

ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ЭКСПЕРТИЗА

ОЦЕНКА И ВЗАИМОСВЯЗЬ ПАРАМЕТРОВ ТОКСИЧНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ИНFUЗОРИЙ ТЕТРАХИМЕНА ПИРИФОРМИС И БЕЛЫХ КРЫС

В.А. Долгов¹, С.А. Лавина¹,
Д.В. Никитченко²

¹ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии
Звенигородское шоссе, 5, Москва, Россия, 123022

²Кафедра морфологии животных
и ветеринарно-санитарной экспертизы
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

В статье приведены результаты сравнительной оценки параметров токсичности различных веществ для инфузорий тетрахимен и белых крыс, показана их взаимосвязь и возможность межвидовой экстраполяции результатов биотестирования, полученных на инфузориях, на высших животных.

Ключевые слова: параметры токсичности, инфузории тетрахимены, белые крысы.

Введение. Инфузории Тетрахимена пириформис достаточно широко известны в качестве тест-организма, используемого в токсико-биологических исследованиях [2; 7; 8], что объясняется сходством основных этапов обмена веществ этих простейших с высшими животными.

Поскольку использование последних в качестве моделей для определения параметров токсичности различных веществ и соединений требует существенных материальных затрат (наличие вивария, содержание и кормление животных, длительность опыта и т.д.) и неизбежно с этической точки зрения, возникает необходимость поиска альтернативных тест-организмов, которые позволяют проводить подобные исследования с целью последующей экстраполяции полученных данных на высших животных. Это позволит существенно ограничить объем проводимых исследований с использованием лабораторных животных с соответствующей экономией времени и средств, а в некоторых случаях, возможно, и полностью их исключить.

Целью наших исследований было провести сравнительную оценку параметров токсичности различных веществ для инфузорий Тетрахимена пириформис и белых крыс, изучить их взаимосвязь и возможность использования результатов анализа на инфузориях для ориентировочного определения показателей токсичности ксенобиотиков для высших животных.

Материалы и методы исследований. Для сравнительной оценки параметров токсичности, определяемых в опытах на инфузориях и белых крысах, нами были взяты дозы различных веществ, вызывающие 50%-й летальный эффект при их введении в желудок лабораторных животных (белых крыс) — LD_{50} , поскольку этот показатель является одним из самых распространенных в токсикологических исследованиях.

Количественные значения LD_{50} заимствованы нами из соответствующих литературных источников [1; 9—11] для следующих соединений: перманганата калия; сульфатов железа, меди и кадмия; нитрита натрия; нитрата калия, карбонатов лития и таллия; хлорида кобальта; фенола; хлороформа; ацетонитрила; этанола; резорцина; фурацилина; диметилсульфоксида; циодрина; хлорофоса; ДДВФ; ди-ацетоксисцирпенола; Т-2 токсина. Многие из этих соединений имеют ветеринарно-санитарное и экологическое значение как возможные загрязнители кормовых и пищевых продуктов, а также объектов окружающей среды, используются в промышленности, сельскохозяйственном производстве и ветеринарной практике.

Опыты на инфузориях проводились с определением основных тест-функций простейших — ростовой (генеративной) и поведенческой (хемотаксической) реакций. При изучении ростовой реакции тетрахимен использовали ряд основных методических подходов, изложенных в разработанных нами методических рекомендациях [3; 6].

В опытах применяли пептонную среду, в которую вносили необходимое количество исследуемого вещества в различных концентрациях, ингибирующих рост инфузорий от минимального значения до полного (IC — ингибирующие концентрации). Анализ проводили во флаконах из-под антибиотиков в объеме среды 2 мл. Количество инокулята (3—5-суточная культура тетрахимен), вносимого во флаконы с средой и испытуемым веществом, составляло 0,05 мл. Контролем служила пептонная среда без добавления исследуемого токсиканта.

