

15. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. М.: Мир, 1989, 439 с.
16. Огородникова С.Ю., Головкин Т.К. Агрехимия, 2005, № 4, с. 37—41.
17. Кочурова Т.И., Тимонюк В.М., Машковцева Л.В. В сб.: Актуальные проблемы регионального экологического мониторинга: теория, методика, практика. Мат. Всерос. на-уч. школы, г. Киров, 16—18 ноября 2004 г. Киров, 2004, с. 218—219.
18. Научно-методическое руководство по организации под-системы биологического мониторинга природных сред и объектов в рамках государственного экологического кон-троля и мониторинга объектов хранения и уничтожения химического оружия. Под ред. Т.Я. Ашихминой. Киров.: ВятГГУ, 2006, 249 с.

УДК 661.718.1.004.74:573.6

Изучение токсикологического и цитогенетического эффектов действия зомана и продуктов его детоксикации на гидробионтов методом биотестирования

Е. Ю. Конешова, С. А. Конешов, Т. А. Радюшкина, В. В. Волков

Саратовский военный институт радиационной, химической и биологической защиты

В рамках задачи создания надежной системы экологического мониторинга на территории, где располагаются объекты по уничтожению химического оружия, особую актуальность приобретают вопросы изучения токсического действия на представителей фауны природных экосистем, способных реагировать на очень низкие концентрации отравляющих веществ, в ряде случаев на уровне чувствительности аналитического прибора или превышающих ее. Использование метода биотестирования, наряду с общепринятыми методами химико-аналитического анализа, позволит обеспечить эффективный экологический контроль и мониторинг, повысить надежность оценки уровня загрязнения окружающей среды в районе техногенного влияния химически опасного производства и осуществить прогноз в отношении долгосрочных последствий.

Создание системы экологического мониторинга должно базироваться на результатах исследований закономерностей функционирования природных экосистем, изучения действия токсичных соединений на всех уровнях организации живой материи — от цитогенетического до биогеоценологического — в условиях лабораторного (биотестирование) и полевого эксперимента (биоиндикация). Выбор биоиндикаторов и тест-объектов для контроля за состоянием окружающей среды на территории экологического риска осуществляется путем изучения их ответных реакций на воздействие отравляющих веществ и продуктов их детоксикации — реакционных масс. Таким образом, изучение токсикологического и цитогенетического эффекта действия отравляющих веществ и продуктов их детоксикации методом биотестирования является одним из необходимых этапов создания научно-методической базы данных для практической реализации защитных мероприятий на объектах по уничтожению химического оружия.

В данной статье представлены результаты лабораторного эксперимента по изучению реакций представителей водных экосистем на воздействие зомана и продуктов его детоксикации.

В качестве модельных видов для экспериментов были выбраны фоновые виды гидробионтов водоемов, находящихся на территории размещения объектов по хранению фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ), с учетом вертикального распределения гидробионтов в водной среде. Так, двустворчатые моллюски и хирономиды, представляющие личиночную стадию двукрылых насекомых — комаров, являются типичными глубоководными обитателями и сосредоточены в илестых или илисто-песчаных биотопах, прудовики занимают верхние слои водоема, а озерная лягушка — зону побережья и является своего рода связующим звеном между водными и наземными экосистемами. Выбранные виды относятся к разным экологическим нишам рассматриваемого природного комплекса, они характеризуются различными типами дыхания и поведенческими реакциями, различаются размерами тела и степенью проницаемости покровов. Конкретно в экспериментах использовались следующие виды: хирономиды (*Chironomus thummi*), беззубка (*Anodonta sp.*), прудовик малый (*Lumna truncatula L.*), лягушка озерная (*Pana ridibunda Pall.*) (общее количество опытных гидробионтов — 852 экземпляра).

Исследования проводили поэтапно, используя различные подходы биотестирования — физиологический, иммунологический, клеточный и генетический.

На первом этапе определяли значения основных токсикометрических показателей: среднесмертельную концентрацию (LC_{50}) — концентрацию, воздействие которой приводит к 50%-ному смертельному исходу, среднесмертельную ингаляционную токсодозу ($LC\tau_{50}$) и среднесмертельное время (Lt_{50}) — время, за которое фиксируется 50%-ный смертельный исход при воздействии токсиканта определенной концентрации. На основании этих показателей был установлен экологический ряд чувствительности гидробионтов к зоману и его продуктам детоксикации, а также диапазон действующих концентраций токсикантов. Одновременно велось наблюдение за поведением гидробионтов, что имело важное значение для раннего обнаружения

специфических симптомов реагирования на присутствие токсиканта в водной среде.

