



СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

Малочкина Е.И., Горбунова З.И., Ходаковская О.А., Глухова Л.Д., Петрунин В.А. Ингаляционная токсичность битумно-солевых масс, полученных при уничтожении зарина, зомана и российского VX	2
Филенко О.Ф., Медянкина М.В. Роль донных грунтов в модификации токсичности загрязняющих веществ (на примере бихромата калия и сульфата имазалила)	7
Селивановская С.Ю., Галицкая П.Ю. Оценка токсичности почв с использованием контактного метода биотестирования	12
Таликина М.Г., Комов В.Т., Гремячих В.А., Чеботарева Ю.В. Влияние ртути на морфологические и цитоморфологические показатели молоди окуня <i>Perca Fluviatilis</i> в хроническом эксперименте	16
Папченкова Г.А. Исследование деградации гербицида «Раундап» в острых опытах с <i>Daphnia magna</i>	20
Сычева Л.П., Шереметьева С.М., Коваленко М.А., Пинигин М.А., Тепикина Л.А., Журков В.С. Изучение цитогенетического и цитотоксического действия диоксида азота полиорганным микроядерным методом	23
Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Шперлинг И.А., Филиппова, О.Н. Рогов О.А., Сапрыкина Э.В. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при токсическом действии метгемоглобинообразователей	27
Рожнова С.А., Гаврилин М.В., Лысенко Т.А., Крикова А.В. Изучение некоторых токсических свойств амлодипина безилата	32
Кацнельсон Б.А., Привалова Л.И., Кузьмин С.В., Киреева Е.П., Хрущева Н.А., Бейкин Я.Б., Постникова Т.В., Журавлёва Н.С., Макаренко Н.П., Поровицина А.В., Денисенко С.А., Солобоева Ю.И. Связь доклинических изменений в почках у детей дошкольного возраста с содержанием кадмия и свинца в моче	35
БЮЛЛЕТЕНЬ РОССИЙСКОГО РЕГИСТРА ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫХ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ	
Монографии МАИР по оценке канцерогенного риска для человека (том 85)	42
Новые сведения о токсичности и опасности химических и биологических веществ	43
Новые публикации по токсикологии и смежным дисциплинам	45
Информация	45
Планируемые международные мероприятия на 2006 г.	47
Перечень химических и биологических веществ, прошедших государственную регистрацию (сообщение № 70)	48

Malochkina Ye.I., Gorbunova Z.I., Khodakovskaya O.A., Glukhova L.D., Petrunin V.A. Inhalation toxicity of bitumen salt masses resulting from destruction of zarine, zoman and Russian VX	2
Fileenko O.F., Medyankina M.V. Role of sediments in modifying toxicity of contaminants (on the example of potassium bichromate and imazalil sulphate)	7
Selivanovskaya S.Yu., Galitskaya P.Yu. Toxicity evaluation of soils with the use of contact microbial method	12
Talikina M.G., Komov V.T., Gremyachikh V.A., Chebotaryova Yu.V. Effect of mercury on morphophysiological and cytomorphological indicators in perch young <i>Perca Fluviatilis</i> in chronic experiments	16
Papchenkova G.A. Investigation of the degradation of Roundup herbicide in acute experiments on <i>Daphnia Magna</i>	20
Sychyova L.P., Sheremetyeva S.M., Kovalenko M.A., Pinigin M.A., Tepikina L.A., Zhurkov V.S. Study of cytogenetic and cytotoxic actions of nitrogen dioxide using a polyorganic micronuclear method	23
Ryazantseva N.V., Novitsky, V.V. Shperling I.A., Filipova O.N., Rogov O.A., Saprykina E.V. Molecular disturbances in erythrocyte membrane at toxic effect produced by methemoglobin formers	27
Rozhnova S.A., Gavrillin M.V., Lysenko T.A., Krikova A.V. Study of certain toxic properties of amlopidine besylate	32
Katsnelson B.A., Privalova, L.I. Kuzmin S.V., Kiryeva Ye.P., Krushcheva N.A., Beikin Ya.B., Postnikova T.V., Zhuravlyova N.S., Makarenko N.P., Porovitsina A.V., Denisenko, S.A. Soloboyeva Yu.I. Links of preclinical renal lesion in children at preschool age to the cadmium and lead concentration in urine	35
BULLETIN OF THE RUSSIAN REGISTER OF POTENTIALLY HAZARDOUS CHEMICAL AND BIOLOGICAL SUBSTANCES	
Monographs IARC on the evaluation of the carcinogenic risk to humans (vol. 85)	42
News on toxicity and hazard of chemical and biological substances	43
New publications on toxicology and related disciplines	45
Information	45
International Congress and Course Calendar in 2006	47
List of chemical and biological substances registered on the state level (list № 70)	48

УДК [615.9:662.164].032.23

Е.И.Малочкина*, З.И.Горбунова, О.А.Ходаковская, Л.Д.Глухова, В.А.Петрунин

ИНГАЛЯЦИОННАЯ ТОКСИЧНОСТЬ БИТУМНО-СОЛЕВЫХ МАСС, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ УНИЧТОЖЕНИИ ЗАРИНА, ЗОМАНА И РОССИЙСКОГО VX

ФГУП «ГосНИИОХТ», Москва

Исследована ингаляционная токсичность битумно-солевых масс (БСМ), полученных при уничтожении зарина, зомана и российского VX по двухстадийной технологии. Установлены пороговые и недействующие концентрации летучих компонентов БСМ зарина, зомана и российского VX при однократном 4-часовом ингаляционном воздействии на крыс самцов и самок линии Wistar.

Ключевые слова: уничтожение ОВ, битумно-солевые массы зарина, зомана и RVX, ингаляционная токсичность, пороговые концентрации.

Введение. В соответствии с Федеральной программой уничтожения химического оружия на объекте уничтожения в п. Щучье Курганской области реализована двухстадийная технология уничтожения фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ) – зарина, зомана и российского VX [2]. Конечными продуктами уничтожения ФОВ являются малоопасные битумно-солевые массы (БСМ). На уровне чувствительности современных аналитических методов следовых количеств зарина, зомана и российского VX (RVX) в битумно-солевых массах не обнаружено [7].

Полученные битумно-солевые массы отправляют на полигон захоронения, располагающийся в непосредственной близости от промышленной зоны объекта уничтожения.

В случае возникновения аварийных ситуаций в производственных помещениях растаривания БСМ на объекте уничтожения химического оружия (УХО) может иметь место поступление в легкие паров токсических веществ из БСМ. Не исключено выделение летучих компонентов из БСМ фосфорорганических отравляющих веществ в воздушную среду при их длительном хранении.

Целью данной работы явилась оценка острой ингаляционной токсичности БСМ при различных температурных режимах обращения.

Материал и методы исследования. Объектами исследования являлись битумно-солевые массы – продукты детоксикации зарина, зомана, RVX и битум дорожный марки БНД 60/90. Образцы БСМ представляют собой твердые массы черного цвета со слабым специфическим запахом, пластичные при нагревании.

Эксперименты выполнены на белых крысах обоего пола линии Wistar массой 200–220 г. Экспериментальные исследования проводили в 200-литровых ингаляционных камерах динамическим способом. Паро-воздушную смесь создавали путем барботирования воздуха через слой расплавленного БСМ. Заданная температура поддерживалась автоматически с помощью термостата, заполненного глицерином. Интервал температур составлял 30–130°C. Постоянное перемешивание насыщенных паров воздуха, поступающего в ингаляционную камеру, осуществлялось вентилятором. Воздух из камеры выходил самотеком. Количество воздуха, проходящего через камеру, определяли ротаметром. В модельных камерах находилось одновременно 12 животных. Скорость поступления паро-воздушной смеси составляла 12 литров в минуту из расчета 1 литр в минуту на 1 крысу. Отбор проб воздуха проводили каждый час в течение 4-часовой экспозиции. Учет концентраций осуществляли по средней величине 4-х измерений за эксперимент.

Для определения состава парогазовой смеси была выбрана газожидкостная хроматография – хроматографы HP5890 с масс-селективным детектором и «Цвет-500» с термоионным детектором.

В каждой статистической группе (контрольной и опытной) использовали 12 животных (6 самцов и 6 самок). Контрольная группа животных находилась в течение эксперимента в «чистой» ингаляционной камере в условиях, аналогичных содержанию опытных животных. Животных в ингаляционных камерах помещали в индивидуальные домики с целью изоляции поверхности тела от сорбции компонентов БСМ. Перед каждым экспериментом животные в те-

* Фрагмент диссертационной работы

чение трех дней проходили процесс адаптации к условиям пребывания в домиках. Выживших в эксперименте животных подвергали эвтаназии углекислым газом.

У крыс после четырехчасового ингаляционного воздействия БСМ в динамических условиях изучали комплекс интегральных и специфических показателей. Физиологические показатели: суммационно-пороговый показатель, вертикальная подвижность (верхний и средний уровень), горизонтальная активность («открытое поле»), норковый эффект, температура тела, частота дыхания и сердечных сокращений, систолическое и диастолическое давление крови.

Биохимические показатели плазмы крови: холинэстераза [11], кислая и щелочная фосфатаза, общий холестерин, глюкоза, общий белок, мочевины, креатинин, аспартаттрансаминаза, аланинтрансаминаза, лактатдегидрогеназа, билирубин [5], SH-группы [8]. Биохимические показатели мочи: рН, белок, глюкоза, уробилиноген, билирубин, кетоновые тела. Определение биохимических показателей плазмы крови осуществляли с использованием диагностических наборов фирмы «Lachema» (Чехия). Биохимические показатели мочи определяли полуколичественным методом с помощью диагностических полосок Neptaphan фирмы «Lachema».

Гематологические показатели: количество лейкоцитов и эритроцитов, гемоглобин, скорость оседания эритроцитов. Количество эритроцитов и лейкоцитов регистрировали, применяя счетчик форменных элементов клеток крови «Пикоскель PS-5» (Венгрия). Определение содержания гемоглобина проводили с использованием диагностического набора фирмы «Lachema». Скорость оседания эритроцитов определяли согласно методике [1].

Регистрацию двигательной и исследовательско-ориентировочной активности проводи-

ли с помощью электронно-оптического регистра оценки движений (РОДЭО-2), суммационно-порогового показателя – на приборе СПП–01М [9]. Исследование функционального состояния сердечно-сосудистой системы и частоты дыхания проводили с помощью трехканальной системы регистрации физиологических характеристик.

Полученные данные обрабатывали на компьютере с использованием программы статистического анализа. Средние значения показателей в контрольной и опытной группах сравнивали с использованием критерия Стьюдента (t-тест). Уровень значимости принимали равным 0,05 [4].

Результаты и их обсуждение. В предварительных экспериментах с использованием газожидкостной хроматографии была проведена идентификация основных компонентов, выделяющихся в паровую фазу из битумно-солевых масс в условиях, заведомо обеспечивающих получение максимальных концентраций летучих соединений в паровой фазе. В результате проведенных исследований были обнаружены и идентифицированы следующие соединения:

в паровой фазе над БСМ зарина – моноэтанолламин и O,O'-диизопропилметилфосфонат;

в паровой фазе над БСМ зомана – моноэтанолламин и O,O'-дипинаколилметилфосфонат;

в паровой фазе над БСМ RVX – O,O'-диизобутилметилфосфонат, 2-(диэтиламино)этилизо-бутилсульфид и N-метилпирролидон.

В табл. 1 приведены данные по содержанию летучих компонентов в парогазовых смесях при различных температурах нагрева БСМ (животные в камере отсутствуют).

Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что содержание летучих компонентов БСМ, полученных при детоксикации зарина и зомана, закономерно увеличивается с ростом температуры. Для БСМ, полученных при

Таблица 1

Состав парогазовой смеси в ингаляционной камере при различных температурах нагрева БСМ

Вид БСМ	Компонент	Концентрация, мг/м ³			
		30°С	60°С	90°С	130°С
БСМ зарина	Моноэтанолламин	0,00	0,56	0,80	1,40
	O,O'-Диизопропиловый эфир метилфосфоновой кислоты	0,11	0,30	0,50	0,86
БСМ зомана	Моноэтанолламин	0,00	0,80	1,30	1,60
	O,O'-Дипинаколиновый эфир метилфосфоновой кислоты	0,00	0,12	0,36	0,50
БСМ RVX	N-Метилпирролидон	0,7	19,50	23,00	19,30
	O,O'-Диизобутиловый эфир метилфосфоновой кислоты	0,2	5,30	11,90	8,90
	2-(Диэтиламино) этилизобутилсульфид	0,08	15,50	48,40	29,00

детоксикации RVX, максимальная концентрация летучих компонентов наблюдается при температуре 90°C. Не обнаружен моноэтаноламин в воздушной среде ингаляционной камеры при 30°C нагрете БСМ зарина и зомана.

При увеличении температуры нагревания БСМ зарина и зомана от 60 до 130°C концентрация моноэтаноламина находилась на уровне предельно допустимой концентрации (ПДК для моноэтаноламина в воздухе рабочей зоны составляет 0,5 мг/м³) [3] либо превышала это значение примерно в 3 раза при температуре 130°C. Концентрации О,О'-диизопропилового эфира метилфосфоновой кислоты и О,О'-дипинаколинового эфира метилфосфоновой кислоты увеличивались с ростом температуры. Однако судить о гигиенической значимости этих концентраций не представляется возможным из-за отсутствия к настоящему времени установленных величин ПДК для этих соединений в воздухе рабочей зоны [3]. Содержание N-метилпирролидона в воздушной среде при различных температурах нагревания колебалось от 0,7 до 23,0 мг/м³, что значительно ниже установленного санитарного норматива (ПДК для N-метилпирролидона в воздухе рабочей зоны составляет 100 мг/м³) [3]. Санитарные стандарты для О,О'-диизобутилового эфира метилфосфоновой кислоты, 2-(диэтиламино)этилизообутилсульфида в воздухе рабочей зоны в России не разработаны.

Кроме того, из БСМ могут испаряться не идентифицированные компоненты, вносящие вклад в ингаляционную токсичность. Это обусловило необходимость изучения ингаляционной токсичности БСМ в целом в опытах на животных.

При проведении экспериментов были выбра-

ны следующие температурные режимы: 130°C для БСМ зарина и зомана и 90°C для БСМ RVX. В каждом эксперименте были испытаны по две концентрации.

Клинические признаки отравления отсутствовали во всех сериях экспериментов. В то же время, по комплексу интегральных и специфических показателей, регистрируемых у животных в день эксперимента, были обнаружены изменения, свидетельствующие о токсическом ингаляционном воздействии летучих компонентов БСМ ФОВ. На основании полученных изменений был установлен порог острого действия (Lim_{ac}) летучих компонентов БСМ при однократном их воздействии. За порог острого действия (Lim_{ac}) принимали минимальную концентрацию летучих компонентов БСМ, которая вызывала изменения 2–3 интегральных показателей по сравнению с контролем, выходящие за пределы ($> 2 \sigma$) физиологических колебаний данных показателей, при экспозиции 4 часа.

Результаты однократного ингаляционного воздействия летучих компонентов из БСМ зарина представлены в табл. 2.

При создании паро-воздушной смеси в ингаляционной камере путем нагрева БСМ зарина при температуре 130°C были получены следующие концентрации: моноэтаноламина 19,1±2,1 мг/м³, О,О'-диизопропилового эфира метилфосфоновой кислоты – 1,1±0,3 мг/м³, которые оценены как пороговые, вызывающие снижение суммационно-порогового показателя и увеличение мочевины плазмы крови подопытных животных.

Содержание моноэтаноламина на уровне 1,1±0,1 мг/м³ и О,О'-диизопропилового эфира метилфосфоновой кислоты на уровне 0,7±0,1 мг/м³ в ингаляционной камере не приво-

Таблица 2

Изменения интегральных показателей у крыс, наблюдаемые при однократном ингаляционном воздействии летучих компонентов из БСМ зарина

Показатель	Концентрация (M±m), мг/м ³	
	моноэтаноламин: 19,1±2,1 О,О'-диизопропиловый эфир метилфосфоновой кислоты: 1,1±0,3	моноэтаноламин: 1,1±0,1 О,О'-диизопропиловый эфир метилфосфоновой кислоты: 0,7±0,1
Горизонтальная активность – «открытое поле»	• ↓ < 2 σ	-
Суммационно-пороговый показатель	• ↓ > 2 σ	-
Кислая фосфатаза в плазме крови	• ↑ < 2 σ	-
Глюкоза в плазме крови	• ↑ < 2 σ	-
Мочевина в плазме крови	• ↑ > 2 σ	-

Примечание. Здесь и в табл. 3 и 4:

↓ – снижение данного показателя по сравнению с контрольной группой, ↑ – увеличение данного показателя по сравнению с контрольной группой, «-» – изменений не обнаружено

Таблица 3

Изменения показателей, наблюдаемые при однократном ингаляционном воздействии летучих компонентов из БСМ зомана

Показатель	Концентрация в (M±m), мг/м ³	
	моноэтаноламин: 23,0±2,8 О,О'-дипинаколиновый эфир метилфосфоновой кислоты: 1,3±0,15	моноэтаноламин: 2,3±0,1 О,О'-дипинаколиновый эфир метилфосфоновой кислоты: 0,49±0,01
Вертикальная активность – верхний уровень	• ↓ < 2 σ	-
Вертикальная активность – средний уровень	• ↓ < 2 σ	-
Горизонтальная активность – «открытое поле»	• ↓ < 2 σ	-
Суммационно-пороговый показатель	• ↓ > 2 σ	-
Кислая фосфатаза в плазме крови	• ↑ < 2 σ	-
Холинэстераза в плазме крови	↓ > 2 σ	-
Общий белок в плазме крови	-	• ↑ < 2 σ
Мочевина в плазме крови	-	• ↑ > 2 σ

дили к каким-либо функциональным изменениям показателей органов и систем животных, поэтому указанные концентрации были определены как недействующие.

Результаты ингаляционного воздействия летучих компонентов БСМ зомана представлены в табл. 3.

За пороговые концентрации паро-воздушной смеси БСМ зомана приняты концентрации моноэтаноламина 23,0±2,8 мг/м³ и О,О'-дипинаколинового эфира метилфосфоновой кислоты – 1,3±0,15 мг/м³, при которых было отмечено снижение суммационно-порогового показателя, выходящее за пределы (> 2 σ) физиологических

колебаний, а также снижение активности холинэстеразы у крыс на 27% по сравнению с контролем. По данным литературы, порогом токсического действия фосфорорганических соединений является угнетение активности холинэстеразы крови на 25% [10].

За недействующие концентрации было принято содержание моноэтаноламина на уровне 2,3±0,1 мг/м³ и О,О'-дипинаколинового эфира метилфосфоновой кислоты на уровне 0,49±0,01 мг/м³. При таком содержании летучих компонентов в ингаляционной камере только один показатель – содержание мочевины в плазме крови выходил за пределы (> 2 σ) физиологических

Таблица 4

Изменения интегральных показателей, наблюдаемые при однократном ингаляционном воздействии летучих компонентов из БСМ RVX

Показатель	Концентрация (M±m), мг/м ³	
	N-метилпирролидон: 24,1±1,6	N-метилпирролидон: 6,4±0,3
	2-(диэтиламино)этилизобутилсульфид: 26,4±3,0	2-(диэтиламино)этилизобутилсульфид: 2,98±0,07
	О,О'-диизобутиловый эфир метилфосфоновой кислоты: 7,0±0,2	О,О'-диизобутиловый эфир метилфосфоновой кислоты: 1,1±0,1
Суммационно-пороговый показатель	• ↑ > 2 σ	-
Лейкоциты	• ↓ > 2 σ	-
Общий холестерин в плазме крови	• ↓ < 2 σ	-
Мочевина в плазме крови	-	• ↑ > 2 σ
Креатинин в плазме крови	• ↑ < 2 σ	-
Лактатдегидрогеназа в плазме крови	• ↑ > 2 σ	• ↓ > 2 σ

колебаний.

В табл. 4 представлены изменения интегральных показателей, которые наблюдались при однократном ингаляционном воздействии летучих компонентов из БСМ RVX.

Концентрации летучих компонентов БСМ от RVX: N-метилпирролидона – $24,1 \pm 1,6$ мг/м³, 2-(диэтиламино)этилизобутилсульфида – $26,4 \pm 3,0$ мг/м³, O,O'-диизобутилового эфира метилфосфоновой кислоты – $7,0 \pm 0,2$ мг/м³ вызывали ряд изменений интегральных показателей у животных и характеризовались как пороговые концентрации.

Содержание в парогазовой смеси N метилпирролидона в количестве $6,4 \pm 0,3$ мг/м³, 2-(диэтиламино)этилизобутилсульфида – $2,98 \pm 0,07$ мг/м³ и O,O'-диизобутилового эфира метилфосфоновой кислоты – $1,1 \pm 0,1$ мг/м³ вызывало увеличение содержания мочевины и снижение активности лактатдегидрогеназы у крыс.

Следует отметить, что наблюдавшееся снижение активности общей лактатдегидрогеназы у крыс по сравнению с параллельной контрольной группой животных не может рассматриваться как критерий вредности, поскольку только увеличение активности общей лактатдегидрогеназы, по мнению ряда авторов, может указывать на наличие каких-либо патологических изменений в организме [6]. В связи с этим смещение только одного показателя – содержания мочевины за пределы физиологических колебаний ($> 2\sigma$) позволяет считать эти концентрации летучих компонентов как недействующие.

В целях выяснения возможного вклада в токсический эффект БСМ ФОВ летучих компонентов самого битума был проведен четырехчасовой эксперимент на животных при нагревании битума при температуре 130°C. Анализ полученных данных показал, что каких-либо изменений изученных показателей крыс не наблюдалось.

Заключение. Установлены пороговые концентрации летучих компонентов БСМ зарина, зомана и RVX при однократном 4-часовом ингаляционном воздействии.

Отмеченные изменения ряда показателей у животных в основном определяются действием летучих компонентов, которые образуются в процессе детоксикации ФОВ.

В условиях аварийного разлива БСМ от зарина и зомана, разогретых до 130°C, и БСМ от RVX, разогретых до 90°C, могут образовываться концентрации летучих компонентов на уровне порога острого действия.

4. При хранении БСМ в условиях температурного режима 30°C концентрации летучих компонентов БСМ не превышают установленных ПДК.

Список литературы

1. *Альтгаузен А.Я.* Лабораторные клинические исследования. М.: Медицина, 1964. – С. 118.
2. *Белецкая И.* Уничтожение химического оружия в России: политические, правовые и технические аспекты. М., 1999. – 156 с.
3. *ГОСТ 12.1.005-88.* Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.
4. *Закс Л.* Статистическое оценивание. М.: Статистика, 1976.
5. *Колб В.Г., Камышников В.С.* Справочник по клинической химии. Минск: 1982. – 366 с.
6. *Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В.* Биохимические исследования в клинике. Элиста: АПП «Джангар», 1988. – 237 с.
7. *Петрунин В.А., Шелученко В.В., Демидюк В.В.* Проблемы уничтожения химического оружия // *Материалы 1 Межрегиональной конференции.* Киров, 2000. – 110 с.
8. *Практикум по биохимии.* / Под ред. С.Е.Северина, Г.А.Соловьевой. М.: МГУ, 1989. – 260 с.
9. *Сперанский С.В.* // *Фармакология и токсикология*, 1965. – № 1. – С. 123-124.
10. *Токсикометрия химических веществ, загрязняющих окружающую среду.* / Под ред. А.А.Каспарова и И.В.Саноцкого. М., 1986. – 427 с.
11. *Ellman G.E., Courtney K.D., Andres V. et al.* // *Biochemical Pharmacol.*, 1961. – V. 7. – P. 88-95.

Материал поступил в редакцию 20.12.05.

Ye.I.Malochkina, Z.I.Gorbunova, O.A.Khodakovskaya, L.D.Glukhova, V.A.Petrinin

INHALATION TOXICITY OF BITUMEN SALT MASSES RESULTING FROM DESTRUCTION OF ZARINE, ZOMAN AND RUSSIAN VX

State-owned Establishment «State Research Institute of Organic Chemistry and Technology», Moscow

Inhalation toxicity of bitumen salt masses (BSM) resulting from destruction of zarine, zoman and Russian VX was investigated using two-stage technology. Threshold and no-effect concentrations of volatile ingredients of BSM from sarine, zoman and Russian VX are established at a single 4-h inhalation exposure of Wistar male and female rats.

УДК 614.777

О.Ф.Филенко, М.В.Медянкина

РОЛЬ ДОННЫХ ГРУНТОВ В МОДИФИКАЦИИ ТОКСИЧНОСТИ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ (НА ПРИМЕРЕ БИХРОМАТА КАЛИЯ И СУЛЬФАТА ИМАЗАЛИЛА)

Биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

Проведена оценка влияния донных осадков разного состава на токсичность неорганического (бихромат калия) и органического (сульфат имазалила) веществ для рачка *Daphnia magna*. При оценке токсического эффекта на тест-объект использовали показатель повременной выживаемости, характеризующий жизнестойкость выборки и отражающий вероятность выживания членов популяции при экстремальном воздействии. Отмечено изменение биодоступности токсикантов в присутствии различных донных грунтов. На основе оценки уменьшения токсичности загрязнителя в присутствии донного грунта возможно ориентировочное определение количества вещества, поглощенного донным грунтом.

Ключевые слова: донные грунты, токсичность, рачки, бихромат калия, сульфат имазалила.

Введение. Донные осадки, образующиеся в результате седиментации взвешенного в воде материала и его взаимодействия с водной фазой, играют ведущую роль в формировании гидрохимического режима водоемов. Основная масса загрязняющих веществ, поступающих в водоемы, адсорбируется на минеральных и органических частицах, оседает на дно и накапливается в донных осадках [4, 7], причем основными накопителями загрязняющих веществ являются илистые фракции [5]. Аккумулирующая способность донных осадков в значительной степени зависит от размеров входящих в их состав частиц и содержания в них органического вещества [8, 9].

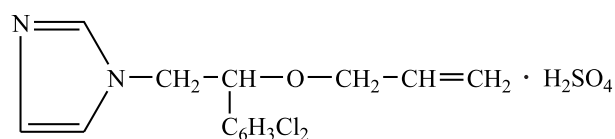
Накопление загрязнителей в донных осадках приводит к их накоплению в бентосных организмах и дальнейшей передаче по трофическим цепям [2, 5]. Переход потенциально токсичных веществ между водой и донными осадками служит важным механизмом регулирования их содержания в водной толще, влияющей на качество воды и на токсичность водной среды для гидробионтов [6].