Через 24 часа экспозиции под микроскопом определяли жизнеспособность инфузорий, затем клетки фиксировали каплей 5%-го спиртового раствора йода и подсчитывали их количество в камере Фукса-Розенталя. На основании результатов подсчета выросших клеток определяли величины концентраций исследуемых соединений, вызывающих минимальную статистически достоверную задержку роста инфузорий по сравнению с контролем ($IC_{мин}$), 50%-ю задержку роста (IC_{50}) и полное его подавление, т.е. гибель инфузорий (IC_{100}).

Изучение поведенческой реакции тетрахимен осуществляли по разработанному нами методу [4; 5] с использованием прибора «Биотестер-2». Растворы исследуемых соединений готовили на дистиллированной воде в различных концент-

рациях, обеспечивающих подавление хемотаксиса инфузорий от минимального значения до полного.

При исследовании микотоксинов их растворяли в 10%-м водном растворе диметилсульфоксида (ДМСО), а затем разбавляли полученный раствор в 10 раз, доводя концентрацию ДМСО до 1%, не оказывающую отрицательного влияния на инфузорий. Анализ проводили в фотометрических кюветах, куда вносили по 2 мл 3—5-суточной культуры инфузорий, выращенных на пептонной среде, затем сверху наслаивали такой же объем раствора испытуемого вещества и через 30, 45 и 60 минут проводили фотометрию верхнего слоя жидкости в приборе с целью определения концентрации инфузорий. Устанавливали концентрации веществ, вызывающих минимальное ($IC_{мин}$), 50%-е (IC_{50}) и полное подавление хемотаксической реакции инфузорий (IC_{100}) по сравнению с контролем (дистиллированная вода).

Полученные данные подвергали статистической обработке с определением коэффициента корреляции между показателями токсичности, установленными для белых крыс (LD_{50}), и ингибирующими концентрациями ($IC_{мин}$, IC_{50} , IC_{100}), определенными в опытах на инфузориях. На основании графических построений рассчитывали математические формулы, отражающие их взаимосвязь.

Результаты исследований. Полученные данные представлены в таблице, в которой приводятся также логарифмы параметров токсичности изученных соединений для белых крыс и инфузорий, использованные при построении графиков, отражающих взаимосвязь показателей LD_{50} и ингибирующих концентраций (IC).

Анализируя результаты проведенных исследований, можно сделать вывод о том, что чувствительность инфузорий к различным веществам неодинакова, как неодинаковы и пределы чувствительности ростовой и поведенческой реакций тетрахимен. Минимальная концентрация соединений, ингибирующая ростовую реакцию, может колебаться в довольно широких пределах — от сотых долей мг/л (диацетоксисцирпенол, Т-2 токсин) до нескольких тысяч мг/л (нитрат калия, диметилсульфоксид, этанол).

Аналогичная картина была и в отношении поведенческой реакции, которая начинала ингибироваться в диапазоне концентраций от 0,08 мг/л (диацетоксисцирпенол) до 40000 мг/л (диметилсульфоксид).

Хемотаксис инфузорий оказался более чувствительным, чем ростовая реакция, при индикации минимальных ингибирующих концентраций 8 из 21 изученного вещества; обратная картина наблюдалась при биотестировании 9 соединений, а для 4 чувствительность обеих тест-функций была примерно равной.

Из представленных в таблице данных видно также, что количественные значения LD_{50} изученных веществ в целом сопоставимы с величинами их ингибирующих концентраций (IC), выраженными в мг/л питательной среды, а для ряда соединений (перманганат калия, сульфаты меди и железа, нитрит натрия, ацетонитрил, резорцин и др.) они близки и в абсолютном значении, в особенности при сравнении LD_{50} с концентрациями, подавляющими ростовую реакцию инфузорий.

