицательного контроля с числом ревертантных колоний на чашках положительного контроля) проведена с использованием парного t -критерия Стьюдента для независимых выборок; проверка наличия мутагенного эффекта объекта испытания выполнена тестом Даннетта t ; наличие зависящего от концентрации объекта испытания увеличения числа ревертантных колоний проверено методом ранговой корреляции Спирмена.

Проверку нормальности распределения показателя %ДНКхв. и средних значений медиан %ДНКхв. проводили методом Колмогорова-Смирнова. Для оценки генотоксических эффектов ципродинила в разных концентрациях использовали средние значения медиан %ДНКхв.

и средние арифметические %ДНКхв. Сравнение полученных средних значений медиан %ДНКхв. и средних арифметических %ДНКхв. проводили с использованием t -критерия Стьюдента для независимых выборок.

Для оценки значимости различий долей клеток с разными формами гибели применяли точный критерий Фишера.

Статистический анализ результатов выполнен с помощью программного пакета IBM.SPSS. Statistics.v22.

Результаты

Исследование мутагенности ципродинила в тесте Эймса показало, что тестируемое вещество не обладает способностью к индукции точковых мутаций у штаммов *Salmonella typhimurium*. Число ревертантных колоний в опытном варианте, как в условиях метаболической активации, так и без нее, значимо не превышало число спонтанных ревертантных колоний в отрицательном контроле при наличии мутагенного эффекта во всех вариантах положительных контролей. Не выявлено достоверной зависимости повышения количества ревертантов от концентрации ни для одного из штаммов. Кратность превышения числа ревертантов при внесении ципродинила по сравнению с числом спонтанных ревертантных колоний в отрицательном контроле была $\leq 1,2$ раз для TA100, TA102, TA97, TA98 и $\leq 1,4$ для TA1535. Число ревертантов при внесении объекта испытаний не выходило за верхнюю границу распределения исторического отрицательного лабораторного контроля. Полученные результаты подтверждены в повторном эксперименте в условиях предварительной инкубации.

В условиях метаболической активации цитотоксические эффекты для бактерий *S. typhimurium*, приводящие к снижению числа ревертантов более 40%, обнаружены при концентрации ципродинила, начиная с 1,6 мг/чашка у штаммов TA98, TA100, TA102 и TA1535. В отсутствие S_9 уменьшение числа ревертантов на чашку отмечали для бактерий TA98, TA102 и TA1535 при концентрации ципродинила 0,5–5,0 мг/чашка. Наиболее выраженные цитотоксические эффекты наблюдали на культуре TA1535, что сопровождалось гибелью клеток выше 85% (табл. 1).

Результаты оценки возможных генотоксических эффектов ципродинила на лимфоцитах периферической крови доноров методом щелочного кометного анализа приведены в табл. 2.

Для оценки генотоксических эффектов ципродинила использовали средние значения

Таблица 1 / Table 1

Оценка мутагенной активности ципродинила в тесте Эймса (основной тест)
Evaluation of the mutagenic activity of cyprodinil in the Ames test

Концентрация, мг/ чашка	TA97			TA98			TA100			TA102			TA1535		
	M	±SD	ЦТ	M	±SD	ЦТ	M	±SD	ЦТ	M	±SD	ЦТ	M	±SD	ЦТ
В присутствии метаболической активации															
Отрицательный контроль	125	10	–	39	4	–	100	11	–	147	10	–	14	3	–
0,05	128	9	–	36	3	8	102	7	–	132	5	10	18	4	–
0,16	110	15	12	42	5	–	75	6	25	124	8	16	17	3	–
0,5	124	9	–	28	4	28	81	8	19	115	4	22	15	4	–
1,6	135	7	–	23	2	41	70	6	30	120	7	18	4	2	71
5,0	132	9	–	20	2	49	42	4	58	77	9	48	2	1	86
Положительный контроль	1223	94	–	1235	45	–	1640	88	–	1550	56	–	421	22	–
В отсутствие метаболической активации															
Отрицательный контроль	120	5	–	27	3	–	90	5	–	150	12	–	18	2	–
0,05	131	12	–	26	1	–	106	7	–	124	7	17	17	3	–
0,16	101	5	16	19	2	30	96	9	–	100	5	33	15	4	17
0,5	82	9	32	12	3	56	74	5	18	88	7	41	10	4	44
1,6	72	10	40	11	3	59	52	8	42	72	5	52	5	1	72
5,0	42	11	65	6	2	78	47	6	48	50	8	67	2	1	89
Положительный контроль	1682	52	–	1008	79	–	1375	45	–	1965	125	–	1201	43	–

Примечание. M – среднее; SD – стандартное отклонение; ЦТ – цитотоксичность (уменьшение числа колоний на чашках с пестицидом по сравнению с отрицательным контролем, выраженное в %).

