

О.О. Змаженко^{1,2}, Я.В. Колянчук¹

¹Державне підприємство «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України», м. Київ, Україна.

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини».

ВПЛИВ БЕТА-ЦИФЛУТРИНУ НА РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ САМИЦЬ ЩУРІВ WISTAR HANNOVER

РЕЗЮМЕ. Бета-цифлутрин – це піретроїд 2-го покоління, який використовується як інсектицид широкого спектра дії. Вплив оригінальної молекули бета-цифлутрину на репродуктивну функцію не вивчено. Його вірогідну репродуктивну токсичність з'ясовано внаслідок досліджень кількох поколінь щурів, які піддавалися дії цифлутрину.

Мета. Дослідити вплив бета-цифлутрину на репродуктивну функцію самиць щурів Wistar Hannover у період гаметогенезу. **Матеріали та методи.** Бета-цифлутрин (95%) вводився per os 5 разів на тиждень у дозах 3 та 30 мг/кг маси тіла двом групам піддослідних самиць щурів (по 20 осіб у кожній групі) протягом 9 тижнів. Контрольні тварини отримували воду з розчинником в еквівалентній кількості. Також у віварії знаходилися інтактні самці, призначені для спарювання. Протягом двох останніх тижнів експозиції у самиць досліджували естральний цикл. Після періоду експозиції піддослідні самиці спарювалися з інтактними самцями, що тривало не більше трьох тижнів. На 20-й день вагітності самиці піддавалися евтаназії для подальшого вивчення репродуктивних показників.

Результати. Встановлено, що бета-цифлутрин володіє загальнотоксичною дією на піддослідних самиць щурів, що підтверджує зниження маси тіла за впливу дози 30 мг/кг, також зафіксовано, що тестова субстанція впливає на естральний цикл самиць, зокрема на тривалість стадії проеструсу. Доза 3 мг/кг маси тіла не вплинула на репродуктивну функцію самиць, статистично достовірних змін між піддослідними та контрольною групами не виявлено.

Висновки. За результатами проведеного дослідження гонадотоксичної активності можна зробити висновок: бета-цифлутрин має загальнотоксичний ефект та володіє репродуктивною токсичністю на рівні дози 30 мг/кг маси тіла. Недіючою дозою (NOEL) встановлено 3 мг/кг маси тіла.

Ключові слова: бета-цифлутрин, піретроїд, репродуктивні функції, естральний цикл, щури Wistar Hannover.

О. Zmazhenko^{1,2}, Y. Kolyanchuk¹

¹Li. Medved's Research Center of Preventive Toxicology, Food and Safety, Ministry of Health, Ukraine (State Enterprise)

²Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv

THE EFFECT OF BETA-CYFLUTHRIN ON THE REPRODUCTIVE FUNCTION OF FEMALE WISTAR HANNOVER RATS

ABSTRACT. Beta-cyfluthrin is the 2nd generation pyrethroid, that is used as a broad-spectrum insecticide. The effect of the original beta-cyfluthrin molecule on reproductive function has not been studied. The assessment of possible reproductive toxicity of beta-cyfluthrin was based on the results of the multi-generational rat study of cyfluthrin.

Aim. To investigate the effect of beta-cyfluthrin on the reproductive function of female Wistar Hannover rats during gametogenesis.

Materials and Methods. Beta-cyfluthrin was administered per os 5 times a week by gavage in the form of an aqueous emulsion to two groups of females (20 animals each) in doses 3 and 30 mg/kg bw/day during 9 weeks. Control animals received distilled water with the addition of an emulsifier. In parallel with the control and experimental females, intact males were contained for mating. The estrous cycle was studied in female rats in the last 2 weeks of exposure to beta-cyfluthrin. After the period of exposure, the experimental females were mated with intact males for no longer than 3 weeks. On the 20th day of gestation, the experimental rats were euthanized to assess reproductive parameters.

Results. The decrease in the body weight gain at a dose of 30 mg/kg establishes the general toxic effect of beta-cyfluthrin on female rats. It was also installed, that the test substance affects the estrous cycle of females, namely the duration of the proestrus stage, which received the maximum dose. The dose of 3 mg/kg bw/day had no effect on the reproductive function of females and no statistically significant changes were found between the experimental and control groups.

Conclusion. Based on the results of the gonadotoxicity study, it can be concluded that beta-cyfluthrin has a general toxic effect and reproductive toxicity at a dose of 30 mg/kg bw/day. The no-observed-effect level (NOEL) was set at 3 mg/kg bw/day.

Keywords: beta-cyfluthrin, pyrethroid, reproductive function, estrous cycle, rats Wistar Han.

Вступ. Бета-цифлутрин – це пестицид, що є піретроїдним інсектицидом широкого спектра дії, це ізомер цифлутрину [1]. Він вперше був описаний та зареєстрований у 1995 році в США [5] і ніколи більше не перереєстровувався. В Україні бета-цифлутрин зареєстровано у 2008 році [6]. Але у 2009 році цю речовину було внесено до списку особливо небезпечних пестицидів [7]. Отже, його використання було обмежене. У 2018 році у звіті European Food Safety Authority (EFSA) [8] зазначалося, що це рішення переглянуто через неповноту даних. Отже, було дозволено використовувати бета-цифлутрин у встановлених Європейським агентством межах. З 2021 року [9] бета-цифлутрин дозволено повноцінно використовувати на сільськогосподарських агрокультурах, призначених для годування худоби. Хоча при цьому EFSA наголошує, що наявної інформації недостатньо для останньої оцінки щодо токсичного впливу цього піретроїду на споживачів [10].