Таблица

Сравнительная оценка параметров токсичности различных веществ для белых крыс и инфузорий (в скобках — логарифмы концентраций)

Вещества	LD ₅₀ для белых крыс, мг/кг	Ингибирующая концентрация (IC) для инфузорий, мг/л					
		ростовая (генеративная) реакция			поведенческая (хемотаксическая) реакция		
		IC _{мин}	IC ₅₀	IC ₁₀₀	IC _{мин}	IC ₅₀	IC ₁₀₀
Перманганат калия	750 (2,88)	25 (1,4)	400 (2,6)	500 (2,7)	0,5 (-0,3)	10 (1,0)	100 (2,0)
Сульфат железа	533 (2,73)	50 (1,7)	250 (2,4)	5 000 (3,7)	50 (1,7)	1 000 (3,0)	5 000 (3,7)
Нитрит натрия	200,5 (2,3)	150 (2,18)	300 (2,48)	1 500 (3,18)	40 (1,6)	700 (2,85)	800 (2,9)
Нитрат калия	3 540 (3,55)	2 000 (3,3)	6 000 (3,78)	17 000 (4,23)	2 500 (3,4)	6 500 (3,81)	11 000 (4,04)
Карбонат лития	553 (2,74)	90 (1,95)	250 (2,4)	1 800 (3,26)	9 (0,95)	100 (2,0)	500 (2,7)
Карбонат таллия	15 (1,18)	75 (1,88)	150 (2,18)	700 (2,85)	1 (0)	8,5 (0,93)	1 000 (3,0)
Сульфат меди	450 (2,65)	420 (2,65)	750 (2,88)	2 400 (3,38)	0,4 (-0,4)	7,5 (0,88)	50 (1,7)
Сульфат кадмия	60 (1,78)	1 (0)	2,5 (0,4)	25 (1,4)	1 (0)	25 (1,4)	45 (1,65)
Хлорид кобальта	80 (1,9)	2 (0,3)	25 (1,4)	2 000 (3,3)	0,01 (-2)	5 (0,7)	3 000 (3,48)
Фенол	512 (2,71)	80 (1,9)	140 (2,15)	270 (2,43)	100 (2,0)	250 (2,4)	800 (2,9)
Хлороформ	1 750 (3,24)	1 (0)	300 (2,48)	1 800 (3,26)	100 (2,0)	500 (2,7)	2 500 (3,4)
Ацетонитрил	3 800 (3,58)	900 (2,95)	6 000 (3,78)	16 000 (4,2)	5 000 (3,7)	17 000 (4,23)	32 000 (4,51)
Этанол	8 500 (3,93)	4 500 (3,65)	8 500 (3,93)	28 000 (4,45)	15 000 (4,18)	20 000 (4,3)	40 000 (4,6)
Резорцин	239 (2,38)	22 (1,34)	90 (1,95)	910 (2,96)	0,1 (-1,0)	250 (2,4)	600 (2,78)
Фурацилин	600 (2,78)	43 (1,63)	150 (2,18)	240 (2,38)	0,1 (-1,0)	180 (2,26)	240 (2,38)
Диметилсульфоксид	24 000 (3,38)	12 000 (4,08)	15 000 (4,18)	23 000 (4,36)	40 000 (4,6)	>80 000 (4,9)	—
Циодрин	35 (1,54)	0,5 (-0,3)	3,0 (0,48)	25 (1,4)	100 (2,0)	150 (2,18)	300 (2,48)
Хлорофос	630 (2,8)	650 (2,81)	1 400 (3,15)	4 500 (3,65)	1 000 (3,0)	6 500 (3,81)	10 000 (4,0)
ДДВФ	80 (1,9)	2,5 (0,4)	30 (1,48)	150 (2,18)	150 (2,18)	250 (2,4)	450 (2,65)
Диацетоксисцирпенол	7,3 (0,86)	0,015 (-1,82)	0,06 (-1,22)	0,25 (-0,6)	0,08 (-1,1)	1,25 (0,1)	10 (1,0)
T-2 токсин	3,8 (0,58)	0,02 (-1,7)	0,05 (-1,3)	0,25 (-0,6)	0,5 (-0,3)	>10 (1,0)	—

Сравнительная оценка данных параметров показала высокую степень их корреляционной связи. Так, коэффициент корреляции (r) между LD₅₀ и концентрациями, угнетающими рост тетрахимен (IC_{мин}, IC₅₀ и IC₁₀₀), равнялся, соответственно, 0,99, 0,94 и 0,77; между LD₅₀ и аналогичными концентрациями, ингибирующими хемотаксис — 0,99, 0,98 и 0,91. Данная взаимосвязь свидетельствует о том, что

в проявлении токсико-биологической реакции как высших животных, так и инфузорий тетрахимен есть много общего, что является следствием сходства основных этапов обмена веществ.