Таблица 2 / Table 2

Уровень фрагментации ДНК (показатель %ДНКхв) в лимфоцитах периферической крови при культивировании в среде с ципродинилом

Level of DNA fragmentation (% Tail Intensity) in peripheral blood lymphocytes when cultivated in a medium with cyprodinil

Концентрация ципродинила, мкг/мл	Процент ДНК в хвосте комет (%ДНКхв)							
	–S9		+S9		–S9		+S9	
	$M_{Me} \pm m$	p	$M_{Me} \pm m$	p	$M \pm m$	p	$M \pm m$	p
0	0,41 ± 0,07	–	1,88 ± 0,27	–	1,83 ± 0,17	–	4,75 ± 0,47	–
5	0,36 ± 0,09	0,664	1,36 ± 0,39	0,167	1,59 ± 0,21	0,389	4,24 ± 0,91	0,629
10	0,28 ± 0,19	0,102	1,26 ± 0,28	0,120	1,76 ± 0,18	0,763	4,10 ± 0,66	0,429
25	0,73 ± 0,39	0,310	1,16 ± 0,25	0,057	2,31 ± 0,55	0,410	3,60 ± 0,59	0,138
50	0,49 ± 0,09	0,529	1,57 ± 0,32	0,474	2,74 ± 0,39	0,051	4,61 ± 0,67	0,867
100	93,43 ± 0,58	0,000	1,89 ± 0,24	0,977	82,09 ± 2,88	0,000	5,16 ± 0,56	0,575

Примечание. M_{Me} – среднее медианных значений; M – среднее арифметическое; m – ошибка среднего.

медиан %ДНКхв. для каждой концентрации ципродинила как в присутствии, так и в отсутствие смеси для метаболической активации (S9), для всей группы доноров, а также средние арифметические значения %ДНКхв. [12].

Как следует из табл. 2, культивирование лимфоцитов в среде с ципродинилом в концентрациях 5, 10, 25 и 50 мкг/мл в условиях с и без метаболической активации не приводило к статистиче-

ски значимому изменению уровня разрывов ДНК по сравнению с контролем. Действие ципродинила в концентрации 100 мкг/мл (–S9) вызывало резкое увеличение показателя %ДНКхв. Эффект отсутствовал в условиях метаболической активации, в этом случае статистически значимых отличий от контрольного значения не обнаружено.

В отсутствие смеси для метаболической активации гибель лимфоцитов периферической

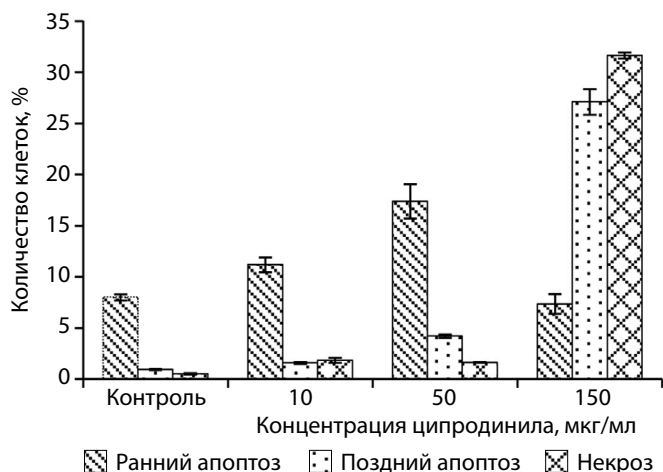


Рис. 1. Количество лимфоцитов периферической крови с разными формами гибели при культивировании в среде с ципродинилом

Fig. 1. The number of peripheral blood lymphocytes with different types of death after cultivation in a medium with cyprodinil.