Нині також є значна кількість прогалин щодо визначення дії бета-цифлутрину на репродуктивну функцію ссавців, адже вплив оригінальної молекули бета-цифлутрину на репродуктивну функцію не був вивчений. У звіті EFSA [4] вказано, що оцінку про можливий репродуктивний токсичний ефект бета-цифлутрину було екстрапольовано за результатами дослідження репродуктивної токсичності цифлутрину на кількох поколіннях щурів. Було зазначено, що за відсутності впливу на репродуктивні параметри, NOAEL для батьківського покоління становив 3,3 мг/кг на основі зменшення маси тіла. NOAEL для потомства також був 3,3 мг/кг маси тіла. Основа для подібних тверджень — клінічні ознаки та зниження маси піддослідних тварин. Саме це і стало підґрунтям щодо класифікації бета-цифлутрину, як Lact H362 "May cause harm to breastfed children" [4].

За даними дослідження тератогенної активності бета-цифлутрину був встановлений NOAEL для материнської токсичності на рівні 3 мг/кг на основі зменшення приросту маси тіла та споживання корму, смертності та клінічних ознак. Відповідний NOAEL для розвитку становив 10 мг/кг маси тіла на день на основі зменшення маси тіла плодів та затримки осифікації/варіацій скелета за дії дози 40 мг/кг маси тіла на день. Також було проведено на кролях дослідження впливу

Introduction. Beta-cyfluthrin is a broad-spectrum pyrethroid, insecticide, that is an isomer of cyfluthrin [1]. It was first described and registered in 1995 in the United States [5] and after that there was no decision on its re-registration, while in Ukraine beta-cyfluthrin was registered in 2008 [6]. However, in 2009, this substance was added to the list of highly hazardous pesticides [7], which restricted its use. In 2018, in a report by the European Food Safety Authority (EFSA) [8], the current state of research was reviewed with notes on incomplete data and beta-cyfluthrin was allowed to be used within the limits set by the European agency. Since 2021 [9], beta-cyfluthrin has been allowed for full use on agricultural crops intended for livestock feeding. Although EFSA emphasizes that the available information is not sufficient to fully assess the toxic effects of beta-cyfluthrin on consumers [10].

As of today, there are also a large number of gaps in the information regarding the effects of beta-cyfluthrin on mammalian reproductive function. No studies have been conducted on the effect of the original beta-cyfluthrin molecule on reproductive function. The EFSA report [4] states that the assessment of the possible reproductive toxicity of beta-cyfluthrin was extrapolated from the results of a multi-generation rat study of cyfluthrin. It was determined that, in the absence of effects on reproductive parameters, the NOAEL for the parental generation was 3.3 mg/kg based on body weight loss. The NOAEL for the offspring was also 3.3 mg/kg bw/day based on clinical signs and weight loss, leading to a new proposal to classify beta-cyfluthrin as Lact H362 "May cause harm to breastfed infants" [4].

According to the study of teratogenic activity of beta-cyfluthrin, a NOAEL for maternal toxicity was established at a dose level of 3 mg/kg based on decreased body weight gain and feed intake, mortality and clinical signs, and the corresponding NOAEL for development was 10 mg/kg bw/day based on decreased fetal body weight and delayed ossification/skeletal variations at a dose of 40 mg/kg. Developmental effects of beta-cyfluthrin were also studied in rabbits, where the NOAEL for maternal and developmental toxicity was 20 mg/kg per body

бета-цифлутрину на розвиток. Так, NOAEL для материнської токсичності та для розвитку становив 20 мг/кг маси тіла на основі зниження споживання корму, зниження маси тіла та збільшення кількості резорбцій після імплантацій. На основі збільшення випадків мікрофтальмії в дослідженні при інгаляційному впливі бета-цифлутрину, експерти з EFSA запропонували класифікацію для бета-цифлутрину як репродуктивного токсиканта категорії 2 H361d "Suspected of damaging the unborn child" [4, 8].

Бета-цифлутрин можливий репродуктивний токсикант. Він досі маловивчений, майже відсутня інформація щодо його впливу на репродуктивну функцію. Отже, дослідження репродуктивної токсичності бета-цифлутрину, його впливу на одне покоління тварин, зокрема на розвиток та функціонування статеві системи в самиць щурів, є актуальним.

Мета. Дослідити вплив бета-цифлутрину на репродуктивну функцію самиць щурів Wistar Han у період гаметогенезу.

Матеріали та методи. Дослідження репродуктивної токсичності 95% бета-цифлутрину проводили відповідно до вимог принципів GLP [12] та з урахуванням рекомендацій OECD 443 [13] на двох рівнях доз. Це дозволило мінімізувати кількість тварин, виходячи з біоетичних принципів (دوزи обрано з урахуванням результатів щодо дослідження репродуктивної токсичності цифлутрину [2, 8]).

З SPF-розплідника Державного підприємства «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України» отримано партію тварин з 60 самиць та 30 самців (інтактні) масою 80-100 г. Тварини були розподілені на три групи по 20 самиць у кожній: контрольна, з мінімальним дозуванням, з максимальним дозуванням. Також до відповідних груп були приєднані самці (по 10 тварин у кожній), які були призначені лише для спарювання. Період адаптації тривав 5 днів, протягом якого щури звикали до нових умов та типу раціону. Коливання вологості було в межах 41-60 %, температура – 18-20°C і штучне освітлення – 12 годин «день»/12 годин «ніч».

Бета-цифлутрин вводився двом групам самиць 5 днів на тиждень внутрішньошлунково за допомогою металевого зонда у вигляді водної емульсії з ОП-10 у дозах 3 та 30 мг/кг

weight based on decreased feed intake, decreased body weight, and increased resorption after implantation. Based on the increased incidence of microphthalmia in the study with inhalation of beta-cyfluthrin, EFSA experts proposed a classification for beta-cyfluthrin as a reproductive toxicant category 2 H361d "Suspected of damaging the unborn child" [4, 8].

Considering the possible beta-cyfluthrin's reproductive toxicity and large knowledge gaps in its effects on reproduction, one-generational study of the reproductive toxicity of beta-cyfluthrin is relevant, in particular on the development and functioning of the reproductive system in female rats.