В связи с этим задачей данной работы служила оценка влияния донных осадков разного состава на токсичность неорганического (бихромата калия) и органического (сульфат имазалила) веществ для рачка *Daphnia magna*, как основного объекта токсикологического регламентирования и биотестирования качества водной среды.

Материалы и методы исследования. В качестве тест-объекта использовали рачков *Daphnia magna* из лабораторной культуры. Кормом для рачков

служила хлорелла (*Chlorella*), которую выращивали в соответствии с методическими указаниями [3].

Исследовали токсическое действие бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$) и фунгицида сульфата имазалила:



Оценивали действие на рачков растворов сульфата имазалила в концентрациях 0,5, 1 и 2 мг/л и бихромата калия – в пересчете на хром – 0,3, 0,5 и 0,7 мг/л.

Испытания проводили в стеклянных стаканах объемом 300 мл, куда помещали по 7 рачков в возрасте до 24 ч. Замену растворов проводили через 2 суток.

В часть стаканов вносили слой грунта толщиной 1 см одного из четырех типов. В качестве грунта служил чистый кварцевый песок («песок»), осадок, формирующийся в аквариальном фильтре («ил»), илистые отложения из проточного пруда («пылеватый тяжелый суглинок») и песчаные отложения из р. Москвы, отобранные в районе Звенигородской биологической станции МГУ («супесь тяжелая»). Природным грунтам названия были присвоены в соответствии с классификацией на основании данных гранулометрического анализа по классификации В.В.Охотина [1].

Регулярно учитывали выживаемость рачков и затем, после наступления половозрелости, количество и выживаемость молоди. Для полово-

зрелых особей показателем гибели служило полное прекращение движения, а показателем гибели эмбрионов – выброс мертвых зародышей из выводковой камеры самок.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с использованием программ STATISTICA 6.0. и Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение. В качестве показателя состояния выборки, подвергавшейся воздействию, использовали величину суммарной продолжительности жизни особей, входящих в состав этой выборки, которая может быть выражена через площадь, ограничиваемую осями координат (времени и численности особей) и кривой динамики численности особей в выборке. Размерностью такого показателя служит произведение числа живых рачков на сутки наблюдения («особи – дни»). Такой показатель может быть назван «повременной выживаемостью» («ПВ»). Вычислять ПВ (N) можно в соответствие следующим уравнением:

$$N = \sum_{i=1}^T \frac{(n_{(t_i)} + n_{(t_j)})}{2} \cdot (t_i - t_j)$$

где: $n_{(t_i)}$ и $n_{(t_j)}$ – численности особей в выборке в последовательные сроки наблюдения t_i и t_j ; T – общий срок наблюдения.

Этот показатель характеризует жизнестойкость выборки и отражает вероятность выживания членов популяции при экстремальном воздействии. Чем большее число членов популяции проживет более продолжительный срок, тем выше вероятность особей адаптироваться к воздействию и дать потомство, тем выше вероятность сохранения популяции в целом. Показатель ПВ

может быть использован для токсикометрических оценок даже в том случае, если не удастся по каким-либо причинам установить такие традиционные показатели, как ЭК₅₀.

Для сравнений ПВ выборок в разных условиях исследования могут быть сопоставлены величины площадей в опыте и в соответствующем контроле в каждой из серий, а результат может быть выражен как в долях единицы, так и в процентах. Важно при этом, чтобы конечный срок наблюдения в обеих выборках был одинаковым. Получаемый коэффициент может быть назван «отношением повременных выживаемостей» («ОПВ»). На рис. 1 показано в качестве примера определение ПВ при действии хрома в разных концентрациях без грунта и в присутствии суглинка, а также вычисление ОПВ для каждой концентрации.

В отсутствие грунтов все концентрации бихромата калия были абсолютнолетальными. При концентрации 0,3 мгСг/л без грунта гибель рачков завершилась к 15 суткам, однако в присутствии суглинка гибель рачков была несущественной. При концентрациях 0,5 и 0,7 мгСг/л в присутствии грунта все рачки жили в течение 7 суток, однако затем выживаемость резко снижалась.

В табл. приведены значения ПВ при наличии и отсутствии грунтов и соответствующие ОПВ.

Как видно из табл., в присутствии песка и супеси токсичность хрома менялась мало. Причем, при увеличении концентрации хрома защитный эффект песка снижался. Эффект влияния ила и суглинка на токсичность был более выраженным и с увеличением концентрации повышался.

Таблица

Величины ПВ в присутствии и отсутствии грунтов и ОПВ при действии бихромата калия и сульфата имазазила

Тип грунта	Бихромат калия				Сульфат имазазила			
	Концентрация (мгСг/л)	ПВ		ОПВ	Концентрация (мг/л)	ПВ		ОПВ
		без грунта	с грунтом			без грунта	с грунтом	
Песок	0,3	65±9	104±15	1,6	1,0	110±20	118±27	1,1
	0,5	62±7	74±10	1,2				
Ил	0,3	94±10	187±3	2,0	0,5	173±16	182±8	1,0
	0,5	40±10	171±4,5	4,3	1,0	139±11	150±17	1,1
					2,0	52±7	83±4,5	1,6
Суглинок	0,3	83±10	158±3	1,9	0,5	154±21	174±21,5	1,1
	0,5	21±4	95±18	4,5	1,0	137±9	155±10	1,1
	0,7	13±7	78±2	6,0	2,0	28±7	40±16	1,4
Супесь	0,3	83±10	85±11	1,0	0,5	179±2	190	1,1
	0,5	21±4	23±7	1,1	1,0	117±24	189±2	1,6
	0,7	13±7	14±8	1,1	2,0	37±8	84±25	2,3

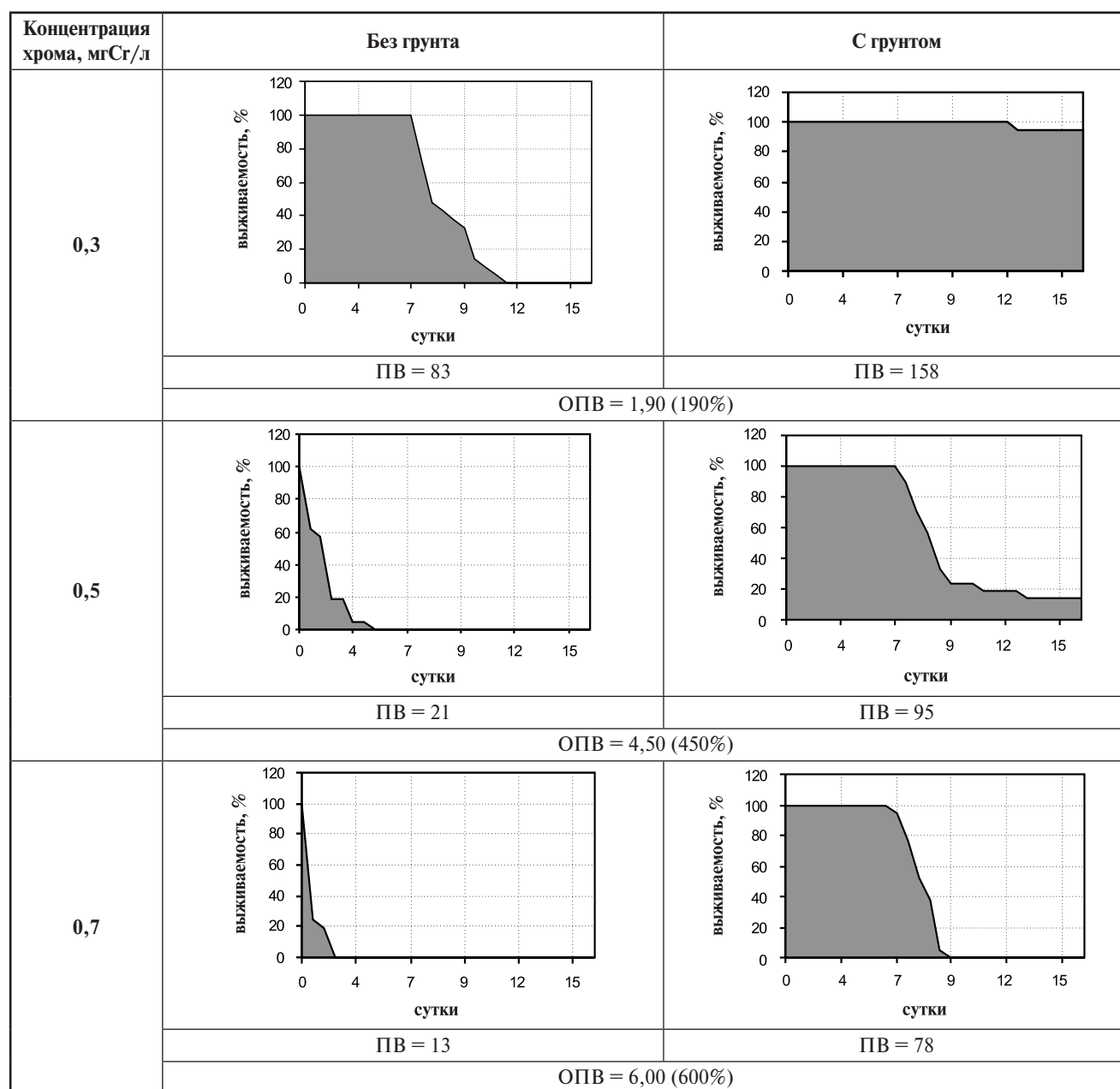


Рис. 1. Влияние пылеватого тяжелого суглинка на токсичность бихромата калия для дафний

При одинаковых концентрациях хрома значения ОПВ в присутствии ила и суглинка были близкими. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что связывающая активность песка и супеси по отношению к хрому невысока, и с повышением концентрации хрома быстро достигается предел связывающего потенциала грунтов. Ил и суглинок способны более активно связывать хром, и концентрация 0,7 мгСг/л не исчерпывает их адсорбирующей емкости. Вероятно, основную роль в связывании хрома играет органическая часть грунта.

На токсичность сульфата имазалила до концентрации 1 мг/л существенно влияла только супесь. Защитное действие остальных грунтов

практически не проявлялось. При концентрации имазалила сульфата 2 мг/л ОПВ в присутствии супеси составило 2,3, а суглинка и ила – 1,4 и 1,6, соответственно. Проявление защитного эффекта ила и суглинка при повышенной концентрации может свидетельствовать о том, что для образования комплекса имазалила с компонентами грунта необходимо достижения определенного концентрационного порога токсиканта, однако содержание органической фракции не имело существенного значения при связывании сульфата имазалила.

По степени ослабления токсического эффекта можно косвенно судить об уровне остаточной концентрации токсиканта в растворе в присут-

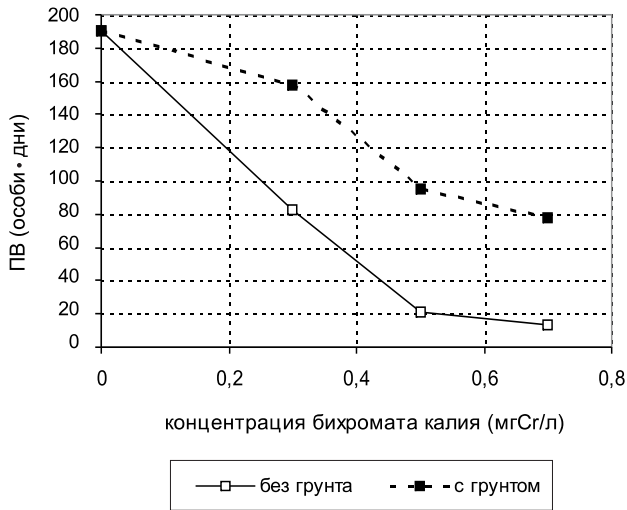


Рис. 2. Влияние суглинка на ПВ дафний при разных концентрациях хрома

ствие грунтов. Так, например, на рис. 2 показаны величины ПВ при разных концентрациях бихромата калия без грунта и в присутствии суглинка. Сопоставление кривых свидетельствует, например, что эффект бихромата в концентрации 0,3 мгCr/л в отсутствие грунта соответствует эффекту приблизительно 0,7 мгCr/л в присутствии суглинка. Это может свидетельствовать о том, что концентрация токсиканта в виде, доступном для планктонных рачков, в присутствии суглинка снижалась приблизительно наполовину.

Также может быть оценен объем абсорбированного сульфата имазалила в присутствии супеси (рис. 3). На рис. 3 видно, что во всем концентрационном диапазоне одинаковые эффекты на ПВ без грунта и в присутствии супеси оказывали концентрации, отличающиеся на 0,5 мг/л. Очевидно, эта величина отражает накапливающий предел супеси по отношению к данному загрязнителю.

Влияние грунтов на токсичность проявлялось и по эффекту на плодovitость рачков. Сами грунты на плодovitость практически не влияли. Так, если в контроле без грунта на 1 самку приходилось 42,4 молодых особей, то в присутствии ила их число составило 44,2.

При действии бихромата калия без грунтов молодые особи вплоть до окончания опыта вообще не рождались. В присутствии грунтов размножение происходило даже активнее, чем в контроле, однако по мере увеличения концентрации число молодых особей снижалось. Так, в присутствии ила количество молодых дафний снижалось с 57,5 на самку при концентрации 0,3 мгCr/л до 33,04 на самку при концентрации 0,5 мгCr/л. Мертвых эмбрионов во всех опытах с би-

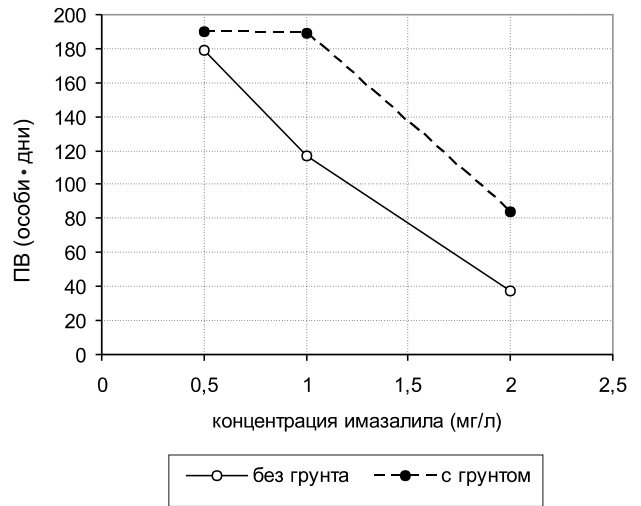


Рис. 3. Влияние супеси на ПВ дафний при разных концентрациях сульфата имазалила

хроматом калия отмечено не было. Помимо ила защитный эффект на показатель плодovitости проявил также суглинок.

Сульфат имазалила, в основном, вызывал гибель эмбрионов, в связи с чем, количество молодых рачков (при концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л) было низким, особенно в отсутствие грунта. Так, при концентрации сульфата имазалила 0,5 мг/л в отсутствие грунта на одну самку приходилось 5,7 молодых рачков, в присутствии ила, наиболее эффективно защищавшего плодovitость, 20,7.

В концентрациях 2,0 мг/л как при наличии, так и при отсутствии грунта молодки (живой или мертвой) и погибших эмбрионов не обнаружено.

Эффект ослабления токсичности в присутствии донных осадков кажется явлением закономерным, однако, наши опыты свидетельствуют о том, что в значительной степени это ослабление зависит от состава грунта, природы загрязняющего вещества, его концентрации. В конечном счете, токсичность определяется биодоступностью вещества, которая меняется в связи с переходом токсиканта в грунт или с изменением формы вещества в водной толще. В растворе бихромата калия хром, как наиболее ядовитый компонент вещества, находится в составе бихромат-иона, имеющего отрицательный заряд, а имазалил присутствует в растворе в виде катиона. Очевидно бихромат (анион) и имазалил (катион) имеют разное сродство к компонентам грунтов, чем и определяется различное влияние грунтов на их токсичность.

Абсорбционная емкость грунтов различна, и различны характеристики сродства загрязнителей к компонентам грунтов даже при наличии защитного эффекта. Так, защитное действие пес-

ка от токсичности бихромата калия снижалось с повышением концентрации, что может свидетельствовать о насыщении связывающих центров в песке. С другой стороны, защитное действие ила и суглинка от сульфата имазалила проявлялось только при наибольшей концентрации токсиканта (ОПВ = 1,4–1,6). Причина этого может заключаться не только в резком возрастании токсичности вещества при этой концентрации в отсутствие грунта, но и в необходимости достижения определенной концентрации токсиканта для смещения равновесия в сторону его связывания компонентами грунтов.

Выводы. 1. При оценках токсического эффекта на тест-объектах, наряду с традиционными показателями эффекта, может быть использован и показатель временной выживаемости («ПВ»), характеризующий жизнестойкость выборки и отражающий вероятность выживания членов популяции при конкретном экстремальном воздействии. В частности, этот показатель оказался информативным при оценках роли донных грунтов в изменении токсичности неорганического (бихромат калия) и органического (сульфат имазалила) токсикантов.

2. Присутствие донных грунтов изменяло биодоступность токсикантов, ослабляя их эффект. Эффект бихромата калия на выживаемость и плодовитость рачков в наибольшей степени ослаблялся в присутствии ила и суглинка, имевших относительно высокое содержание органического компонента, в то время, как супесь активнее других грунтов ослабляла действие сульфата имазалила на выживаемость рачков.

3. На основе оценки уменьшения токсичности загрязнителя в присутствии донного грунта возможно ориентировочное определение изменения концентрации загрязняющего вещества в растворе, и, соответственно, — объема вещества, поглощенного донным грунтом.

Список литературы

1. **Вадюнина А.Ф., Корчагина З.А.** Методы исследования физических свойств почв и грунтов. Учебное пособие для студентов вузов (специальность агрохимия и почвоведение). Изд. 2-е. М., «Высшая школа», 1973. — 399 с.
2. **Козловская В.Н., Герман А.В.** Полихлорированные бифенилы и полиароматические углеводороды в экосистеме Рыбинского водохранилища // *Вод. Ресурсы*, 1997. — Т. 24. — № 5. — С. 563-569.
3. **Методические указания по установлению эколого-рыбохозяйственных нормативов (ПДК и ОБУВ) загрязняющих веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение / под ред. О.Ф.Филенко, С.А.Соколовой.** М.: Изд-во ВНИРО, 1998. — 145 с.
4. **Нахшина Е.П.** Тяжелые металлы в системе «вода-донные отложения» водоемов (обзор) // *Гидробиологический журнал*, 1985. — Т. 21. — № 2. — С. 80-90.
5. **Перевозников М.А., Богданова Е.А.** Тяжелые металлы в пресноводных экосистемах. С-Пб.: Изд-во ГосНИОРХ, 1999. — 226 с.
6. **Томилини И.И., Комов В.Т.** Донные отложения как объект токсикологических исследований (обзор) // *Биология внутренних вод*, 2002. — № 2. — С. 20-26.
7. **Щербань Э.П.** Экспериментальная оценка токсичности дунайской воды для *Daphnia magna straus* // *Гидробиологический журнал*, 1982. — Т. 18. — № 2. — С. 82-87.
8. **Kemble N.E., Dwyer F.J., Ingersoll C.G.** Tolerance of freshwater test organisms to formulated sediments for use as control materials in whole-sediment toxicity tests // *Environ. Toxicol. and Chem.*, 1999. — V. 18. — № 2. — P. 222-230.
9. **Suedel B.C., Rogers J.H.Jr.** Development of formulated reference sediments for use in freshwater and estuarine tests // *Environ. Toxicol. Chem.*, 1994. — V. 13. — P. 1163-1175.

Материал поступил в редакцию 01.11.05.

O.F.Filenko, M.V.Medyankina

ROLE OF SEDIMENTS IN MODIFYING TOXICITY OF CONTAMINANTS (ON THE EXAMPLE OF POTASSIUM BICHROMATE AND IMAZALIL SULPHATE)

Biology Department, M.V.Lomonosov Moscow State University

Assessment of the effect of sediments of different composition on toxicity of inorganic (potassium bichromate) and organic (imazalil sulphate) substances was conducted for *Daphnia magna Crustacea*. For assessing toxic effect on test-object, the indicator of time survival was used, this indicator characterizing viability of samplings and representing survival likelihood of population members at extreme exposure. Changes in biological availability of toxicants was noted in the presence of different sediments. Basing on the assessed lowering of contaminants toxicity in the presence of sediments, it is possible to tentatively determine the amount of a substance taken up by the sediment.

УДК 614.774.08

С.Ю.Селивановская, П.Ю.Галицкая

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ПОЧВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНТАКТНОГО МЕТОДА БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Казанский государственный университет, кафедра прикладной экологии

Представлен метод оценки токсичности почв с использованием интродуцированной культуры *Bacillus cereus*. Возможность применения метода для анализа почв и водных объектов продемонстрирована на примере биотестирования водных растворов токсикантов (Pb, Ni, Сг и фенол) и модельных почвенных образцов.

Ключевые слова: токсичность, почва, метод биотестирования.

Введение. В результате увеличения антропогенной нагрузки на экосистемы во всем мире появилась необходимость создания системы мер по минимизации воздействия и восстановлению качества биосферы. В связи с этим разрабатываются законодательные, нормативные и методические документы, связанные с нормированием качества природных сред и воздействия на них [3, 4]. Согласно директивам стран Европейского союза, для оценки и нормирования качества окружающей среды приоритетным является использование токсикологических методов [6].

Наиболее сложными для биологического анализа представляются плотные объекты, такие как почвы или отходы. Для их оценки применяют различные методы, в частности, основанные на применении анализа аборигенной микрофлоры или элюатных методов биотестирования [5, 9]. Одним из перспективных направлений при оценке токсичности плотных сред является контактное микробное биотестирование. Контактное биотестирование в отличие от традиционных элюатных методов предполагает непосредственный контакт образцов с тест-объектами, а в отличие от методов анализа аборигенной микрофлоры не требует обязательного наличия контрольного (фоновое) образца. Однако на сегодня в России не существует стандартизованных методик контактного микробного биотестирования, в странах ЕС и США они так же находятся в стадии разработки [6, 8].

Указанные обстоятельства послужили основанием для проведения экспериментальной работы с целью разработки контактного метода биотестирования для оценки токсичности плотных сред.

Методы исследования. Тест-объектом служила грам-положительная бактерия *Bacillus cereus* КМ-21. При отборе тест-объекта также использовали штаммы *Vac. circulans* КМ-34, *Vac.*

intermedius КМ-13, *Vac. megaterium* КМ-16, *Vac. mesentericus* КМ-6, *Vac. polymixa* КМ-4Ф, *Vac. pumilis* КМ-22, *Vac. subtilis* КМ-5, *Vac. thuringiensis* КМ-3Ф. Культуры микроорганизмов получены из коллекции кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

Хранение культуры осуществляли в пробирках на мясо-пептонном агаре. Культивирование проводили при 28°C в колбах на 250 мл с 50 мл глюкозо-пептонной среды (ГПС) (г/л): пептон – 10, глюкоза – 5, NaCl – 3. Для биотестирования культуру инкубировали до достижения оптической плотности 0,5 опт. ед. Оптическую плотность культуры определяли на ФЕК-4А ($\lambda = 600$ нм, кювета 10мм).

Анализу на токсичность подвергали:

- водные растворы PbCl₂, Cr₂O₃, Ni(NO₃)₂ и фенола.

- почвы, искусственно загрязненные солью меди и комплексом металлов Pb, Cu, Cd, Ni. Содержание каждого их металлов в почвенных образцах варьировало на уровне значений равных ОДК для песчаных и супесчаных почв, а также превышающих их в 5, 10 и 50 раз. В качестве контроля использовали незагрязненные почвы.

Перед исследованием почвы увлажняли до 60% влажности, инкубировали в течение 7 суток при комнатной температуре.

Дегидрогеназную активность аборигенной микрофлоры почвы определяли методом Ленарда в модификации Колешко, который основан на колориметрическом измерении формазана, образующегося в результате восстановления 2,3,5-трифенилтетразолийхлорида (ТТХ) [2]. К навеске почвы 1г приливали 1 мл 0,1М раствора глюкозы, 2 мл 0,1М фосфатного буфера (рН 7,2), и 1 мл 1% раствора ТТХ. Смесь встряхивали и инкубировали 24 часа при 28°C. После инкубирования в реакционную смесь добавляли 5 мл этанола и центрифугировали при 4 тыс. об. мин.

Надосадочную жидкость колориметрировали при 480 нм. Количество формазана находили по калибровочной кривой, построенной по чистому формазану. Активность выражали в мг формазана/г почвы · 24 часа.

При проведении контактного биотестирования в пластиковую пробирку вносили навеску почвы, предварительно стерилизованной при температуре 180°C, массой 1 г, приливали 1 мл 0,1М раствора глюкозы, 2 мл 0,1М фосфатного буфера, рН 7,2, 1 мл 1% раствора ТТХ и 1 мл бактериальной культуры (не слепая проба). В случае слепой пробы вместо 1 мл бактериальной культуры добавляли 1 мл ростовой среды. Далее в соответствии с методикой, приведенной выше.

Для контроля активности культуры при каждом биотестировании предусматривали так называемый «водный контроль», в котором почвенную навеску заменяли на 1 мл дистиллированной воды. Дегидрогеназная активность культуры служила контролем при расчете ингибирующего эффекта.

При анализе чувствительности бациллярных культур в отношении растворов токсикантов тестирование проводили, заменяя 1 г почвы на 1 мл водного раствора токсиканта.

Измерения проводили не менее чем в пятикратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили с помощью электронных таблиц Excell и программы Origin 4.1. Достоверность различий полученных результатов оценивали с использованием коэффициента Стьюдента ($p < 0,05$). Взаимосвязь ряда факторов устанавливали посредством расчета коэффициента корреляции.

Результаты исследования. В качестве тест-объекта для оценки токсичности образцов были выбраны бактерии, относящиеся к роду *Bacillus*, тест-реакцией служила активность фермента де-

гидрогеназы. Этот выбор был обусловлен тем, что, согласно данным литературы, активность фермента дегидрогеназы у микробов является адекватным показателем их метаболической активности [7]. Известно также, что наиболее активен этот фермент у бактерий рода *Bacillus* [9].

