

ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ
АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

На правах рукопису
УДК 615.9:632+576.3

СТРАТУЛАТ Тетяна Григорівна

ТОКСИКОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА
НОВИХ СТИМУЛЯТОРІВ РОСТУ РОСЛИН
ПАВСТИМА ТА ЕКОСТИМА

14.03.11 - Токсикологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового
ступеня кандидата біологічних наук

Київ - 1996

8-15.9

AB 35.937

Роботу виконано в Державній
гігієні та епідеміології

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00753861 (U)

Науковий керівник - кандидат медичних наук
с.н.с. Васілос Андрій Федорович

Науковий консультант - доктор медичних наук
професор Спину Костянтин Іванович

Офіційні опоненти: - доктор медичних наук
професор Максимов Юрій Миколайович

- кандидат медичних наук
с.н.с. Кірсенко Віктор Володимирович

Провідна організація: Інститут здоров'я ім. Л.І.Медведя

Захист відбудеться " 26 " листопада 1996 р. о 13 год. н
засіданні спеціалізованої Вченої ради Д.01.44.01 при Інституті
фармакології та токсикології АМН України (252057, м.Київ-57, ву:
Ежена Потье, 14).

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інститут
фармакології та токсикології АМН України.

Автореферат розіслано " 24 " жовтня 1996 р.

Вчений секретарь
спеціалізованої ради
кандидат біологічних наук

Данова І.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Останнім часом у сільськогосподарській практиці ведеться інтенсивний пошук нових екологічно безпечних засобів, які використовуються для підвищення стійкості культурних рослин до захворювань та несприятливих умов навколишнього середовища, що сприяють підвищенню врожайності.

Широке використання в якості регуляторів росту рослин, знайшли речовини терпеноїдної природи - фітогормони гіберелін і абсцизова кислота та їх похідні (Л.Н.Роцаховська, 1985; Т.М.Косогова, 1986). Одночасно із сполуками ретардантного типу дії в сільському господарстві відповідне місце займають регулятори росту, які використовуються для передпосівного замочування насіння. До цієї групи відносяться павстим та екостим - стероїдні глікозиди фуростанолового ряду, розроблені та запропоновані Інститутом Генетики Академії наук Республіки Молдова (проф. П.К.Кінтя).

Стероїдні глікозиди, що відносяться до класу тритерпеноїдів - це низькомолекулярні сполуки, похідні циклопентанпергідрофенантрени. В залежності від хімічної будови вони виявляють широкий спектр фізіологічної та медико-біологічної дії. Відносно даної групи сполук слід зазначити їх протимікробну, противірусну та фунгіцидну активність. Стероїдні глікозиди володіють гіпохолестеринемічною та гіполіпідемічною активністю, імуностимулюючими та імуномодулюючими властивостями. Стероїдні глікозиди по аналогії з гормональними речовинами, з якими вони знаходяться в біологічному спорідненні, широко використовуються при годівлі різноманітних сільськогосподарських тварин з метою посилення

їх росту та розвитку.

Речовини, які одержані з натуральної сировини (павстим - з листя наперстянки пурпурової, екостим - з насіння томатів), як правило відносяться до малотоксичних сполук і не викликають небезпеки в плані забруднення навколишнього середовища та негативного впливу на організм теплокровних. Разом з тим із літературних джерел відомо, що діапазон токсичності стероїдних глікозидів дуже широкий - від 10 мг/мл для сполуки E із *Yucca aloifolia* (100%- ний летальний наслідок в дослідженнях на виноградному слимаку) до декількох тисяч мг/кг маси тіла для діаспоніну і поліспоніну в дослідях на щурах (Л.Н.Соколова, 1970; Kishor Navin et al, 1991). Близькість стероїдних глікозидів по своїй хімічній будові до гормонів також диктує необхідність всесторонньої токсикологічної експертизи вперше розроблених та запропонованих для промислового виробництва сполук, маючи на увазі в першу чергу віддалені наслідки їх дії на організм теплокровних. Виходячи із зазначеного, мета нашого дослідження - дати токсикологічну характеристику павстиму та екостиму, вивчити їх вплив на репродуктивну функцію організму тварин і клітин *in vivo* та *in vitro*, розробити гігієнічні нормативи наявності вказаних сполук в об'єктах навколишнього середовища.

Завдання дослідження :

- визначити основні токсикометричні параметри павстиму та екостиму при гострій та хронічній дії на організм дослідних тварин;
- вивчити вплив павстиму та екостиму на репродуктивну функцію тварин, виявити їх мутагенні властивості;
- вивчити характер впливу павстиму та екостиму на соматичні клітини *in vivo* та *in vitro*;

- розробити нормативи їх наявності в об'єктах навколишнього середовища.

