

УДК 59.08 : 615.9

ВТОРИЧНОЕ ПОРАЖЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ (100 СУТОК) ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ ГАЗОВОГО ОРУЖИЯ

Н.П. Подосиновичева,
М.Л. Александрова,
П.А. Качерович, Н.В. Лапина

Федеральное государственное
учреждение науки «Институт
токсикологии Федерального медико-
биологического агентства» (ФГБУН
ИТ ФМБА) России, 192019, г. Санкт-
Петербург, Российская Федерация

Задачей настоящего исследования явилось выяснение возможности вторичного поражения биологических объектов в отдаленные сроки (100 суток) после применения ирритантов хлорацетофенона, ортохлорбензилиденмалонодинитрила, дибензоксазепина и морфолида пеларгоновой кислоты, как компонентов газового оружия. В модельном эксперименте ирританты наносились на тканевую мишень в количестве, соответствующем расчетной концентрации, возникающей при распылении газового баллончика на расстоянии 0,5 метров и 1,5 метра. Представлены данные по сохранности ирритантов на мишени через 100 суток при открытом способе хранения. Проведена оценка токсичности ирритантов для биологического тест-объекта – зоогидробионтов *Daphnia magna* Straus. Концентрации ирритантов, экстрагируемых с мишени, сопоставлены с их токсичностью для дафний. Установлено, что хлорацетофенон, дибензоксазепин и морфолид пеларгоновой кислоты сохраняют активность и возможность негативного влияния на экосистему более 100 суток после их применения. Ортохлорбензилиденмалонодинитрил через 100 суток при максимальном извлечении с мишени биологическую активность не сохраняет.

Ключевые слова: ирританты, сохраняемость на мишенях, вторичное поражение биообъектов, *Daphnia magna*, биотестирование.

Введение. Задачей настоящего исследования явилось выяснение возможности вторичного поражения биологических объектов в отдаленные сроки (100 суток) после применения ирритантов, как компонентов газового оружия.

В работе были использованы ирританты хлорацетофенон (CN), ортохлорбензилиденмалонодинитрил (CS), дибензоксазепин (CR) и морфолид пеларгоновой кислоты (МПК), применяемые в качестве компонентов смесей для снаряжения газового оружия самообороны. В эксперименте оценена их стабильность при длительном сроке хранения (100 суток), токсичность для биологического тест-объекта *Daphnia magna* Straus и возможность использования дафний для целей экологического контроля после применения ирритантов.

В качестве тест-объекта были выбраны зоогидробионты *Daphnia magna* Straus. Дафнии яв-

ляются многоклеточными организмами, имеющими целый ряд медиаторных и ферментных систем, аналогичных млекопитающим и считаются одним из наиболее чувствительных тест – объектов в отношении многих экотоксикантов [1-4]. Они интенсивно используются в водной токсикологии благодаря своему малому размеру, короткому жизненному циклу и доступности к лабораторному разведению. Биотестирование проводится на синхронизированной культуре дафний. Синхронизированной является одновозрастная культура, полученная от одной самки путём ациклического партеногенеза в третьем поколении. Такая культура генетически однородна, а её особи обладают близкими уровнями устойчивости к токсическим веществам. Гидробионты представляют одно из начальных звеньев трофической цепи и влияют на состояние биоценоза в целом. Методы биотестирования с использова-

Подосиновичева Нина Павловна (Podosinivikova Nina Pavlovna), кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории фармацевтической и токсикологической диагностики ФГБУН ИТ ФМБА России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, institute@toxicology.ru

Александрова Марина Леонидовна (Alexandrova Marina Leonidovna), кандидат химических наук, заведующая лабораторией фармацевтической и токсикологической диагностики ФГБУН ИТ ФМБА России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, analekt@mail.ru.

Качерович Полина Андреевна (Kacherovich Polina Andreevna), научный сотрудник лаборатории токсикологии ФГБУН ИТ ФМБА России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, institute@toxicology.ru

Лапина Наталия Вадимовна (Lapina Nataliya Vadimovna), кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией прикладной токсикологии и фармакологии ФГБУН ИТ ФМБА России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, lapina2005@inbox.ru.

нием дафний имеют метрологическую аттестацию и описаны в действующей нормативно-технической документации.