На первом этапе нами был конкретизирован тест-объект. Для этого были изучены ростовые характеристики девяти штаммов бактерий этого рода (*Bac. cereus* КМ-21, *Bac. circulans* КМ-34, *Bac. intermedius* КМ-13, *Bac. megaterium* КМ-16, *Bac. mesentericus* КМ-6, *Bac. polymixa* КМ-4Ф, *Bac. pumilis* КМ-22, *Bac. subtilis* КМ-5, *Bac. thuringiensis* КМ-3Ф.) и проведена сравнительная оценка их дегидрогеназной активности и чувствительности по отношению к стандартным токсикантам.

Наибольшую дегидрогеназную активность продемонстрировали штаммы *Bac. cereus* КМ-21 и *Bac. mesentericus* КМ-6 – 0,80 и 0,76 мг формазана г⁻¹ 24 ч⁻¹ соответственно. В случае остальных штаммов активность оказалась ниже и варьировала в интервале 0,47–0,60 мг формазана г⁻¹ 24 ч⁻¹ (рис.1).

Для оценки чувствительности бактерий нами были подвергнуты биотестированию растворы, содержащие неорганические загрязнители: свинец, хром (III), никель, а также фенол. Анализ данных биотестирования позволил рассчитать концентрации, вызывающие 50%-ное ингибирование дегидрогеназной активности штаммов (ЭК₅₀), для предложенных токсикантов, значения которых представлены в табл.

Как видно из данных табл., наиболее токсичным для бактериальных культур оказался органический токсикант – фенол. Значения ЭК₅₀ варьировали в интервале 50–77 мг/л. Из неорганических токсикантов минимальные значения ЭК₅₀ продемонстрировал никель (170–220 мг/л). Для свинца и хрома значения ЭК₅₀ достоверно

Таблица

Значения ЭК₅₀ для бактерий рода *Bacillus* в присутствии солей свинца, хрома, никеля, и фенола

Вид	CL ₅₀ , мг/л			
	фенол	никель	свинец	хром (III)
<i>Bac. subtilis</i> КМ-5	-	207	302	343
<i>Bac. megaterium</i> КМ-16	-	201	282	304
<i>Bac. pumilis</i> КМ-22	69	212	381	345
<i>Bac. thuringiensis</i> КМ-3Ф	55	-	325	308
<i>Bac. cereus</i> КМ-21	58	198	371	301
<i>Bac. polymixa</i> КМ-4Ф	59	-	319	306
<i>Bac. intermedius</i> КМ-13	65	221	285	311
<i>Bac. mesentericus</i> КМ-6	77	-	418	374
<i>Bac. circulans</i> КМ-34	51	172	-	312

Примечание. «-» – не анализировали

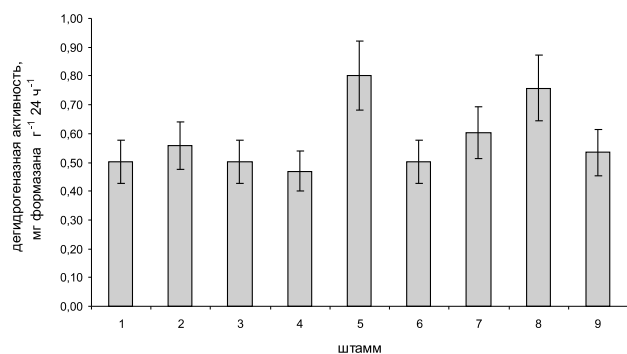


Рис. 1. Дегидрогеназная активность штаммов бактерий рода *Bacillus*

1 – *Bac. subtilis* KM-5, 2 – *Bac. megaterium* KM-16, 3 – *Bac. pumilis* KM-22, 4 – *Bac. thuringiensis* KM-3Ф, 5 – *Bac. cereus* KM-21, 6 – *Bac. polymixa* KM-4Ф, 7 – *Bac. intermedius* KM-13, 8 – *Bac. mesentericus* KM-6, 9 – *Bac. circulans* KM-34

отличались от значений, установленных для никеля и оказались в среднем выше в 2,0 и 1,9 раз, соответственно, что свидетельствует о большей токсичности никеля для грам-положительных бактерий.

Сравнительный анализ чувствительности бактерий продемонстрировал отсутствие достоверных различий. В целом же, исходя из уровня дегидрогеназной активности культуры, а также наиболее удобного для исследователя времени достижения активной фазы культуры, для дальнейших исследований выбрана культура *Bac. cereus*.

На следующем этапе с использованием *Bac. cereus* нами были протестированы образцы почвы, содержащие в качестве токсикантов сульфат меди, а также смесь токсичных металлов (Cd, Cu, Ni, Pb), наиболее часто встречаемых в почвах РТ [1]. Необходимо отметить, что в этих экспериментах был предусмотрен, так называемый, водный контроль, когда почву в реакционной смеси заменяли на дистиллированную воду. В этом

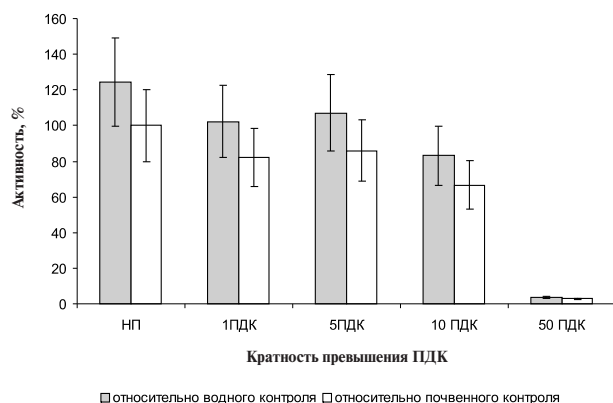


Рис. 2. Дегидрогеназная активность *Bac. cereus* при анализе образцов почв, загрязненных комплексом металлов. НП – незагрязненная почва

случае оценивали уровень дегидрогеназной активности культуры.

При анализе результатов определения токсичности почвенных образцов было установлено, что незагрязненная (контрольная) почва оказывает стимулирующий эффект на дегидрогеназную активность *Bac. cereus*, увеличивая ее в 1,3 раза. Скорее всего этот стимулирующий эффект оказывают органические компоненты почвы. Достоверные различия в дегидрогеназной активности *Bac. cereus* KM-21 при тестировании контрольных и загрязненных образцов обнаружены при содержании меди в почве 30 мг/кг почвы, а рассчитанное значение EC_{50} составило 304 мг/кг. При анализе данных литературы обнаружено, что EC_{50} меди в тесте с дегидрогеназной активностью группы микробов, обитающих в донных отложениях, составляет 400 мг/кг [9]. В единственной публикации, посвященной перспективам применения контактных тестов, приведены значения EC_{50} для меди – 200 мг/кг, и указано, что медь в концентрации 900 мг/кг вызывает 96% ингибирование, однако авторы не указывают тип исследуемой почвы [8]. Таким образом, чувствительность используемого нами штамма в отношении меди оказалась соизмеримой со значениями, представленными в литературе.

При анализе результатов определения токсичности образцов с внесенной смесью токсикантов было установлено, что достоверное различие в дегидрогеназной активности обнаружено при содержании Cu, Pb, Cd, Ni равном 10 ПДК (ингибирование активности в отношении незагрязненной почвы составляет 33%), а 97% ингибирование ферментативной активности выявлено при их содержании равном 50 ПДК (рис. 2). Также как и в предыдущем случае незагрязненная почва оказывала выраженный стимулирующий эффект на активность культуры.

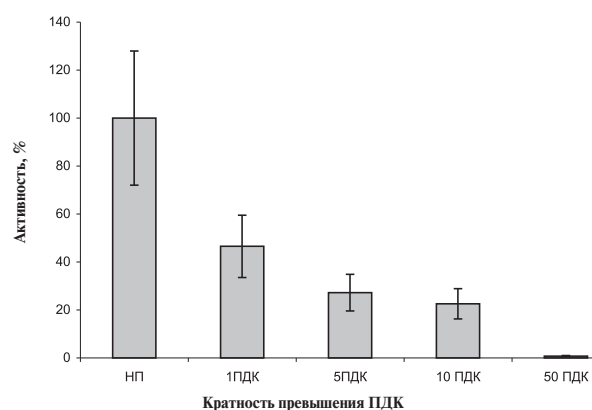


Рис. 3. Дегидрогеназная активность аборигенной микрофлоры в почвенном образце, загрязненном смесью металлов. НП – незагрязненная почва

Для того чтобы определить, насколько адекватны результаты, полученные методом контактного биотестирования, и действительно ли они отражают состояние почвенного микробного сообщества, подвергнутого воздействию токсикантов, нами была в этих же образцах определена дегидрогеназная активность, проявляемая аборигенной микрофлорой (рис. 3)

Сравнение активности аборигенной микрофлоры и тест-культуры в контактном тесте со смесью металлов показывает, что в случае аборигенной микрофлоры достоверный ингибирующий эффект наблюдается уже при концентрации металлов 1 ПДК. Причем активность аборигенной микрофлоры при данной концентрации ингибируется на 53%. Интродуцированная культура *Bac. cereus* оказалась менее чувствительной к токсикантам, и при той же концентрации ингибирование ее активности составило 18%, а 50%-ное ингибирование дегидрогеназной активности культура *Bac. cereus* показывает лишь при концентрациях свыше 10 ПДК (рис. 2). В обоих вариантах испытаний концентрации металлов на уровне 50 ПДК, вызывали ингибирующий эффект близкий к 100%. Полученные результаты показывают, что аборигенная микрофлора является более чувствительным индикатором загрязнения комплексом тяжелых металлов по сравнению с интродуцированной культурой *Bac. cereus*. Однако, несмотря на большую чувствительность тестов с использованием анализа активности аборигенной микрофлоры, этот метод обладает и некоторыми недостатками. Так, при оценке реальных объектов крайне затруднительно получить контрольные (фоновые) образцы почв, с такими же характеристиками, как и опытные образцы. Отсутствие возможности рассчитать ингибирующий эффект не позволяет сравнивать состояние почвенных образцов, отобранных в разное время и на различных территориях. Использование же в качестве контроля лабораторной культуры, находящейся в стандартном состоянии, позволяет преодолеть данное затруднение. Более того, проведенный корреляцион-

ный анализ показывает, что уровень корреляции полученных массивов данных (активностей аборигенной микрофлоры и культуры *Bac. cereus*) достаточно велик – коэффициент корреляции составляет 0,95, что говорит о принципиальной возможности применения контактного метода вместо тестирования на аборигенной микрофлоре.

Список литературы

1. Государственный доклад «О состоянии природных ресурсов и об охране окружающей среды Республики Татарстан». Казань: изд-во «Мир без границ», 2004. – 471 с.
2. Колешко О.И. Экология микроорганизмов в почве. Минск: Высш. шк., 1981. – 345 с.
3. ПНД Ф Т 14.1;2;3;4.3-99 Токсикологические методы контроля. Методика определения токсичности воды по смертности и изменению плодовитости дафний. М., 1999. – 31 с.
4. ФР.1.39.2003.00923 Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных вод, сточных, и очищенных сточных, поверхностных, грунтовых и питьевых вод методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий *Paramecium caudatum*. Казань, 2003. – 20 с.
5. **Abbondanzi F.** Optimization of a microbial bioassay for contaminated soil monitoring: bacterial inoculum standardisation and comparison with Microtox® assay // *Chemosphere*, 2003. – № 53. – P. 889-897.
6. **Kapanen A.** Ecotoxicity Tests Compost Applications // *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2001. – № 49. – P. 1-16.
7. **Moreno J.L.** Ecotoxicity Tests for Compost Applications // *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2001. – № 49. – P. 1-16.
8. **Roepagel K.** Asking for indicator function of bioassays evaluating soil contamination: are bioassays results reasonable surrogates of effects on soil microflora? // *Chemosphere*, 1998. – V. 36. – № 6. – P. 1291-1304.
9. **Van Beelen P.** A review on the application of microbial toxicity tests for deriving sediment quality guidelines // *Chemosphere*, 2003. – № 53. – P. 795-808.

Материал поступил в редакцию 29.09.05.

S. Yu. Selivanovskaya, P. Yu. Galitskaya

TOXICITY EVALUATION OF SOILS WITH THE USE OF CONTACT MICROBIAL METHOD

Chair of Applied Ecology, Kazan State University

A method of toxicity evaluation of soils with the use of introduced *Bacillus cereus* culture is presented. Potential application of the method for analysis of soils and water bodies is proven on the example of biotesting water solutions of toxicants (Pb, Ni, Cr and phenol) and modelled soil samples.

УДК597.554.3-115 + 575.1

М.Г.Таликина, В.Т.Комов, В.А.Гремячих, Ю.В.Чеботарева

ВЛИЯНИЕ РТУТИ НА МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МОЛОДИ ОКУНЯ *PERCA FLUVIATILIS* В ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН, пос. Борок, Ярославская обл.

Выявлен характер ответной реакции молоди окуня на уровне организма, органа и клетки при долговременном воздействии ртути в прудах с естественной кормовой базой. В испытанном экологическом варианте повышенная концентрация ртути в корме не оказывает общетоксического эффекта, однако ее очевидное цитотоксическое влияние приводит к заторможенному развитию репродуктивных желез у самок и тотальной дегенерации яичников у 23% подопытных рыб, а также к отклонению от нормы гистофизиологического состояния гепатоцитов.

Ключевые слова: ртуть, ооциты, гепатоциты, гистофизиология, дегенерация.

Введение. Во внутренних водоемах Волжского бассейна накопление ртути в организме рыб, реализуемое главным образом через звенья трофической цепи [20], имеет видовую, возрастную и экологическую специфику [2, 10].

Являясь тиоловым ядом, ртуть оказывает ингибирующее влияние на регуляцию белкового метаболизма клетки [23, 5] и процессы клеточной пролиферации [25, 22], на субклеточном уровне тяжелые металлы, включая ртуть, накапливаются преимущественно в ядрах [15].

Особенности механизма действия ртути, а также долгосрочные прогнозы о возрастании ртутной нагрузки на внутренние водоемы Европейской части России [10], обусловили интерес к изучению долговременного влияния этого токсиканта на адаптивные возможности организма рыб в раннем онтогенезе. В течение первых месяцев жизни происходит формирование жизненно важных органов и функциональных систем, участвующих в том числе в процессах детоксикации чужеродных веществ, и в этой связи важна оценка степени риска любого хронического воздействия токсикантов на рыб.

В настоящем сообщении приведены результаты длительного воздействия фоновой и повышенной концентраций ртути в корме на линейно-весовой рост, гаметогенез и цитоморфологию гепатоцитов сеголетков окуня *Perca fluviatilis*, развившихся в прудовых условиях.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на экспериментальной базе Института биологии внутренних вод РАН.

В два однотипных нерестовых пруда (60 м³) с естественной кормовой базой было высажено по 300 личинок окуня, перешедших на внешнее пи-

тание. В течение 5 месяцев, еженедельно, в контрольный пруд вносили рыбный фарш с содержанием ртути 0,03 мг/кг, в опытный – 0,30 мг/кг. В первые два месяца разовая масса вносимого фарша в каждый из прудов составляла 200 г, в последующие три – 400 г. Методика определения ртути приведена в статье [10]. По окончании опыта у рыб определяли длину тела (до конца чешуйчатого покрова), массу гонад, печени и тела без внутренностей. Относительными показателями функционального состояния исследованных органов служили гонадосоматический (ГСИ, %) и гепатосоматический (ГПСИ, %) индексы. Гистофизиологический анализ гонад и печени выполнен на поперечных депарафинированных срезах, окрашенных железным гематоксилином по Гейденгайну [7]. При определении этапа развития половых желез у сеголетков окуня руководствовались разработанными для этого вида шкалами зрелости [3, 4, 8]. Количественными показателями функционального состояния клеток паренхимы печени были: 1) их относительный размер, определяемый по числу ядер на контрольной площади (7000 мкм² в каждом из 15–20 участков среза); 2) объем ядер гепатоцитов $V = 4/3\pi r^3$ (для каждой особи высчитывали среднее из 30–40 измерений).

Для сравнения средних значений использовали критерий Стьюдента (t_c).

Результаты и обсуждение. Длительное применение повышенной концентрации ртути, по сравнению с фоновой, не выявило существенных различий в уровне накопления ее в теле сеголетков. У рыб из обеих экспериментальных групп этот показатель имел близкие значения и не превышал 0,07 мг/кг (табл.). Следует отметить, что

Значения морфобиологических и цитоморфологических показателей у экспериментальной молодежи окуня, $M \pm t$

Показатель	Содержание ртути в корме, мг/кг	
	0,03	0,30
Содержание ртути в сырой массе рыб, мг/кг	0,06±0,01	0,07±0,01
Выживаемость рыб, экз.	55	74
Масса тела без внутренностей, г	20,0±0,7	19,7±0,6
Масса семенников, г	1,9±0,1	1,8±0,1
Гонадосоматический индекс самцов, %	11,5±0,4	11,4±0,5
Масса яичников, г	0,11±0,02	0,07±0,004*
Гонадосоматический индекс самок, %	0,63±0,12	0,35±0,02*
Диаметр ооцитов старшей генерации, мкм	91,7±1,7	99,7±2,5
Масса печени, г	0,25±0,04	0,16±0,01*
Гепатосоматический индекс, %	1,34±0,12	0,92±0,05*
Число ядер гепатоцитов на контрольной площади среза	19,6±0,8	15,7±0,7*
Объем ядер гепатоцитов, $1 \cdot 10^{-6}$ мм ³	0,46±0,01	0,56±0,02*
Число рыб: самцы	18	12
самки	18	22
всего	36	34

Примечание. * – различия статистически значимы

при аналогичном режиме токсического воздействия в бетонированных бассейнах емкостью 0,16 м³ с искусственно поддерживаемой кормовой базой, концентрация ртути в организме подопытной молодежи окуня такого же возраста была выше, в контроле она составила 0,09±0,005, в опыте – 0,15±0,021 мг/кг [12]. Выявленная специфика накопления тестируемого яда отражает, по-видимому, различия в кормовой базе, пищевой избирательности, в скорости поступления токсиканта в организм рыб и в интенсивности его метаболического разрушения.

Из данных, приведенных в табл., видно также, что внесение в пруды повышенного количества ртути в течение длительного времени не оказало отрицательного влияния на линейно-весовой рост сеголеток и развитие репродуктивных желез у самцов. В семенниках рыб, как в контроле, так и в опыте, содержались половые клетки сперматогенного и спермиогенного ряда, включая спермии (рис. 1а). В природной среде это состояние половых желез окуня, оцениваемое по 6-балльной шкале, соответствует IV–V стадии зрелости [3, 8].

Яичники самок окуня из контрольной и опытной групп по составу половых клеток соответствовали I стадии зрелости [4, 8], для которой характерно наличие оогониев, ооцитов ранней профазы первого мейотического деления созревания и ооцитов протоплазматического роста

(рис. 1б). Как следует из табл., в варианте с повышенным содержанием ртути в корме, средние величины абсолютной и относительной массы гонад, достоверно меньше контрольных. Кроме того, гистологический анализ в этом же варианте выявил у 5 из 22 исследованных самок далеко зашедшую дегенерацию половых клеток (рис. 1в).

Указанные отклонения от нормы развития яичников, обусловлены, возможно, тем, что ртуть, присутствующая в тканях пресноводных рыб преимущественно (> 95%) в токсичной для них метилированной форме [18], обладает антимитотическим действием [26], а в ряде случаев выявлено ее угнетающее воздействие на биосинтез половых гормонов, обеспечивающих полноценное становление генеративной и соматической ткани в формирующихся репродуктивных органах [6, 17].

Последствия хронического влияния высокой концентрации ртути на морфофункциональное состояние печени проявились в снижении ее абсолютной и относительной массы (табл.). Сравнительный гистофизиологический анализ выявил заметную вакуолизацию цитоплазмы гепатоцитов, а результаты кариометрии – увеличение их размера, статистически подтвержденное снижением числа ядер на контрольной площади среза и увеличение объема ядер гепатоцитов. Микроскопическая картина печени в контроле и в опыте приведена на рис. 2.

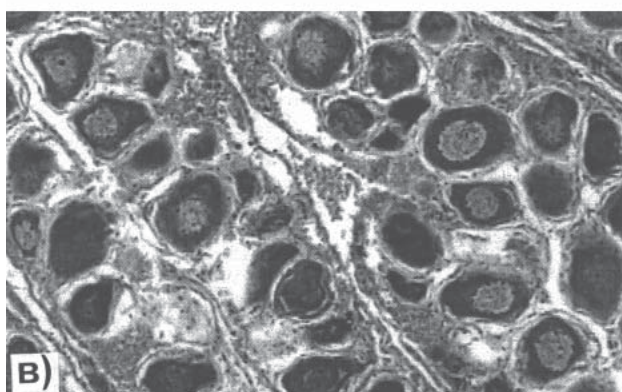
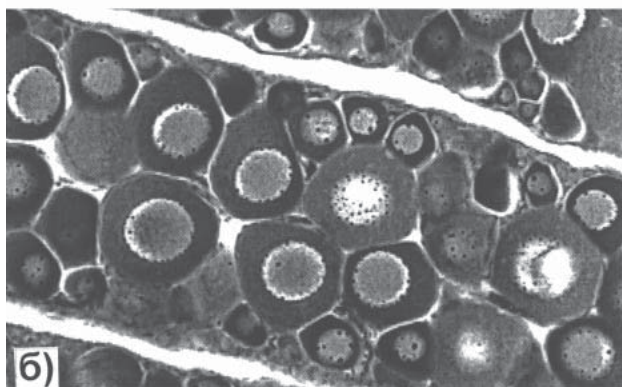


Рис. 1. Гистология репродуктивных желез у экспериментальной молоди окуня

а) в семеннике содержатся цисты с половыми клетками на разных этапах сперматогенеза; б) яичник ювенильной самки в контроле; в) тотальная дегенерация генеративной и стромальной ткани яичника у самки из опытной группы. Ок. 10, об. 10х. Железный гематоксилин по Гейденгайну

Сходные черты гистопатогенеза, свидетельствующие о дистрофических изменениях в паренхиматозных клетках печени, были обнаружены у экспериментальных сеголеток плотвы, карпа и окуня после воздействия органических ядов, в том числе и ртути в корме, в эмбриональный и постэмбриональный периоды развития [12, 13, 14]. По данным литературы, подобные изменения на цитоморфологическом уровне рассматриваются как неспецифический ответ паренхимы печени на повреждающие факторы

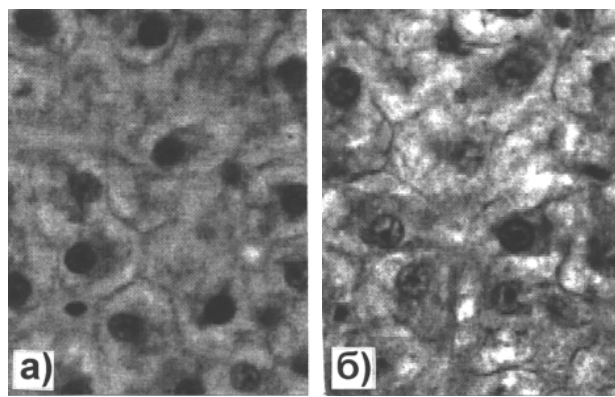


Рис. 2. Гистоструктура паренхимы печени

а) контроль – плотное расположение гепатоцитов с относительно однородной цитоплазмой; б) опыт – после ртутной нагрузки заметны увеличение размера гепатоцитов и их вакуолизация. Ок. 10, об. 100х. Железный гематоксилин по Гейденгайну

внешней среды, в том числе и токсические, и отражают нарушение и ослабление ее метаболической функции [16, 1, 11, 21, 19, 24].

Закключение. Выявлен характер ответной реакции молоди окуня на долговременное воздействие ртути в прудах с естественной кормовой базой на уровне организма, органа и клетки. В испытанном экологическом варианте повышенная концентрация ртути в корме не оказывает общетоксического эффекта, однако, ее очевидное цитотоксическое влияние приводит к заторможенному развитию репродуктивных желез у самок и тотальной их дегенерации у определенного числа подопытных рыб и к нарушению гистофизиологического состояния гепатоцитов.

Список литературы

1. Ильинских И.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск: Наука, 1992. – 272 с.
2. Комов И.Т. Природное и антропогенное закисление малых озер северо-запада России: причины, следствия, прогноз. Дис. ... докт. биол. наук. СПб.: Ин-т озераведения РАН, 1999. – 45 с.
3. Кулаев С.И. Наблюдения над изменением семенников окуня (*Perca fluviatilis* L.) в течение годового цикла // Русский зоологический журнал, 1927. – Т. 7. – Вып. 3. – С. 15-53.
4. Мейен В.А. Наблюдения над годовичными изменениями яичника у окуня (*Perca fluviatilis* L.) // Русский зоологический журнал, 1927. – Т. 7. – Вып. 4. – С. 75-113
5. Немова Н.Н., Клявьярйнен Е.И., Крупнова М.Ю. и др. Активность внутриклеточных протеолитических ферментов в тканях речного окуня *Perca fluviatilis* с различным содержанием ртути // Вопросы ихтиологии, 2001. – Т. 41. – № 5. – С. 704-707.