Aim. To investigate the effect of beta-cyfluthrin on the reproductive function of female Wistar Hannover rats during gametogenesis.

Materials and methods. The study of reproductive toxicity of 95 % beta-cyfluthrin was conducted in accordance with the requirements of GLP principles [12] while also considering the recommendations of OECD 443 [13]. The study was conducted at two dose levels, which minimized the number of animals based on bioethical principles (doses were chosen based on the results of the study of reproductive toxicity of digitalis [2, 8]).

A batch of animals consisting of 60 females and 30 intact males weighting 80-100g was obtained from the SPF nursery of the State Enterprise "LI. Medved's Research Center for Preventive Toxicology, Food and Chemical Safety of the Ministry of Health of Ukraine". The female animals were divided into 3 groups of 20 females each: control, with a minimum dosage and with a maximum dosage. Also 3 male groups (10 animals each), that are intended exclusively for mating, were assigned to the corresponding female groups. The adaptation period lasted 5 days, during which the rats became accustomed to the new environment and diet. Humidity fluctuations were in the range of 41-60 %, temperature was 18-20°C, and artificial lighting was 12 hours/day and 12 hours/night.

Beta-cyfluthrin was administered to two groups of females 5 days a week intraga-

маси тіла протягом 9 тижнів (період експозиції). Контрольні тварини пероральним методом також отримували еквівалентну кількість суспензії у вигляді суміші дистильованої води з емульгатором ОП-10. Протягом всього періоду експозиції контрольних та експериментальних самиць зважували щотижня задля корегування об'єму доз, що вводився. Також зважування піддослідних вагітних самиць відбувалося на 0, 6, 13 та 20 гестаційні дні задля реєстрації динаміки маси тіла та оцінки материнської токсичності.

Для дослідження тривалості естрального циклу та окремих його стадій відбиралися вагінальні мазки протягом двох останніх тижнів експозиції. Стерильною, змоченою в дистильованій воді ватною паличкою проводилося обережне, швидке та неглибоке введення у вагінальний отвір, аби не спровокувати надмірну стимуляцію шийки матки, після чого її обережно обертало [14, 15]. Відібраний матеріал переносився на предметне скельце та профарбовувався метиленовим синім барвником, після чого аналізувався вміст мазка за допомогою світлового мікроскопа.

Після закінчення періоду експозиції 20 піддослідних самиць спарювали з 10 інтактними самцями у співвідношенні 2:1 відповідно. Після підтвердження за допомогою вагінальних мазків зачаття (день виявлення сперматозоїдів у вагінальному вмісті приймається за 0-й день вагітності), самиць відсаджували в окрему клітку для подальшого спостереження за ними. Тривалість періоду спарювання тривав не більше 3 тижнів.

Визначали індекси спарювання, зачаття, фертильності, вагітності, вираховували тривалість прекоїтального інтервалу.

На 20-й день вагітності проводили евтаназію піддослідних самиць за допомогою CO₂ боксу з подальшою препаратамиєю рогів матки та підраховували загальну кількість жовтих тіл в яєчниках, кількість місць імплантацій, кількість резорбованих зародків та плодів, кількість мертвих та живих плодів, наявність грубих аномалій розвитку в плодів, середню масу плодів, загальну масу приплоду. Самицям, що після трьох тижнів спарювання не завагітніли, також проводили евтаназію для подальшого аналізу.

Отримані дані, що характеризують функціонування репродуктивної спроможності

trically using a metal probe in the form of an aqueous emulsion at doses of 3 and 30 mg/kg [2, 8] for exposure period of 9 weeks. The control animals also received an equivalent amount of the suspension in the form of a mixture of distilled water and OP-10 emulsifier by oral gavage. During the entire exposure period, control and experimental females were weighed weekly to adjust the dose volume. And the experimental pregnant females were weighed on days 0, 6, 13, and 20 of gestation to record body weight dynamics and assess maternal toxicity.

To study the duration of the estrous cycle and its individual stages, vaginal swabs were taken during the last two weeks of exposure. A sterile cotton swab dipped in distilled water was carefully, quickly, and shallowly inserted into the vaginal opening so as not to provoke excessive stimulation of the cervix, and then gently rotated [14, 15]. The sampled material was transferred to a slide and stained with methylene blue dye, after which the contents of the smear were analyzed using a light microscope.

At the end of the exposure period, 20 experimental females were mated with 10 intact males in the 2:1 ratio respectively. After confirmation of conception using vaginal swabs (the day of detection of sperm in the vaginal contents is taken as day 0 of pregnancy), females were placed in a separate cage for further observation. The duration of the mating period was no longer than 3 weeks.

The indices of mating, conception, fertility, and pregnancy were also determined, and the duration of the precoital interval was calculated.

On the 20th day of pregnancy, experimental females were euthanized using a CO₂ box, followed by preparation of the uterine horns, and the following parameters were estimated: the total number of corpus luteum in the ovaries, the number of implantation sites, the number of resorbed embryos and fetuses, the number of dead and live fetuses, the presence of gross developmental anomalies in fetuses, the average weight of fetuses, and the total weight of the litter. Females that did not become pregnant after 3 weeks of mating were also euthanized for further analysis.