Материалы и методы исследования. В модельном эксперименте растворы ирритантов наносили на тканевую мишень из хлопчатобумажной ткани округлой формы, диаметром 12 см. Исходное количество каждого вещества соответствовало расчетной концентрации, возникающей при распылении газового баллончика на расстоянии 0,5 метров и 1,5 метра. После хранения образца в течение 100 суток в открытом виде при комнатной температуре, ткань (образец) разрезали на полоски, помещали в пробирку, заливали 20 мл этанола и оставляли на 30 минут при комнатной температуре. С помощью пинцета (в перчатках) извлекали полоски ткани и отжимали их в пробирку от остатков растворителя. Открытую пробирку помещали в горячую водяную баню (70-80°C), упаривали спиртовой раствор до объема 10 мл и передавали для определения концентрации ирритантов и их биологической активности. Полнота извлечения ирритантов составляла порядка 70-80%. Количественное определение ирритантов проводили методом ВЭЖХ, в соответствии с методическими указаниями [5].

Для проведения биотестирования на дафниях использовали методы, описанные в действующей нормативно-технической документации [6,7].

Методики основаны на определении смертности дафний при воздействии водных дисперсных систем, содержащих тестируемые препараты (опыт), по сравнению с чистой водой без препаратов (контроль).

В экспериментах по определению острого токсического действия устанавливали:

1. Среднюю летальную концентрацию тестируемого препарата при экспозиции 48 часов – ЛК₅₀.
2. Безопасную концентрацию препарата – БК₁₀, вызывающую гибель не более 10% особей.

Дафний разводили в лабораторных условиях в соответствии с требованиями методики [7].

Поскольку ирританты плохо растворимы в воде, их растворяли в этиловом спирте. При приготовлении исходного раствора создавали максимально возможную концентрацию ирританта. Исходный раствор разводили этанолом в 10, 100 и 1000 раз и использовали для установления диапазона чувствительности гидробионтов к ирританту. Для этого вещество в каждом разведении вносили в пробу с дафниями в объеме, не превышающем 1% от объема пробы (0,5 мл при объеме 50,0 мл), в этой концентрации спирт не оказывал на дафний токсического действия. Для установления средней токсичной и безопасной концентраций в предварительно отобранном диапазоне готовили растворы исследуемого вещества в этаноле в 5–10 концентрациях, возрастающих по логарифмической шкале. Спиртовой раствор вносили в пробу с дафниями в объеме, не превышающем 1% от объема пробы. Количество дафний в пробе было равно пяти. Определение токсичности каждой пробы проводили в трех параллельных сериях. В качестве контроля в каждой серии использовали три параллельные пробы с культивационной водой.

Результаты и обсуждение. В модельном эксперименте на тканевой мишени при открытом способе хранения была исследована стабильность ирритантов через 100 суток после их нанесения (табл. 1).

Токсическое действие ирритантов на биологический тест-объект было оценено в опытах на гидробионтах *Daphnia magna* Straus. В результате биотестирования установлено, что все исследованные ирританты оказывают на дафний острое токсическое действие (табл. 2). Расчетные значения средней летальной концентрации и безопасной концентрации препаратов представлены в таблице 3.

Таблица 1

Сохраняемость ирритантов на тканевой мишени

| Препарат | Начальное количество вещества, мг | Количество на мишени в % от исходного через 100 суток | Концентрация препарата в спиртовом смыве с мишени, мг/л |
|----------|-----------------------------------|---|---|
| CN | 10,0 | 1,7 | 13,6 |
| | 50,0 | 2,7 | 108,0 |
| CS | 20,0 | 0 | 0 |
| | 70,0 | 1,1 | 61,6 |
| CR | 5,0 | 47,3 | 189,6 |
| | 10,0 | - | - |
| МПК | 60,0 | 50,0 | 2400,0 |
| | 400,0 | 69,6 | 22272,0 |

Таблица 2

Оценка острой токсичности растворов ирритантов для *Daphnia magna* Straus

| Концентрация ирританта (мг/л) | Гибель дафний (%) при экспозиции 48 часов | | | |
|-------------------------------|---|-----|-----|-----|
| | CN | CR | CS | МПК |
| 0,1 | 10 | 0 | 0 | |
| 0,2 | 40 | 10 | 10 | |
| 0,4 | 80 | 20 | 0 | |
| 0,6 | 100 | 20 | 0 | 0 |
| 0,8 | 100 | 40 | 10 | 0 |
| 1,0 | | 50 | 0 | 10 |
| 2,0 | | 90 | 20 | 10 |
| 4,0 | | 100 | 20 | 10 |
| 5,0 | | 100 | 40 | 10 |
| 6,0 | | | 60 | 40 |
| 8,0 | | | 100 | 50 |
| 10,0 | | | 100 | 50 |
| 15,0 | | | | 80 |
| 20,0 | | | | 100 |
| 40,0 | | | | 100 |