6. **Персов Г.М.** Дифференцировка пола у рыб. Л.: Изд-во ЛГУ, 1975. — 131 с.
7. **Ромейс Б.** Микроскопическая техника. М.: Иностран. лит-ра, 1953. — 718 с.
8. **Сакун О.Ф., Буцкая Н.А.** Определение стадий зрелости и изучение половых циклов у рыб. М.: Рыбное хоз-во, 1963. — 47 с.
9. **Степанова И.К., Комов В.Т.** Ртуть в абиотических и биотических компонентах озер северо-запада России // *Экология*, 1996. — № 3. — С. 198-202.
10. **Степанова И.К., Комов В.Т.** Биоценологические закономерности накопления ртути в рыбе внутренних водоемов // *Экология*, 2002. — № 3. — С. 334-335.
11. **Сякина И.Г., Арбузова Л.Л., Жадько Е.А.** Гистоморфологические изменения в органах камбалы *Pleuronectes obscurus* из загрязненной части Амурского залива Японского моря // *Биология моря*, 2000. — Т. 26. — № 4. — С. 265-271.
12. **Таликина М.Г., Комов В.Т.** Реакция молоди карпа *Suiprinus carpio* и окуня *Perca fluviatilis* на длительное воздействие ртути // *Вопросы ихтиологии*, 2003. — Т. 43. — № 1. — С. 127-131.
13. **Таликина М.Г., Изюмов Ю.Г., Чеботарева Ю.В.** Отдаленные генотоксические ответы у сеголеток плотвы *Rutilus rutilus* после воздействий органических ядов на спермии родителей // *Вопросы ихтиологии*, 2003. — Т. 43. — № 3. — С. 411-417.
14. **Таликина М.Г., Комов В.Т., Чеботарева Ю.В. и др.** Комплексная оценка длительного воздействия ртути на молодь плотвы *Rutilus rutilus* в экспериментальных условиях // *Вопросы ихтиологии*, 2004. — Т. 44. — № 6. — С. 847-852.
15. **Трахтенберг И.М., Иванова Л.А.** Тяжелые металлы и клеточные мембраны // *Медицина труда и промышленная экология*, 1999. — № 11. — С. 28-32.
16. **Халилов Ф.Х., Инюшин В.М.** К сравнительной оценке содержания ДНК в ядрах печени некоторых рыб // *Цитология*, 1966. — Т. 8. — № 3. — С. 415-417.
17. **Beverly A.S., Gross T.S., Ruessler D.S.** The influence of methyl mercury on reproductive biomarkers in aquatic species // 4 International Symposium on Aquatic Animal Health, New Orleans, La Sept. 1-5, 2002: ISAAH 2002: Proceedinds. New Orleans, 2002. — P. 98.
18. **Bloom N.S.** On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue // *Canad. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1992. — V. 49. — P. 1010-1017.
19. **Cengiz E., Unlii E., Balci K.** The histopathological effects of thiodan^R on the liver and gut of mosquitofish, *Gambusia affinis* // *J. Environ. Sci. and Health*, 2001. — V. 36. — № 1. — P. 75-85.
20. **Hall B.D., Bodaly R.A., Furge R.J.P. et al.** Food as the dominant pathway of methylmercury uptake by fish // *Water, Air, and Soil Pollut.*, 1997. — V. 100. — № 1. — P. 13-24.
21. **Jones B.E., Czaja M.J.** Mechanisms of hepatic toxicity. III. Intracellular signaling in response to toxic liver in jury // *Amer. J. Physiol.*, 1998. — V. 275. — № 5. — P. 874-878.
22. **Massaro E.J.** Inhibition of progression throuth the S Phase of the cell cycle: a mechanism of cytotoxicity of methylmercury // *Mercury pollution: integration and synthesis*. CRC Press, Inc. Lewis Publishers, 1994. — P. 677-688.
23. **Olson F.C., Massaro E.J.** Effects of methylmercury on murine fetal amino acid uptake, protein synthesis and palate closure // *Teratology*, 1977. — № 16. — P. 187-194.
24. **Ortiz J.B., Gonzalez de Canales M.L., Sarasquete C.** Histopathological changes induced by lindane (γ -HCH) in various organs of fishes // *Sci. mar.*, 2003. — V. 67. — № 1. — P. 53-61.
25. **Vogel D.G., Margolis R.L., Mottet N.K.** The effects of methylmercury binding to microtubules // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1985. — V. 80. — № 5. — P. 473-486.
26. **Wester P.W.** Histopathological effects of environmental pollutants β -HCH and methylmercury on reproductive organs in freshwater fish // *Comp. Biochem. Physiol.*, 1990. — V. 100C. — № 1-2. — P. 237-239.

Материал поступил в редакцию 11.01.06.

M.G.Talikina, V.T.Komov, V.A.Gremyachikh, Yu.V.Chebatoryova

EFFECT OF MERCURY ON MORPHOPHYSIOLOGICAL AND CYTOMORPHOLOGICAL INDICATORS IN PERCH YOUNG *PERCA FLUVIATILIS* IN CHRONIC EXPERIMENTS

I.D.Papanin Institute of Inland Waters Biology, Russian Academy of Sciences settlement, Borok, Yaroslav Region

It was found out the character of responses from the perch young at a level of the organisms, organ and cell at long exposure to mercury in ponds with a natural fodder base. Under ecological conditions tested, an increased concentration of mercury in fodder did not produce a general toxic effect but its obvious cytotoxic influence led to inhibited development of reproductive glands in females and a total degeneration of ovaries in 23% of fishes under test as well as to the deviation from a normal histophysiological state of hepatocytes.

УДК 595.324.2.08+[574.64:595.324.2] 08

Г.А.Папченкова

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕГРАДАЦИИ ГЕРБИЦИДА «РАУНДАП»
В ОСТРЫХ ОПЫТАХ С *DAPHNIA MAGNA****Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, пос. Борок, Ярославская обл.*

С целью исследования деградации растворов «Раундапа», хранящихся в разных условиях, проведен эксперимента по выживаемости *Daphnia magna* в растворах токсиканта в диапазоне концентраций 0,008–0,50 мл/л. Установлено, что скорость деградации растворов «Раундапа» зависит от условий хранения и концентрации. При хранении на свету в аэробных условиях деградация растворов происходит значительно быстрее, чем в темноте в анаэробных условиях. Достоверно значимые различия в гибели дафний в диапазоне концентраций 0,03–0,06 мл/л при хранении растворов на свету в аэробных условиях появляются на 5–6 день, а в растворах с концентрацией 0,12 мл/л – на 9-й день.

Ключевые слова: деградация, «Раундап», *Daphnia magna*.

Введение. В последнее десятилетие в России в качестве эффективного средства для борьбы с сорняками и осветления лесов активно используется гербицид широкого спектра действия «Раундап», который состоит из активного вещества глифосата [N-(phosphonomethyl) glycine], поверхностно-активного вещества полиэтоксилат таллоamina (polyethoxylated tallowamine) и воды. Понятно, что при использовании этого препарата вполне возможно попадание его в открытые водоемы в результате выноса дождевыми водами и ветром при распылении. Поэтому выяснение токсичности данного средства для гидробионтов является важной задачей. В литературе имеется немало данных по воздействию «Раундапа» на фитогидробионтов [5 и др.]. Значительно меньше таких данных по зоогидробионтам. Глифосат разлагается присутствующими в почве и воде аэробными и анаэробными микроорганизмами, поэтому считается экологически нестойким гербицидом [3]. Из литературы [4] известно, что минимальный период полураспада глифосата в воде – две недели, в то же время в естественных не текущих водных экосистемах он варьирует от семи до десяти недель.

Перед проведением запланированного длительного хронического эксперимента с «Раундапом», где в качестве тест-объекта используется *Daphnia magna*, необходимо было выяснить, как долго может быть использована приготовленная среда (раствор «Раундапа») без статистически достоверного уменьшения токсичного воздействия на объект. Для этого мы решили сравнить выживаемость дафний в свежеприготовленном растворе токсиканта и в растворе, хранящемся в разных условиях.

В настоящей работе изложены результаты опыта по исследованию деградации «Раундапа» на примере гибели *D. magna* в растворах токсиканта разных концентраций, хранившихся при разных условиях, отчасти имитирующих некоторые природные условия.

Материал и методы исследования. Работа выполнена с учетом рекомендаций «Методики определения токсичности воды по смертности и изменению плодовитости дафний» [1]. Опыт проводили на культуре *Daphnia magna*, размножающейся в условиях лаборатории партеногенезом. Культура непрерывно поддерживается в лаборатории в 1,5 литровых аквариумах с дехлорированной водопроводной водой при 22–23°C. Режим освещения: 16 ч – день и 8 ч – ночь. Рачков, возраст которых был менее 24 часов, ежедневно рассаживали в стаканы, объемом 250 мл с 125 мл среды по 10 штук в каждый, не менее чем в трех повторностях для каждой концентрации токсиканта. Количество повторностей зависело от наличия народившейся молоди в данный день. После 24-часовой экспозиции пересчитывали оставшихся в живых особей. Рачков кормили суспензией клеток водоросли *Chlorella vulgaris*, культура которой поддерживается в лаборатории.

В качестве экспериментальной среды использовали растворы, приготовленные из средства от сорняков, имеющее торговое название «Раундап». Производитель – компания Монсанто (США), расфасовано ОАО ВИРТАК-ПРОМЭКС (Россия). Среда была приготовлена в первый день эксперимента в концентрациях 0,50, 0,25, 0,125, 0,06, 0,03, 0,015, 0,008 и 0 (контроль) мл/л, приготовление каждого последующего раствора

Таблица

Выживаемость (M±m, n = 3-8) D. тагла в растворе «Раундапа», хранившегося в разных условиях

Концентрация среды, мг/л	Время хранения среды (сутки)															
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12	14	16			
<i>Раствор хранился в темноте при комнатной температуре в анаэробных условиях</i>																
0 (Контроль)	10,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00	9,67±0,333	10,00±0,00	10,00±0,00	9,67±0,333	9,67±0,333	9,67±0,333	10,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00	9,67±0,333		
0,008	10,00±0,00	9,67±0,333	10,00±0,00	10,00±0,00	9,67±0,333	10,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00	9,67±0,333	10,00±0,00	10,00±0,00	9,67±0,333		
0,015	9,50±0,342	9,67±0,333	9,00±0,00	9,67±0,333		10,00±0,00	10,00±0,00	9,67±0,333	9,67±0,333	10,00±0,00	8,33±1,202	9,33±0,667	10,00±0,00	10,00±0,00		
0,03	7,00±0,866	7,00±1,000	6,60±0,400	8,63±0,365	8,33±0,667	7,13±0,934	9,67±0,333	8,67±1,333	9,33±0,667	9,33±0,667	9,00±0,577	4,33±1,453	7,00±0,577	7,00±0,577		
0,06	2,38±0,375	2,40±0,510	2,60±0,510	2,88±0,295	2,60±0,510	4,13±0,854	3,67±0,667	2,67±0,667	3,50±0,866	3,33±0,333	3,50±0,645	3,33±0,333	3,00±0,707	3,00±0,707		
0,12	0,33±0,333	0,33±0,333	2,00±2,000	0,33±0,333	1,67±1,667	1,50±0,428	1,67±0,667	1,00±0,577	1,67±0,882	1,67±0,333	2,00±1,000	1,33±0,333	1,00±1,000	1,00±1,000		
0,25	0,00±0,00			0,00±0,00	0,33±,333	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00		
0,50	0,00±0,00			0,00±0,00		0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00		
<i>Раствор хранился на свету при комнатной температуре в аэробных условиях</i>																
Время хранения среды (сутки)																
0	10,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00	9,67±0,333	10,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00	9,67±0,333	9,67±0,333	9,67±0,333	10,00±0,00	9,67±0,333	9,67±0,333		
0,008	10,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00		9,67±0,333		10,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00	9,67±0,333	10,00±0,00	9,67±0,333	9,67±0,333	9,67±0,333		
0,015	9,50±0,342	9,25±0,479	9,17±0,477	8,67±0,667	9,67±0,333		9,67±0,333	9,67±0,333	9,67±0,333	9,00±0,577	9,67±0,333	9,00±0,577	9,67±0,333	9,67±0,333		
0,03	7,00±0,866	5,57±1,192	8,00±0,945	7,80±0,374	8,33±0,760	5,25±1,436	9,67±0,333	8,67±1,333	8,67±1,333	9,67±0,333	5,00±1,732	9,67±0,333	10,00±0,00	10,00±0,00		
0,06	2,38±0,375	2,57±1,110	3,00±0,756	3,80±0,583	3,57±0,481	4,67±0,333	5,60±0,812	5,00±1,080	7,17±0,307	7,17±0,307	7,33±0,333	7,60±0,510	8,00±0,316	8,00±0,316		
0,12	0,33±0,333	0,00±0,00	1,83±0,749	1,67±0,882	1,50±0,806	1,00±,707	1,33±0,333	2,33±0,882	3,00±0,577	3,00±0,577	2,67±0,333	3,67±0,333	3,33±0,333	3,33±0,333		
0,25	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00		0,50±0,342	0,00±0,00	0,33±0,333	0,00±0,00	0,67±0,667	0,67±0,667	0,00±0,00	0,00±0,00	1,00±0,577	1,00±0,577		
0,50	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00		0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00		

Примечание. Жирным шрифтом выделены показатели выживаемости достоверно отличающиеся при p < 0,05 в хранившемся растворе по сравнению со свежеприготовленным раствором

сводилось к разбавлению предыдущего в два раза. Хранились растворы в следующих условиях: 1) в темноте при комнатной температуре без доступа воздуха (Т), что имитировало условия почвенных и грунтовых вод; 2) при дневном свете с доступом воздуха (С) – имитация условий открытых водоемов. Оставшийся неиспользованным исходный препарат хранился в холодильнике во вскрытой, но защищенной от доступа воздуха ампуле (А).

Средство представляет собой водный раствор 360 г/л глифосата, т.е. в пересчете на глифосат концентрации приготовленных растворов были 180, 90, 45, 22,5, 11,25, 5,62, 2,81 и 0 (контроль) мг/л. Поскольку в состав «Раундапа» кроме глифосата входит, так называемая «инертная» добавка, которая также в определенной степени токсична, то все расчеты мы приводили непосредственно на продукт «Раундап», т.е. считали, сколько миллилитров гербицида растворено в 1 литре воды (мл/л). В эксперименте использовали дехлорированную водопроводную воду для культивирования дафний.

Эксперимент проводили 2 раза в течение двух недель.

Результаты и их обсуждение. Объединенные результаты двух экспериментов представлены в таблице. Как видно из приведенных в ней данных, достоверно значимые различия в гибели дафний в растворах, хранившихся на свету в аэробных условиях, появляются на 5–6 день эксперимента. Так, если в свежем растворе концентрации 0,03 мл/л гибель дафний составляла 30%, то на 6-й день она снижалась до 3%; при концентрации 0,06 мл/л доля погибших дафний с 76% в свежем растворе на 5-й день эксперимента уменьшалась до 53%; при концентрации 0,12 мл/л на 9-й день величина гибели падала с 97 до 70%. При низких концентрациях среды (0,008 и 0,015 мл/л) гибели рачков практически не наблюдалось. При высоких концентрациях (0,25 и 0,50 мл/л), наоборот, она была 100% в течение всего времени эксперимента, поэтому при этих концентрациях о степени деградации токсиканта по смертности дафний судить невозможно. Следует отметить, что при малых концентрациях токсиканта в среде, его токсичность уменьшается значительно быстрее, чем в более концентрированных средах, т.е. скорость деградации растворов зависит от их концентрации.

В растворах, хранившихся в темноте при комнатной температуре в анаэробных условиях, устойчивой достоверно значимой разницы по выживаемости дафний в растворах «с возрастом» по сравнению со свежеприготовленным получено не было. Т.е. относительно хранения при этих условиях можно сделать вывод, что в течение 2-х

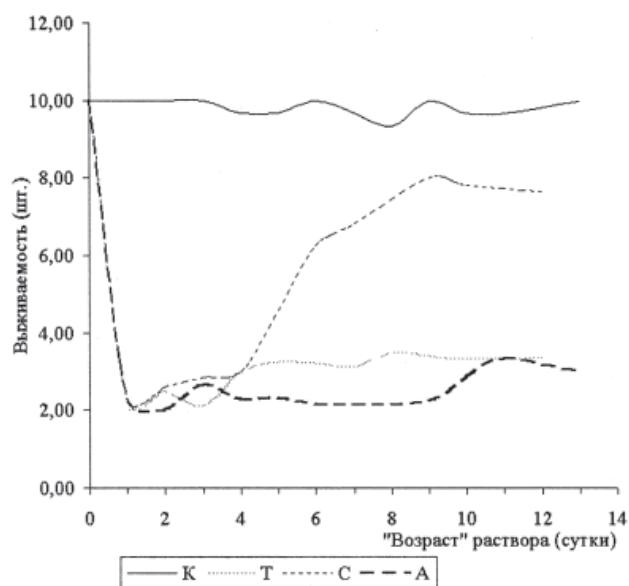


Рис. Динамика выживаемости *D. magna* при экспозиции в растворах «Раундапа» с концентрацией 0,06 мл/л

Т – раствор хранился в темноте при комнатной температуре в анаэробных условиях; С – хранился при дневном свете в аэробных условиях; А – исходный препарат во вскрытой, но защищенной от доступа воздуха ампуле, хранящийся в холодильнике; К – контроль (вода)

недель деградация токсиканта, если и имеется, то она незначительна.

На рис. представлены результаты выживаемости рачков в хранившихся в условиях Т и С растворах самой информативной в данном эксперименте концентрации 0,06 мл/л, а также в растворе, ежедневно готовящемся из исходного гербицида «Раундап», сохраняемого в ампуле (А) и приведена выживаемость в чистой воде (К – контроль). Как видно из графика, количество выживших дафний в растворе, хранившемся на свету в аэробных условиях (С) уже на 5–6-й день увеличилась с 24% (1-й день опыта) до 50%, а к концу 2-х недельного эксперимента их количество приблизилось к контролю (К). В растворах же, хранившихся при условиях Т и А выживаемость практически не увеличилась за время проведения эксперимента. Более того, в растворе исследуемого токсиканта с концентрацией 0,06 мл/л, приготовленного из «Раундапа», хранившегося в течение 4-х месяцев в холодильнике (А), выживаемость увеличилась лишь до 39%.

Выводы. 1. Скорость деградация растворов «Раундапа» зависит от условий хранения и от концентрации.

2. При хранении на свету в аэробных условиях деградация растворов происходит значительно быстрее, чем в темноте в анаэробных условиях.

3. Достоверно значимые различия в гибели дафний в диапазоне концентраций 0,03–0,06 мл/л при хранении растворов на свету в аэроб-

ных условиях появляются на 5–6 день, а в растворах концентрацией 0,12 мл/л – на 9-й день.

4. При хранении растворов в темноте в анаэробных условиях, деградация токсиканта в течение 2-х недель незначительна.

Список литературы

1. *Токсикологические методы контроля // Методика определения токсичности воды по смертности и изменению плодовитости дафний. Государственный комитет РФ по охране окружающей среды. М., 1999. – 35 с.*

2. *Cox C. Glyphosate // Journal of Pesticide Reform, 2004. – V. 24. – №. 4. – P. 11–15.*

3. *Duke S.O. Glyphosate // In: Kearney P.C.,*

Kaufman D.D. (eds) Herbicides: chemistry, degradation and mode of action. Marcel Dekker. New York, 1988. – P. 1–58.

4. *Reinert K.H., Rodgers J.H. Fate and persistence of aquatic herbicides // Rev Environmental Contamination and Toxicology, 1987. – V. 98. – P. 61–91.*

5. *Saenz M.E., Di Marzio W.D., Alberdi J.L. et al. Effects of Technical Grade and a Commercial Formulation of Glyphosate on Algal Population Growth // Bull. Environmental Contamination and Toxicology, 1997. – V. 59. – P. 638–644.*

Материал поступил в редакцию 22.12.05.

G.A.Papchenkova

**INVESTIGATION OF THE DEGRADATION OF ROUNDUP HERBICIDE
IN ACUTE EXPERIMENTS ON *DAPHNIA MAGNA***

I.D.Papanin Institute of Inland Waters Biology, Russian Academy of Sciences, Borok

To investigate the degradation of «Roundup» solutions stored under different conditions, an experiment on survival of *Daphnia Magna* was conducted in toxicants solutions in the concentration range of 0,008 to 0,50 ml/l. It was revealed that the degradation speed of Roundup solutions depends on storage conditions and concentrations. Stored by the light under aerobic conditions, solutions degrade significantly faster than in the dark under anaerobic conditions. When stored by the light under aerobic conditions, trustworthy significant differences in daphnia death in the range of concentrations of 0.03 to 0.06 ml/l appear by the 5th or 6th day and in solutions of 0.12 ml/l concentration by the 9th day.

УДК [615.916:546.17].015.44

**Л.П.Сычева, С.М.Шереметьева*, М.А.Коваленко,
М.А.Пинигин, Л.А.Тепикина, В.С.Журков**

**ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО И ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
ДИОКСИДА АЗОТА ПОЛИОРГАНЫМ МИКРОЯДЕРНЫМ МЕТОДОМ**

ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н.Сыгина РАМН, Москва

Диоксид азота в концентрациях 10,1, 21,1 и 44,93 мг/м³ не оказывал цитогенетического действия на клетки корстного мозга, легких и мочевого пузыря крыс при ингаляции в течение 4, 48 или 120 ч. Установлено цитотоксическое действие вещества во всех экспериментальных группах, характеризующееся повышением доли полихроматофильных эритроцитов, частоты двуядерных клеток и клеток с центральной ядерной перетяжкой в мочевом пузыре и легких крыс.

Ключевые слова: диоксид азота, микроядерный тест, легкие, мочевой пузырь, двуядерные клетки.

Введение. Диоксид азота (NO₂) является одним из основных загрязнений атмосферного воздуха. Он поступает в окружающую среду с выбросами предприятий черной металлургии, ТЭЦ, и других производств, сжигающих топливо, а также с автомобильным транспортом. Вопрос о мутагенной активности диоксида азота

остается спорным. Мутагенный эффект вещества установлен в бактериальном тесте Эймса, в тестах по выявлению разрывов ДНК и хромосомных aberrаций в легких крыс [6], цитогенетических повреждений в лимфоцитах периферической крови людей при высокой концентрации вещества в воздухе рабочей зоны [9]. Имеются единичные указания на канцерогенный эффект диоксида азота у мышей при хроническом

* Фрагмент диссертационной работы

действию высоких доз [6]. Целью данного исследования является изучение цитогенетического и цитотоксического действия диоксида азота с помощью предложенного нами полиорганного микроядерного метода, включающего классический микроядерный метод на полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ) костного мозга, анализ эффекта в органе мишени – легких и органе выделения – мочевом пузыре [4].

Материал и методы исследования. Эксперимент проведен на самцах белых неинбредных крыс, полученных из питомника Крюково, массой 350–400 г. Животных содержали при 12-часовом световом режиме в условиях свободного доступа к воде и пище. Первая группа крыс дышала чистым воздухом и служила контролем. Крысы второй-пятой групп находились в условиях ингаляционного воздействия диоксида азота в специальных 730-литровых камерах. Вторая группа подвергалась воздействию вещества в концентрации 44,93 мг/м³ в течение 4 ч, фиксацию органов проводили через 5 суток. Крысы третьей (10,1 мг/м³) и пятой групп (21,1 мг/м³) – круглосуточно в течение двух суток; четвертая группа (10,1 мг/м³) – в течение 5 суток. Фиксацию органов крыс 3–5 групп проводили сразу же после окончания воздействия диоксида азота.

Препараты клеток костного мозга готовили по стандартной методике в нашей модификации. Суспензионные препараты клеток легких и мо-

чевого пузыря получали путем фиксации органов в формалине с последующей щелочной диссоциацией в соответствии с [5]. Микроскопический анализ зашифрованных препаратов проводили при увеличении 1000. Анализировали по 1000 полихроматофильных эритроцитов костного мозга (ПХЭ), клеток легких (пневмоцитов I и II типа и альвеолярных макрофагов суммарно) и эпителиальных клеток мочевого пузыря. В костном мозге для оценки цитотоксичности учитывали долю полихроматофильных эритроцитов от суммы всех эритроцитов при анализе 200 эритроцитов. В легких и мочевом пузыре в качестве показателей цитогенетического действия учитывали клетки с микроядрами и протрузиями, которые представляют собой шаровидные, нитевидные или иной формы ядерные структуры в цитоплазме, четко отграниченные от ядра и соединяющиеся с ним перемычкой. Определяли частоту двуядерных клеток и клеток с центральной ядерной перетяжкой как показателей цитотоксического действия. В мочевом пузыре определяли также долю клеток с атипичной формой ядра.

Для статистической обработки результатов использовали программу STATISTICA for Windows. Показатели в опытных и контрольной группах сравнивали с помощью критерия χ^2 .

Результаты и обсуждение. Показатели цитогенетического и цитотоксического эффекта диокси-

Таблица

Цитогенетический и цитотоксический эффект диоксида азота при исследовании клеток костного мозга, легкого и мочевого пузыря крыс ($\bar{x} \pm m$)

Показатель	Группа животных, концентрация и длительность ингаляции				
	1 группа контроль	2 группа 44,93 мг/м ³ , 4 ч	3 группа 10,1 мг/м ³ , 48 ч	4 группа 21,1 мг/м ³ , 48 ч	5 группа 10,1 мг/м ³ , 120 ч
Количество животных	6	6	6	6	7
<i>Костный мозг</i>					
Доля клеток с микроядрами, ‰	1,16±0,40	0,67±0,21	0,16±0,16	2,0±0,58	1,16±0,48
ПХЭ/все эритроциты	0,48±0,01	0,64±0,03*	0,56±0,01*	0,69±0,04*	0,72±0,04*
<i>Легкие</i>					
Доля клеток с микроядрами, ‰	0,50±0,34	0,83±0,54	0,50±0,34	0,33±0,21	0,28±0,18
Доля клеток с протрузиями, ‰	1,00±0,36	1,33±0,33	1,67±0,49	2,33±0,61	1,86±0,51
Доля двуядерных клеток, ‰	8,17±0,94	10,83±1,14	11,5±1,99	8,00±1,50	13,14±4,47*
Доля клеток с ядерной перетяжкой, ‰	8,17±1,78	10,50±1,73	13,00±4,16*	13,00±2,26*	9,71±1,32
<i>Мочевой пузырь</i>					
Доля клеток с микроядрами, ‰	0,33±0,21	0,33±0,21	0,17±0,17	0,50±0,34	0,14±0,14
Доля клеток с протрузиями, ‰	1,67±0,67	1,83±0,70	2,00±0,36	2,50±1,06	1,43±0,48
Доля двуядерных клеток, ‰	3,33±0,80	7,00±2,61*	9,83±2,36*	7,33±2,60*	8,57±2,06*
Доля клеток с ядерной перетяжкой, ‰	21,67±4,28	23,50±5,09	28,00±2,29*	41,83±15,46*	35,14±9,07*
Доля клеток с атипичной формой ядра, ‰	80,50±9,35	105,00±14,78*	93,17±16,59*	78,83±8,50	98,43±9,53*

Примечание. * – значимое различие с контролем по критерию χ^2 ($p < 0,05$)

да азота в клетках костного мозга, легких и мочевого пузыря представлены в табл. Цитотоксическое действие диоксида азота на клетки костного мозга, легких и мочевого пузыря отражено на рис.