Наукова новизна роботи полягає у тому, що:

- вперше проведено комплексну токсиколого-гігієнічну експертизу нових стимуляторів росту рослин павстиму і екостиму, розроблені гранично допустимі концентрації (ГДК) сполук для води відкритих водоймищ, розраховано і обгрунтовано допустимі середньодобові дози (ДСД) для людини та орієнтовно-безпечний рівень дії (ОБРД) для атмосферного повітря;

- встановлено, що павстим та екостим не виявляють специфічної онкоадоксичної, ембріотоксичної, тератогенної та мутагенної дії, володіють антимутагенним ефектом при тривалому застосуванні в низьких дозах. Останнє виявляється у достовірному зниженні патологічних форм мітозу в клітинах епітелію крипт тонкого кишечника;

- вперше виявлено стимулюючий ефект низьких доз павстиму та екостиму на приріст маси тіла молодих та новонароджених лабораторних тварин;

- вперше розкрито механізм дії стимуляторів росту рослин на соматичні клітини *in vivo* та *in vitro*, який полягає в активації проліферативних процесів та зростанні синтезу ДНК;

- сукупність отриманих результатів відкриває перспективи подальших досліджень павстиму та екостиму з метою розширення спектру їх застосування в біології та медицині.

Практичне значення роботи. На основі проведених досліджень обгрунтовані ГДК павстиму та екостиму у воді відкритих водоймищ, розраховані і обгрунтовані ДСД для людини. Отримані результати стали основою для занесення павстиму та екостиму в "Список химических и биологических средств защиты растений и регуляторов роста, разрешенных для применения в сельском и лесном хозяйствах Республики Мол-

дова" (Кишинів, 1994). Матеріали по токсикологічній експертизі екостиму використані Фармкомітетом МОЗ РМ при вирішенні питання про його клінічні дослідження в якості протівірусного препарату. Розроблена оригінальна технологія культивування клітин людини та тварин в поживному середовищі, яке містить у собі додаток павстиму (патент на винахід по заявці N94030310/13 (030321) від 28.5.96).

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідались на конференції, присвяченій 20-річчю вищої ветеринарної освіти (Кишинів, 1994) і на XXIX сесії Інституту гігієни та суспільного здоров'я, 28-30 червня, 1995, м.Ясси, Румунія; на засіданнях Вченої Ради ГННПЦГЕ (грудень 1993 та квітень 1996).

Публікації. Матеріали дисертації відображені у 4 друкованих працях.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена на 181 сторінках машинопису. Робота ілюстрована таблицями та схемами по тексту. Список використаної літератури містить 228 джерел вітчизняних та зарубіжних авторів.

Положення, що виносяться на захист

1. Павстим та екостим належать до малотоксичних сполук (IV клас небезпечності, ГОСТ 12.1.007-88), не володіють подразнюючими та мулятивними властивостями; павстим має слабку шкірно-резорбтивну дію, обидві сполуки не подразнюють кон'юнктиву очей; не мають специфічної гонадо-, ембріотоксичної, тератогенної та мутагенної активності.

2. Обидві сполуки впливають на органолептичні та загально-санітарні показники води; павстим відноситься до стійких, а екостим - до помірно стійких у воді сполук; на основі встановлених порогових рівней

розраховані та гігієнічно обґрунтовані нормативи наявності павстиму та екостиму в об'єктах навколишнього середовища.

3. На прикладі екостиму доведена стимулююча дія на соматичні клітини *in vitro*, про що свідчить збільшення індексу мітотичної активності, прискорення проходження клітинами стадії клітинного циклу, посилення синтезу ДНК. При тривалій дії малих доз павстиму та екостиму відбувається значне зниження спонтаного рівня патології мітозу в органах тварин, що може бути обумовлено їх антімутагенною активністю. Павстим і екостим стимулюють приріст маси тіла, особливо у новонароджених та молодих тварин.

Матеріали і методи досліджень

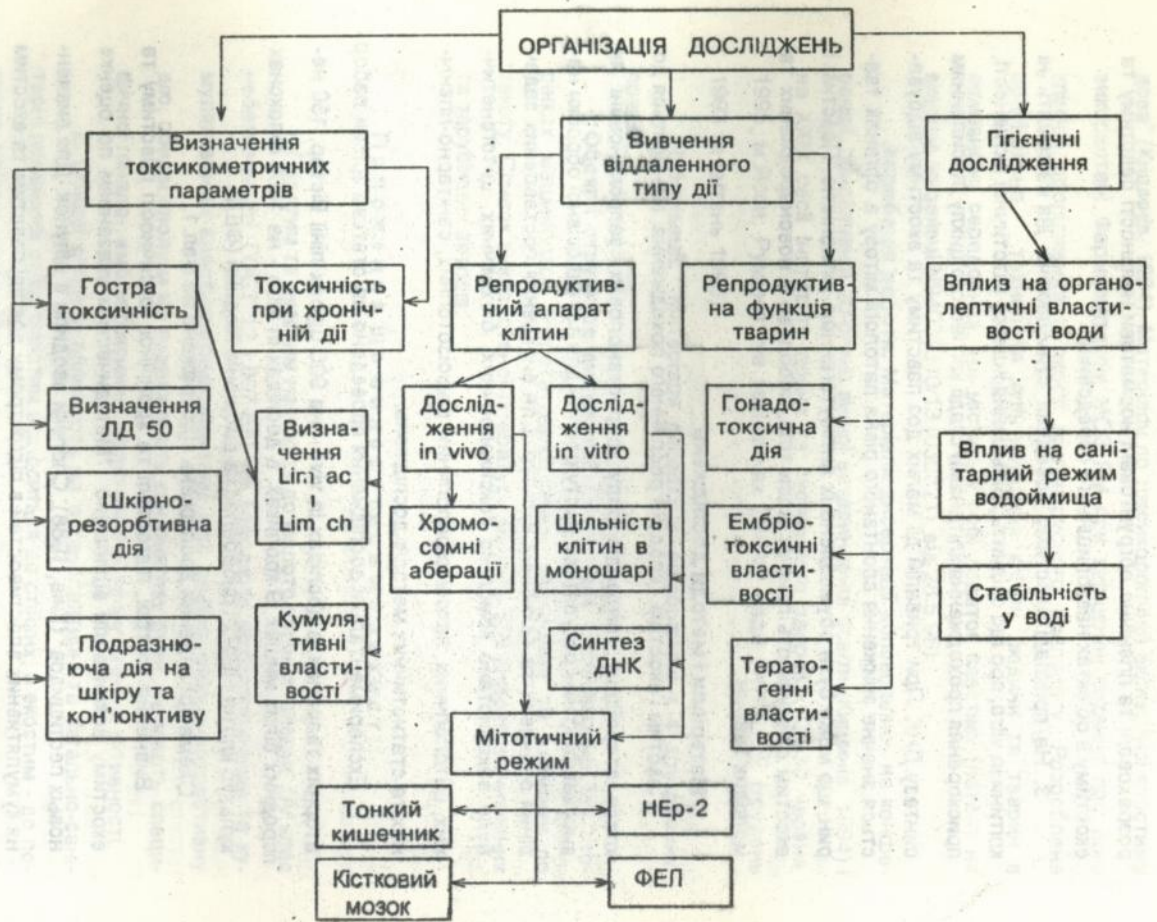
Павстим і екостим - сполуки рослинного походження, відносяться до класу стероїдних глікозидів ряду фуростансових, запропоновані як високоєфективні регулятори росту рослин для передпосівної обробки насіння овочевих та технічних культур. Для вирішення поставлених задач було використано комплекс токсикологічних, біохімічних, цитогенетичних, цитологічних, патоморфологічних, радіоізотопних, санітарно-гігієнічних та статистичних методів досліджень.