На втором этапе изучали возможности биотестирования на клеточном уровне с использованием наиболее чувствительного к действию зомана и продуктов его детоксикации вида — озерной лягушки с последующим обнаружением тест-реакций со стороны периферической крови в ответ на воздействие токсикантов.

На третьем этапе биотестирования проводился кариологический анализ политенных хромосом. В этих экспериментах использовали наиболее устойчивый к действию зомана и реакционным массам вид — хирономиды.

Токсичность зомана и продуктов его детоксикации для гидробионтов

Токсическое действие зомана и продуктов его детоксикации для представителей пресноводных водоемов (первый этап исследований) изучалось в условиях, моделирующих естественное существование животных в природной среде. Такая постановка экспериментов позволяла наиболее полно создать возможные условия воздействия токсикантов на обитателей водной среды в случае аварийной ситуации, сопровождающейся попаданием ксенобиотиков в водоемы. Эксперименты проводили на клинически здоровых озерных лягушках массой от 50 до 100 г; моллюсков отбирали приблизительно одних размеров. Животных, отловленных за сутки до эксперимента, разбивали на группы (в одной группе — не менее 6 особей позвоночных животных и от 12 до 18 беспозвоночных), помещали их в лабораторную посуду в условия, моделирующие естественное существование в окружающей среде, и вносили зоман в количестве, необходимом для получения исследуемых концентраций.

При наблюдении за животными, находящимися в среде, зараженной зоманом (диапазон концентраций 0,0075—50 мг/л) и продуктами его детоксикации (0,002—8000 мг/л), отмечали смертельные исходы и фиксировали видимые изменения в поведенческих реакциях животных. Расчет токсиметрических параметров с доверительными интервалами проводили по методу пробит-анализа Литчфилда—Уилкоксона [1].

По токсикологическим показателям обитающих в водной среде животных по мере снижения чувствительности их к зоману можно расположить в следующем порядке:

лягушка озерная	($LC_{\tau_{50}} = 5,5 \text{ мг} \cdot \text{мин/л}$)
	↓
прудовик малый	($LC_{50} = 0,0044 \text{ мг/л}$)
	↓
беззубка	($LC_{50} = 0,24 \text{ мг/л}$)
	↓
хирономиды	($LC_{50} = 6,64 \text{ мг/л}$)

В клинике интоксикации у гидробионтов выявлялось нарушение координации движений, рефлекса равновесия, признаки, свидетельствующие о вовлечении в патологический процесс дыхательной мускулатуры, наблюдалось подавление строительной функции у хирономид, разведение створок раковин у беззубок, развитие состояния асфиксии у прудовиков в результате обводнения их организма.

На основании результатов проведенных токсикологических исследований можно сделать следующие выводы. Из обитателей водоемов наиболее чувствительны к воздействию зомана животные, для активной жизнедеятельности которых необходим в больших количествах кислород. Это представители класса амфибий (*Pana ridibunda Pall.*) и брюхоногих моллюсков (*Lumna truncatula L.*), более устойчив к рассматриваемому ксенобиотику вид двухстворчатых (*Anodonta sp.*) моллюсков и наименее чувствителен вид класса насекомых (*Chironomus thummi*). Представитель амфибионтов — озерная лягушка — может быть использован в качестве объекта биоиндикации водной среды.

С продуктами деструкции зомана в случае попадания их в водоем одними из первых будут контактировать хирономиды (плотность этих реакционных масс больше плотности воды) и они наиболее устойчивы к воздействию самого эталона (зомана). Результаты исследований показали, что ответная реакция хирономид на воздействие продуктов детоксикации зомана аналогична той, которая наблюдается при воздействии эталона. Токсичность же реакционных масс для этих гидробионтов по сравнению с зоманом на третьи сутки наблюдения снижается в среднем в 539 раз, о чем свидетельствуют значения LC_{50} : относительно реакционных масс на третьи сутки эксперимента LC_{50} составляет 3610 (2910—4670) мг/л, а для зомана — 6,7 (4,0—12,1) мг/л.

Для получения более полной информации о видовой чувствительности реакционных масс в отношении обитателей пресных водоемов были проведены эксперименты с самым чувствительным представителем гидрофауны — озерной лягушкой. Наблюдалась несколько иная картина в развитии интоксикационного процесса, свидетельствующая о способности лягушек частично восстанавливать дыхательную и двигательную активности после воздействия вещества в концентрации 7600 мг/л в течение не более 39 мин.