Примечание: в таблице представлены средние значения 3-х независимых экспериментов

Таблица 3

Расчетные параметры токсичности растворов ирритантов для *Daphnia magna* Straus

| Препарат | Средняя летальная концентрация (ЛК ₅₀), мг/л | Безопасная концентрация (БК10), мг/л |
|----------|---|---------------------------------------|
| CN | 0,32±0,04 | 0,12±0,01 |
| CR | 0,89±0,09 | 0,55±0,06 |
| CS | 4,30±0,90 | 1,50±0,20 |
| МПК | 9,60±1,00 | 5,00±0,7 |

Как указывалось в методах, ирританты плохо растворимы в воде и для проведения биотестирования их предварительно растворяют в спирте. Поскольку при внесении в пробу с дафниями спиртового смыва или спиртового раствора ирританта происходит его разбавление в 100 раз, для проявления биологической активности концентрация препарата в спиртовом смыве с тестируемой поверхности после упаривания должна в 100 раз превышать расчетное значение средней летальной концентрации.

Из представленных в таблице 3 данных следует, что токсическое действие и возможность вторичного поражения препаратом CN в экспериментах на гидробионтах *Daphnia magna* Straus может быть зарегистрировано в концентрациях, больше или равно 32 мг/л. Препараты CR, CS и МПК будут оказывать токсическое действие при кон-

центрациях, больших или равных 89 мг/л, 430 мг/л и 960 мг/л соответственно. Согласно представленным в таблице 1 данным по изучению стабильности в модельном эксперименте, такая концентрация сохраняется на тканевой мишени при открытом способе хранения больше 100 суток после нанесения на мишень препаратов хлорацетофенона, дибензоксазепина и морфолида пеларгоновой кислоты. Соответственно, в течение этого времени сохраняется возможность вторичного поражения при попадании токсиканта в окружающую среду и выявления его биологической активности в экспериментах с использованием гидробионтов *Daphnia magna*. Препарат CS, в соответствии со своей химической структурой, в отличие от других ирритантов, достаточно легко подвергается гидролизу. Вследствие этого, его количество на мишени при предложенном

способе хранения через 100 суток не превышало 1,1% от нанесенного (табл.1). Максимальная концентрация ирританта в пробе для биотестирования после экстракции с мишени составляла 0,616 мг/л, что существенно ниже порога чувствительности дафний к препарату. Продукты гидролиза ирританта, очевидно, обладали меньшей токсичностью, чем исходное вещество. Вследствие этого, после хранения в открытом виде в течение 100 суток, при максимальном извлечении с мишени, ирритант CS не сохранял свою биологическую активность и не вызывал гибели дафний.

Выводы. 1. Компоненты газового оружия – ирританты хлорацетофенон, ортохлорбензилиденмалондинитрил, дибензоксазепин и морфолид пеларгоновой кислоты оказывают острое токсическое действие на биологический тест-объект – гидробионтов *Daphnia magna* Straus.

2. Биологическая активность и возможность вторичного поражения гидробионтов ирритантами хлорацетофеноном, дибензоксазепином и морфолидом пеларгоновой кислоты сохраняется более 100 суток после их нанесения на мишень. Ортохлорбензилиденмалондинитрил через 100 суток открытого хранения при максимальном извлечении с мишени биологическую активность не проявляет.

3. В тесте на зоогидробионтах *Daphnia magna* Straus установлен порог концентраций, безопасных для окружающей среды (БК₁₀) и предложены процедуры биологического контроля и оценки вероятности вторичного поражения ирритантами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Подосиновикова Н.П., Космачев А.Б., Тонкопий В.Д. Новые подходы к анализу взаимоотношений холинергической и дофаминергической медиаторных систем. // Эксп. и клин. фармакол. 2001; 64 (6): 20-22.

2. Тонкопий В.Д., Подосиновикова Н.П., Загребин А.О. *Daphnia magna* Straus как объект для фармакологического анализа ГАМК-ергических препаратов в условиях целостного организма // Эксп. и клин.

фармакол. 2005; 68 (5): 55-58.