Костный мозг. Частота ПХЭ с микроядрами в среднем в контрольной группе составила 1,16‰; в опытных группах – от 0,16‰ до 2‰. Межгрупповые отличия этих показателей не достоверны. В опытных группах отмечено достоверное увеличение частоты ПХЭ на 17-50% по сравнению с контролем. Корреляционный анализ данных по Спирмену показал сильную высоко достоверную связь этого показателя со временем воздействия ($R = 0,79$; $df = 60$; $p < 0,001$).

Легкие. Средняя частота клеток легкого с микроядрами в контрольной группе животных составила 0,5‰, в опытных группах от 0,28 до 0,83‰. Частота клеток с легкого с ядерными протрузиями варьировала в пределах 1,67–2,33‰ в опытных группах при 1‰ в контроле. Отличия показателей в опытных группах от контроля не достоверны. Частота двуядерных клеток статистически значимо увеличилась от 8,17‰ в контроле до 13,14‰ в опытной группе при пятисуточной ингаляции диоксида азота. Корреляционный анализ показал зависимость этого показателя от длительности воздействия ($R = 0,36$; $df = 60$; $p < 0,05$). Частота клеток с центральной ядерной перетяжкой достоверно увеличилась через двое суток воздействия до 13,00‰ по сравнению с 8,17‰ в контрольной группе.

Мочевой пузырь. Частота эпителиальных кле-

ток с микроядрами и протрузиями в мочевом пузыре крыс опытных групп варьировала в пределах 0,14–0,5‰ и 1,43–2,5‰ и не отличалась от контроля. Отмечено достоверное 2–3-кратное повышение частоты двуядерных клеток во всех опытных группах по сравнению с контролем, частоты клеток с ядерными перетяжками на 29–93% в 3–5 группах, частоты клеток с атипичной формой ядра на 15–30% (2, 3 и 5 группы).

Исследованные концентрации диоксида азота значительно превышают нормативы этого вещества для атмосферного воздуха. Максимальная разовая и среднесуточная ПДК, принятые в Российской Федерации, составляют 0,085 мг/м³ и 0,04 мг/м³ соответственно [2]. Среднегодовая ПДК в США составляет 0,1 мг/м³. ВОЗ и ЕС рекомендует годовую допустимую концентрацию NO₂ в атмосферном воздухе – 0,04 мг/м³. Референтная концентрация для хронического ингаляционного воздействия – 0,04 мг/м³ [1,6]. Следовательно, испытанные концентрации в 100 и более раз превышают рекомендуемые нормативы. При данных условиях эксперимента цитогенетический эффект диоксида азота не выявлен классическим микроядерным методом на клетках костного мозга, а также в органах дыхательной и выделительной системы. Отмеченный некоторыми авторами генотоксический эффект наблюдали при более высоких концентрациях вещества. Диоксид азота вызывал образование однонитевых разрывов ДНК в легких крыс *in vivo* после 5-часовой ингаляции 94 мг/м³ и 16-ча-

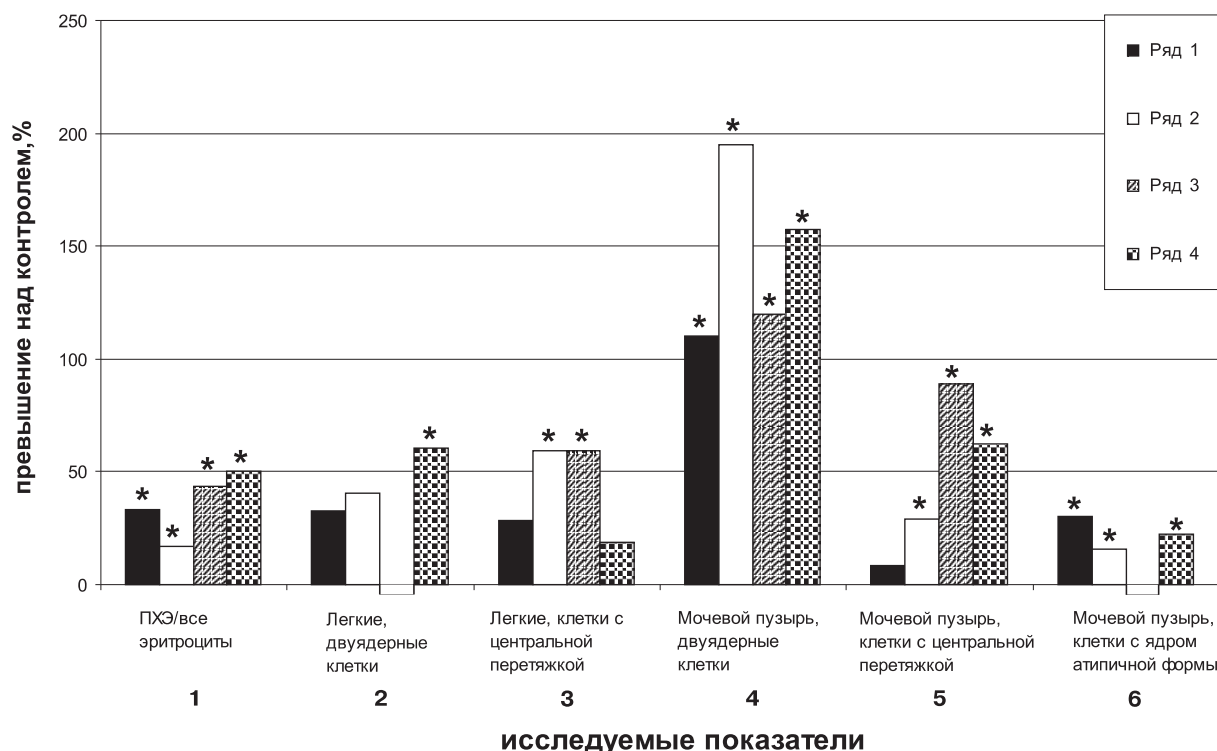


Рис. Цитотоксическое действие диоксида азота на клетки костного мозга, легких и мочевого пузыря крыс
 Ряд 1 – 44,93 мг/м³, 4 ч; Ряд 2 – 10,1 мг/м³, 48 ч; Ряд 3 – 21,1 мг/м³, 48 ч; Ряд 4 – 10,1 мг/м³, 120 ч

совой ингаляции в концентрации 54 мг/м³ [11]. Isomura K. с соавторами [8] показал повышение частоты мутаций и хромосомных aberrаций в клетках легких крыс при действии 50 мг/м³ диоксида азота в течение 3 ч. В то же время двухчасовая ингаляция диоксида азота в концентрации 75 мг/м³ не увеличивала частоту хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови обследуемых [10].

Токсическое действие препарата отмечено нами во всех исследованных органах. Повышение частоты ПХЭ и, соответственно, снижение частоты нормохромных эритроцитов, показано начиная с 4-часовой ингаляции. По данным литературы, снижение содержания эритроцитов и гемоглобина в крови мышей при ингаляции 6–19 мг/м³ NO₂ наблюдается уже через час после воздействия [1]. По-видимому, высокие концентрации диоксида азота приводят к гибели эритроцитов, что стимулирует эритропоэз и образование ПХЭ. Повышение частоты двуядерных клеток и клеток с центральной ядерной перетяжкой в легких и мочевом пузыре, по-видимому, также связано с токсическим действием вещества. Считают, что образование двуядерных клеток происходит в результате деления ядра без деления цитоплазмы. Можно предположить два механизма, определяющих увеличение частоты двуядерных клеток при токсическом действии вещества. Это может быть прямое или опосредованное повреждающее действие вещества на цитоскелет, приводящее к нарушению цитотомии. В то же время образование двуядерных клеток (клеток с удвоенным геномом) является косвенным показателем усиления пролиферации ткани как компенсаторный ответ на повреждающее действие вещества [3]. Прямые доказательства увеличения пролиферативной активности клеток легкого получены при анализе включения НЗ-тимидина в клетки бронхиального эпителия крыс, которое происходит уже через час после воздействия NO₂ в концентрации 36,7 мг/м³. В пневмоциты II типа НЗ-тимидин включается на 5 сутки после воздействия [7].

С этих позиций можно рассматривать и повышение частоты клеток с центральными ядерными перетяжками. Такие клетки могут быть образованы в результате повреждения веретена деления в процессе митоза, что приводит к нарушению кариотомии, или в результате непрямого деления ядра (амитоза). Отмечена средняя значимая корреляция этого показателя с частотой двуядерных клеток ($R = 0,47$; $df = 60$; $p < 0,01$).

Среди исследованных клеточных популяций наиболее чувствительными к цитотоксическому действию диоксида азота оказались эпителиальные клетки мочевого пузыря (рис.). Почти все показатели, характеризующие ци-

тотоксическое действие, достоверно превышали контрольный уровень, причем, частота двуядерных клеток была в 2–3 раза выше контроля. Диоксид азота, в основном, поступает в организм через верхние дыхательные пути, растворяется в жидкостях легких, что может приводить к образованию NO₂⁻ и NO₃⁻, которые захватываются и транспортируются через кровь к другим органам [6]. Считается, что диоксид азота оказывает наиболее выраженное действие на органы дыхания. Однако при действии этого вещества страдают и другие органы. Нефротоксический синдром (повышение альбумина, α -, β - и γ -глобулина в моче) отмечен у морских свинок, экспонированных в течение 14 часов к диоксиду азота в концентрации 0,94 мг/м³. Протеинурия выявлена и при более низкой экспозиции – 0,75 мг/м³ в течение 4 часов [6]. Это подтверждает наши данные и свидетельствует о системном токсическом эффекте диоксида азота.

Выводы. 1. Диоксид азота не оказывал цитогенетического действия на клетки легких, костного мозга и мочевого пузыря крыс в условиях проведенных исследований.

2. Установлено цитотоксическое действие вещества на животных всех экспериментальных групп, характеризующееся повышением доли полихроматофильных эритроцитов, частоты двуядерных клеток и клеток с центральной ядерной перетяжкой в мочевом пузыре и легких крыс и увеличивающееся в зависимости от длительности воздействия.

Список литературы

1. *Вредные вещества в промышленности / Под ред. Н.В.Лазарева и И.Д.Гадаскиной. Л.:Химия, 1977. – Т. III. – С. 108-111.*
2. *Опищенко Г.Г., Новиков С.М., Рахманин Ю.А. и др. Основы оценки риска для здоровья при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. М., 2002. – С. 347.*
3. *Рябинина З.А., Бенюш В.А. Полиплоидия и гипертрофия клеток в процессах роста и восстановления. М.: Медицина, 1973. – 207 с.*
4. *Сычева Л.П., Журков В.С., Рахманин Ю.А. Новый подход к диагностике мутагенных и канцерогенных свойств факторов окружающей среды // Гигиена и санитария, 2003. – № 6. – С. 87-90.*
5. *Сычева Л.П., Юрченко В.В., Журков В.С. и др. Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микроядерным методом. Методические рекомендации. М.: Межведомственный научный совет по экологии человека и гигиене окружающей среды, 2001. – 21 с.*
6. *Environmental Health Criteria 188. //Nitrogen oxides 2nd edition. –WHO, Geneva.-1997.-550 p.*

7. *Evans M.J., Dekker N.P., Cabral-Anderson L.J. et al. Quantitation of damage to the alveolar epithelium by means of type 2 cell proliferation // Am Rev Respir Dis., 1978. — V. 118. — № 4. — P. 787-790.*

8. *Isomura K., Chikahira M., Terannishi K. et al. Induction of mutations and chromosome aberrations in lung cells following in vivo exposure of rats to nitrogen oxides // Mutat. Res., 1984. — V. 136. — P. 119-125.*

9. *Jodinger S., Seth Y., Seth N. Effect of NO_x on the somatic chromosomes goldsmiths // Environ Health Perspect., 1998. — V. 106. — № 10. — P. 643-647.*

10. *Luhr O.R., Frostell C.G., Heywood R. et al. Induction of chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes after short time inhalation of nitric oxide // Mutat. Res., 1998. — V. 414. — № 1-3. — P. 107-15.*

11. *Wallis S.A., Victorin K., Lundborg M. DNA damage in lung cells in vivo and in vitro by 1,3-butadiene and nitrogen dioxide and their photochemical reaction products // Mutat. Res., 1995. — № 328. — P. 11-19.*

Материал поступил в редакцию 28.10.05.

L.P.Sychyova, S.M.Sheremetyeva, M.A.Kovalenko, M.A.Pinigin, L.A.Tepikina, V.S.Zhurkov

STUDY OF CYTOGENETIC AND CYTOTOXIC ACTIONS OF NITROGEN DIOXIDE USING A POLYORGANIC MICRONUCLEAR METHOD

*A.N.Sysin Research Institute for Human Ecology and Environmental Health,
Russian Academy of Medical Sciences, Moscow*

Nitrogen dioxide in concentrations of 10.1, 21.1 and 44.93 mg/m³ did not produce any cytogenetic effects on medulla, lung, urinary bladder cells in rats at inhalation for 4,48 and 120 hours. A cytotoxic action displayed by the substance was revealed in all the test groups which was characterized by an increased part of polychromatophilic erythrocytes, formation frequency of two-nuclear cells and cells with central nuclear strangulation in rat urinary bladder and lungs.

УДК 615.111.014.2.014.46

Н.В.Рязанцева¹, В.В.Новицкий¹, И.А.Шперлинг^{2*},
О.Н.Филиппова¹, О.А.Рогов², Э.В.Сапрыкина¹

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ НАРУШЕНИЯ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ МЕТГЕМОГЛОБИНОБРАЗОВАТЕЛЕЙ

¹ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет
Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

²Томский военно-медицинский институт Министерства обороны Российской Федерации

У крыс линии Wistar после однократного внутрибрюшинного введения нитрита натрия и солянокислого фенилгидразина в дозах DL₅₀ установлено, что нарушения структурного статуса эритроцитарной мембраны у крыс при токсическом действии метгемоглобинообразователей характеризуются возрастанием микровязкости как в области интегральной липидной фазы, так и в области анулярных липидов, а также угнетением активности Na⁺, K⁺-АТФазы. При этом действие солянокислого фенилгидразина характеризуется более выраженным и длительным мембранодестабилизирующим эффектом. Признаки структурной модификации мембраны эритроцитов при введении нитрита натрия и солянокислого фенилгидразина (DL₅₀) в эксперименте выражены в течение длительного времени (до 21 сут), сохраняясь в период ликвидации метгемоглобинемии.

Ключевые слова: метгемоглобинемия, эритроцит, мембрана, флуоресцентные зонды, активность Na⁺, K⁺-АТФазы

Введение. В последние годы наметилась тенденция к увеличению случаев интоксикации соединениями, обладающими метгемоглобинообразующими свойствами [1, 4]. Отравления мет-

гемоглобинообразователями характеризуются скоротечностью и высокой частотой смертельных исходов [9]. Современные сведения о токсикологии метгемоглобинообразователей позволяют говорить о большом многообразии патологических эффектов, вызываемых этими соеди-

* Фрагмент диссертационной работы

нениями, включая метгемоглобинообразование, активацию свободно-радикального окисления, подавление активности антиоксидантных систем клеток, что приводит к изменению структурно-метаболического и функционального статуса эритроцитов [12, 13]. В основе действия метгемоглобинообразующих ксенобиотиков лежит окисление двухвалентного железа гемоглобина в трехвалентное с потерей возможности обратимой связи с кислородом. Основным патогенетическим звеном интоксикации метгемоглобинообразователями является нарушение кислородтранспортной функции гемоглобина и блокирование тканевого дыхания вследствие угнетения активности ферментов дыхательной цепи. Вместе с тем, в механизмах формирования данной патологии немаловажное значение могут иметь нарушения структурной организации мембраны красных кровяных клеток. В связи с этим целью настоящего исследования явилось определение характера и динамики нарушений липид-липидных и липид-белковых взаимодействий, изменений активности Na^+, K^+ -АТФазы в эритроцитарной мембране у крыс при экспериментальных метгемоглобинемиях, вызванных однократным токсическим действием нитрита натрия и солянокислого фенилгидразина.

Материал и методы исследования. Эксперименты проведены на 157 крысах-самцах линии Wistar массой 190–250 г. Метгемоглобинемии моделировали однократным внутрибрюшинным введением 0,6% раствора нитрита натрия (НН) в дозе 90 мг/кг (DL_{50}) (62 крысы) и 2% раствора солянокислого фенилгидразина (ФГ) в дозе 150 мг/кг массы животного (DL_{50}) (74 крысы). Полученные результаты сравнивали с аналогичными показателями у 21 интактного животного (группа контроля).

Забор крови у экспериментальных животных осуществляли под эфирным наркозом из хвостовой вены через 1,5 ч, 1, 3, 5, 7, 13 и 21 сут. после введения НН и ФГ. Кровь стабилизировали гепарином (50 Ед/мл). Все вмешательства проводили с соблюдением принципов Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными.

Уровень метгемоглобина (MtHb) в крови определяли по методу [8].

Мембраны эритроцитов (МЭ) выделяли с помощью гипосмотического гемолиза эритроцитарной взвеси [14]. Содержание белка в мембранной суспензии определяли микробиуретовым методом.

Измерение собственной флуоресценции теней эритроцитов, а также определение спек-

тральных характеристик взаимодействия МЭ с флуорофором пирен проводили на спектрофлуориметре «МРФ-4» («Hitachi», Япония). Измерения проводили в среде следующего состава (мМ): NaCl – 145, трис- HCl – 10 ($\text{pH} = 7,4$). Раствор пирена (растворитель – этанол) добавляли в кювету с тенями эритроцитов (содержание белка – 0,3 мг/мл) до конечной концентрации 10 мкМ, инкубировали в течение 10 мин при постоянном помешивании. Для оценки микровязкостных свойств липидной фазы и гидрофобного объема МЭ рассчитывали коэффициент эксимеризации пирена (I_{470}/I_{370}), равный отношению максимумов интенсивностей флуоресценции эксимерной формы зонда к мономерной при длинах волн возбуждающего света (λ_b) 285 и 340 нм. Полярность окружения молекул пирена оценивали по соотношению I_{370}/I_{390} при $\lambda_b = 340$ нм [3]. Процент индуктивно-резонансного переноса энергии с триптофановых остатков белков на пирен рассчитывали по формуле [5].

Определение активности Na^+, K^+ -АТФазы в МЭ проводили методом [7], основанном на накоплении неорганического фосфора (P_i) в инкубационной среде следующего состава (мМ): NaCl – 125, KCl – 25, MgCl_2 – 3, ЭДТА – 0,5, АТФ – 2, трис- HCl – 50 ($\text{pH} = 7,4$). Инкубацию проводили при 37°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 20% раствора трихлоруксусной кислоты. Активность Na^+, K^+ -АТФазы рассчитывали как разницу между активностью АТФазы, измеренной в условиях, описанных выше, и активностью АТФазы, определенной в безнатриевой среде в присутствии 125 мМ KCl . Активность фермента выражали в мкмоль $\text{P}_i/\text{час} \cdot \text{мг}$ белка.

Достоверность различий значений показателей между сравниваемыми группами проводили с использованием t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. Проведенное исследование показало, что через 1,5 ч после однократного введения крысам НН в дозе 90 мг/кг существенно возрастало содержание MtHb в крови. В последующие сроки наблюдения (с 1-х сут и вплоть до окончания эксперимента – 21 сут) уровень MtHb в крови экспериментальных животных не отличался от такового у крыс контрольной группы. Однократное введение крысам ФГ в дозе 150 мг/кг приводило через 30 мин к резкому возрастанию концентрации MtHb в крови. Через 24 ч после введения ксенобиотика уровень MtHb в крови у подопытных животных сохранялся достоверно повышенным. В последующем величина изучаемого показателя по-

Показатели флуоресценции зонда пирена в эритроцитарной мембране у крыс после однократного внутрибрюшинного введения нитрита натрия (НН) (90 мг/кг) и солянокислого фенилгидразина (ФГ) (150 мг/кг) ($\bar{X} \pm m$)

Группа животных		Параметры флуоресценции, усл. ед.			Величина миграции энергии с триптофана на пирен, %	
		I_{470}/I_{370} , $\lambda_b = 285$ нм	I_{470}/I_{370} , $\lambda_b = 340$ нм	I_{370}/I_{390} , $\lambda_b = 340$ нм		
Контрольная группа		0,402±0,011	0,560±0,014	0,955±0,007	41,4±1,0	
<i>Опытная группа</i>						
Срок исследования, сут	1,5 ч	НН	0,237±0,015***	0,273±0,011***	0,224±0,006***	32,0±0,5***
		ФГ	—	—	—	—
	1	НН	0,283±0,011***	0,311±0,009***	1,155±0,009***	33,5±0,4***
		ФГ	0,255±0,009***	0,287±0,012***	1,360±0,018**	27,9±0,5***
	3	НН	0,309±0,013***	0,343±0,010***	1,110±0,013***	34,2±0,6***
		ФГ	0,274±0,012***	0,311±0,013***	1,421±0,010***	28,4±0,4***
	5	НН	0,314±0,012***	0,368±0,013***	1,129±0,015***	33,8±0,6***
		ФГ	0,293±0,013***	0,329±0,013***	1,320±0,018***	30,7±0,6***
	7	НН	0,335±0,011**	0,401±0,016***	1,118±0,008***	35,2±0,6***
		ФГ	0,346±0,009**	0,373±0,011***	1,276±0,019**	32,4±0,7***
	13	НН	0,371±0,009*	0,472±0,009***	0,998±0,017	37,6±0,5**
		ФГ	0,365±0,011*	0,433±0,010***	1,124±0,013**	34,9±0,5***
	21	НН	0,397±0,006	0,533±0,013	0,964±0,011	40,7±0,4
		ФГ	0,385±0,011	0,463±0,016**	1,063±0,021*	37,7±0,3**

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с аналогичными показателями у животных контрольной группы.
 \bar{X} – среднее значение; m – ошибка средней

степенно снижалось и в период с 3-х по 21-е сут эксперимента достоверно не отличалась от нормы (рис. 1).

Определение степени эксимеризации флуоресцентного зонда пирен в МЭ у крыс после однократного воздействия НН позволило установить существенные изменения структуры мембраны в течение 13 сут эксперимента (таблица), характеризующиеся повышением упорядоченности молекул как интегрального липидного бислоя, оцениваемой при $\lambda_b = 340$ нм (коэффициент I_{470}/I_{370}), так и анулярной липидной фракции (коэффициент I_{470}/I_{370} при $\lambda_b = 285$ нм). После однократного введения ФГ у животных были также выявлены признаки возрастания вязкости липидного компонента эритроцитарной мембраны, в том числе в области белок-липидных контактов, на протяжении всего периода наблюдения (до 21 сут). При этом наиболее выраженные изменения структурных свойств мем-

браны красных кровяных клеток соответствовали острому периоду метгемоглобинемии.

Наряду с этим, после токсического действия метгемоглобинообразователей было отмечено значительное увеличение значений показателя I_{370}/I_{390} при $\lambda_b = 340$ нм, указывающее на возрастание полярности микроокружения зонда в интегральной липидной фазе МЭ, одной из причин которого может быть повышение содержания полярных молекул воды в условиях интенсификации липопероксидации. Исследование индуктивно-резонансного переноса энергии с триптофановых остатков мембранных белков на пирен, позволяющего судить о характере белково-липидных взаимодействий в мембране, показало пролонгированное статистически значимое снижение указанного параметра (табл.).

Известно, что структурная модификация липидного матрикса эритроцитарной мембраны закономерно приводит к изменениям кон-

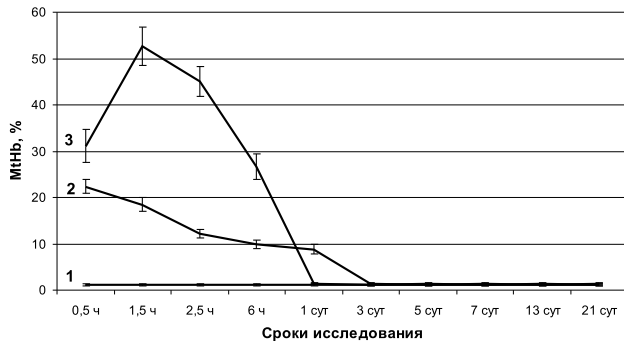


Рис. 1. Динамика содержания метгемоглобина (MtHb) в крови у крыс после однократного введения нитрита натрия (НН) в дозе 90 мг/кг и солянокислого фенилгидразина (ФГ) в дозе 150 мг/кг

1 – контроль; 2 – после введения ФГ; 3 – после введения НН

формации встроенных в него белковых молекул [11], что, в свою очередь, влияет на их функциональную активность [10]. Как показало проведенное в нашей лаборатории исследование, в МЭ у животных после острого токсического воздействия метгемоглобинообразователей в течение 21 сут эксперимента имело место отчетливое угнетение активности мембранно-ассоциированного ионтранспортирующего энзима Na^+, K^+ -АТФазы (рис. 2). При этом минимальный уровень активности Na^+, K^+ -АТФазы в МЭ у животных после введения НН был зафиксирован через 1,5 ч от начала эксперимента и составлял в среднем 15% от среднестатистической нормы ($0,050 \pm 0,004$ мкмоль P_i /час·мг белка при контроле $0,326 \pm 0,005$ мкмоль P_i /час·мг белка, $p < 0,001$). После введения ФГ через 1 сут средний уровень активности Na^+, K^+ -АТФазы оказался равным $0,101 \pm 0,003$ мкмоль P_i /час·мг белка, что составило 31% от соответствующих значений у животных контрольной группы ($p < 0,001$). Еще более значимое угнетение активности этого ионтранспортирующего фермента было выявлено на 3-и сут наблюдения (в 6,7 раза ниже аналогичного показателя у животных контрольной группы) (рис. 2).