The data obtained characterizing the functioning of the reproductive capacity of

самиць, обраховувались за допомогою пред-
ставлених нижче формул (1-5):

females were calculated using the formulas
presented below (1-5):

Прекоїтальний інтервал =

$$\frac{\sum(\text{день періоду спарювання}) * (\text{к-сть самиць, спарених у цей день})}{\text{загальна кількість самиць, що спарилися}} \quad (1)$$

Precoital interval =

$$\frac{\sum(\text{day of mating period}) * (\text{number of females mated in a given day})}{\text{total number of mated females}} \quad (1)$$

$$\text{Індекс спарювання} = \frac{\text{кількість спарених тварин}}{\text{кількість тварин, що спарювалися}} * 100 \quad (2)$$

$$\text{Mating Index} = \frac{\text{number of mated females}}{\text{total number of mating animals}} * 100 \quad (2)$$

$$\text{Індекс зачаття} = \frac{\text{кількість тварин, що завагітніли}}{\text{кількість спарених тварин}} * 100 \quad (3)$$

$$\text{Fertilization Index} = \frac{\text{number of pregnant animals}}{\text{total number of mated animals}} * 100 \quad (3)$$

$$\text{Індекс фертильності} = \frac{\text{кількість тварин, що завагітніли}}{\text{кількість тварин, що спарювалися}} * 100 \quad (4)$$

$$\text{Fertility Index} = \frac{\text{number of pregnant animals}}{\text{total number of mated animals}} * 100 \quad (4)$$

Статистичний аналіз проводився за допомогою бібліотеки SciPy на мові програмування Python для порівняння значень між експериментальними групами та контрольною. Перевіряли розподіл показників за критерієм Шапіро-Вілка, у разі ненормального розподілу даних використовували непараметричний аналіз за критеріями Манна-Уїтні та Краскела-Уоліса. Описові дані та відсоткові значення були проаналізовані за допомогою one-way ANOVA з наступним тестом Fisher LSD. Графіки представлені у вигляді середніх групових значень (M) із стандартним відхиленням (SD). У таблицях дані наведені у вигляді середніх групових значень зі стандартною помилкою середнього значення (m), що обраховувалося:

Statistical analysis was performed using the SciPy library in the Python programming language to compare values between the experimental and control groups. The distribution of indicators was checked according to the Shapiro-Wilk test, and in case of non-normal distribution of data, non-parametric analysis was used according to the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests. Descriptive data and percentages were analyzed using one-way ANOVA followed by Fisher LSD test. Graphs are presented as group means (M) with standard deviation (SD). In the tables, data are presented as group means with standard error of the mean (m) calculated:

$$m = \sqrt{\frac{\sum(M-\bar{M})^2}{(n-1)n}}$$

$$m = \sqrt{\frac{\sum(M-\bar{M})^2}{(n-1)n}}$$

де \bar{M} – індивідуальні значення показника у варіаційному ряду (припід розглядався як статистична одиниця);

M – середнє групове значення показника;

n – число вимірювань.

where \bar{M} – individual values of the indicator in the variation series (the litter was considered as a statistical unit);

M – average group value of the indicator;

n – number of measurements.

Усі дослідження на тваринах проведені з дотриманням вимог «Європейської конвенції про захист тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» [16], а також виконані відповідно до принципів біоетики та вимог комісії з біоетики Центру превентивної та регуляторної токсикології ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки ім. академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України» (№ 29 від 08.07.2024).

Результати досліджень та їхнє обговорення. При дослідженні впливу бета-цифлутрину в дозі 30 мг/кг маси тіла, оцінюючи загальний стан піддослідних щурів на третьому тижні експозиції, спостерігалася зміна поведінки, що виражалася у підвищенні агресії та гіперактивності. Смертність самоць серед піддослідних груп протягом усього дослідження була відсутня.

У піддослідних групах тварин протягом усього періоду експозиції прослідковувалося зниження маси тіла порівняно з контрольною групою (рис. 1).

All animal studies were conducted in compliance with the requirements of the “European Convention for the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” [17], and were performed in accordance with the principles of bioethics and the requirements of the Bioethics Committee of the Center for Preventive and Regulatory Toxicology of the State Enterprise “L.I. Medved’s Research Center for Preventive Toxicology, Food and Chemical Safety of the Ministry of Health of Ukraine”.

Results and discussion. In the study of the beta-cyfluthrin effect on the general condition of experimental rats at a dose of 30 mg/kg bw/day, a change in behavior was observed on the 3rd week of exposure, which was expressed in increased aggression and hyperactivity. There was no mortality of females among the experimental groups throughout the study.

The decrease in the weight gain was observed in the experimental groups of animals during the entire exposure period (Fig. 1).

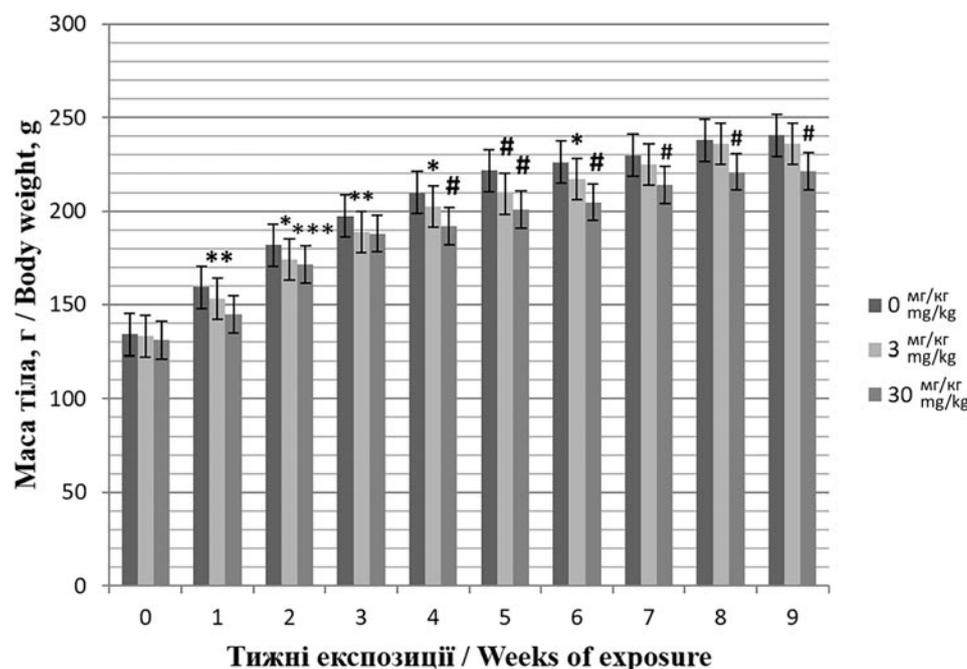


Рис. 1. Динаміка маси тіла (г) піддослідних самоць щурів ($n = 20$) протягом періоду експозиції бета-цифлутрином.