Експериментальні дослідження проведено на статевозрілих лабораторних тваринах: в досліджах *in vivo* - на 900 щурах лінії Вістар, 150 непородних білих мишах, 9 кроликах; в досліджах *in vitro* - на 1800 флаконах культур клітин HEp-2 і фібробластів ембріонів людини (ФЕЛ).

Схема проведення досліджень відображена на мал. 1.

Вивчення гострої, підгострої та хронічної токсичності павстиму та екостиму виконували відповідно "Методическим указаниям по оценке новых пестицидов" (Київ, 1988). Сполуки вводили в шлунок. Для вивчення кумулятивних властивостей в підгострому досліді павстим та екостим вводили в кількості 500 і 1000 мг/кг (1/20 та 1/10 від доз, встановлених при одноразовому введенні). При визначенні Lim_{ch} павстим вводили в

МАЛ. 10



дозах 5, 50 та 500 мг/кг, а екостим - 25, 250 і 2500 мг/кг маси тіла протягом 6 місяців. Вибір показників для оцінки стану організму тварин при дії досліджуваних речовин визначався даними літератури про характер впливу стероїдних глікозидів і найбільш чутливих до їх дії органів та систем. В якості показників загальнотоксичного впливу сполук використовували динаміку маси тіла тварин, патоморфологічні зміни в печінці, нирках, селезінці, серці, легенях, шлунку та тонкому кишечнику. В підгострому та хронічному дослідженнях слідували в динаміці за гематологічними та низкою біохімічних показників (активність АЛТ, АСТ, холінестерази, гамма-глутамінтранспептидази, рівень загальних ліпідів, фракцій ліпопротеїдів, сечовини та глюкози в сироватці крові).

Для оцінки цитогенетичної активності павстиму і екостиму проводили аналіз аберацій хромосом у клітинах кісткового мозку мишей на стадії метафази за методом Форда і Волома (1977) через 24 години після одноразового внутрішньошлункового введення речовин в діапазоні доз від 250 до 10000 мг/кг.

Цитологічні дослідження включали в себе комплексне вивчення мітотичного режиму клітин кісткового мозку, епітелію крипт тонкого кишечника щурів (in vivo) і клітин культур НЕР-2 та ФЕЛ (in vitro). Використовували такі показники: індекс мітотичної активності, співвідношення фаз ділення, якісний та кількісний аналіз патологічних форм мітозу згідно методичних рекомендацій "Нарушения митоза как показатель общетоксического и цитогенетического действия пестицидов" (Київ, 1983). Ступінь проліферативної активності визначали за кількістю клітин, які виростили в моношарі на культурах НЕР-2 і ФЕЛ та за рівнем включення 3Н-тімідинової мітки в клітинах культури ФЕЛ на різних термінах інкубації.

Вплив тривалого введення в організм павстиму та екостиму на репродуктивну функцію експериментальних тварин вивчали згідно з "Методическими указаниями по гигиенической оценке новых пестицидов"

(Київ, 1988). Вивчення поведінки павстиму та екостиму в модельних в доймищах (стійкість, вплив на органолептичні властивості води санітарний режим водоймищ) проводили згідно з "Методическими указаниями по разработке и научному обоснованию предельно допустимой концентрации вредных веществ в воде водоемов" (М., 1976). Отримані експериментальні дані були оброблені методом варіаційної статистики використанням критерію Стюдента. Різниця між показниками в дослідній та контрольній групах вважалася значимою при $P < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Проведеними дослідженнями доведено, що обидва препарати відносяться до малотоксичних сполук (IV клас небезпечності, ГОСТ 12.1.007-88). Середньолетальні дози для щурів при внутрішньошлунковому введенні - вище 10000; для мишей - вище 5000 мг/кг маси тіла.