Важное значение в обеспечении функционирования ионтранспортирующих систем МЭ принадлежит липидному микроокружению. Регулирующая роль липидно-белковых взаимодействий для Na^+, K^+ -АТФазы сводится к обеспечению ее каталитических функций и переходов между различными конформационными состояниями посредством поддержания определенной вязкости мембран, а также за счет взаимодействия заряженных боковых цепей этого фермента с полярными головками мембранных липидов. Снижение текучести в плазматической мембране приводит к устранению кооперативных взаимодействий между АТФ-связывающими центрами и предотвращает «сшивание» больших субъединиц фермента, что вызывает отрицательную кооперативность по субстрату и, в конечном счете, снижение активности АТФазы [10]. Кроме того, ингибирование Na^+, K^+ -АТФазы возможно путем прямого воздействия на фермент свободнорадикальных соединений, химической атаки SH-групп Na^+, K^+ -АТФазы в условиях усиления липопероксидации, в результате чего происходит ее разобщение с активным транспортом ионов, а затем и ингибирование гидролитической активности [2].



Рис. 2. Активность Na^+, K^+ -АТФазы в эритроцитарной мембране у крыс после однократного внутривенного введения нитрита натрия (НН) в дозе 90 мг/кг и солянокислого фенилгидразина (ФГ) в дозе 150 мг/кг

1 – контроль; 2 – после введения ФГ; 3 – после введения НН

Не исключено, что столь длительное нарушение структуры МЭ может быть следствием необратимых изменений физико-химических свойств мембраны циркулирующих эритроцитов, а также результатом поступления в кровотоки качественно неполноценных красных кровяных клеток, генерируемых в условиях напряженного эритропоэза в гипоксический период [6].

Не исключено, что столь длительное нарушение структуры МЭ может быть следствием необратимых изменений физико-химических свойств мембраны циркулирующих эритроцитов, а также результатом поступления в кровотоки качественно неполноценных красных кровяных клеток, генерируемых в условиях напряженного эритропоэза в гипоксический период [6].

Заключение. Представленный фактический материал является достаточно веским доказательством молекулярных нарушений мембраны эритроцитов при токсическом действии метгемоглобинообразователей. Нарушения структурного статуса эритроцитарной мембраны у крыс, подвергшихся острому воздействию нитрита натрия (DL_{50}) и солянокислого фенилгидразина (DL_{50}), носят однотипный характер и проявляются возрастанием микровязкости как в области интегральной липидной фазы, так и в области анулярных липидов, а также угнетением активности Na^+, K^+ -АТФазы. При этом действие солянокислого фенилгидразина характеризуется более выраженным и продолжительным по времени мембранодестабилизирующим эффектом.

Признаки структурной модификации мембраны эритроцитов при введении нитрита натрия и солянокислого фенилгидразина (DL_{50}) в эксперименте выражены в течение длительного времени (до 21 сут), сохраняясь в период ликвидации метгемоглобинемии.

Полученные результаты исследования, на наш взгляд, представляют интерес с точки зрения возможности разработки новых патогенетически обоснованных способов предупреждения и коррекции нарушений со стороны системы красной крови при токсических метгемоглобинемиях. Успешное решение обозначенной проблемы позволит разработать адекватную терапевтическую стратегию коррекции развивающихся при отравлениях метгемоглобинообразователями гипоксических расстройств и связанных с ними осложнений.

Список литературы

1. **Артамонов Р.Г.** Алиментарная метгемоглобинемия // *Медицинский научный и учебно-методический журнал*, 2004. – № 18. – С. 70–73.
2. **Болдырев А.А., Булыгина Е.Р., Крамаренко Г.Г.** Является ли Na^+, K^+ -АТФаза мишенью окислительного стресса? // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 1996. – № 3. – С. 275–278.
3. **Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е.** Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980. – 320 с.
4. **Головко А.И., Шилов В.В., Гребенюк А.И. и др.** Токсикологические проблемы медицины катастроф. СПб.: Изд-во НИИХ СПбГУ, 2000. – 110 с.
5. **Добрецов Г.Е.** Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов. М.: Наука, 1989. – 277 с.
6. **Зюзиков Г.Н., Абрамова Е.В., Дыгай А.М. и др.** Механизмы регуляции эритропоэза при гемолитической анемии // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2004. – № 10. – С. 378–381.
7. **Казеннов А.М., Маслова М.Н., Шалабодов А.Д.** Исследование активности Na^+, K^+ -АТФазы в эритроцитах млекопитающих // *Биохимия*, 1984. – № 7. – С. 1089–1094.
8. **Кушаковский М.С.** Клинические формы повреждения гемоглобина. Ленинград: Медицина, 1968. – 324 с.
9. **Лужников Е.А., Костомарова Л.Г.** Острые отравления: руководство для врачей, 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2000. – 434 с.
10. **Мацкевич Ю.А., Казеннов, А.М. Маслова М.Н.** Активность транспортных АТФаз и некоторые характеристики белково-липидного состава мембран безъядерных эритроцитов ряда млекопитающих // *Эволюционная биохимия и физиология*, 1994. – № 4. – С. 497–504.
11. **Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А.** Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. – 202 с.
12. **Новицкий В.В., Шперлинг И.А., Жаткин О.А. и др.** Изменения морфофункционального статуса эритроцитов при экспериментальных метгемоглобинемиях // *Токсиколог. вестник*, 2004. – № 1. – С. 7–12.
13. **Штабский Б.М., Федоренко В.И.** К токсикологии нитрита и нитрата натрия // *Токсиколог. вестник*, 1996. – № 5. – С. 22–25.
14. **Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J.** The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes // *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1963. – V. 100. – P. 119–130.

Материал поступил в редакцию 29.09.05.

N.V.Ryazantseva¹, V.V.Novitsky¹, I.A.Sherling², O.N.Filipova¹, O.A.Rogov², E.V.Saprykina¹

MOLECULAR DISTURBANCES IN ERYTHROCYTE MEMBRANE AT TOXIC EFFECT PRODUCED BY METHEMOGLOBIN FORMERS

¹Siberian State Medical University, Federal Agency of Health and Social Development

²Military Medical Institute of Tomsk, RF Ministry of Defense

Molecular properties of the erythrocyte membrane in Wistar rats were investigated after a one-time intraperitoneal injection of sodium nitrite and phenil hydrazine chloride in LD_{50} doses. It was found out that disturbances of the structural status of the erythrocyte membrane in rats at toxic impact of methemoglobin formers are characterized by increasing microviscosity both in the integral lipid phase and anular lipids, as well as by activity inhibition of Na^+, K^+ -AT Phase. Destabilizing action of phenil hydrazine chloride is characterized by more expressed and longer membrane-destabilizing effect. At administration of sodium nitrite and phenil hydrazine chloride in LD_{50} doses in experiment, signs of erythrocyte membrane structural modification are present for a long time (up to 21 days), even remaining during elimination of methemoglobinemia.

УДК 615.22.099

С.А.Рожнова, М.В.Гаврилин, Т.А.Лысенко, А.В.Крикова

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АМЛОДИПИНА БЕЗИЛАТА

Пятигорская государственная фармацевтическая академия

Проведено изучение хронической токсичности антиангинального препарата амлодипина безилата в 2 различных таблетированных формах. Установлено, что при введении амлодипина крысам в течение месяца в терапевтических дозах незначительно увеличивается количество ретикулоцитов, эритроцитов, возрастает гематокрит и осмотическая резистентность эритроцитов. Полученные результаты указывают на некоторые нарушения кровообращения, приводящие к гипоксии. Увеличение выработки эритроцитов при этом является компенсаторной реакцией. Препарат при длительном приеме способен оказывать некоторое миелотоксическое действие.

Ключевые слова: амлодипин безилат, хроническая токсичность, миелотоксическое действие, увеличение выработки эритроцитов.

Введение. Амлодипин — производное дигидропиридина — антагонист кальция второго поколения. Амлодипин связывается с дигидропиридиновыми рецепторами, блокирует кальциевые каналы, ингибирует трансмембранный переход ионов кальция внутрь клетки (в большей степени в гладкомышечные клетки сосудов, чем в кардиомиоциты). Оказывает пролонгированный дозозависимый антигипертензивный эффект. Гипотензивное действие обусловлено прямым расслабляющим влиянием на гладкие мышцы сосудов. Уменьшает выраженность ишемии миокарда за счёт расширения периферических артериол, мало влияя на частоту сердечных сокращений. Препарат применяется в виде безилата в виде таблеток, содержащих 5 и 10 мг активного вещества [3].

В виду высокой активности данного препарата освоение производства таблеток, содержащих амлодипин, является целесообразным. В связи с этим на ЗАО «Биоком» (г. Ставрополь) освоена технология производства таблеток амлодипина.

Материал и методы исследования. Задачей настоящего исследования являлось сравнительное изучение токсических свойств отечественной и зарубежной лекарственных форм, в частности, влияние амлодипина на гематологические показатели крыс получавших сравнимые лекарственные формы перорально в виде суспензии в течение 1 месяца в двух дозах. Одна из которых терапевтическая (1 мг/кг), рассчитанная с учетом межвидового переноса доз [2], другая превышает терапевтическую в 10 раз. Исследования проводили отдельно на самцах и самках. Для проведения опыта использовали по 6 групп животных. В группах 1–2 крысы получали изотонический раствор натрия хлорида в дозах 1 и 10 мг/кг, в группах 3 и 4 таблетки отечественного производства в дозах 1 и 10 мг/кг и в группах 5–6

животные получали таблетки нормодипин (Гедеон Рихтер) в тех же дозах. По окончании опыта животных декапитировали под наркозом, собирали кровь и выполняли общеклинические анализы по общепринятым методикам, полученные результаты представлены в табл., интерпретацию данных приводили с учётом литературных сведений [1, 4].

Результаты и обсуждение. Влияние амлодипина на количество эритроцитов в крови. Введение амлодипина в течение 28 дней привело к повышению количества эритроцитов в группах, получавших амлодипин-биоком и нормодипин. Причём эти изменения характерны для самцов и для самок. Таким образом, амлодипин способен вызывать незначительную эритремию, так как показатели не выходят за пределы физиологических норм.

Влияние амлодипина на количество ретикулоцитов в крови. В связи с тем, что ретикулоциты являются молодыми формами эритроцитов, их количество может объяснить сдвиги в количестве эритроцитов. В данном случае для двух изучаемых препаратов на больших дозах (10 мг/кг) наблюдается увеличение количества ретикулоцитов. Это может быть связано с гипоксией или усилением костномозгового кроветворения. В целом изменения показателя незначительны.

Влияние амлодипина на средний объём эритроцита. Средний объём эритроцита — показатель, который позволяет дифференцировать возможные анемии. В данном случае у самцов и самок наблюдали возрастание среднего объёма. Вместе с тем, изменение среднего объёма эритроцита возможно не только при развитии анемий, но при поражениях печени, что в данном случае более вероятно.

Влияние амлодипина на среднее содержание гемоглобина в эритроците. Полученные результа-

Таблица

Результаты клинического анализа крови экспериментальных животных (крысы-самцы – числитель, крысы-самки – знаменатель) получавших 0,9% раствор натрия хлорида (1-я, 2-я группы), таблеток амлодипин-биоком в дозе 1 мг/кг (3-я группа), таблеток амлодипин-биоком в дозе 10 мг/кг (4-я группа), таблеток нормодипина в дозе 1 мг/кг (5-я группа) и 10 мг/кг (6-я группа), (M±m, n = 6)

Показатель	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа	6 группа
Эритроциты, 10 ¹² г/л	4,2±0,03 4,3±0,029	4,7±0,13 4,6±0,2	5,25±0,18** 5,31±0,12**	5,35±0,1** 5,4±0,3**	5,35±0,08** 5,5±0,1**	5,36±0,05** 5,42±0,09**
Ретикулоциты, %	0,35±0,12 0,69±0,2	0,36±0,19 0,37±0,24	0,5±0,06 0,51±0,09	0,63±0,05**§* 0,65±0,08**§*	0,53±0,08** 0,57±0,1**	0,76±0,05** 0,8±0,07**
Гемоглобин, г/л	144,1±2,1 145,0±5,3	139,8±7,1 149,6±7,7	138,1±1,39 140,6±1,9	137,3±2,9 145,3±3,5	139,06±1,29 146,4±2,9	137,3±0,91 136,7±0,5 [†]
Средний объём эритроцита, фл	107,1 104,9	98,1 100,0	118,7 118,5	111,4 111,3	115,5 111,8	116,2 115,3
Среднее содержание гемоглобина в эритроците	34,3 33,7	29,74 35,52	26,3 26,5	25,7 26,9	25,9 26,6	25,6 25,2
СОЭ, мм/ч	2,3±0,4 2,45±0,33	2,0±0,5 2,1±0,7	2,5±2,25 2,46±2,5	1,16±0,4 1,3±0,35	3,33±2,8 3,5±2,1	1,38±0,51 1,33±0,7
Гематокрит, %	45,0±4,2 45,1±3,2	46,1±3,2 46,0±2,3	62,3±3,2** 62,9±1,9**	59,6±2,5** 60,1±4,4**	61,8±2,7** 61,5±3,4**	62,3±1,9** 62,5±2,6**
Осмотическая резистентность, % NaCl	0,37±0,07 0,38±0,05	0,31±0,02 0,31±0,04	0,35±0,03 0,34±0,09	0,3±0,01* 0,3±0,01	0,35±0,03 0,35±0,03	0,28±0,02 [‡] 0,27±0,01 [†]
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	4,9±0,2 4,88±0,2	5,1±0,04 5,1±0,03	6,3±1,69** 6,4±1,5**	4,26±0,24* 4,3±0,15*	5,96±2,33 5,9±2,0	5,0±0,6 5,08±0,09
Эозинофилы, %	1,0±0,18 1,0±0,18	1,2±0,1 1,2±0,01	2,16±0,75** 2,13±0,29**	1,66±0,51** 1,68±0,4**	2,0±0,5 2,0±0,7	1,66±0,5 1,62±0,3
Базофилы, %	-	-	-	-	-	-
Нейтрофилы палочкоядерные, %	5,9±0,3 5,7±0,09	5,3±0,2 5,31±0,08	2,66±0,51** 2,67±0,5**	2,0±0,63** 2,0±0,52**	2,66±2,1 2,7±1,5	1,83±1,16 1,89±1,2
Сегментоядерные, %	32,6±0,9 33,3±0,5	34,8±1,8 34,2±1,03	21,0±2,82** 21,2±2,26**	19,16±0,98** 19,8±0,5**	21,5±3,72** 21,6±2,3**	20,33±1,86** 20,5±1,44**
Лимфоциты, %	53,5±1,8 54,1±1,2	56,1±0,8 59,3±1,3	67,16±3,12** 67,0±1,2**	71,16±0,75** 71,5±0,5**	66,3±6,21** 68,0±5,5	69,16±3,5** 69,5±6,3**
Моноциты, %	4,3±0,42 4,3±0,36	4,4±0,3 4,4±0,34	7,0±0,89** 7,1±0,9**	6,0±0,63*** 6,5±0,31***	7,33±0,81** 7,2±0,36**	7,16±1,16** 7,3±0,9**
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	528,5±21 522,0±12,3	520,1±11 525,1±17,0	563,1±5,2 [‡] 566,2±7,7 [‡]	656,17±36,0*** 653,2±21,0***	514,0±36,6 545,0±21,7	647,0±5,36 [†] ** 655,0±6,3 [†] **

Примечание: * – достоверно относительно амлодипина в дозе 1 мг/кг; [†] – достоверно относительно амлодипина в дозе 10 мг/кг; [‡] – достоверные различия между минимальными дозами амлодипина и амлодипина; ** – достоверно относительно контрольных групп животных; *** – достоверно относительно контрольных групп животных

ты позволяют достоверно судить о том, что приём амлодипина в виде двух лекарственных препаратов однозначно приводит к снижению содержания гемоглобина в эритроците. Снижение среднего содержания гемоглобина в эритроците возможно при различных анемиях, свинцовом отравлении, нарушении синтеза порфиринов. В данном случае сложно связывать изменение этого показателя с развитием анемии, так как он не коррелируется с другими клиническими показателями.

Влияние амлодипина на гематокрит. Длительное применение амлодипина привело к достоверному, по сравнению с контролем, увеличению гематокрита, что можно объяснить увеличением количества эритроцитов в крови. Повышение гематокрита также возможно при гипоксии и резком увеличении диуреза, однако в ходе эксперимента этого не было отмечено.

Влияние амлодипина на осмотическую резистентность эритроцитов. В ходе эксперимента установлено достоверное увеличение осмотической резистентности эритроцитов для двух сравниваемых препаратов, но только на максимальных дозах. Такое явление может наблюдаться при гемоглобинопатии – состоянии, обусловленном присутствием в красных кровяных тельцах (эритроцитах) одного или нескольких аномальных (патологических) гемоглобинов. Развитие гемоглобинопатии возможно с наличием циркуляторной гипоксии, связанной с нарушениями кровообращения. Вместе с тем, эти явления наблюдаются при применении амлодипина в дозе, превышающей терапевтическую в 10 раз, что не может служить основанием для опасений при назначении препарата.

В ходе эксперимента установлено, что общее количество лейкоцитов при применении амлодипина в виде двух препаратов не меняется, хотя имеются отдельные колебания в их количестве, не выходящие за пределы физиологических норм.

Вместе с тем, наблюдается увлечение количества эозинофилов, вне зависимости от доз, препаратов и пола животных, что очевидно свидетельствует о возможности развития аллергических реакций на фоне приёма амлодипина.

Значительно более важным побочным действием амлодипина является выраженная нейтропения. Причём она проявляется для двух испытываемых препаратов, вне зависимости от пола животных и уже на терапевтической дозе. Вместе с тем, миелотоксическое действие характерно для многих лекарственных препаратов. Одновременно у всех животных, получавших лекарственные препараты, содержащие амлодипина

бесилат, наблюдается лимфоцитоз, который является компенсаторной реакцией на нейтропению.

Другим негативным последствием применения таблеток, содержащих амлодипин, является моноцитоз. Несмотря на то, что это увеличение не выходит за пределы нормы, можно считать, что длительное применение амлодипина вызывает развитие некоторых воспалительных процессов, например в печени или почках.

Влияние амлодипина на количество гемоглобина в крови. Для всех групп животных достоверного изменения содержания гемоглобина не отмечено.

Влияние амлодипина на скорость оседания эритроцитов. Применение амлодипина в течение 28 дней на данный показатель достоверно не влияет.

Закключение. Длительное применение амлодипина безилата сопровождается незначительным увеличением количества ретикулоцитов, эритроцитов, возрастанием гематокрита и осмотической резистентности эритроцитов, что может быть связано с увеличением продукции эритроцитов. Можно также предположить, что некоторые нарушения кровообращения, приводят к гипоксии и увеличение выработки эритроцитов являющихся компенсаторной реакцией. Препарат при длительном приёме способен оказывать некоторое миелотоксическое действие.

Длительный приём амлодипина способен привести к незначительному снижению тимоловой пробы, общего билирубина и холестерина и увеличить продукцию альбуминов. Возможно, именно поэтому усиливается экскреция билирубина и холестерина.

Однако эти изменения, как правило, не выходят за пределы физиологических норм и характерны для обоих изучаемых форм.

Список литературы

1. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М.: Медицина, 2000. – С. 14-40.
2. Руководство по экспериментальному. (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Издание 2 перераб. и доп. / Под ред. чл.-корр. РАМН, Р.У.Хабриева. М.: 2005. – С. 41-53.
3. Энциклопедия лекарств. – 12 вып. /Гл. ред. Г.Л.Вышковский. М.: РЛС-2005, 2004. – С. 107-109.
4. Юрковский О.И., Грицюк А.М. Общеклинические анализы в практике врача. М., 1997. – С. 11-29.

Материал поступил в редакцию 01.11.05.

S.A.Rozhnova, M.V.Gavrilin, T.A.Lysenko, A.V.Krikova

STUDY OF CERTAIN TOXIC PROPERTIES OF AMPLODINE BESYLATE

State Pharmaceutic Academy of Pyatigorsk

Chronic toxicity of amlopdine besylate, antianginal preparation, was studied in two different tablet forms. It was found out that administration of amlopdine to rats for a month in therapeutic doses leads to an insignificantly increased amount of reticulocytes and erythrocytes, growing hematocrite and osmotic resistance of erythrocytes. The outcome of the study showed a certain disturbance of blood circulation leading to hypoxia. The increase in erythrocytes production presents a compensatory response. Long administration of the preparation can produce a certain myelotoxic action.

УДК [616.61-06:616.632]-053.4

Б.А.Кацнельсон, Л.И.Привалова, С.В.Кузьмин, Е.П.Киреева, Н.А.Хрущева,
Я.Б.Бейкин, Т.В.Постникова, Н.С.Журавлёва, Н.П.Макаренко,
А.В.Поровицина, С.А.Денисенко, Ю.И.Солобоева

СВЯЗЬ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПОЧКАХ У ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА С СОДЕРЖАНИЕМ КАДМИЯ И СВИНЦА В МОЧЕ

Екатеринбургский Медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий Роспотребнадзора, Уральская государственная медицинская академия, Диагностический Центр лабораторной диагностики ВИЧ, инфекционной патологии и болезней матери и ребёнка, Екатеринбург

В эколого-эпидемиологических исследованиях, проведенных на выборках из клинически здорового детского населения 4 уральских городов, установлена связь между концентрациями в моче свинца и кадмия, с содержанием β 2-микроглобулина (чувствительного маркера повреждения почечных канальцев).

Ключевые слова: повреждение почек, содержание кадмия и свинца в моче.

Введение. Хроническая патология системы мочевого выделения и, в частности, заболевания с поражением почечных канальцев (пиелонефрит, тубулоинтерстициальный нефрит, тубулоинтерстициальный компонент при гломерулонефрите) играют важную роль в заболеваемости детского населения России, в особенности, её промышленных регионов. Примером может служить Свердловская область и некоторые её города, в особенности, которые занимают в этом отношении одно из первых мест. Так, например, если в 1996 г. заболеваемость болезнями системы мочевого выделения на 1000 детей составляла по Российской Федерации в целом 15,4, а в 1997 г. – 16,3, то по Свердловской области – 38,3 и 39,6, а по городу Верхняя Пышма (в то время вместе с г. Среднеуральском) – 60,0 и 65,4 соответственно. Положение существенно не изменилось и в последующем; так, в 2002 г. показатели по области варьировали от 45,1 до 49,3 на 1 000 детей (в зависимости от возраста), причём в 75% случаев речь шла о тубуло-интерстициальных заболеваниях почек [1].

Такое особое положение данного региона косвенно свидетельствует о существенной роли в развитии рассматриваемой патологии техногенного загрязнения среды обитания. В частности, учитывая развитую здесь цветную металлургию и значительную автотранспортную нагрузку городов, особое значение имеет загрязнение среды кадмием и свинцом. Судя по данным о содержании этих двух металлов в моче детей младшего школьного и дошкольного возраста, нагрузка детского организма ими, как правило, наиболее высока именно в тех городах Свердловской области, которые находятся под воздействием выбросов предприятий цветной металлургии [2]. Оценка непрофессиональной кадмиевой экспозиции, которой подвергалось население Верхней Пышмы (вместе со Среднеуральском), позволила обосновать прогноз высокой нефрологической заболеваемости этого населения [3].

Нефротоксичность кадмия и свинца неоднократно демонстрировалась как в экспериментальных, так и в эпидемиологических исследованиях, однако последние, как правило, оцени-

вали риск для работающих в промышленности под воздействием этих металлов или для взрослых жителей интенсивно загрязняемых ими территорий. При этом внимание было сосредоточено либо на кадмии [4-9], либо на свинце [4, 10, 11] как изолированных факторах риска. До проведения наших собственных исследований (экспериментального [12] и эпидемиологического [13]) исключение в этом отношении составляла лишь работа, в которой позитивная корреляция риска поражения почек с уровнем свинца в крови была найдена в поперечном эпидемиологическом исследовании, демонстрировавшем эффект кадмия [14], но опять-таки у взрослых.

Нами были проведены два исследования на детях дошкольного возраста, дизайн которых был нацелен на то, чтобы выявить возможную связь между экспозицией к этим металлам и доклиническим поражением почечных канальцев. Мы сосредоточились на начальной стадии поражения по двум соображениям. Во-первых, клинически выраженная патология почек полиэтиологична, и на фоне «информационного шума», создаваемого множеством причинных и способствующих факторов, выявить влияние относительно слабого воздействия свинца или кадмия могло быть затруднительно. Во-вторых, именно факторы, влияние которых выражено на доклинической стадии любой экологически обусловленной болезни, представляют особый интерес с позиций профилактики последней.

Материал и методы исследований. *Получение информации.* Первое исследование было проведено осенью 2004 г. в Среднеуральске, расположенном вблизи крупного завода по огневому и электрохимическому рафинированию черновой меди, и в Сысерти, расположенной вдоль транспортной магистрали. Расстояние между ними приблизительно 60 км. Второе исследование было выполнено весной 2005 г. в городах Первоуральске и Ревде, располагающихся на расстоянии ~9 км друг от друга. При наличии в каждом из этих двух городов отдельных источников техногенного загрязнения среды обитания, наиболее важным источником для обоих является крупный медеплавильный завод, расположенный в черте города Ревды с наветренной стороны по отношению к Первоуральску.

В дошкольных образовательных учреждениях (ДОУ), выбранных исходя из примерного равенства удовлетворительных условий содержания и медицинского обслуживания, все дети обоего пола в возрасте 3–7 лет были осмотрены квалифицированными педиатрами-нефрологами с целью отбора тех, у которых на данный момент или в анамнезе не было явных признаков заболевания системы мочевого выделения. Группы, включён-

ные в последующее исследование, насчитывали 89 детей в 2004 г. и 184 – в 2005 г. У всех этих детей проводились стандартные клинические анализы мочи и крови. Наряду с этим, в моче определялось содержание кадмия и свинца, выбранное в качестве биомаркёра токсической экспозиции организма к ним не только ввиду предпочтительности не инвазивных методов её оценки [15], но и потому, что концентрация металла в моче ближе всего оценивает уровень его воздействия на почки. В качестве основного биомаркёра токсического эффекта использована концентрация в моче микроглобулина В2_μ – одного из наиболее чувствительных показателей повреждения почечных канальцев, широко использовавшегося, в частности, в упомянутых выше и других эпидемиологических исследованиях по кадмиевому риску. В исследовании 2005 г. определялась также концентрация δ-аминолевулиновой кислоты (АЛК) в моче в качестве чувствительного биомаркёра токсического действия свинца на порфириновый обмен.