3. Tonkopyi V. *Daphnia magna* as alternative bioobject in ecotoxicology. In 13 MEGAT Kongress Alternative zum Tierexperiment, Linz. Altex. 2006; 23 (2): 131.

4. Долго-Сабуров В.Б., Подосиновикова Н.П., Петров В.В. и др. К сравнительной оценке токсичности ксенобиотиков // Токсикологический вестник. 2008; (1): 34-36.

5. Методические указания (МУК № 4.1.059-08). Методика выполнения измерения массовой концентрации ортохлорбензилиденмалондинитрила (CS), хлорацетофенона (CN), дибензоксазепина (CR), капсаициноидов, морфолида пеларгоновой кислоты (МПК) в спиртовом растворе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Издательство ФМБА России, 2008.

6. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06, Т

16.1:2:3:3.9-Методика определения острой токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по смертности дафний (*Daphnia magna* Straus). М., 2011.

7. ФР.1.39.2007.032 Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. «АКВАРОС». 2007.

REFERENCES:

1. Podosinovicova N.P., Kosmachev A.B., Tonkopyi V.D. New approaches to the analysis of relations between cholinergic and dopaminergic neurotransmitter systems// Eksp. and Clin. pharmacol. 2001; 64 (6): 20-22 (in Russian).

2. Tonkopyi V.D., Podosinovicova N.P., Zagrebini A.O. *Daphnia magna* Straus as a target for pharmacological analysis of GABA-ergic drugs in the whole organism// Eksp. and Clin. pharmacol.

2005; 68 (5): 55-58 (in Russian).

3. Tonkopyi V.D. *Daphnia magna* as alternative bioobject in ecotoxicology. In 13 MEGAT Congress Alternative zum Tierexperiment. Altex. 2006; 23 (2): 131.

4. Dolgo-Saburov V.B., Podosinovicova N.P., Petrov V.V., A comparative assessment of the toxicity of xenobiotics// Toxicological review. 2008; (1): 34 -36 (in Russian).

5. Methodical instructions (MI).

Methods of measurement of the mass concentration orthochlorobenzilidenmalonodinitrila (CS), chloroacetophenone (CN), CR gas, capsaicinoids, morpholide nonanoic acid in alcoholic solution by high performance liquid chromatography. FMBA of Russia. 2008 (in Russian).

6. FER T 14.1:2:3:4.12-06, T 16.1:2:3:3.9-06 Method of determining the acute toxicity of drinking, fresh

natural water and sewage, water extracts of soils, sewage sludge and waste mortality of *Daphnia* (*Daphnia magna* Straus). Moscow. 2011 (in Russian).

7. FR.1.39.2007.03222 «Method of determining the acute toxicity of water and aqueous extracts from soils, sewage sludge, waste mortality and fertility change in *Daphnia*». AKVAROS. 2007 (in Russian).

N.P. Podosinovicova, M.L. Alexandrova, P.A. Kacherovich, N.V. Lapina

THE SECONDARY DAMAGE TO BIOLOGICAL OBJECTS IN REMOTE PERIOD (100 DAYS) AFTER THE GAS WEAPON APPLICATION

«Institute of Toxicology» of Federal Medico-Biological Agency, 192019, Saint Petersburg, Russian Federation

The objective of the present research was a clarification of possibility of secondary damage to biological objects in a remote period (100 days) after application of irritants chloracetophenone, orthochlorobenzilidenmalonodinitrile, dibenzoxazepine and morpholide of pelargonic acid as components of the gas weapon. In a model experiment, irritants were applied to a fabric target in a quantity corresponding to an estimated concentration arising at the dispersion of a gas spray from a distance of 0.5 meters and 1.5 meters. Data are submitted on a remaining irritant in the target object after 100 days at an open way of storage. The toxicity assessment of irritants to a biological test object zoohydrobiont *Daphnia magna* Straus was carried out. The concentration of irritants extracted from the target object were compared to their toxicity to *Daphnia*. It was established that chloracetophenone, dibenzoxazepine, and pelargonic acid morpholine preserved their activity and possibility to affect an ecosystem more than 100 days after their application. At the maximum extraction from the target, orthochlorobenzilidenmalonodinitrile does not preserve its biological activity 100 days after application.

Keywords: irritant, ability preservation in targets, bio objects secondary damage, *Daphnia magna*, bio testing.

Переработанный материал поступил в редакцию 11.11.2015 г.