Разумеется, не все существующие токсиканты могут в одинаковой мере угнетать жизнедеятельность инфузорий и высших животных, поскольку видовые отличия в чувствительности к тем или иным соединениям, которые, как известно, существуют и среди высших организмов, неизбежно будут оказывать на это влияние.

Тем не менее полученные данные, свидетельствующие о высокой степени корреляционной связи параметров токсичности, определяемых на крысах и инфузориях, позволяют использовать результаты анализа на тетрахименах с целью ориентировочного определения концентраций веществ, которые могут вызывать токсический эффект у высших организмов.

Графическая взаимосвязь показателей токсичности (LD_{50} и IC) представлена на рисунке.

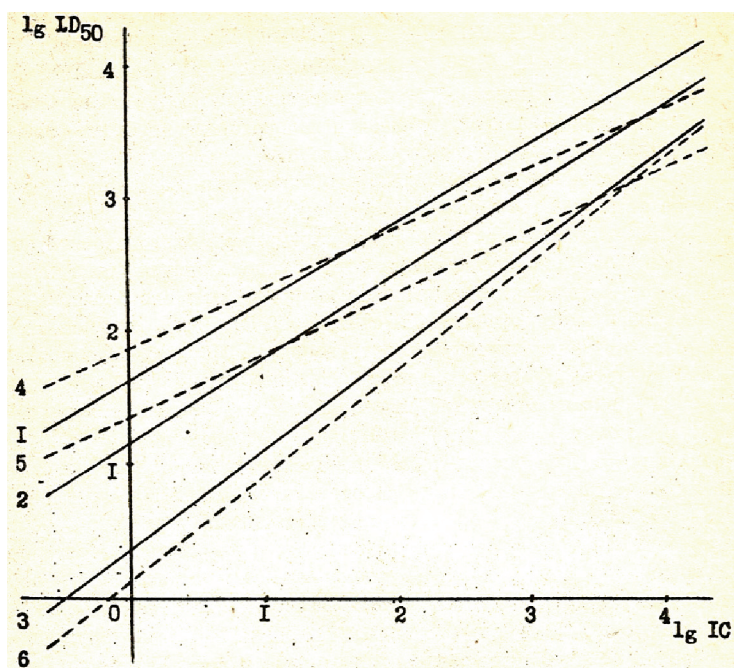


Рис. Взаимосвязь логарифмов LD_{50} и IC

(— — — — — ростовая реакция; - - - - - поведенческая реакция)

- 1) $\lg LD_{50} = 1,67 + 0,588 \lg IC_{мин}$ ($r = 0,99$; $m_r = 0,031$; $n = 21$; $P < 0,01$)
- 2) $\lg LD_{50} = 1,20 + 0,625 \lg IC_{50}$ ($r = 0,94$; $m_r = 0,025$; $n = 21$; $P < 0,01$)
- 3) $\lg LD_{50} = 0,36 + 0,756 \lg IC_{100}$ ($r = 0,77$; $m_r = 0,091$; $n = 21$; $P < 0,01$)
- 4) $\lg LD_{50} = 1,87 + 0,455 \lg IC_{мин}$ ($r = 0,99$; $m_r = 0,0004$; $n = 21$; $P < 0,01$)
- 5) $\lg LD_{50} = 1,38 + 0,450 \lg IC_{50}$ ($r = 0,98$; $m_r = 0,006$; $n = 21$; $P < 0,01$)
- 6) $\lg LD_{50} = 0,15 + 0,787 \lg IC_{100}$ ($r = 0,91$; $m_r = 0,03$; $n = 21$; $P < 0,01$)

Исходя из установленных зависимостей между LD_{50} и IC , нами предложен ряд формул, использование которых дает возможность расчета параметров токсичности веществ для крыс на основании их биотестирования на инфузориях.