Проба утренней мочи собиралась дома проницированными родителями, которые доставляли её в специальных пластиковых контейнерах в ДОУ, где эти пробы делились нами на порции и тем же утром перевозились в охлаждаемых термоизолированных сумках в лаборатории, находящиеся в Екатеринбурге. В одной из них проводилось определение концентраций свинца и кадмия при помощи атомно-абсорбционной спектрофотометрии с электротермической атомизацией (Shimadzu AA-6650, Япония). В другой лаборатории определялась концентрация В2_μ с помощью иммуноферментной методики с использованием коммерческого набора реактивов ORGENTEC (5BM30618) и аппаратуры фирмы ORGANON TEKNIKA (ФРГ). В третьей определялась концентрация δ-АЛК по образованию пиррола в реакции с ацетилацетоном (при нагревании) с последующей спектрофотометрией окрашенного продукта реакции пиррола с реактивом Эрлиха.

Анализ информации. Оба исследования были построены по дизайну «случай – контроль», широко используемому в эпидемиологии неинфекционных заболеваний для выявления значимых факторов риска. Как «случаи» обозначались дети, у которых уровень В2_μ оказался выше медианного в данном распределении значений, а как «контроли» – те, у которых он не превышал медианы. В основе такого деления лежит допущение, согласно которому чем выше концентрация В2_μ, тем выше вероятность того, что у данного индивидуума имеется какая-то степень повреждения эпителия почечных канальцев, даже если оно не достигает клинически значимого уровня.

В качестве ориентировочного свидетельства возможной связи между экспозицией и ответом мы использовали различие между «случаями» и «контролями» по средним концентрациям свинца или кадмия в моче. Затем с помощью логистического регрессионного анализа, осуществляемого с помощью пакета STATA-6, использующего пошаговую процедуру backward stepwise, определялись величины отношения шансов (odds ratio – OR) по очереди для каждого из индивидуальных факторов риска (ИФР), предполагаемых согласно общепринятым воззрениям педиатров, а также для каждого металла в отдельности, но во всех уравнениях с поправкой на пол и город. Те ИФР, для которых на этой стадии анализа были найдены OR, отличающиеся от 1,0 при $p < 0,1$, наряду с концентрацией свинца или кадмия, а также переменными «пол» и «город», затем включались в многовариантную регрессионную модель, которая строилась по той же процедуре. Наконец, она повторялась с включением в модель концентраций обоих металлов одновременно. Заметим, что $OR > 1,0$ в нашем исследовании означает, что данный ИФР повышает вероятность попадания ребёнка в число «случаев» по значению концентрации В2и, превышающему медианное.

Результаты и обсуждение. Как видно из табл. 1, в обоих исследованиях средние концентрации

В2и и металлов в моче в группах «случаев» выше, чем в группах «контролей». Для В2и такое различие соответствует дефиниции этих групп, но для металлов оно согласуется с рабочей гипотезой об их повреждающем действии на почки. Индивидуальные значения В2и в первом исследовании варьировали между 10 и 1200 мкг/л с медианой на уровне 100 мкг/л. Во втором исследовании диапазон значений был тем же, но медиана несколько выше: 120 мкг/л; как видно из таблицы, несколько выше были и средние значения. Только у 5 детей в первой когорте (5,6%) и у 12 детей во второй (6,5%) были обнаружены концентрации В2и ≥ 300 мкг/л – уровень, который в настоящее время принимается в качестве диагностически значимого.

Когорта второго исследования была достаточно численно наполненной, чтобы распределение концентраций В2и можно было проанализировать не только по отношению к медиане, но и по квартилям. Как видно из результатов, представленных в табл. 2, концентрации кадмия и свинца нарастают в первых трёх квартилях и несколько снижаются в четвёртой по сравнению с третьей (оставаясь более высокими, чем во второй).

Значения OR с поправкой на пол и город, полученные при одновариантном моделировании для всех рассматривавшихся нами потенциальных ИФР, приведены в табл. 3 и 4 для первого и вто-

Таблица 1

Средние концентрации β -2-микроглобулина, кадмия и свинца в моче у «случаев» и «контролей»

Группа детей	Арифметическая средняя концентрация (\pm s.e.), мкг/л		
	В2и	кадмий	свинец
<i>Первое исследование *</i>			
«Случаи»	227 \pm 28	1,31 \pm 0,26	23,73 \pm 3,43
«Контроли»	61 \pm 4	0,75 \pm 0,13	12,71 \pm 2,01
t	5,78	1,95	2,77
<i>Второе исследование **</i>			
«Случаи»	241,5 \pm 19,7	6,5 \pm 0,7	62,1 \pm 2,7
«Контроли»	82,1 \pm 3,0	4,9 \pm 0,6	41,9 \pm 2,5
t	8,0	1,9	5,5

* – Объединённая когорта по Среднеуральску и Сысерти; медиана В2и = 100 μ g/L

** – Объединённая когорта по Первоуральску и Ревде; медиана В2и = 120 μ g/L

Таблица 2

Средние концентрации β -2-микроглобулина, кадмия и свинца в моче в группах, соответствующих квартилям распределения концентраций В2и во втором исследовании

Квартили	Арифметическая средняя концентрация (\pm s.e.), мкг/л		
	В2и	свинец	кадмий
I	55,10 \pm 3,20	36,98 \pm 3,43	4,20 \pm 0,75
II	106,18 \pm 1,52	46,23 \pm 3,47	5,48 \pm 0,79
III	144,41 \pm 2,54	64,84 \pm 4,33	7,58 \pm 1,25
IV	313,26 \pm 30,16	60,13 \pm 3,35	5,70 \pm 0,71

Связи между ИФР и вероятностью классификации ребёнка в качестве «случая» с поправкой на пол и город по данным 1-го исследования (объединённая когорта детей в Среднеуральске и Сысерти)

Индивидуальный фактор риска	Отношение шансов	P	95% доверительный интервал
Свинец в моче	1,19 на мкг/л*	0,001	1,07–1,31
Кадмий в моче	1,65 на мкг/л*	0,047	1,01–2,69
Длина тела при рождении < 49 см	0,61	0,536	0,13–2,88
Вес тела при рождении < 2500 г	0,11*	0,050	0,01–1,001
Недоношенность	0,21	0,068	0,04–1,12
Перинатальная патология	2,46	0,092	0,86–7,03
Острая респираторная инфекция > 3 раз в год	4,07	0,110	0,73–22,73
Другие заболевания	1,94	0,178	0,74–5,13
Нефро-урологические болезни у кровных родственников	1,23	0,705	0,43–3,54
Сердечно-сосудистые болезни у кровных родственников	1,20	0,691	0,48–3,00
Малые аномалии развития	2,38	0,128	0,78–7,26
«Воспалительный» анализ крови	1,11	0,817	0,47–2,58

Примечание. Здесь и в табл. 4, 5: жирным шрифтом выделены ИФР, значимые при $p < 0,1$; * – отмечены те из них, для которых $p \leq 0,05$

рого исследования, соответственно. В обоих исследованиях статистически значимые величины $OR > 1,0$ на каждое повышение концентрации металла на 1 мкг/л получены и для свинца, и для кадмия. Влияние остальных ИФР не столь однозначно и не всегда воспроизводимо, однако ожидавшийся высокий риск начального повреждения почек под влиянием частых респираторных инфекций был подтверждён в обоих исследованиях, хотя статистически значимо – только во втором.

При многовариантном моделировании данных первого исследования процедура backward stepwise оставила, помимо априорных поправок на пол и город, только поправки на низкий вес тела при рождении (автоматически исключив коррелирующую с ним переменную «недоношенность») и перинатальную патологию. При этом в моделях для одного металла получены значения OR , равные 1,89 (1,13–3,16, $p < 0,02$) для кадмия и 1,19 (1,07–1,31, $p = 0,001$) для свинца, а в модели для комбинации металлов – соответственно, 2,48 (1,36–4,54, $p = 0,003$) и 1,23 (1,10–1,38, $p < 0,0001$).

Результаты такого же моделирования данных второго исследования приведены в табл. 5. При сравнении её с табл. 4 можно увидеть, что включение в модели для одного металла дополнительной поправки на частые респираторные инфекции (единственный ИФР, оказавшийся статистически значимым на этапе одновариантного моделирования) не изменило значений OR ни для кадмия, ни для свинца. Вместе с тем, если в модели, включающей комбинацию металлов, OR для свинца лишь незначительно выше, чем в «однометаллической», то в этой же комбинации

онной модели OR для кадмия неожиданно оказался не отличающимся значимо от 1,0. Вероятная причина отличия этого результата от результата, полученного в первом исследовании, будет специально рассмотрено ниже.

Рассматривая все описанные результаты, отметим прежде всего, что уровни кадмия в моче, приведенные в табл. 1, выше тех, которые были получены в 1990–1992 гг. на большой и репрезентативной группе детского населения Германии: в среднем, 0,12 мкг/л [16]. Средняя концентрация кадмия в моче американских детей не моложе 6 лет была ещё ниже: 0,8 мкг/л [17]. Аналогичных по репрезентативности данных о содержании свинца в моче детей известные нам литературные источники не приводят.

В нашем втором исследовании средние уровни обоих металлов в моче как у «случаев», так и у «контролей» оказались выше, чем в первом. Возможно, это связано с сезонными различиями, но вероятнее всего, основной причиной является наличие в городах, включённых во второе исследование, более мощного источника промышленной эмиссии свинца и кадмия в атмосферу, а именно крупного медеплавильного завода. Уровни В2и у детей, проживающих под воздействием этих эмиссий, также выше, чем у изученных в первом исследовании, однако наиболее показательно то, что в обоих исследованиях концентрации как кадмия, так и особенно свинца были выше у «случаев», чем у «контролей». Эти результаты указывают на вероятную связь повышенной экскреции В2и с повреждением почечных канальцев, которое предположительно выше у тех детей, у которых токсическая нагрузка свинцом и кадмием более высока. Квартильный ана-

Связи между ИФР и вероятностью классификации ребёнка в качестве «случая» с поправкой на пол и город по данным 2-го исследования (объединённая когорта детей в Первоуральске и Ревде)

Индивидуальный фактор риска	Отношение шансов	P	95% доверительный интервал
Свинец в моче	1,03 на мкг/л*	0,0001	1,02–1,05
Кадмий в моче	1,13 на мкг/л*	0,002	1,05–1,22
Длина тела при рождении < 49 см	0,73	0,541	0,27–1,97
Вес тела при рождении < 2500 г	0,42	0,292	0,08–2,13
Недоношенность	0,97	0,953	0,34–2,77
Острая респираторная инфекция > 3 раз в год	2,06*	0,022	1,11–3,80
Другие заболевания	1,76	0,377	0,50–6,22
Нефро-урологические болезни у кровных родственников	0,66	0,228	0,33–1,30
Сердечно-сосудистые болезни у кровных родственников	1,38	0,298	0,75–2,54
Малые аномалии развития	1,69	0,323	0,60–4,80
«Воспалительный» анализ крови	1,66	0,218	0,74–3,69

лиз (табл. 2) подкрепляет эту гипотезу, поскольку даже в пределах тех значений В2и, которые ниже медианного, переход от первой квартили ко второй сопровождается увеличением средних концентраций обоих металлов. Ещё выше они в третьей квартили, а то обстоятельство, что они несколько снижаются при переходе к четвёртой, вероятнее всего, связано с нарушением экскреторной функции почек при их токсическом повреждении. Действительно, в 4-й квартили у 12 из 46 детей были обнаружены концентрации В2и > 300 мкг/л – общепринятая граница клинически значащей почечной патологии.

Такая трактовка косвенно подтверждается «от противного» нашими экспериментами [12, 18], в которых защита организма и, в частности, почек от свинцово-кадмиевой токсичности комплексом биопротекторов сопровождалась повышением экскреции обоих металлов; этот же эффект дал близкий по составу биопротективный комплекс при его испытании у детей, проживающих вблизи медеплавильного комбината в гор. Кировграде Свердловской области [18]. Правда, в настоящем исследовании мы не располагаем независимыми (т.е. не относящимися к функции почек) показателями того, что даже наиболее высокие из наблюдавшихся концентраций кадмия в моче лежат в диапазоне токсичных. Однако это может быть сказано о концентрациях свинца, по крайней мере, во второй когорте, для которой мы располагаем данными о концентрациях δ-АЛК в моче. Последние оказались коррелирующими (хотя и не слишком тесно, но статистически значимо) с концентрациями свинца: $r = 0,161$, $p < 0,05$. Средние концентрации δ-АЛК равнялись у детей Первоуральска $36,8 \pm 3,75$ мкМ/л, у детей Ревды – $32,2 \pm 1,29$ мкМ/л; у первых был несколько выше и уровень

свинца в крови: соответственно, $52,75 \pm 2,44$ и $48,66 \pm 3,05$ мкг/л.

Регрессионный анализ показал, что некоторые широко признанные в детской нефрологии индивидуальные факторы, предрасполагающие к заболеванию почек (перинатальная патология, малый аномалии развития, частые респираторные инфекции, другие заболевания ребёнка, «воспалительные» данные анализа крови, сердечно-сосудистые заболевания у кровных родственников) действительно могли быть связаны с повышением уровня В2и, хотя и не всегда статистически значимо. С другой стороны, мы пока не можем найти объяснения негативной связи этого уровня с недоношенностью и низкой массой тела новорожденного.

При многовариантном анализе во втором исследовании было найдено, что вероятность повышенного (надмедианного) уровня В2и у детей, проживающих в Ревде, выше, чем у проживающих в Первоуральске – в особенности, судя по модели только для кадмия (табл. 5). Это легко объяснить тем, что если приведенное выше различие между городами по средним концентрациями свинца в моче было невелико, то по концентрациям кадмия оно было четырёхкратным и высоко значимым статистически: соответственно, $8,96 \pm 0,67$ и $2,13 \pm 0,17$ мкг/л ($p < 0,001$). Таким образом, признак «проживание в Ревде» является маркёром вероятности сравнительно более высокой кадмиевой (но не свинцовой) экспозиции ребёнка. Корреляция между этими двумя признаками высоко значима ($r = 0,59$; $p < 0,0001$), но поскольку переменная «город проживания» вводится в модель принудительно как априорная поправка («конфаундер»), она сохраняется в ней наряду с переменной «концентрация кадмия».

**Многовариантное моделирование связи между ИФР и вероятностью классификации ребёнка
в качестве «случая» по данным 2-го исследования
(объединённая когорта детей в Первоуральске и Ревде)**

Индивидуальный фактор риска	Отношение шансов	P	95% доверительный интервал
<i>В модели для свинца</i>			
Проживание в Ревде	1,17	0,638	0,61–2,26
Мужской пол	0,74	0,377	0,38–1,44
Острая респираторная инфекция > 3 раз в год	2,26	0,017	1,16–4,40
Свинец в моче	1,03 на мкг/л*	< 0,0001	1,02–1,05
<i>В модели для кадмия</i>			
Проживание в Ревде	3,13	0,006	1,39–7,08
Мужской пол	0,87	0,662	0,46–1,63
Острая респираторная инфекция > 3 раз в год	2,05*	0,027	1,08–3,86
Кадмий в моче	1,13 на мкг/л*	0,002	1,04–1,22
<i>В модели для комбинации металлов</i>			
Проживание в Ревде	1,06	0,902	0,40–2,82
Мужской пол	0,74	0,373	0,38–1,44
Острая респираторная инфекция > 3 раз в год	2,27*	0,016	1,16–4,42
Свинец в моче	1,04 на мкг/л*	< 0,0001	1,02–1,05
Кадмий в моче	0,99 на мкг/л	0,792	0,90–1,08

Введение в многовариантную модель одновременно обоих металлов в первом исследовании дало для них (в особенности, для кадмия) наиболее высокие значения OR. Во втором исследовании такая закономерность не только не подтвердилась, но и более того, в комбинационной модели значимо влияющей на ответ оказалась только концентрация свинца. Этот кажущийся парадокс вполне может быть объяснён следующим. При наличии в городах Ревде и Первоуральске единого преобладающего источника загрязнения среды обитания обоими металлами (медеплавильный завод) имелась довольно тесная и высоко статистически значимая положительная корреляционная связь между их концентрациями в моче детей на объединённом массиве данных ($r = 0,493$; $p < 0,0001$). В подобных случаях компьютерная процедура backward stepwise «выбирает» только одну из двух коррелированных переменных. То, что этот выбор автоматически пал не на кадмий, а на свинец, можно объяснить тем, что распределение данных по свинцу было ближе к нормальному и не имело нулевых значений (воспринимаемых компьютером как пропуск данных), между тем как нулевая концентрация кадмия была отмечена у 7 человек. Напротив, в Среднеуральске и Сысерти, где нет такого общего источника загрязнения, корреляция между концентрациями двух металлов в моче оказалась слабой, статистически менее значимой и при том отрицательной ($r = -0,192$; $p = 0,07$). В этом случае компьютер рассматривал каждую из переменных как независимую и

в «двуметалльной» модели не только подтвердил влияние обеих, но и несколько усилил оценку этого влияния (что может предположительно расцениваться как отражение токсикологического синергизма свинца и кадмия).

Результаты первого исследования были доложены нами на 17-й годичной конференции Международного общества экологической эпидемиологии (Йоханнесбург, сентябрь 2005 г.) и в краткой форме опубликованы в том же году в журнале *Epidemiology* [13]. В 2006 г. появились результаты обследования свыше 800 детей, проживающих в исторических зонах цветной металлургии Франции, Чехии и Польши [19]. Экскреция с мочой ретинол-связывающего белка, белка клеток Clara и активность N-ацетил-d-глюкозаминидазы мочи (маркёры повреждения почек) позитивно коррелировали с концентрациями кадмия в крови и в моче и ртути в моче. Микроглобулин В2 определялся только в сыворотке крови, причём его концентрация отрицательно коррелировала с уровнем свинца в крови, что, по мнению авторов, может свидетельствовать о почечной гиперфильтрации этого микроглобулина при повышенных уровнях воздействия свинца.

Заключение. Результаты двух проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что экологически обусловленная экспозиция детского населения к кадмию и свинцу может вызвать повреждение почечных канальцев. Это указывает на необходимость формирования среди такого населения групп риска с учётом индивидуальных биомаркёров экспозиции к нефро-

токсичным металлам и доклинического повреждения почек. Отдельно публикуемые результаты экспериментального исследования [12] свидетельствуют о возможности ослабить это повреждение с помощью комплекса безопасных биопротекторов.

Список литературы

1. Государственный доклад о состоянии здоровья детей по результатам Всероссийской диспансеризации детей 2002 г.: Свердловская область / Под ред. М.С.Скляра. Екатеринбург: Министерство здравоохранения Свердловской области, 2003. – 77 с.
2. Привалова Л.И., Кацнельсон Б.А., Кузьмин С.В. и др. Экологическая эпидемиология: принципы, методы, применение / Екатеринбург: ЕМНЦ ПОЗРП, 2003. – 276 с.
3. Privalova L.I., Wilcock K.E., Keane S.E. et al. Some considerations concerning multimedia – multi-pollutant risk assessment methodology: use of epidemiologic data for non-cancer risk assessment in Russia // *Environm Health Persp.*, 2001. – V. 109. – P. 1-7.
4. IPCS (International Programme on Chemical Safety). *Environmental Health Criteria 119. Principles and methods for the assessment of nephrotoxicity associated with exposure to chemicals.* Geneva: WHO, 1991. – 266 pp.
5. Jarup L., Elinder C.G., Spang G. Cumulative blood-cadmium and tubular proteinuria: a dose-response relationship // *Environm. Health*, 1988. – V. 60. – P. 223-229.
6. Jarup L., Alfven N., Carlsson D. et al. Cadmium and tubular proteinuria [Abstract] // *Epidemiology*, 1998. – V. 9. – № 4. – P. 112.
7. Nogawa K., Kobayashi E., Honda R. et al. Renal dysfunction in inhabitants in a cadmium-polluted area // *Environm. Res.*, 1980. – V. 23. – P. 13-23.
8. Nogawa K., Kido T., Honda T. et al. A dose-response analysis of cadmium in the general environment with special reference to total cadmium intake limit // *Environ. Res.*, 1989. – V. 48. – P. 77-85.
9. Nakagawa H., Kawano S., Okumura T. et al. Mortality study of inhabitants in a cadmium polluted area // *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 1987. – V. 38. – P. 553-560.
10. Campbell B.C., Beattie A.D., Moore M.R. et al. Renal insufficiency associated with excessive lead exposure // *Brit. Med. J.*, 1977. – № 1. – P. 482-485.
11. Pocock S.J., Shaper A.G., Ashby D. et al. Blood lead concentration, blood pressure, and renal function // *Brit. Med. J.*, 1984. – V. 289. – P. 872-874.
12. Куреева Е.П., Кацнельсон Б.А., Дегтярёва Т.Д. и др. Нефротоксическое действие свинца, кадмия и его торможение комплексом биопротекторов // *Токсикологический вестник*, 2006. – № 3. – С. 26-32.
13. Katsnelson B.A., Kuzmin S.V., Privalova L.I. et al. An association between incipient renal damage and urine levels of cadmium and lead in a group of Russian preschool children [Abstract] // *Epidemiology*, 2005. – V. 16. – № 5. – P. S21.
14. Staessen J., Lauwerys R.A., Bushet J.-P. et al. Impairment of renal function with increasing blood lead concentrations in general population // *New Engl. J. Med.*, 1992. – V. 327. – P. 151-156.
15. IPCS (International Programme on Chemical Safety). *Environmental Health Criteria 155. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles.* Geneva: WHO, 1993. – 82 p.
16. Seifert B., Becker K., Helm D. The German environmental survey 1990/1992 (GerES II): reference concentrations of selected environmental pollutants in blood, urine, hair, house dust, drinking water and indoor air // *J. Exp. Anal. Environm. Epidemiol.*, 2000. – V. 10. – P. 552-565.
17. ATSDR Toxicological Profile for Lead. (Draft current through 2005). <http://www.atsdr.cdc.gov/tox-profiles/tp13-c6.pdf>.
18. Кацнельсон Б.А., Дегтярёва Т.Д., Привалова Л.И. и др. Биологическая профилактика как комплексное воздействие, повышающее резистентность организма к действию вредных химических факторов производственной и окружающей среды // *Вестник Уральской медицинской акад. Науки*, 2005. – № 2. – С. 70-76.
19. de Burbure C., Buchet J.-P., Leroyer A. et al. Renal and neurologic effects of cadmium, lead, mercury, and arsenic in children: evidence of early effects and multiple interactions at the environmental exposure levels // *Environm. Health Perspect.*, 2006. – V. 114. – P. 584-590.

Материал поступил в редакцию 10.05.06.

B.A.Katsnelson, L.I.Privalova, S.V.Kuzmin, Ye.P.Kiryeva, N.A.Krushcheva, Ya.B.Beikin, T.V.Postnikova, N.S.Zhuravlyova, N.P.Makarenko, A.V.Porovitsina, S.A.Denisenko, Yu.I.Soloboyeva

LINKS OF PRECLINICAL RENAL LESION IN CHILDREN AT PRESCHOOL AGE TO THE CADMIUM AND LEAD CONCENTRATION IN URINE

Medical Research Centre for Prophylaxis and Health Protection of Industrial Workers, Rospotrebnadzor, Ural State Medical Academy,

Diagnosis Center for laboratory diagnosis of HIV, infection pathology and maternal and infantile diseases, Ekaterinburg

Ecological and epidemiological studies conducted on samples from clinically healthy childhood population in four Ural towns showed that there is a link between cadmium and lead concentrations and β 2-microglobuline content (sensitive marker of renal tubulesion).

Минздравсоцразвития России


 Российский регистр потенциально опасных
химических и биологических веществ
Роспотребнадзора

БЮЛЛЕТЕНЬ

Российского регистра потенциально опасных химических и биологических веществ

Монографии Международного агентства по изучению рака (МАИР) по оценке канцерогенного риска для человека

УДК 616-006-02:613.262

Том 85. Жевание бетеля и орехов ареки и некоторые образующиеся из орехов ареки нитрозамины.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 85. Betel-quid and Areca-nut Chewing and Some Areca-nut-derived Nitrosamines. IARC, Lyon, France, 2004.

Жевание бетеля и орехов ареки. Бетель — жевательная масса, для приготовления которой в свежий лист перца бетеля (*Piper betle L.* сем. перцевых *Piperaceae*) заворачивают тонко нарезанные семена пальмы ареки катеху (*Areca catechu L.* сем. пальмовых *Agacaceae*), дубильный экстракт катеху и известь. В диком виде арека катеху растет в Индонезии, Малайе, Южном Вьетнаме. В тропиках культивируется повсюду. Семена ареки содержат алкалоиды ареколин, арекаин, гувацин и др., а также жирное масло и дубильные вещества; обладают психотропным стимулирующим и противоглистным действием.

Жевание бетеля широко распространено в населении Южной и Юго-Восточной Азии и среди выходцев из этого региона. В Индии, Пакистане, Бангладеш и Шри Ланка в жевательную смесь добавляют табак. Жевание бетеля и семян ареки сопряжено с воздействием алкалоидов ареки, N-нитрозосоединений, образующихся из алкалоидов пгш жевании, полифенолов, а при добавлении табака — к табаку.

Ранее экспертами МАИР было признано канцерогенным для человека жевание бетеля, содержащего табак. Относительно бетеля, не содержащего табак, доказательства канцерогенности были признаны неадекватными (Vol. 37, 1985, Suppl. 7, 1987). К настоящему времени в результате многочисленных исследований получено достаточно доказательств канцерогенности не содержащего табак бетеля (вызывает рак полости рта) и содержащего табак бетеля (вызывает рак полости рта, глотки и пищевода). В нескольких исследованиях была показана связь

между жеванием бетеля (с табаком и без него) и риском развития злокачественных опухолей печени. На основании ряда эпидемиологических работ предполагается связь риска развития рака желудка и шейки матки с жеванием бетеля.

Получены также убедительные доказательства канцерогенности содержащего и не содержащего табак бетеля, а также семян ареки в опытах на животных.