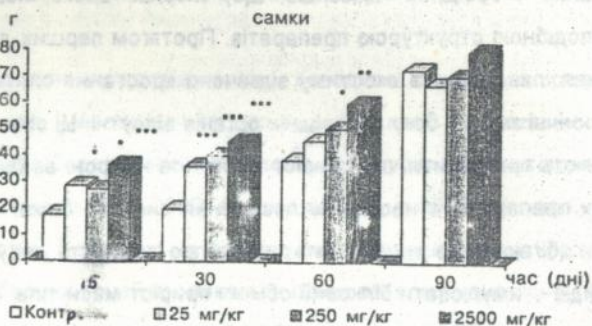
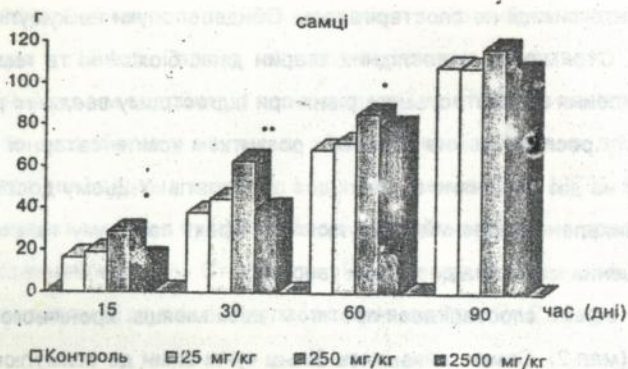
Павстим і екостим не подразнюють непошкоджену шкіру щурів та слизові оболонки очей кроликів при одноразовому нанесенні; при багаторазових аплікаціях викликають слабку шкірно-резорбтивну дію.

Для визначення порогу гострої дії препаратів були використані біохімічні показники, які відображають функціональний стан печінки, нирок склад периферійної крові, вивчена морфологія внутрішніх органів. Павстим в дозі 1000 мг/кг значно пригнічує білковий обмін, веде до помірного лейкоцитозу, який зростає із збільшенням дози препарату. Екостим лише в максимальній з досліджених доз (1000 мг/кг) достовірно знижує рівень тригліцеридів, що свідчить про можливість підвищення рівня холестерину. Патоморфологічні зміни у вигляді помірних гемодинамічних порушень спостерігались при дії максимальних доз препаратів.

При внутрішньошлунковому введенні павстиму та екостиму протягом двох місяців у дозах 500 і 1000 мг/кг загибелі тварин і зовнішніх по-

казників інтоксикації не спостерігалось. Обидві сполуки не кумулюють в організмі. Отримані у піддослідних тварин деякі біохімічні та гематологічні відхилення від контрольного рівня при підгострому введенні регуляторів росту рослин можна пояснити розвитком компенсаторної реакції організму на дію порівняно високих доз препаратів. У цьому дослідженні вперше виявлено виразний стимулюючий ефект павстиму та екостиму на збільшення маси тіла дослідних тварин.

Цей ефект спостерігався протягом двох місяців хронічного експеримента (мал.2). Самки виявились більш чутливими до стимулюючої дії досліджуваних стероїдних глікозидів, що, скоріше всего, пов'язано з естрогеноподібною структурою препаратів. Протягом перших двох місяців введення павстиму та екостиму відмічено зростання синтезу білка. Патогістологічні зміни з боку внутрішніх органів відсутні. Ці спостереження дозволяють припустити, що приріст маси тіла на фоні введення досліджуваних препаратів є наслідком посилення синтезу білка. Отримані результати збігаються з даними літератури про здатність ряду стероїдних глікозидів стимулювати білковий обмін і приріст маси тіла, особливо на ранніх строках дії (Б.М.Федоров, 1989). Окрім зазначених ефектів слід підкреслити наявність гіполіпідемічних властивостей павстиму та екостиму, які найбільш значні при введенні мінімальних доз (5 мг/кг павстиму та 25 мг/кг екостиму), що узгоджується з даними літератури про наявність у більшості стероїдних глікозидів гіполіпідемічної активності (A. Esquera, 1990; Ю.М.Мамадов, 1990).



Малюнок 2. Динаміка приросту маси тіла тварин в умовах тривалого введення екостиму

Результати морфологічних, гематологічних та біохімічних досліджень свідчать про те, що тривале введення вивчаємих стимуляторів росту рослин не приводить до структурно-функціональних змін в організмі тварин, які свідчили б про хронізацію токсичного процесу.

Однією із задач проведеного дослідження було вивчення віддалених наслідків впливу павстиму та екостиму на організм дослідних тварин. Встановлено, що препарати не викликають специфічної гонадотоксичної дії. Однак, про деякий вплив павстиму та екостиму на герменативні кліти-

ни як самок, так і самців свідчить тенденція до зростання показника доімплантаційної загибелі запліднених яйцеклітин і зниження індексу запліднення (особливо в дозах 500 і 2500 мг/кг відповідно). Це підтверджується даними літератури про наявність у деяких представників групи стероїдних глікозидів контрацептивної активності (В.В.Корхов, 1988; М.Н.Мац, 1990).