При определении ростовой реакции тетрахимен данные формулы имеют следующий вид:

$$\lg LD_{50} = 1,67 + 0,588 \lg IC_{\text{мин}}; \quad (1)$$

$$\lg LD_{50} = 1,20 + 0,625 \lg IC_{50}; \quad (2)$$

$$\lg LD_{50} = 0,36 + 0,756 \lg IC_{100}. \quad (3)$$

При изучении поведенческой реакции инфузорий формулы расчета LD_{50} имеют следующий вид:

$$\lg LD_{50} = 1,87 + 0,455 \lg IC_{\text{мин}}; \quad (4)$$

$$\lg LD_{50} = 1,38 + 0,450 \lg IC_{50}; \quad (5)$$

$$\lg LD_{50} = 0,15 + 0,787 \lg IC_{100}. \quad (6)$$

При расчетах для получения более стабильных и близких к фактическим значений LD_{50} предпочтительнее брать в качестве критерия ростовую реакцию тетрахимен (формулы 1—3), которая является интегрированным выражением протекающих в клетке обменных процессов; при использовании поведенческой реакции целесообразно применять концентрации, ингибирующие данную тест-функцию на 50 и 100% (формулы 5 и 6).

Заключение. В результате исследований проведена сравнительная оценка и установлена взаимосвязь параметров токсичности различных веществ для инфузорий тетрахимена пириформис и белых крыс. Предложены математические формулы, позволяющие на основании результатов определения концентраций веществ, ингибирующих ростовую и поведенческую реакции инфузорий, ориентировочно определять показатель LD_{50} для белых крыс, что имеет как научное, так и практическое значение при проведении токсикологических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Вредные вещества в промышленности. — Л., 1976.
- [2] Долгов В.А. Методические аспекты и практическое применение ускоренной биологической оценки кормов, продуктов животноводства и других объектов ветеринарно-санитарного и экологического контроля: Дисс. ... докт. вет. наук. — М., 1992.
- [3] Долгов В.А., Нелюбин В.П., Шаблий В.Я., Суханов Б.П. Методические рекомендации для использования экспресс-метода биологической оценки продуктов и кормов. — М.: ВАСХНИЛ, 1990.
- [4] Долгов В.А., Лапаев В.Э. Методические рекомендации «Использование инфузорий (Тетрахимена пириформис) в качестве тест-культуры в приборе «Биотестер-2» (экспресс-метод). — М.: Государственное лечебно-оздоровительное объединение, 1991.
- [5] Долгов В.А., Лавина С.А. Методические указания по использованию инфузорий *Tetrahymena pyriformis* в качестве тест-культуры в приборе «Биотестер-2». — М.: Департамент ветеринарии МСХ РФ, 2000. — № 13-7-2/2156.
- [6] Долгов В.А., Лавина С.А., Арно Т.С. и др. Методическое пособие по биотестовой оценке качества и безопасности различных объектов ветеринарно-санитарного и экологического контроля. — М.: РАСХН, 2010.
- [7] Игнатъев А.Д., Шаблий В.Я. Использование инфузории тетрахимены пириформис как тест-объекта при биологических исследованиях в сельском хозяйстве. — М.: ВАСХНИЛ, 1978.

- [8] *Лавина С.А.* Биотесты на основе ферментных систем для оценки токсического действия ксенобиотиков на объекты ветеринарно-санитарного и экологического контроля: Дисс. ... докт. биол. наук. — М., 2002.
- [9] Микотоксины. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. II. — ВОЗ. Женева, 1982.
- [10] Список химических и биологических средств борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками и регуляторов роста растений, разрешенных для применения в сельском хозяйстве на 1986—1990 годы. — М., 1987.
- [11] *Шамиурин А.А., Криммер М.З.* Физико-химические свойства пестицидов. Справочник. — М.: Химия, 1976.