крови после инкубации с ципродинилом в максимальной концентрации в течение 3 ч составляла от 72 до 95 % (в зависимости от донора). В присутствии системы метаболической активации количество жизнеспособных клеток к концу эксперимента составляло от 55 до 87 %. Культивирование клеток с ципродинилом в концентрации 50 мкг/мл и ниже ($\pm S9$) не приводило к развитию статистически значимых цитотоксических эффектов.

С учётом полученных результатов анализ форм гибели лимфоцитов периферической крови проводили в отсутствие метаболической активации, параллельно оценивая уровень разрывов ДНК. Результаты показаны на рис. 1 и 2.

В контроле зафиксировано 8% клеток на стадии раннего апоптоза, количество клеток на стадиях позднего апоптоза и некроза не превышало 1%. Культивирование лимфоцитов в среде с ципродинилом в концентрациях 10 и 50 мкг/мл сопровождалось увеличением количества клеток на стадии раннего апоптоза – до 11,2 ($p = 0,032$) и 17,4% ($p = 0,028$), соответственно. Количество клеток на стадиях позднего апоптоза и некроза так же возрастало до 1,58 ($p = 0,007$) и 1,83% ($p = 0,022$) при действии ципродинила в концентрации 10 мкг/мл и до 4,21 ($p = 0,17$) и 1,62 % ($p = 0,001$) в условиях культивирования с пестицидом в концентрации 50 мкг/мл.

Ципродинил в концентрации 100 мкг/мл оказывал выраженный цитотоксический эффект и изменял соотношение клеток, гибель которых протекает различными путями, – возрастало ко-

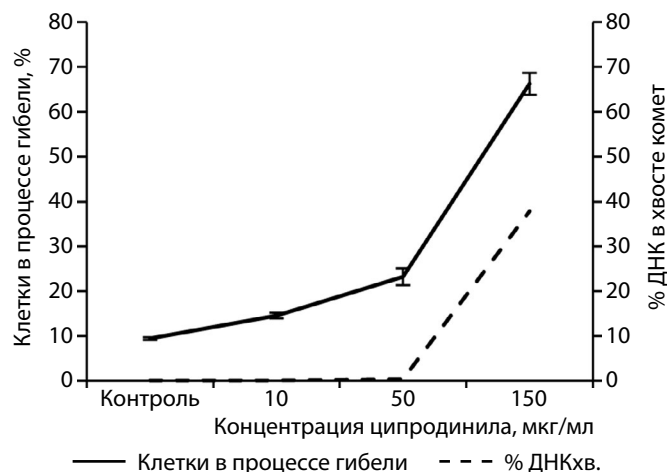


Рис. 2. Сопоставление уровней гибели клеток и разрывов ДНК (показатель %ДНКхв., Me) в лимфоцитах периферической крови при экспозиции ципродинилом.

Fig. 2. Comparison of the levels of cell death and DNA breaks (% Tail Intensity, Me) in the peripheral blood lymphocytes exposed to cyprodinil.

личество клеток в состоянии позднего апоптоза и некроза до 27,1 ($p = 0,000$) и 31,6% ($p = 0,000$), соответственно. При этом количество клеток на стадии раннего апоптоза уменьшалось приблизительно в 2 раза, до 7,3% ($p = 0,568$), до контрольных значений.

Как видно на рис. 2, количество разрывов ДНК в лимфоцитах при культивировании клеток в среде с ципродинилом в концентрациях 10 и 50 мкг/мл статистически значимо не увеличивалось по сравнению с контролем. При этом общее количество гибнущих клеток возрастало в 1,5 ($p = 0,006$) и 2,5 ($p = 0,002$) раза, соответственно, по сравнению с уровнем контроля. Действие ципродинила в концентрации 100 мкг/мл приводило к резкому увеличению количества ДНК в хвосте комет и повышению доли апоптотических и некротических лимфоцитов.