Павстим та екостим не чинять специфічної ембріо- та тератогеної дії. Підвищення рівня постімплантаційної загибелі ембріонів при введенні максимальних доз препаратів протягом усього періоду вагітності слід розцінити як прояв їх загальнотоксичної дії на материнський організм.

Мутагенні властивості сполук, які відносяться до групи регуляторів росту та розвитку рослин, в літературі висвітлені мало. Однак дослідженнями останніх років встановлено, що суттєвим моментом в механізмі дії регуляторів росту є їх вплив на активність генетичного апарату клітин та білоксинтезуючу систему. Для експериментальної оцінки мутагенної активності хімічних речовин нами використано загальноприйнятий метод цитогенетичного дослідження кісткового мозку мишей.

Проведеними аналізами встановлено, що при введенні павстиму та екостиму спостерігається тенденція до зростання числа аберантних хромосом при дозах вище 2500 мг/кг маси тіла. Це зростання обумовлено переважно такою формою патології, як парні та одинокі фрагменти. Однак ці дані статистично не відрізняються від показників контролю, більш того, доза 500 мг/кг павстиму, підпорогова в хронічному експерименті, суттєво знижує число метафаз з абераціями.

Важливу інформацію про цитотоксичну та цитогенетичну активність хімічних сполук дає комплексне вивчення мітотичного режиму в органах з високою природною проліферативною активністю і в культурах клітин. Як найбільш інформативні були вибрані такі показники: індекс проліферативної активності (ІПА), співвідношення фаз мітозу, якісний та кількіс-

ний аналіз патологічних форм ділення. Нам., було вивчено мітотичний режим крипт епітелію тонких кишок та кісткового мозку щурів, які вийшли з гострого, підгострого та хронічного експерименту.

Встановлено, що мітотична активність епітелію крипт тонкого кишечника в гострому, досліді суттєво не мінялась навіть при введенні максимальних доз препаратів. Коефіцієнт фаз мітозу дещо зростав за рахунок збільшення відносного числа метафаз при введенні 500 мг/кг павстиму і 1000 та 500 мг/кг екостиму. Частота патології мітозу зростала тільки на фоні введення максимальних доз. Якісний аналіз форм патології показав значне зростання числа колхіциноподібних мітозів, що є наслідком токсичної дії препаратів на клітину (І.А.Казанцева, 1981).

Підгостре введення 500 і 1000 мг/кг павстиму та екостиму не має токсичної дії на клітини епітелію тонкого кишечника та кісткового мозку щурів. Більш того, обидва препарати значно стимулювали клітинну проліферацію, особливо при введенні меншої дози. Такий же висновок можна зробити щодо результатів хронічного введення різних доз препаратів. Цитостимулюючий ефект виражався в збільшенні ІМА, а також деякому зниженні коефіцієнта фаз мітозу (табл. 1, на прикладі екостиму).

Тривале введення павстиму та екостиму не лише не приводило до зростання частоти патології мітозу, а в деяких випадках при низьких рівнях впливу (5 та 25 мг/кг) суттєво знижувало цей показник, що свідчить про наявність у досліджуваних стероїдних глікозидів певних антимутагенних властивостей.

Клітини кісткового мозку, які діляться, менш чутливі до дії стероїдних глікозидів. Підгостре та хронічне введення павстиму та екостиму не викликало цитотоксичної дії, не приводило до зростання частоти патології мітозу.

Узагальнюючи матеріали комплексного вивчення мітотичного режиму при одноразовій та тривалій дії стимуляторів росту, слід зазначити

поєднання низької цитотоксичності високих доз павстиму та екостиму при виразному цитостимулюючому ефекті низьких доз. Ці висновки збігаються з результатами вивчення загальнотоксичної та ростостимулюючої дії препаратів на цілісний організм.

Таблиця 1. Показники мітотичного режиму епітелію тонкого кишечника при хронічному введенні екостима

| | | Строки спостережень (доба) | | | | | | | |
|---------------|---|--|---|--|---|--|---|--|--|
| | | 15 | | 30 | | 90 | | 180 | |
| Доза мг/кг | Індекс мітоти- чної актив- ності ‰ | Патоло- гічні форми мітозу % | Індекс мітоти- чної актив- ності ‰ | Патоло- гічні форми мітозу % | Індекс мітоти- чної актив- ності ‰ | Патоло- гічні форми мітозу % | Індекс мітоти- чної актив- ності ‰ | Патоло- гічні форми мітозу % | |
| | M±m | M±m | M±m | M±m | M±m | M±m | M±m | M±m | |
| Контр | 32,79 ±2,50 | 9,71 ±0,75 | 33,85 ±4,36 | 7,86 ±0,74 | 24,60 ±2,20 | 6,67 ±0,62 | 34,44 ±2,40 | 9,14 ±0,79 | |
| 25 | 36,81 ±2,16 | 6,0 ** ±0,88 | 33,01 ±5,14 | 6,0 ±1,02 | 48,21*** ±1,33 | 5,57 ±0,83 | 35,19 ±2,77 | 6,66 ±1,31 | |
| 250 | 37,15 ±3,63 | 7,33 ±0,93 | 40,92 ±4,33 | 3,0 *** ±0,58 | 32,36 * ±2,29 | 8,29 ±0,86 | 36,12 ±2,97 | 8,57 ±1,13 | |
| 2500 | 48,76 *** ±3,48 | 9,83 ±0,65 | 37,78 ±4,43 | 5,86 * ±0,52 | 38,55 ** ±3,92 | 6,86 ±0,81 | 35,29 ±1,18 | 7,0 ±0,93 | |