Примітка: * – $P \leq 0,05$;
** – $P \leq 0,02$;
*** – $P \leq 0,01$;
– $P \leq 0,001$

Fig. 1. Dynamics of body weight (g) of experimental female rats ($n = 20$) during the period of exposure to the beta-cyfluthrin.

Notes: * – $P \leq 0,05$;
** – $P \leq 0,02$;
*** – $P \leq 0,01$;
– $P \leq 0,001$

Так, у групі самиць, що отримували бета-цифлутрин у дозі 3 мг/кг маси тіла, спостерігалось статистично достовірне зниження маси тіла з 1-го по 6-й тижні експозиції від 3,6 до 5,5 % порівняно з контрольною групою. Але на останніх тижнях експозиції статистично достовірних змін не спостерігалось, що свідчить про те, що тварини протягом перших тижнів адаптувались до введення тестової субстанції. Беручи до уваги низький відсоток зниження маси тіла та відсутність достовірних змін у динаміці маси тіла на останніх тижнях експозиції, бета-цифлутрин не має загальнотоксичного профілю впливу на організм за дії дози 3 мг/кг маси тіла.

Під час експозиції дози 30 мг/кг маси тіла бета-цифлутрину в піддослідних щурів мало місце вірогідне зниження маси тіла, а саме: другого та з четвертого по дев'ятий тижні експозиції, де маса тіла самиць була достовірно зменшена від 4,2 до 9,5% порівняно з контрольною групою. Беручи до уваги, що зміни в динаміці маси тіла під час впливу максимальної дози залишалися достовірними до кінця періоду експозиції та зважаючи на значимий відсоток зниження маси тіла, можна зробити висновок, що бета-цифлутрин у дозі 30 мг/кг маси тіла має загальнотоксичний ефект.

При дослідженні естрального циклу протягом двох останніх тижнів експозиції у піддослідних та контрольних самиць щурів (рис. 2) не спостерігалась статистично значуща різниця в загальній тривалості циклу. Отримані дані повністю узгоджуються з літературними даними [14, 17], де в середньому естральний цикл коливався від 4 до 5 днів. При введенні максимальної дози (30 мг/кг маси тіла) бета-цифлутрину в піддослідних самиць спостерігалась вірогідна різниця в тривалості стадії проеструсу порівняно з контрольними тваринами на 28,97 %.

Один з можливих механізмів дії бета-цифлутрину на естральний цикл самиць, а саме на зменшення тривалості стадії проеструсу – це антиестрогенний ефект, через що відбувається дисбаланс гормонального рівня. Також, за даними літератури [14, 18], що стосувалися репродуктивної спроможності самиць щурів, були отримані схожі результати зі скороченням тривалості естрального циклу з відповідним висновком: така деградація репродуктивних можливостей самиць може бути пов'язана з недостатнім ростом фолікул яєчників, через

Thus, in the group of females treated with beta-cyfluthrin at a dose of 3 mg/kg bw/day, a statistically significant decrease in the body weight gain from the 1st to the 6th week of exposure from 3.6 to 5.5 % was observed compared to the control group. However, no statistically significant changes were observed in the last weeks of exposure, indicating that the animals adapted to the administration of the test substance during the first weeks. Considering the low percentage of the decrease in the body weight gain and the absence of significant changes in the dynamics of body weight in the last weeks of exposure, beta-cyfluthrin does not have a general toxic profile of exposure to the body at a dose of 3 mg/kg bw/day.

Nevertheless, a significant decrease in the weight gain was observed in experimental rats after administration of 30 mg/kg bw/day of beta-cyfluthrin: the second and fourth to ninth weeks of exposure, where compared to the control group the significant reduction of 4.2 to 9.5% of body weight in females was observed. Based on the fact that changes in body weight dynamics during exposure to the maximum dose remained significant until the end of the exposure period and given the significant percentage of body weight loss, it can be concluded that beta-cyfluthrin at a dose of 30 mg/kg body weight has a generalized toxic effect.

In the study of the estrous cycle during the last 2 weeks of exposure no statistically significant difference in the total cycle duration was observed in the experimental and control female rats (Fig. 2). The data obtained are in full agreement with the literature [14, 18], where the average estrous cycle ranged from 4 to 5 days. When the maximum dose of 30 mg/kg bw/day of beta-cyfluthrin was administered to experimental females, a significant difference in the duration of the proestrus stage was observed by 28.97% compared to control animals.

One of the possible mechanisms of action of beta-cyfluthrin on the estrous cycle of females, namely, the reduction of the duration of the proestrus stage, is an anti-estrogenic effect, which leads to an imbalance of hormonal levels. Also, according to the literature [14, 19] about the reproductive capacity of female rats, similar results were obtained with a reduc-