Обсуждение

Проведённое нами исследование показало, что ципродинил оказывает цитотоксическое действие на клетки бактерий *S. typhimurium*, начиная с концентрации 1,6 мг/чашка в условиях метаболической активации и в концентрациях 0,5 мг/чашка и выше в отсутствие смеси S9. Мутагенного действия в тесте Эймса не обнаружено. В экспериментах на лимфоцитах периферической крови человека ципродинил проявлял выраженное цитотоксическое действие в отсутствие метаболической активации. При концентрации 100 мкг/мл погибало от 70 до 95%

клеток. Согласно полученным данным, гибель клеток происходила в результате апоптоза и некроза. Статистически значимое повышение уровня разрывов ДНК, регистрируемых методом ДНК-комет, отмечено только при концентрации 100 мкг/мл, вызывающей массовую гибель клеток. На основании полученных результатов можно полагать, что ципродинил не проявляет генотоксического действия, а повышение уровня фрагментации ДНК является вторичным процессом и обусловлено общетоксическим действием этого пестицида, приводящим к разрушению клеточных структур. Полученные результаты свидетельствуют о том, что цитотоксическое действие оказывает родительское соединение, а не его метаболиты, образующиеся в условиях метаболической активации, что согласуется с имеющимися в литературе данными. Согласно [13] токсикологически значимых метаболитов ципродинила не идентифицировано ни в растениях, ни у животных.

Механизм действия ципродинила на клетки связывают с ингибированием биосинтеза метионина и других тиоловых аминокислот грибов. В работах на *Botrytis cinerea* [14, 15] авторы выяснили, что механизм такого ингибирования опосредован инактивированием цистатионин-β-лиазы. Однако более поздние исследования на *Penicillium digitatum* не подтвердили эти результаты, что по мнению авторов может свидетельствовать о видоспецифическом ответе *Botrytis* [16].

В работе А. Mosbach и соавт. [4] получили устойчивые к ципродинилу мутантные штаммы *Botrytis cinerea*. Все мутантные гены кодировали митохондриальные белки, что позволило предположить, что механизм действия анилинопиримидиновых фунгицидов, в частности ципродинила, связан с нарушением экспрессии этих генов. Авторы пришли к выводу, что основной мишенью ципродинила в клетках являются митохондрии. Нарушение работы митохондрий может быть одной из причин наблюдаемого в настоящей работе возрастания количества апоптотических клеток при культивировании лимфоцитов периферической крови в среде с ципродинилом за счет активации митохондриального пути апоптоза. Увеличение количества клеток, в которых развивается некроз, также может быть связано с нарушением работы митохондрий и, следовательно, снижением энергообеспечения клетки.

В экспериментах на клеточных линиях человека и мышей показано, что ципродинил индуцирует экспрессию *CYP1A1*. Кроме того, ципродинил активирует киназы, регулируемые внеклеточными сигналами (ERK киназы –

extracellular signal – regulated kinases) [6]. Эти киназы активируются в ответ на воздействие стресс-стимулов и регулируют клеточную пролиферацию и апоптоз [17].

В большинстве исследований генотоксичности ципродинила были получены отрицательные результаты. Он не индуцировал генные мутации у *S. typhimurium* в концентрациях до 5000 мкг/чашка и в культивируемых клетках китайского хомячка (до 150 мкг/мл) *in vitro*, не проявлял кластогенной активности на клетках китайского хомячка в максимальной концентрации 200 мкг/мл и в гепатоцитах крыс до 4800 мкг/мл в условиях *in vitro*. В микроядерном тесте *in vivo* на эритроцитах костного мозга мышей в дозах 1250, 2500 и 5000 мг/кг массы тела этот пестицид не вызывал кластогенных и анеугенных эффектов [5].

Однако в некоторых работах описано генотоксическое действие ципродинила. Так, V. Graillot и соавт. [8], используя в качестве биомаркера генотоксичности уровень фосфорилирования гистона H2AX, показали, что ципродинил в концентрации 20 мкг/мл оказывает слабое генотоксическое действие на клетки линии HepG2.

В работе [9] показано, что развитие эмбрионов *Danio rerio* в среде, содержащей ципродинил в концентрации 500 мкг/л, сопровождается нарушением формирования перикарда у мальков и снижением их выживаемости в 2,5 раза. Эти аномалии развития авторы связали со снижением уровня экспрессии генов *amhc*, *gata4* и *tbx5*, являющихся ключевыми в развитии сердечно-сосудистой системы рыбок. В то же время ципродинил снижал экспрессию генов, ответственных за формирование кальциевых каналов сердца. Проведенный кометный анализ клеток жабр взрослых рыб показал увеличение количества разрывов ДНК (показатель %ДНКхв.) при развитии рыб в среде с ципродинилом.