Среднесмертельная ингаляционная токсодоза для лягушки озерной составляет

$$LC_{\tau_{50}} = 157000 (69100—338000) \text{ мг} \cdot \text{мин/л}, S = 32$$

Следовательно, уровень токсичности продуктов детоксикации зомана для данного гидробионта по сравнению с зоманом значительно ниже (в 28545 раз). На этом основании можно заключить, что получаемые реакционные массы в стадийном технологическом процессе утилизации зомана можно отнести к категории умеренно опасных отравляющих веществ. Тем не менее опасность гибели обитателей водоема остается достаточно высокой.

Гематологическое исследование токсичности зомана и продуктов его детоксикации

В экспериментах с озерной лягушкой изучали изменения в системе крови в ответ на воздействие зомана и продуктов его детоксикации. Для более глубокого исследования клинической картины интоксикационного процесса ФОВ в каждой группе лягушек путем декапитации (удаление головной части) осуществлялся забор крови на определение вида лейкоцитарной реакции (забор крови проводился только у оставшихся в живых особей). В контрольной группе брали пробы крови для измерения процентного соотношения фор-

менных элементов лейкоцитарной формулы в 100 исследованных клетках с целью определения профиля крови и изучения ответной реакции костного мозга на воздействие зомана [2].

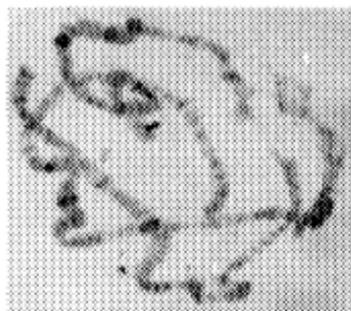
Проведенные исследования показали, что при воздействии зомана в среднететальной концентрации по мере увеличения экспозиции наблюдается тенденция к возрастанию количества лимфоцитов на фоне уменьшения числа эозинофилов, выполняющих дезинтоксикационную роль в организме. С увеличением лимфоцитов уменьшается содержание базофилов, которых в норме вырабатывает противосвертывающий коагулянт — гепарин, участвующий в поддержании реологических свойств крови и обеспечивающий равновесие между процессами свертывания и несвертывания. Динамика выявленных изменений свидетельствует о повышении напряжения функционирования

гуморального звена иммунитета с последующим его угнетением, что подтверждается характером лейкомоидной реакции лимфатического типа.

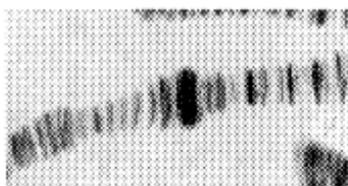
О менее выраженном токсическом действии на озерную лягушку продуктов детоксикации зомана свидетельствуют результаты клинического исследования периферической крови. По мере увеличения действующей токсодозы продуктов деструкции за 24 ч наблюдения выявляется тенденция к снижению количества лимфоцитов, отмечается незначительное повышение содержания сегментоядерных нейтрофилов на фоне некоторого снижения количества базофилов и эозинофилов, что определяет уже нейтрофильный тип лейкомоидной реакции. При этом фагоцитарная активность эозинофилов подавлена в меньшей степени, чем в случае действия зомана, за счет некоторого увеличения сегментоядерных нейтрофилов. Отмечается



Кариотип (контроль)



Кариотип под действием зомана



Хромосома I (контроль)



Хромосома I под действием зомана



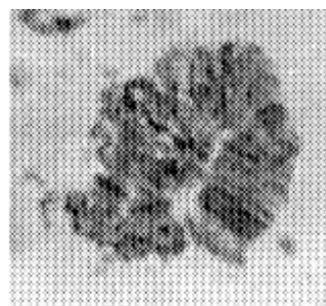
Длинная хромосома под действием РМ



Хромосома IV (контроль)



Хромосома IV под действием зомана



Хромосома IV под действием РМ

Изменения морфофункционального состояния гигантских хромосом *Ch. thummi* под воздействием зомана и реакционных масс (РМ), образующихся при его детоксикации

также и в меньшей степени снижение количества базофилов, ответственных за свертываемость крови.

Выявленные изменения под влиянием действующей токсодозы (Т), могут быть выражены уравнением регрессии в отношении только эозинофилов (Э) и базофилов (Б) на разные сроки экспериментов:

для эозинофилов

$$\text{Э} = 2,41 - 0,87 \lg T \quad r = 0,994; \quad F = 82,74 \text{ на } 1 \text{ ч}$$

$$\text{Э} = 2,195 - 0,92 \lg T \quad r = 0,979; \quad F = 46,8; \quad F_m = 18,5 \text{ на } 24 \text{ ч}$$

для базофилов

$$\text{Б} = 2,6 + 4,7 \cdot 10^{-6} / T \quad r = 0,984; \quad F = 61,4; \quad F_m = 18,5 \text{ на } 24 \text{ ч}$$

На основании выявленных изменений можно предположить, что в организме, пораженном продуктами деструкции зомана, иммунная система в большей степени по сравнению с влиянием зомана сохраняет свои функции, что обуславливает в первом случае более высокую выживаемость организма.