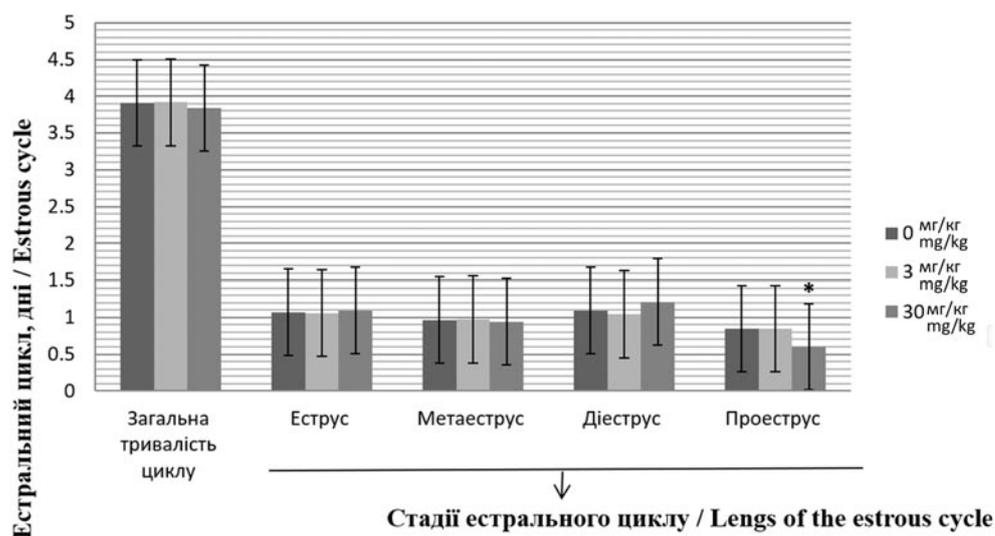


Рис. 2. Сумарні показники естрального циклу у самиць щурів ($n = 20$), які піддавалися впливові досліджуваної речовини бета-цифлутрин.
Примітка: * – $P \leq 0,05$

Fig. 2. Total estrous cycle parameters in female rats ($n = 20$) exposed to the test substance beta-cyfluthrin.
Notes: * – $P \leq 0,05$

що виділялася менша кількість естрогену, що негативно впливала на настання фази еструсу.

У таблиці 1 представлені сумарні показники стану репродуктивної функції піддослідних самиць, що спарювалися з інтактними самцями. Так, більшість піддослідних самиць успішно спарилися з інтактними самцями в першу стадію еструсу, на підставі чого індекс спарювання становив 100%. Після встановлення факту спарювання дві самиці з контрольної групи, а також по одній самиці, що отримували бета-цифлутрин у дозах 3 мг/кг та 30 мг/кг, не завагітніли. Проте показники зачаття, фертильності та вагітності вірогідно не відрізнялися між піддослідними групами самиць та контрольною групою. Під час періоду вагітності жодна самиця не померла та не відбулося позачасових пологів. Такі показники, як середні кількості жовтих тіл та живих плодів на самицю, середня кількість плодів, що загинули до імплантації й після, а також їхня відсоткова частка, загальна маса приплоду та середня кількість плодів не мали статистично достовірних змін між піддослідними групами, які піддавалися впливу бета-цифлутрину в дозах 3 та 30 мг/кг маси тіла, та контрольною групою.

За 20 днів вагітності піддослідні самиці з контрольної групи та групи з мінімальним

впливом в естральному циклі, де було встановлено, що така деградація репродуктивної здатності самиць може бути пов'язана з недостатнім зростанням овариальних фолікулів, які тому секретують менше естрогену, що негативно впливає на початок фази еструсу.

Таблиця 1 представляє загальні показники стану репродуктивної функції експериментальних самиць, які спарилися з інтактними самцями. Таким чином, більшість експериментальних самиць успішно спарилися з інтактними самцями в першу стадію еструсу, що призвело до індексу спарювання 100%. Однак, після встановлення факту спарювання, дві самиці з контрольної групи, а також по одній самиці, що отримували бета-цифлутрин у дозах 3 мг/кг та 30 мг/кг, не завагітніли. Проте показники зачаття, фертильності та вагітності не відрізнялися між дослідними групами самиць та контрольною групою. Під час вагітності жодна самиця не померла та не відбулося позачасових пологів. Такі показники, як середні кількості жовтих тіл та живих плодів на самицю, середня кількість плодів, що загинули до імплантації й після, а також їхня відсоткова частка, загальна маса приплоду та середня кількість плодів не мали статистично достовірних змін між дослідними групами, які піддавалися впливу бета-цифлутрину в дозах 3 та 30 мг/кг маси тіла, та контрольною групою.

**Сумарні показники стану репродуктивної функції піддослідних самиць,
які отримували бета-цифлутрин, спарених із інтактними самцями**

Table 1

**Total indicators of the state of reproductive function of experimental females treated
with beta-cyfluthrin mated with intact males**

Показники / Indicators	Статистичні показники / Statistical indicators	Доза тест субстанції, мг/кг / Dose of test substance, mg/kg		
		0	3	30
Загальна кількість самиць, що спарилися / Total number of mated females	n	20	20	20
Загальна кількість самиць, що завагітніли / Total number of pregnant females	n	18	19	19
Тривалість прекоїтального інтервалу, дні / Duration of the precoital interval, days	M ± m	3,30 ± 0,43	3,60 ± 0,72	2,90 ± 0,36
Індекс спарювання, % / Mating Index, %	M	100	100	100
Індекс зачаття, % / Conception Index, %	M	90	95	95
Індекс фертильності, % / Fertility Index, %	M	90	95	95
Індекс вагітності, % / Pregnancy Index, %	M	100	100	100
Середня кількість жовтих тіл на самицю / Average number of corpora lutea per female	M ± m	13,56 ± 0,42	14,16 ± 0,38	13,42 ± 0,46
Середня кількість живих плодів на самицю / Average number of live fetuses per female	M ± m	11,56 ± 0,72	13,00 ± 0,41	11,79 ± 0,46
Середнє число загиблих до імплантації зародків на самицю / Average number of deaths before implantation of embryos per female	M ± m	1,72 ± 0,52	0,89 ± 0,38	1,21 ± 0,29
% доімплантаційної втрати / % preimplantation loss	M ± m	14,83 ± 4,40	5,92 ± 2,32	8,72 ± 2,12
Середнє число загиблих після імплантації зародків/плодів на самицю / Average number of deaths after implantation of embryos/fetuses per female	M ± m	0,28 ± 0,16	0,26 ± 0,13	0,42 ± 0,16
% постімплантаційної втрати / % postimplantation loss	M ± m	1,96 ± 1,10	1,87 ± 0,90	3,06 ± 1,12
Загальна маса приплоду, г / Total weight of the litter, g	M ± m	43,26 ± 2,66	47,56 ± 1,61	44,36 ± 1,66
Середня маса плодів, г / Average fetus weight, g	M ± m	3,77 ± 0,06	3,67 ± 0,10	3,80 ± 0,12

Примітки: M – середнє групове значення; m - стандартна помилка середнього; n – кількість піддослідних щурів у групі.