COMPARATIVE EVALUATION AND RELATIONSHIP OF TOXICITY PARAMETERS OF DIFFERENT SUBSTANCES TO TETRAHYMENA PIRIFORMIS AND WHITE RATS

V.A. Dolgov¹, S.A. Lavina¹,
D.V. Nikitchenko²

¹All-Russian Scientific and Research Institute
Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology
Zvenigorodsky highway, 5, Moscow, Russia, 123022

²Department of morphology of animals
and veterinary-sanitary inspection
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8/2, Moscow, Russia, 117198

The article presents the results of a comparative evaluation of various substances toxicity parameters for *Tetrahymena pyriformis* and white rats, shows their relationship and the possibility of interspecies extrapolation of bioassay results obtained on infusoria on higher animals.

Key words: toxicity parameters, *Tetrahymena pyriformis*, white rats.

REFERENCES

- [1] *Vrednye veshchestva v promyshlennosti.* — L., 1976.
- [2] *Dolgov V.A.* Metodicheskie aspekty i prakticheskoe primeneniye uskorennoy biologicheskoy ocenki kormov, produktov zhivotnovodstva i drugih obektov veterinarno-sanitarnogo i jekologicheskogo kontrolja: Diss. ... dokt. vet. nauk. — M., 1992.
- [3] *Dolgov V.A., Neljubin V.P., Shablij V.Ja., Suhanov B.P.* Metodicheskie rekomendacii dlja ispol'zovaniya jekspress-metoda biologicheskoy ocenki produktov i kormov. — M.: VASHNIL, 1990.
- [4] *Dolgov V.A., Lapaev V.Je.* Metodicheskie rekomendacii «Ispol'zovanie infuzorij (*Tetrahymena pyriformis*) v kachestve test-kul'tury v pribore «Biotester-2» (jekspress-metod). — M.: Gosudarstvennoe lechebno-ozdorovitel'noe ob#edinenie, 1991.
- [5] *Dolgov V.A., Lavina S.A.* Metodicheskie ukazaniya po ispol'zovaniyu infuzorij *Tetrahymena pyriformis* v kachestve test-kul'tury v pribore «Biotester-2». — M.: Departament veterinarii MSH RF, 2000. — № 13-7-2/2156.

- [6] *Dolgov V.A., Lavina S.A., Arno T.S. i dr. Metodicheskoe posobie po biotestovoj ocenke kachestva i bezopasnosti razlichnyh ob#ektov veterinarno-sanitarnogo i jekologicheskogo kontrolja.* — M.: RASHN, 2010.
- [7] *Ignat'ev A.D., Shabl'ij V.Ja. Ispol'zovanie infuzorii tetrahimeny piriformis kak test-ob#ekta pri biologicheskikh issledovanijah v sel'skom hozjajstve.* — M.: VASHNIL, 1978.
- [8] *Lavina S.A. Biotesty na osnove fermentnyh sistem dlja ocenki toksicheskogo dejstvija ksenobiotikov na obekty veterinarno-sanitarnogo i jekologicheskogo kontrolja: Diss. ... dokt. biol. nauk.* — M., 2002.
- [9] *Mikotoksiny. Gigienicheskie kriterii sostojanija okruzhajushhej sredy. II.* — VOZ. Zheneva, 1982.
- [10] *Spisok himicheskikh i biologicheskikh sredstv bor'by s vrediteljami, boleznjami rastenij i sornjakami i reguljatorov rosta rastenij, razreshennyh dlja primenenija v sel'skom hozjajstve na 1986—1990 gody.* — M., 1987.
- [11] *Shamshurin A.A., Krimmer M.Z. Fiziko-himicheskie svojstva pesticidov. Spravochnik.* — M.: Himija, 1976.