Согласно [10] ципродинил изменял экспрессию генов, участвующих в нескольких сигнальных путях, включая окислительный стресс, в функционировании митохондрий, метаболизме липидов и лекарственных средств, регуляции клеточного цикла. Кроме того, ципродинил изменял экспрессию генов, активируемых повреждением ДНК, что может приводить к нарушению процессов репарации [10].

Следует отметить, что согласно общепринятым подходам к оценке генотоксичности/мутагенности, тестирование *in vitro* проводят при не вызывающих значимой цитотоксичности концентрациях объекта испытаний, а *in vivo* – при дозах, не превышающих максимальную переносимую дозу, что позволяет не учитывать связан-

ные с общей токсичностью повреждения генетического материала, возникающие при разрушении клеток.

Полученные в настоящей работе результаты позволяют сделать вывод о том, что ципродинил не является мутагеном, и наблюдаемые повреждения ДНК являются следствием индукции процессов апоптоза и некроза клеток.

Заключение

Проведённое нами исследование показало, что ципродинил является цитотоксичным, но не индуцирует генные мутации у бактерий

S. typhimurium в тесте Эймса. Статистически значимое повышение уровня разрывов ДНК, регистрируемых методом ДНК-комет в лимфоцитах периферической крови человека, отмечено только при высокой концентрации ципродинила, вызывающей массовую гибель клеток. Таким образом, ципродинил не обладает генотоксичностью, а наблюдаемое повышение уровня разрывов ДНК является следствием общетоксического действия ципродинила, приводящего к апоптозу и некрозу и как следствие к разрушению клеточных структур, высвобождению ферментов, в том числе эндонуклеаз, расщепляющих ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

(пп. 3–10, 12–16 см. в References)

- Илюшина Н.А., Егорова О.В., Масальцев Г.В., Аверьянова Н.С., Ревазова Ю.А. Мутагенность и канцерогенность пестицидов, опасность для здоровья человека. Систематический обзор. *Здравоохранение Российской Федерации*. 2017; 61(2): 96–102. <https://elibrary.ru/yinyusr>
- Илюшина Н.А. Системная оценка генотоксичности пестицидов. *Медицинская генетика*. 2020; 19(9): 67–9. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2020.09.67-69>
- Царёва А.А., Игнатъев С.Д., Егорова О.В., Аверьянова Н.С., Котнова А.П., Илюшина Н.А. Влияние пестицида из класса фталимидов на лимфоциты периферической крови человека *in vitro*: индукция повреждений ДНК. *Токсикологический вестник*. 2023; 31(6): 376–84.
- Шурыгина И. А., Шурыгин М. Г., Зеленин Н. В., Гранина Г. Б. Роль тар-киназных механизмов в регуляции клеточного роста (обзор литературы). *Сибирский медицинский журнал*. 2009; 6: 36–40.