Notes: M – mean group value; m - standard error of the mean; n – number of experimental rats in the group.

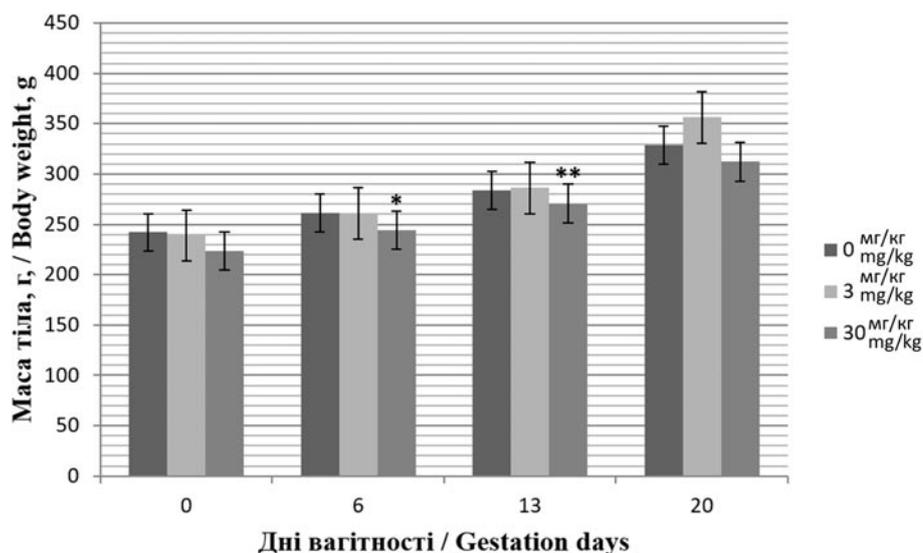


Рис. 3. Динаміка маси тіла (г) піддослідних самиць протягом періоду вагітності, n = 20
Примітка: * – P ≤ 0,02; ** – P ≤ 0,001

Fig. 3. Dynamics of body weight (g) of experimental females during pregnancy, n = 20
Notes: * – P ≤ 0,02; ** – P ≤ 0,001

рівнем дози (3 мг/кг) рівномірно набирали вагу, що корелювалося з кількістю плодів. Однак тенденцію до зниження маси тіла самиць, що отримували бета-цифлутрин у дозі 30 мг/кг, із подальшими достовірними змінами спостерігали на 6-й і 13-й гестаційні дні на 7,56 % та 5,99 % порівняно з контрольною групою, відповідно (рис. 3). Зміни в динаміці маси тіла вагітних самиць після впливу максимальної досліджуваної дози є ознакою прояву материнської токсичності бета-цифлутрину.

Висновки

1. При пероральному введенні бета-цифлутрину у дозі 30 мг/кг маси тіла проявлявся загальнотоксичний вплив, який виражався у зниженні маси тіла піддослідних самиць щурів Wistar Hannover у період експозиції та вагітності.

2. Бета-цифлутрин вплинув на естральний цикл самиць за дії дози 30 мг/кг маси тіла, що проявилось скороченням тривалості стадії проеструсу. Одним із можливих механізмів дії бета-цифлутрину на піддослідних самиць є антиестрогенний ефект.

3. За результатами дослідження, NOEL для бета-цифлутрину за репродуктивною токсичністю та за загальнотоксичним ефектом для самиць щурів Wistar Hannover встановлено на рівні 3 мг/кг.

4. Зважаючи на одержані результати щодо досліджень репродуктивної токсич-

During 20 days of gestation, experimental females from the control group and the group with the lowest dose level of 3 mg/kg gained weight evenly, which correlated with the number of fetuses. However, a significant trend toward a decrease in the body weight in females treated with beta-cyfluthrin at a dose of 30 mg/kg was observed on 6th and 13th days of gestation by 7.56 % and 5.99% compared with the control group, respectively (Fig. 3). Changes in the dynamics of body weight of pregnant females after exposure to the maximum dose studied are a sign of maternal toxicity of beta-cyfluthrin.

Conclusions.

1. Orally administered beta-cyfluthrin at a dose of 30 mg/kg bw/day had a general toxic effect, which was expressed in a decrease body weight of experimental female Wistar Hannover rats during exposure and pregnancy.

2. Reduced duration of the proestrus stage evidenced that beta-cyfluthrin affects the estrous cycle of females at a dose of 30 mg/kg bw/day. One of the possible mechanisms of beta-cyfluthrin action on experimental females is the antiestrogenic effect.

3. According to the results of the study, the NOEL for beta-cyfluthrin for reproductive toxicity and general toxicity for female Wistar Hannover rats was set at 3 mg/kg bw/day.

4. Taking into account the data obtained from the studies of reproductive toxicity of beta-

ності бета-цифлутрину, необхідне подальше вивчення його ендокрин-дизрапторних властивостей та механізмів впливу на ендокринну систему самиць.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

cyfluthrin, further studies of its endocrine disrupting properties and mechanisms of influence on the endocrine system of females are necessary.