Цитогенетическое исследование действия зомана и продуктов его детоксикации

При изучении действия зомана и продуктов его детоксикации на генетическую активность в качестве высокоинформативного тест-объекта использовались гигантские хромосомы из клеток слюнных желез личинок хирономид. Эти гидробионты являются фоновым видом во всех открытых водоемах, расположенных на территории хранения запасов ФОВ. В силу своих крупных размеров они служат удобной моделью для многих цитогенетических исследований [3]. В наших экспериментах оценивался цитогенетический эффект воздействия зомана и реакционных масс по морфофункциональному состоянию хромосом (см. рисунок).

В качестве основного метода анализа применялась ацет-орсеиновая методика [4]. Цитогенетический эффект устанавливался и по таким показателям, как степень компактности ДНК, разрывы хромосом, утрата четкости дисковой структуры, появление меандров (перетяжек), состояние предтеломерных районов, репрессии или стимуляции активных районов — ядрышкового организатора и колец Бальбиани, индукции пухов *de novo*, т.е. новых центров синтеза белка, которые не характерны для генома животных в естественных условиях. Период наблюдения за опытными и контрольными экземплярами составил от 48 до 72 ч.

Можно предположить, что при действии зомана нарушается гормональный фон в результате изменения функции протаракальной железы, вырабатывающей экдизон (гормон, ответственный за рост и развитие личинки), вследствие чего нарушается регуляция синтеза белков, а значит, изменяется процесс пуффинга — синтеза белка. Кроме того, экдизон влияет на содержание солей калия в ядре клетки. Поэтому под воздействием зомана может происходить изменение проницаемости клеточных мембран для небольших

ионов, накопление в ядре калия, который влияет на пуффинг некоторых районов хромосом, обуславливая тем самым деконденсацию компактного гетерохроматина прицентромерного и предтеломерного районов хромосом (в норме же наблюдается компактное состояние ДНК в этих районах). Таким образом, при воздействии зомана поражение происходит на гормонально-клеточном уровне.

При действии продуктов детоксикации наблюдается тенденция к разбуханию хромосом, что можно объяснить нарушением работы калий-натриевого насоса, и это в свою очередь приводит к нарушению активного транспорта ионов через двойную ядерную оболочку. В результате повышается осмотическое давление в ядре: вода пассивно поступает вовнутрь, связи между хромонемами, образующими хромосому, ослабляются и хромосомы разбухают. Поражение идет уже не на гормонально-клеточном уровне, как в случае зомана, а на клеточном, что может свидетельствовать о более токсичном воздействии зомана на морфофункциональное состояние хромосом по сравнению с продуктами его детоксикации.

Ярко выраженной особенностью действия зомана на генетическую функцию хромосом является тенденция к распуффиванию — деконденсации компактного гетерохроматина предтеломерных районов, а реакционных масс — к разбуханию хромосом, которое вызвано в основном нарушением гормонального фона и работы калий-натриевого насоса, соответственно.

Сопоставляя результаты токсикологических и цитогенетических исследований, можно прийти к заключению, что зоман негативно влияет на генетическую активность гигантских хромосом и может являться слабым мутагеном, о чем свидетельствует образование разломов хромосом. Менее выраженными подобными свойствами могут обладать и продукты его детоксикации, что косвенно указывает на потенциальную опасность этих веществ для генетического аппарата.

Таким образом, несмотря на значительное снижение биологической активности фосфорорганических отравляющих веществ, обусловленное реакцией их детоксикации, опасность гибели обитателей водоема остается достаточно высокой, что требует дальнейшего обезвреживания реакционных масс и неукоснительного соблюдения мер безопасности для предотвращения попадания продуктов детоксикации в водную среду.

ЛИТЕРАТУРА

1. Саночкий И.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ. М.: Медицина, 1970, с. 50.
2. Шустов В.Я. Клиническая гематология. Саратов: СМИ, 1994, с. 191—197.
3. Кикнадзе И.И. Функциональная организация хромосом. Л.: Наука, 1972.
4. Белянина С.И., Колбенив А.С. Матер. 2-й Всеросс. конф. «Влияние антропогенных факторов на структурные преобразования органов, тканей, клеток человека и животных». Саратов, 1993, ч. 3, с. 119.