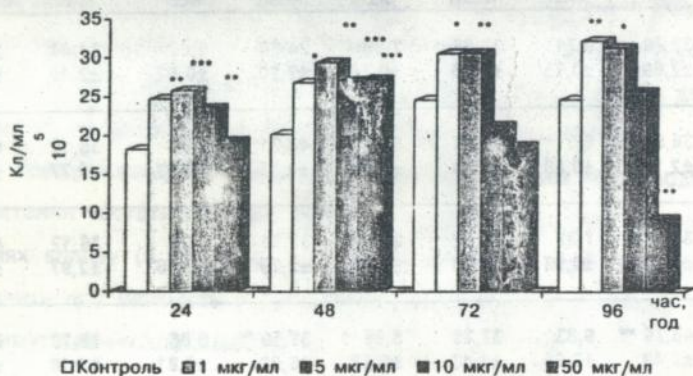
Прим.: * - P < 0,05, ** - P < 0,01, *** - P < 0,001

В гігієні і токсикології в останнє десятиріччя широке використання знайшли моношарові культури клітин, що є зручною моделлю для вив-

чення різних аспектів цитофізіології, цитогенетики і цитотоксикології прямої дії різних хімічних агентів на клітину (А.Ф.Васі лос).

Визначення нами параметрів токсичності для культури НЕР-2 і ФЕЛ на прикладі екостиму показало, що концентрація препарату вище за 10000 мкг/мл приводить до дегенерації моношару клітин з відслойкою їх від скла і прийнята за абсолютно токсичну. Доза екостиму 500 мкг/мл за морфологічним тестом деструкції клітин моношару прийнята за порогову.

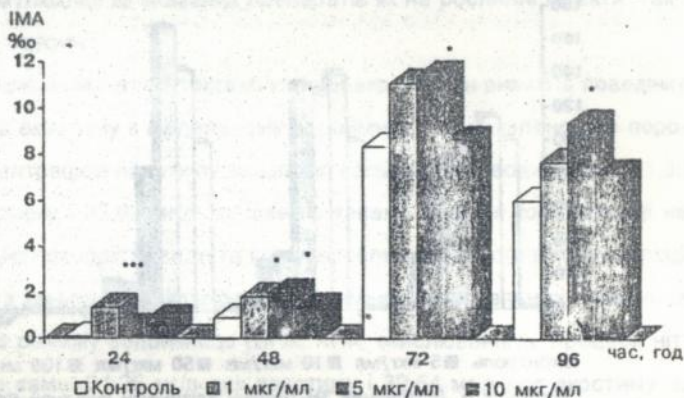
Підрахунок проліферативного пула клітин НЕР-2 і ФЕЛ при внесенні препарату у вихідну суспензію клітин в концентраціях вищих за 500 мкг/мл свідчить про значне інгібування росту культури. Дози нижчі за 100 мкг/мл стимулювали процес клітинного ділення, який зростає обернено-пропорційно дозам препарату. При концентраціях 1, 5 та 10 мкг/мл ефект досягав максимальних значень (мал3).



Малюнок 3. Вплив екостиму на проліферативну активність фібробластів ембріона людини в культурі клітин

Комплексне вивчення мітотичного режиму НЕР-2 і ФЕЛ, вирощених на покривних скельцях, показало, що в контрольній культурі ФЕЛ мітотична активність копівалась в межах 7-9%. Число патологічних мітозів

склало 5-8% від загальної кількості клітин при їх діленні. Внесення еко-стиму в вихідну клітинну суспензію в кількості 1-10 мкг/мл достовірно підвищує індекс мітотичної активності в 5-10 разів за першу добу контакту та в 1,5-1,7 разів на четверту добу (мал. 4). Доза еко-стиму 50 мкг/мл пригнічує ріст культури, починаючи з 3-ї доби, що приводить до дегенерації моношару з відслоюю його від поверхні скельця на п'яту добу експозиції. Ростостимулюючий ефект супроводжується зростанням відносного числа ана- і телофаз, що виражається в зниженні коефіцієнту фаз в середньому в 1,5-1,7 разів. Все це свідчить про прискорення проходження клітиною стадій мітозу. При цьому частота патологічних мітозів залишалася на рівні контрольних значень (6-8%).



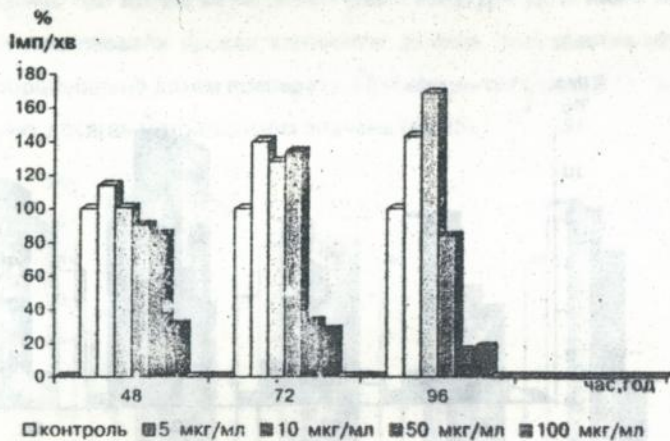
Малюнок 4. Мітотична активність фібробластів ембріона людини при дії еко-стиму

Отримані результати підтверджуються даними ряду авторів про те, що низькі концентрації стероїдних глікозидів (0,01-1,0 мг/л) статистично достовірно стимулюють ріст клітин у культурі (Г. Г. Колеснікова, 1994).