Conflict of Interest. The author note that there is no conflict of interest.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ/REFERENCES

1. National Center for Biotechnology Information (2012). Beta-Cyfluthrin. [online] Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Beta-Cyfluthrin> [Accessed 20 Jan. 2024].
2. BAuA, Federal Institute for Occupational Safety and Health Federal Office for Chemicals. Proposal for Harmonised Classification and Labelling. Based on Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP Regulation), Annex VI, Part 2. Substance Name: reactionmassofrel-(R)-cyano(4-fluoro-3-phenoxyphenyl) methyl(1S,3S)-3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate-andrel-(R)-cyano(4-fluoro-3-phenoxyphenyl)methyl(1S,3R)-3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate (ratio 1:2); Beta-Cyfluthrin. CLH report. 2020; VI(2): 1-187.
3. BAuA, Federal Institute for Occupational Safety and Health Federal Office for Chemicals. Proposal for Harmonised Classification and Labelling. Based on Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP Regulation). α -cyano-4-fluoro-3-phenoxybenzyl-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate; Cyfluthrin. CLH report. 2018; VI(2): 1-125.
4. Conclusion on pesticide peer review. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance beta-cyfluthrin. European Food Safety Authority. EFSA. Journal 2020; 18(4): 6058. DOI: 10.2903/j.efsa.2020.6058.
5. United States Environmental Protection Agency. Cyfluthrins Summary Document Registration Review: Initial Docket. Case #7405. Docket Number EPA-HQ-OPP-2010-0684.
6. Міністерство захисту довкілля та природних ресурсів України (2020). Державний реєстр пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні. [онлайн] Доступ за адресою: <https://mepr.gov.ua/upravlinnya-vidhodamy/derzhavnyj-reyestr-pestytsydiv-i-agrohimiaktiv-dozvolenyh-do-vykozystannya-v-ukrayini/> [Ministry of Environmental Protection and Natural Resources of Ukraine (2020). State register of pesticides and agrochemicals approved for use in Ukraine. [online] Access at: <https://mepr.gov.ua/upravlinnya-vidhodamy/derzhavnyj-reyestr-pestytsydiv-i-agrohimiaktiv-dozvolenyh-do-vykozystannya-v-ukrayini/>].
7. Altenburger R, Watts M. List of Highly Hazardous Pesticides (PAN List of HHP). Hamburg: PAN Germany for PAN International. 16 January 2009, pp. 1-14.
8. Conclusion on pesticide peer review. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance beta-cyfluthrin. European Food Safety Authority. EFSA. Journal 2018; 16(9): 5405. DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5405.
9. Conclusion on pesticide peer review. Review of the existing maximum residue levels for Beta-cyfluthrin and Cyfluthrin according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. European Food Safety Authority. EFSA. Journal 2021; 19(9):6837. DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6837.
10. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. Pesticide residues in food. Rome: FAO Panel of Expertson Pesticide Residuesin Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. Rome: FAO Plant Production and Protection Paper. 2010, pp. 1-23. ISSN: 2070-2515.
11. OECD/OCDE. Test No. 416: Two-Generation Reproduction Toxicity. J OECD Guidelines for the Testing of Chemical. 2001; 4: 1-13. DOI: 10.1787/9789264070868-en.
12. Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004 on the harmonization of laws, regulation sand administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory practice and the verification of their applications fortests on chemical substances. J L 050, 2004, pp. 0044-0059.
13. OECD/OCDE. Test No. 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study. J OECD Guide lines for the Testing of Chemical. 2018; 4: 1-25. DOI: 10.1787/9789264185371-en.
14. Paccola CC, Resende CG, Stumpp T, Miraglia SM, Cipriano I. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. J Anim. Reprod. 2013; 10(4): 677-683.
15. Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. J Birth. Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 2007; 80:84-97. DOI: 10.1002/bdrb.20106.
16. Council of Europe. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. J EuropeanTreaty Series.1986; 123: 1-11.
17. Westwood FR. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. J Toxicol. Pathol. 2008; 36:375-384. DOI: 10.1177/0192623308315665.
18. Maeda K, Ohkura S, Tsukamura H. Chapter 9 – Physiology of reproduction. The Laboratory Rat: Handbook of Experimental Animals. London, UK: Academic Press. 2000; pp. 145-176. DOI:10.1016/B978-012426400-7/50048-0.

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

Змаженко Олена Олександрівна – молодший науковий співробітник Державного підприємства «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України». Адреса: вул. Героїв Оборони, 6, 03127, м. Київ, Україна. Аспірантка Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Адреса: просп. Академіка Глушкова, 2, 02000, м. Київ, Україна. Email: olena.zmazhenko@gmail.com. ORCID: 0000-0003-1540-2734.

Колянчук Яна Віталіївна – кандидат біологічних наук, науковий співробітник Державного підприємства «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України». Адреса: вул. Героїв Оборони, 6, 03127, м. Київ, Україна. Email: kolyanchuk.yana@gmail.com. ORCID: 0000-0003-1263-2059.

УЧАСТЬ АВТОРІВ У СТВОРЕННІ СТАТТІ / INFORMATION ON CONTRIBUTION OF EACH AUTHOR

О.О. Змаженко / O. Zmazhenko^{A,B,C,D,G}

Я.В. Колянчук / Y. Kolianchuk^{C,F}

Стаття надійшла до редакції: 10.10.2024 р.

Дата рецензування 08.08.2024 р.

Дата публікації (оприлюднення) 09.01.2025 р.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Olena Zmazhenko – Junior Researcher at the L.I. Medved's Research Center of Preventive Toxicology, Food and Safety, Ministry of Health, Ukraine (State Enterprise). Address: 6, Heroiv Oborony str., 03127, Kyiv, Ukraine. Postgraduate student at Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Address: 2, Akademika Glushkova Avenue, 02000, Kyiv, Ukraine. Email: olena.zmazhenko@gmail.com. ORCID: 0000-0003-1540-2734.

Yana Kolianchuk – Candidate of Biological Sciences, researcher at the L.I. Medved's Research Center of Preventive Toxicology, Food and Safety, Ministry of Health, Ukraine (State Enterprise). Address: 6, Heroiv Oborony str., 03127, Kyiv, Ukraine. Email: kolyanchuk.yana@gmail.com. ORCID: 0000-0003-1263-2059.

The article was received by the editors on October 10, 2024

Review date August, 08, 2024

Publication date January, 09, 2025