REFERENCES

- Ilyushina N.A., Egorova O.V., Masaltsev G.V., Averyanova N.S., Revazova Yu.A. The mutagenicity and carcinogenicity of pesticides and hazards for human health: A systematic review. *Zdravoohranenie Rossijskoj Federacii*. 2017; 61(2): 96–102. <https://doi.org/10.18821/0044-197X-2017-61-2-96-102> (In Russian)
- Ilyushina N.A. Systemic assessment of pesticide genotoxicity. *Medicinskaya genetika*. 2020; 19(9): 67–9. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2020.09.67-69> (In Russian)
- Blixt E., Djurlie A., Yuen J., Olson Å. Fungicide sensitivity in Swedish isolates of *Phaeosphaeria nodorum*. *Plant Pathology*. 2009; 58: 655–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02041.x>
- Mosbach A., Edel D., Farmer A.D., Widdison S., Barchietto T., Dietrich R.A. et al. Anilino-pyrimidine Resistance in *Botrytis cinerea* Is Linked to Mitochondrial Function. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 2361. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02361>
- FAO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR CYPRODINIL. Available at: https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Cyprodinil09.pdf (data 08.10.2024)
- Fang C.C., Chen F.Y., Chen C.R., Liu C.C., Wong L.C., Liu Y.W., et al. Cyprodinil as an activator of aryl hydrocarbon receptor. *Toxicology*. 2013; (8): 304: 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.11.018>
- Schrenk D., Bignami M., Bodin L., Chipman J. K., Mazo J., Grasl-Kraupp B., et al. Risk assessment of small organoarsenic species in food. *EFSA*. 2024; 22(7): e8844. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8844>
- 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. <https://doi.org/10.1002/em.21676>
- Toğay V., Türel G.Y., Çelik D.A., Özgöçmen M., Tülüceoğlu E.E., Şen İ. DNA damage effect of cyprodinil and thiacloprid in adult zebrafish gills. *Environ Sci Pollut Res*. 2021; 28: 14482–7. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11668-1>
- Kim Y., Berekotoglu C., Sercinoglu O., Pradhan A. *In Vitro*, *In Vivo*, and *In Silico* Analysis of Pyraclostrobin and Cyprodinil and Their Mixture Reveal New Targets and Signaling Mechanisms. *Chem Res Toxicol*. 2024; 18; 37(3): 497–512. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.3c00371>
- Tsareva A.A., Ignatyev S.D., Egorova O.V., Kotnova A.P., Averianova N.S., Ilyushina N.A. Effect of a phthalimide pesticide on human peripheral blood lymphocytes *in vitro*: induction of DNA damage. *Toksikologicheskij vestnik*. 2023; 31(6): 376–84. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2023-31-6-376-384> (In Russian)
- Collins A., Møller P., Gajski G., et al. Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nat Protoc*. 2023; 18: 929–89. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00754-y>
- European Food Safety Authority; Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance cyprodinil. *The EFSA Journal*. 2006; 4(1): RN-51: 1–78. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2006.51r>
- Masner P., Muster P., Schmid J. Possible methionine biosynthesis inhibition by pyrimidinamine fungicides. *Pesticide Science*. 1994; 42(3): 163–6. <https://doi.org/10.1002/ps.2780420304>
- Fritz J.M., Erhard R.E., Delitto A., Welch W.C., Nowakowski P.E. Preliminary results of the use of a two-stage treadmill test as a clinical diagnostic tool in the differential diagnosis of lumbar spinal stenosis. *J Spinal Disord*. 1997; 10(5): 410–6.
- Kanetis L., Forster H., Jones C.A., Borkovich K.A., Adaskaveg J.E. Characterization of genetic and biochemical mechanisms of fludioxonil and pyrimethanil resistance in field isolates of *Penicillium digitatum*. *Phytopathology*. 2008; (98): 205–14.
- Shurygina I.A., Shurygin M.G., Zelenin N.V., Granina L.B. Role of MAP-KINASE mechanisms in THE regulation of cell growth (literature review). *Sibirskij medicinskij zhurnal*. 2009; (6): 36–40.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Ольга Владимировна Горенская, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская область, г. Мытищи, Россия. E-mail: gorenskaya.ov@fncg.ru

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

Наталья Сергеевна Аверьянова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская область, г. Мытищи, Россия. E-mail: averyanova.ns@fncg.ru

Алина Петровна Котнова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская область, г. Мытищи, Россия. E-mail: kotnova.ap@fncg.ru

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

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Olga V. Gorenskaya, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher at the Department of Genetic Toxicology, Federal Scientific Centre of Hygiene named after F.F. Erisman, Rospotrebnadzor, 141014, Mytishchi, Moscow region, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0003-0028-2522> E-mail: gorenskaya.ov@fncg.ru

Olga V. Egorova, Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher at the Department of Genetic Toxicology, Federal Scientific Centre of Hygiene named after F.F. Erisman, Rospotrebnadzor, 141014, Mytishchi, Moscow region, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0003-4748-8771> E-mail: egorova.ov@fncg.ru

Natalia S. Averyanova, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher at the Department of Genetic Toxicology, Federal Scientific Centre of Hygiene named after F.F. Erisman, Rospotrebnadzor, 141014, Mytishchi, Moscow region, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-2973-8776> E-mail: averyanova.ns@fncg.ru

Alina P. Kotnova, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher at the Department of Genetic Toxicology, Federal Scientific Centre of Hygiene named after F.F. Erisman, Rospotrebnadzor, 141014, Mytishchi, Moscow region, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-4333-9288> E-mail: kotnova.ap@fncg.ru

Natalia A. Ilyushina, Doctor of Biological Sciences, Head of the Department of Genetic Toxicology, Federal Scientific Centre of Hygiene named after F.F. Erisman, Rospotrebnadzor, 141014, Mytishchi, Moscow region, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0001-9122-9465> E-mail: ilushina.na@fncg.ru