Вивчення впливу різних концентрацій еко-стиму на синтез ДНК проведено методом радіонуклідного аналізу (по Френші Р.Н., 1989), який

враховує динаміку швидкості включення 3Н-тімідінової мітки культурою ФЕЛ.

Встановлено посилення синтезу ДНК вже через 48 годин після внесення в поживне середовище 1 і 5 мкг/мл екостиму, яке доходить до максимуму через 96 годин - на 60-70% вище контрольного рівня (мал.5). Одержані результати свідчать про активну реакцію клітин на якісний склад середовища. За даними ізотопного аналізу доза 50 мкг/мл екостима через 48 годин контакту пригнічувала синтез ДНК на 30, а через 46 годин на 80% в порівнянні з контролем. Доза 50 мкг/мл прийнята за порогову для даного критерія цитотоксичності, що в 10 разів менше визначеної по тесту деструкції клітин моношару.



Малюнок 5. Включення 3Н-тімідину клітинами культури ФЕЛ при дії екостима

Таким чином, наші дані підтверджують відомості про те, що метод морфологічної оцінки цитотоксичності менш чутливий та інформаційний і відображає глибокий і безповоротний процес впливу на клітину. В той же час порушення мітотичного режиму і проліферативного пулу клітин в культурі розвиваються при дії доз, які в декілька разів нижче за порогові

за інтегральними показниками і виявляють найбільш тонкі (які не ведуть до загібелі клітин) зміни її репродуктивного апарату. Визначення числа клітин в моношарі і показника мітотичної активності можна запропонувати як достатньо прості і інформативні методи попередньої оцінки як токсичної, так і цитостимулюючої дії біологічно-активних речовин.

Таким чином у досліджах *in vivo* та *in vitro* нами відзначено, що павстим і екостим викликають стимулюючий ефект на різних ієрархічних рівнях структурно-функціональної організації біологічних систем: клітинному (підвищення мітотичної активності і швидкості включення тімідінової мітки в клітинах *in vitro*), органному (збільшення мітотичної активності клітин тонкого кишечника) та цілосного організму (прискорення приросту маси тіла тварин). Ця їх властивість, за нашою думкою, є провідною в механізмі стимулюючої дії вказаних препаратів як на рослинні об'єкти, так і на організм тварин.

На заключному етапі токсикологічної експертизи вивчено поведінку павстиму та екостиму в модельному водоймищі. Встановлено, що пороговою концентрацією павстиму за зміною кольоровості води є доза 31,25 мг/л, а екостиму - 32,64 мг/л за зміною запаху. Вказані концентрації не впливають на прозорість води та піноутворення. Ці порогові концентрації збігаються з даними, які встановлено за зміною інтегральних показників санітарного режиму водоймища (БПК, ХПК, окислюваність, процеси нітріфікації), а саме: 31,25 мг/л для павстиму і 32,64 мг/л для екостиму. Із урахування результатів експериментальних досліджень на тваринах обгрунтовані ГДК препаратів у воді водоймищ санітарно-побутового водопостачання на рівні 30 мг/л (за органолептичним критерієм шкідливості).

За стабільністю у воді (згідно з загальноприйнятою класифікацією) павстим відноситься до стійких сполук (T50 - 10 днів), а екостим - до помірно стійких (T50 - 4 дні).

Враховуючи максимально недіючу дозу в хронічному експерименті та приймаючи коефіцієнт запасу 30, розраховано допустимі середньодобові дози для людини (ДСД), які складають для павстиму 1000 мг/люд (або 15,2 мг/кг маси тіла), а для екостиму - 5000 мг/люд (або 83,3 мг/кг маси тіла), ОБРД (розрахунковий) для атмосферного повітря рекомендовані в межах 0,42 та 0,69 мг/м³ відповідно.

Висновки

1. Стимулятори росту рослин павстим та екостим відносяться до малотоксичних сполук (IV клас небезпеки), коефіцієнт кумуляції > 5, володіють слабкою подразнюючою та шкірно-резорбтивною дією.

2. Тривале внутрішньошлункове введення павстиму та екостиму в дозах вище за 500 та 2500 мг/кг маси тіла відповідно не призводить до істотних структурно-функціональних змін в організмі дослідних тварин, що, враховуючи виробничі умови, дозволяє вважати малоімовірною можливість хронічної інтоксикації вказаними препаратами.

3. При тривалому введенні в організм вагітних та лактуючих самок щурів павстим і екостим не чинять специфічної ембріотоксичної та тератогенної дії, не впливають негативно на розвиток наступного покоління (III група небезпеки за гігієнічною класифікацією).

4. Павстим і екостим проявляють виразний стимулюючий ефект на приріст маси тіла молодих та новонароджених щурів, що збігається по часу з періодом інтенсивного синтезу білка. Самки більш чутливі до стимулюючої дії стероїдних глікозидів.