На основании имеющихся данных экспертами МАИР было сделано заключение, что *содержащий табак бетель, не содержащий табак бетель, семена ареки являются канцерогенами для человека (Группа 1).*

Некоторые образующиеся из орехов ареки нитрозамины. N-нитрозогуваколин (N-Nitrosoguvacoline) CAS № 55557-02-3, N-нитрозогувацин (N-Nitrisoguvacine) CAS №55557-01-2, 3-метилнитрозаминопропионитрил (3-Methylnitrosaminopropionitrile) CAS №60153-49-3, 3-метилнитрозаминопропиональдегид (3-Methylnitrosaminopropionaldehyde) CAS №85502-23-4.

Данных о канцерогенности для человека перечисленных выше соединений нет. При подкожном введении 3-метилнитрозаминопропиональдегида крысам у самцов и самок достоверно повышалась частота аденом и аденокарцином легкого. Наблюдалось возникновение доброкачественных и злокачественных опухолей и в других органах. Нанесение 3-(метилнитрозо)пропионитрила на слизистую полости рта крысам-самцам вызывало развитие аденом и аденокарцином легкого и назальной полости, аденом и аденокарцином печени, папиллом пищевода и ротовой полости.

При подкожном введении крысам 3-метилнитрозаминопропионитрила в краткосрочном эксперименте у самцов и самок возникали папилломы и карциномы пищевода и языка и папилломы назальной полости, в длительном эксперименте повышалась частота назальных карцином у животных обоего пола и опухолей печени у самцов. Накожное нанесение мышам 3-метилнитрозаминопропионитрила приводило к

развитию опухолей кожи и аденом легкого. Добавление N-нитрозогуваколина в питьевую воду в одном эксперименте индуцировало у крыс-самцов аденомы поджелудочной железы, в другом эксперименте развития опухолей у животных обоего пола не наблюдалось. На основании имеющихся данных эксперты МАИР классифицировали 3-метилнитрозаминопропионитрил как

возможный канцероген для человека (Группа 2В). N-нитрозогуваколин, N-нитрозогувацин и 3-метилнитрозаминопропиональдегид не классифицированы относительно их канцерогенности для человека (Группа 3).

Л.Г.Соленова

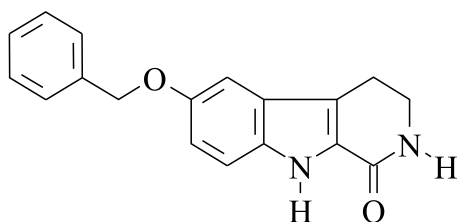
Материал поступил в редакцию 18.04.06.

НОВЫЕ СВЕДЕНИЯ О ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

УДК 547.58

М.В.Бидевкина¹, М.И.Голубева²,
З.И.Жолдакова³, Н.Г.Иванов¹, Г.И.Рожнов²,
И.А.Бобринева², Э.А.Федорова², О.В.Липочкина²,
Л.И.Крымова², Е.А.Тульская³
¹ГОУ ВПО «Российский государственный
медицинский университет федерального агентства
по здравоохранению и социальному развитию»
²ОАО «Всероссийский научный центр по
безопасности биологически активных веществ»
³ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей
среды им. А.Н. Сысина РАМН

2,3,4,9-ТЕТРАГИДРО-6-(ФЕНИЛМЕТОКСИ)-1Н-ПИРИДО[3,4-В]ИНДОЛ-1-ОН
(1-кето-6-бензилокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин, «карболин»)



№ CAS: 51086-22-7. C₁₈H₁₆N₂O₂. М. м. 292.31. Кристаллический порошок светло-коричневого или бежевого цвета. T_{пл.} 200–207°С. Не растворим в воде, плохо растворим в спирте. Содержание основного вещества – 95%. Является промежуточным продуктом производства серотонина.

Изучение влияния «карболина» на органолептические свойства воды позволило установить пороговые концентрации по его влиянию на мутность, окраску и взвешенные вещества, которые составили соответственно 9,8, 22,2 и 50 мг/л.

В качестве пороговой концентрации «карболина» по органолептическому признаку вредности (ПКорг) установлена величина 100 мг/л, лимитирующий показатель – мутность.

Изучение влияния «карболина» на процесс самоочищения водоема проводили по биохимическому потреблению кислорода в 5-суточных экспериментах (БПК₅) в концентрациях 10, 9, 3, 1 и 0,1 мг/л. Порог по общесанитарному признаку (ПКсан) вредности составил 3 мг/л. При проведении эксперимента выявлено, что «карболин» вызывает ингибирование процессов БПК.

DL₅₀ (в/ж, мг/кг, мыши самки и самцы, крысы самки) > 10000 мг/кг (4-ый класс опасности по классификации ГОСТ 12.1.007-76; вещество малоопасное); DL₅₀ (в/б, мг/кг, мыши) – > 1000 мг/кг (V-ый класс токсичности по классификации К.К. Сидорова; практически нетоксичное вещество). Картина острого отравления и гибель животных не наблюдалась.

Обследование белых крыс через 2, 5, 24 часа, а также через 4 и 8 суток после однократного введения «карболина» в дозе 500 мг/кг не выявило патологических изменений в функциональном состоянии нервной системы, печени и почек.

Установлено, что «карболин» обладает слабым раздражающим действием на кожу. Раздражающее действие на слизистые оболочки глаза, кожно-резорбтивный эффект не выявлены.

При исследовании кумулятивных свойств вещество вводили в желудок крысам в дозе 1000 мг/кг в течение 24 дней (5 раз в неделю). Гибели животных, изменения массы тела и развития симптомов интоксикации не наблюдали, что свидетельствует о низкой способности «карболина» к кумуляции в организме.

Острое ингаляционное воздействие «карболина» в статических условиях не выявило изменений в состоянии подопытных животных (мыши).

Принимая во внимание низкую токсичность «карболина» при в/ж и парентеральном поступлении, отсутствие кумулятивной активности, кожно-резорбтивного действия, руководствуясь Положением ГН 1.1.702-98 (п. 3.1.5.) и учитывая сходство по физико-химическим свойствам и изученным параметрам токсикометрии с ранее

нормированным соединением 1-оксо-6-метокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболином, для аэрозоля 2,3,4,9-тетрагидро-6(фенилметокси)-1Н-пиридо[3,4-*b*]индол-1-она («карболина») утвержден ОБУВ в воздухе рабочей зоны 10 мг/м^3 (доп. 1 к ГН 2.2.5.1314-03).

Метод определения в воздухе – спектрофотометрический при длине волны 308 нм. Нижний предел измерения $5,0 \text{ мг/м}^3$.

Для атмосферного воздуха населенных мест утвержден ОБУВ «карболина» $0,01 \text{ мг/м}^3$ (доп. 1 к ГН 2.1.6.1339-03).

Обоснование величины ОДУ «карболина» в воде водоемов проводили на основании установленных пороговых концентраций: $\text{ПК}_{\text{орг}} = 10 \text{ мг/л}$ (мутность), $\text{ПК}_{\text{сан}} = 3,0 \text{ мг/л}$ и по аналогии с «гидразоном»*, близким к «карболину» по структурной формуле, физико-химическим свойствам и биологическому действию.

В качестве ОДУ «карболина» в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования рекомендована величина 3 мг/л по общесанитарному показателю вредности, класс опасности 3.

Материал поступил в редакцию 31.01.06.

* – см. «Токсикологический вестник», 2006, № 2, с. 41-42.

УДК 631.842.6

Л.А.Тепикина¹, З.В.Шипулина¹, Н.П.Зиновьева¹,
Н.В.Лебедева¹, Е.Н.Игнатова¹, Н.П.Сергеюк²,
Ю.И.Походзей², Л.В.Походзей²,
И.А.Пчелинцев², А.А.Силаев²

¹ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н.Сысина РАМН

²НИЦ «Экос» ЗАО «Алгاما», Москва

КАЛЬЦИЙ-АММОНИЙ НИТРАТ (КАН)

КАН представляет собой гранулированный продукт бежевого цвета, полученный путем совместной кристаллизации аммиачной селитры (77%) и доломита (23%) в соответствии с ТУ 2181-18-00206486-2003. Применяется в сельском хозяйстве в качестве удобрения.

Результаты острого опыта с внутрижелудочным введением КАН в растворе крахмала самцам крыс обрабатывали с помощью метода наименьших квадратов. DL_{50} составила $4715,2 \pm 501,6 \text{ мг/кг}$ ($\text{DL}_{16} = 3775,1 \text{ мг/кг}$, $\text{DL}_{84} = 11770,6 \text{ мг/кг}$), что соответствует 3 классу опасности по классификации ГОСТ 12.1.007-76 (вещества умеренно опасные). Симптомы интоксикации были слабо выражены, через 30 мин снижалась двигательная

активность и аппетит. Гибель отмечалась на 1–2 сутки после затравки. Выжившие животные были пассивны, мало двигались, плохо принимали пищу, но пили воду из поилок, их состояние нормализовалось через 24–36 ч. У забитых на 15-е сутки животных обнаружено венозное полнокровие печени и селезенки.

Исследование способности продукта к кумуляции проводили на самцах крыс по схеме Lim et al. После 24-го введения КАН гибели животных не последовало, суммарная доза, полученная ими (24605 мг/кг), в 5,2 раза превысила DL_{50} при однократном введении. Таким образом, вещество не обладает выраженными кумулятивными свойствами при повторном введении в желудок ($\text{C}_{\text{cum}} > 5,2$).

КАН оказывает слабое местное раздражающее действие на оболочки глаза (кролики, 50 мг) и кожные покровы при однократной и повторных аппликациях в виде 60% водной суспензии (морские свинки).

Сенсибилизирующее действие продукта не выявлено при воспроизведении реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на мышцах по методу Черноусова. Величина показателя ГЗТ в опытной группе составила $0,21 \pm 0,02 \text{ мм}$ против $0,17 \pm 0,02 \text{ мм}$ в контрольной группе ($p > 0,05$).

Однократное ингаляционное действие аэрозоля КАН исследовано на самцах крыс. Контроль за его концентрациями в воздухе осуществлялся гравиметрическим методом с использованием фильтров АФА-ВП-10, а также с помощью фотометрической методики, позволяющей надежно определять кальций-аммоний нитрат в диапазоне концентраций $5\text{--}50 \text{ мг/м}^3$. За Lim_{ac} принята концентрация $100,9 \text{ мг/м}^3$, которая вызвала достоверное увеличение СПП ($p < 0,05$), в то время как другие использованные показатели, оказавшиеся чувствительными при исследовании близких по химическому строению веществ (поведенческие реакции, частота дыхания и сердечных сокращений, содержание мочевины и активность АЛТ в сыворотке крови, содержание хлоридов в моче), не изменялись. Концентрация на уровне $29,6 \text{ мг/м}^3$ оказалась недействующей.

На основании расчетов по полученным параметрам токсикометрии и аналогии с близкими по физико-химическим свойствам и характеру биологического действия веществами рекомендован ОБУВ аэрозоля КАН в воздухе рабочей зоны на уровне 10 мг/м^3 и ОБУВ в атмосферном воздухе населенных мест на уровне $0,5 \text{ мг/м}^3$.

Материал поступил в редакцию 06.05.06.

НОВЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТОКСИКОЛОГИИ И СМЕЖНЫМ ДИСЦИПЛИНАМ

Гурочкин Ю.Д., Соседко Ю.И. Судебная медицина: Учебник для мед. вузов. — М.: Эксмо, 2006. — 320 с. — (Рос. юрид. образование). 3000 экз.

Клиническая фармакология и фармакотерапия: Учебник для вузов / Под общ. ред. В.Г.Кукеса, А.К.Стародубцева. — 2-е изд, испр. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 640 с. — (XXI век). 2000 экз.

Клиническая фармакология по Гудману и Гилману / Пер. с англ.; Под общ. ред. А.Г.Гилмана. — М.: Практика, 2006. — 1648 с. — (Классика соврем. медицины). 5000 экз.

Лошадкин Н.А., Курляндский Б.А., Беженарь Г.В., Дарьина Л.В. Военная токсикология / Под ред. Б.А.Курляндского. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2006. — 208 с. (Учебная литература. Для студентов медицинских вузов.) 8000 экз.

Полный справочник фармацевта / О.В.Ананьева и др. — М.: Эксмо, 2006. — 768 с. 4000 экз.

Рабинович М.И. Несовместимость и побочное действие лекарств, применяемых в ветеринарии: Учеб. пособие для вузов. — М.: КолосС, 2006. — 248 с. — (Учебники и учеб. пособия для студ. высш. учеб. заведений). 1000 экз.

Руководство по проведению клинических исследований новых лекарственных средств / Под общ. ред. Р.У.Хабриева и др. — М.: Рус. врач, 2005. — 360 с. 1000 экз.

Судебная медицина: Общая и Особенная части: Учебник для вузов / С.Ф.Щадрин и др. — 2-е изд, испр, доп. — М.: Эксмо, 2006. — 640 с. — (Рос. юрид. образование). 3000 экз.

Судебная медицина: Учебник для мед. вузов / Под ред. В.Н.Крюкова. — 5-е изд., перераб., доп. — М. Медицина, 2006. — 448 с. — (Учеб. литература для студ. мед. вузов). 5000 экз.

Фармацевтическая химия: Учеб. пособие для вузов / Под ред. А.П.Арзамасцева. — 3-е изд., испр. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 640 с. 3000 экз.

Шаров П.О. Загрязнение свинцом пос. Рудная Пристань и его влияние на здоровье детей. — Владивосток: Дальнаука, 2005. — 132 с. 400 экз.

WHO Library Cataloguing in Publication Data. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Concise international chemical assessment document (CICAD) № 69: Cobalt and inorganic cobalt compounds. WHO, Geneva, 2006.

WHO Library Cataloguing in Publication Data. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA) № 64: Evaluation of certain food contaminants WHO TRS 930. WHO, Geneva, 2006.

WHO Library Cataloguing in Publication Data. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Harmonization Project. Document № 3: Principles of Characterizing and Applying Human Exposure Models. WHO, Geneva, 2005.

С международными документами, публикуемыми ВОЗ на английском языке, можно ознакомиться на веб-странице: <http://www.inchem.org>.

European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). Joint Assessment of Commodity Chemicals JACC № 50:1,1,1,2-Tetrafluoroethane (HFC-134a) (CAS № 811-97-2). Brussels, Belgium, 2006.

С аннотациями документов Европейского центра по экотоксикологии и токсикологии химических веществ на английском языке можно ознакомиться на веб-странице: www.ecetoc.org.

К.К.Сидоров, А.А.Виноградова

ИНФОРМАЦИЯ

ФГУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора извещает о том, что в июле-августе 2006 г. закончился срок действия государственной регистрации следующих веществ

№ п/п	Наименование вещества по IUPAC	№ CAS	Синонимы, торговые и фирменные названия	Номер государственной регистрации	Дата окончания срока госрегистрации
1	[N,N''-(Метиленди-1,4-фенилен)]бис(N',N'-диметилкарбамид) C ₁₉ H ₂₄ N ₄ O ₂	10097-09-3	Бис(N,N'-диметилкарбамид)дифенилметан, Отвердитель 9	ВТ 001792	04.07.06

№ п/п	Наименование вещества по IUPAC	№ CAS	Синонимы, торговые и фирменные названия	Номер государственной регистрации	Дата окончания срока госрегистрации
2	4-Амино-3-[[4-[[[4-(2,4-диаминофенил)азо]фенил]амино]сульфонил]фенил]азо]-5-гидрокси-6-[(4-нитрофенил)азо]нафталинсульфонат динатрия $C_{34}H_{25}N_{11}O_{11}S_3Na$		4-Амино-3-(((4'-(((2,4-диаминофенил)азо)фениламино)сульфонил)-фенил)азо)-5-гидрокси-6-(4-нитрофенил)азо-2,7-нафталинсульфонат динатрия, краситель органический анионный черный	ВТ 001794	07.07.06
3	Полимер N,N-диметил-N-проп-2-енилпроп-2-ен-1-аминий-хлорида с диоксидом серы $[[C_8H_{16}ClN]_m[O_2S]_n]_x$	26470-16-6	Сополимер диаллилдиметиламмония хлористого с сернистым ангидридом, полимер диметилдиаллил-аммония хлорида с диоксидом серы; входит в состав сополимера ВПК-10	ВТ 001799	14.07.06
4	1-(2-Хлорпроп-2-енил)-3,5,7-триаза-1-азониатрицикло-[3,3,1,1 ^{3,7}]деканхлорид $C_9H_{16}Cl_2N_4$	101914-01-6	N-(2-Хлор-2-пропенил)гексаметилентетрамин хлористый цис- и трансизомеры; входит в состав препарата «Бактерицид» марок ЛПЭ-11б и ЛПЭ-11в	ВТ 001804	19.07.06
5	Три(карбонилдигидразид N ² O)кадмий дихлорат $C_3H_{18}CdCl_2N_{12}O_{11}$	111275-28-6	Трис(карбогидразид)кадмий II перхлорат, Циркон	ВТ 001805	19.07.06
6	2-Феноксиэтанол $C_8H_{10}O_2$	122-99-6	Монофениловый эфир этиленгликоля; фенилгликоль; фенилцеллозольв, феноксиэтанол	ВТ 001808	20.07.06
7	2-Метилбут-2-ен C_5H_{10}	513-35-9	β-Изоамилен, 2-метил-2-бутен, триметилэтилен	ВТ 002474	02.07.06
8	Октан-2-ол $C_8H_{18}O$	123-96-6	втор-Октиловый спирт; гексилметилкарбинол; 2-октанол; 1-метил-1-гептанол; β-октиловый спирт, октанол-2, 2-каприловый спирт	ВТ 002475	04.07.06
9	μ-7,7'-[Бис[4-[4,5-дигидро-4-(5-гидрокси-1-фенил)азо]-3-метил-5-гидрокси-1Н-пирразол-1-ил]-2,4-нафталинсульфонат(4-)]дикупрат(2-) динатрия $C_{40}H_{24}Cu_2N_8Na_2O_{16}S_4$		Краситель органический прямой красно-фиолетовый СВ 3КМ	ВТ 002476	07.07.06
10	4-[[4-(Ацетиламино)фенил]амино]-1-амино-9,10-дигидро-9,10-диоксо-2-антраценсульфовая кислота $C_{22}H_{17}N_3O_6S$	6247-34-3	Краситель органический кислотный чисто-синий антрахиноновый	ВТ 002477	07.07.06
11	8,18-Дихлор-5,15-диэтил-5,15-дигидродииндол[3.2-b:3',2'-m]-трифенодиоксазин $C_{34}H_{22}Cl_2N_4O_2$	6358-30-1	Краситель органический пигмент фиолетовый 23; С.І.51319; С.І. Pigment Violet 23	ВТ 002478	07.07.06
12	1,1-Диметилэтилгидропероксид $C_4H_{10}O_2$	75-91-2	Гидропероксид трет-бутила, трет-бутилгидропероксид	ВТ 002479	08.07.06
13	1,1'-[1,4-Фениленбис[[имино(6-хлор-1,3,5-триазин-4,2-дил)имино]][4-(5-гидрокси-3-сульфофенил)азо]]]бис(нафталин-2,7-дисульфонат)гексанатрия $C_{44}H_{24}Cl_2N_{14}Na_6O_{20}S_6$	77907-32-5	Краситель органический активный темно-синий К; С.І.Активный синий 171; Procion Navy H-ER	ВТ 002480	08.07.06

№ п/п	Наименование вещества по IUPAC	№ CAS	Синонимы, торговые и фирменные названия	Номер государственной регистрации	Дата окончания срока госрегистрации
14	7,7'-[2,2'-((Дисульфо)дифенил-4,4'-диил)бис[[имино(6-хлор-1,3,5-триазин-4,2-диил)имино]]3-((ацетиламин)фенил)азо]]бис-(нафталинтрисульфонат) октанатрия $C_{54}H_{32}Cl_2N_{16}Na_8O_{26}S_8$	61951-85-7	Краситель органический активный желтый 4 К; С.І.Активный желтый 84; Procion Yellow H-E4R	BT 002481	08.07.06
15	2,2'-[1,4-Фениленбис[[имино(6-хлор-1,3,5-триазин-4,2-диил)имино]](8-гидрокси-3,6-дисульфо-1,7-нафталиндиил)азо]]бис-(нафталин-1,5-дисульфонат) октанатрия $C_{52}H_{26}Cl_2N_{14}Na_8O_{26}S_8$	61931-52-0	Краситель органический активный красный 7 С; С.І.активный красный 141; Procion Red HE 7B	BT 002482	08.07.06
16	N-(4-Хлорфенил)-N'-(3,4-дихлорфенил)карбамид $C_{13}H_9Cl_3N_2O$	101-20-2	Трихлоркарбан, 3,4,4'-трихлоркарбамид, [1-(4-хлорфенил)-3-(3,4-дихлорфенил)]мочевина, трихлордифенилмочевина; ТСС	BT 002483	10.07.06
17	Циклогексилнитрат $C_6H_{11}NO_3$	2108-66-9	Циклогексильный эфир азотной кислоты, циклогексилнитрат	BT 002484	11.07.06
18	2-Хлор-1,4-диаминобензол $C_6H_7ClN_2$	615-66-7	o-Хлор-p-фенилендиамин 1,4-диамин-2-хлорбензол 2-хлор-1,4-фенилендиамин; 2-хлор-p-фенилендиамин 3-хлор-p-фенилендиамин, мономер МД, С.І.76065, URSOL BROWN O	BT 002487	28.07.06
19	Иридий тетрахлорид гидрат $Cl_4Ir \cdot nH_2O$	207399-11-9	Иридий (IV) хлорид гидрат	AT 002488	28.07.06

Производство и применение перечисленных веществ возможно только после их перерегистрации.



Планируемые международные мероприятия на 2006 г.*

4-6 сентября, Ливерпуль, Англия	Ежегодное заседание Общества по токсикологии окружающей среды и химии. Annual meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC-2006).
	Для справок: http://www.setacuk2006.org
26-29 ноября, Альмерия, Испания	4-ая Европейская конференция по пестицидам и другим органическим микрозагрязнителям в окружающей среде и 10-ый Симпозиум по химии и отдаленным превращениям современных пестицидов. 4th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment and 10th Symposium on the Chemistry and Fate of Modern Pesticides.
	Для справок: www.uat.es/Congresos/Conference2006 .

* Начало в № 6 за 2005 г.

**ПЕРЕЧЕНЬ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ,
ПРОШЕДШИХ ГОСУДАРСТВЕННУЮ РЕГИСТРАЦИЮ
(печатается с продолжением, сообщение № 70*)**

№ п/п	Наименование вещества по IUPAC	№ CAS	Синонимы, торговые и фирменные названия	Номер гос. регистрации Номер РПОХБВ	Дата регистрации	Срок действия регистрации
1	2 - [[6 - [(4 - Ам - но-6-хлор-1,3,5-триазин-2-ил)метиламино]-1-гидрокси-3-сульфо-2-нафталил]азо]нафталин-1,5-дисульфонат тринатрия $C_{24}H_{15}ClN_7Na_3O_{10}S_3$	12225-85-3	Краситель органический активный оранжевый 2К; краситель оранжевый 13 (Reactive Orange 13); Procion Orange H-2R; C.I.18270	77.99.26.8.У. 3942.5.06 ВТ 002813	06.05.06	временно до 10.04.09
2	Бензолуксусная кислота $C_8H_8O_2$	103-82-2	α -Толуиловая кислота, фенилуксусная кислота	77.99.26.8.У. 3024.4.06 ВТ 002460	04.04.06	временно до 12.05.09
3	Доц-1-ен ди-, три-, тетра- и пентамеры гидрированные		1-Децена димеры, тримеры, тетрамеры, пентамеры гидрированные (изопарафины), масла базовые полиальфаолефиновые марки: ПАОМ-2, ПАОМ-4, ПАОМ-6, ПАОМ-12, ПАОМ-13	77.99.26.8.У. 4399.5.06 ВТ 002814	22.05.06	временно до 20.04.09
4	Калий гипохлорит СКО	7778-66-7	Калий хлорноватистокислый, калий оксихлорид, калиевая соль хлорноватистой кислоты, калий хлорид оксид, калий гипохлорит	77.99.26.8.У. 4146.5.06 АТ 002810	16.05.06	временно до 24.03.09
5	Краситель хромитовый Глейз Грин		Руда хромовая обогащенная, краситель хромитовый Глейз Грин (Glaze Green) марки А, Б и В	77.99.26.8.У. 4415.5.06 АТ 002817	23.05.06	постоянно
6	Меди (I) цианид CCuN	544-92-3	Медь цианистая, медь цианид	77.99.26.8.У. 3023.4.06 АТ 002809	04.04.06	постоянно
7	Парафины (нефтяные) изо- и линейные C_5 - C_{20} $C_{5-20}H_{12-42}$		НИ-ТЕСН 120	77.99.26.8.У. 3941.5.06 ВТ 002815	06.05.06	постоянно
8	Три(2-гидроксиэтил)аминоалкил C_{8-18} сульфат $C_{14-24}H_{33-53}NO_7S$		Триэтаноламиновые соли алкил C_{8-18} серных кислот, триэтаноламиноалкил- C_{8-18} сульфаты, триэтаноламиновые соли сернокислых эфиров первичных высших жирных спиртов фракции C_{8-18} , триэтаноламин алкилсульфаты первичных высших жирных спиртов фракций C_{8-18} (водный раствор вещества)	77.99.27.8.У. 3467.4.06 ВТ 002812	20.04.06	постоянно
9	Три(карбонилдигидразид N_2O)кадмий дихлорат $C_3H_{18}CdCl_2N_{12}O_{11}$	111275-28-6	Трис(карбогидразид)кадмий II перхлорат, Циркон	77.99.26.8.У. 4400.5.06 ВТ 001805	22.05.06	временно до 19.07.09
10	Цирконий динитрат оксид дигидрат $N_2O_7Zn \cdot 2H_2O$	20213-65-4	Цирконил нитрат дигидрат, бис-(нитрат-0)оксоцирконий, динитратоксоцирконий, цирконил азотнокислый 2-водный	77.99.27.8.У. 4589.5.06 АТ 002805	26.05.06	временно до 01.03.09

* Начало в № 4 за 1994 г.