5. Одноразове введення павстиму та екостиму приводить до зростання відносного числа патологічних мітозів та зниження мітотичної активності в клітинах тонкого кишечника та кісткового мозку. Пороговими дозами при одноразовому введенні за дією на мітотичний режим є 1000 і

10000 мг/кг для клітин кісткового мозку і 10000 мг/кг для епітелію крипт тонкого кишечника.

6. Підгострий та хронічний вплив павстима та екостима в дозах нижче 1000 мг/кг і 2500 мг/кг відповідно, стимулює мітотичний режим клітин епітелію крипт, тонкого кишечника, що виявляється в достовірному збільшенні числа проліферуючих клітин і зниженні коефіцієнту фаз ділення. Клітини кісткового мозку, які діляться, менш чутливі до стимулюючої дії препаратів.

7. При хромосомному аналізі клітин кісткового мозку мишей виявлено слабку цитогенетичну активність павстиму і екостиму при введенні доз вищих за 5000 мг/кг. Дози, нижчі за 1000 мг/кг, знижують частоту патологічних мітозів в клітинах тонкого кишечника і кісткового мозку при їх діленні, що свідчить про наявність у даних сполук антимутагенних властивостей.

8. Екостим чинить стимулюючу дію на проліферативні процеси в дїплїдних клітинах людини *in vitro*, яка відзначається істотним збільшенням числа клітин в моношарї та підвищенням індексу мітотичної активності. Співвідношення фаз ділення і частота патологічних форм мітозу при цьому зберігається на рівні контролю. Максимальний ефект спостерігався при введенні в культуральне середовище низьких доз препарату (1 і 5 мкг/мл).

9. Введення в культуральне середовище екостиму в дозах 1 і 5 мкг/мл збільшує на 150-170% інтенсивність включення 3Н-тімїдіну в клітини фїбробластів ембріонів людини, що свідчить про суттєве збільшення синтезу ДНК.

10. При вивченні токсичного процесу *in vitro* найбільш інформаційними є індекс проліферативної активності клітин (мітотична активність, число клітин в моношарї), швидкість і ступінь включення тімїдинової мітки, а також рівень патологічних форм мітозу. Зміни вказаних показників

спостерігаються при рівнях впливу, значно нижчих від доз, які викликають морфологічні зміни клітин, що дозволяє запропонувати їх критерійно значимими при оцінці цитотоксичності хімічних сполук.

11. Дослідження в модельному водоймищі дозволили запропонувати як ГДК у воді для павстима та екостима концентрацію 30 мг/л. ОБРД в атмосферному повітрі (розрахунковим методом) складає для павстиму 0,42 мг/м³, для екостиму - 0,69 мг/м³; ДСД - 1000 та 5000 мг на людину за добу відповідно.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Влияние экостима на эксплантированные клетки человека //Актуальные вопросы железнодорожной медицины: Сб. науч. работ, посвященный 50-летию железнодорожной медицины. Кишинев, 1995. С.15 (соавт. А.Ф.Вас ілос).

2. Токсиколого-гигиеническая оценка экостима //Актуальные вопросы железнодорожной медицины: Сб. науч. работ, посвященный 50-летию железнодорожной медицины. Кишинев, 1995. С.17. (соавт. А.Ф.Вас ілос, Л. І. Іванова).

3. Токсиколого-гигиеническая оценка нового стимулятора роста растений павстима // Curier medical, 1996. N 2. С.25-27.

4. The investigation of antiviral and immunological prospertis of vegital origin // J. de medicine preventive. Iasi , 1995. Vol. 3. N1-2. P.92. (с.авт. К. І.Спину, П.Г.Скоферца, А.Ф.Вас ілос).

Резюме

Стратупат Т.Г. Токсикологическая характеристика новых стимуляторов роста растений павстима и экостима. Диссертация на со-

искание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.11. - токсикология; ГНПЦГиЭ, г.Кишинев, 1996.

Павстим (П) и экостим (Э), стероидные гликозиды ряда фураностаноловых, относятся к классу малотоксичных соединений, не обладают кумулятивным, раздражающим действием, специфической гонадо-, эмбриотоксической, тератогенной и мутагенной активностью. Изучаемые препараты оказывают выраженное стимулирующее действие на прирост массы тела новорожденных и молодых особей, синтез белка. П и Э активируют процессы клеточной пролиферации как *in vivo*, так и *in vitro*, что проявляется в увеличении индекса митотической активности, ускорении прохождения клеткой стадий митоза, усилении синтеза ДНК. Длительное воздействие низких доз П и Э существенно снижает спонтанный уровень патологии митоза в эпителии крипт тонкого кишечника, что свидетельствует о наличии у них определенных антимутагенных свойств. Разработаны гигиенические нормативы содержания П и Э в объектах окружающей среды.

Summary

Stratulat T.G. Toxicology assessment of new stimulators for the plant growth pavstim and ecostim. Dissertation is the manuscript for the Degree of Candidate of Science (Biology) on speciality 14.03.11.- "toxicology", National Research Practical Centre of Hygiene and Epidemiology, Kishineu, 1996.

Pavstim (P) and ecostim (E), steroid furostanol glycosides, belong to the class of minor toxic substances. They don't show cumulative and irritative action, specific gonado-, embriotoxic, teratogenic and mutagenic activity. Investigated preparations display a significant stimulator effect to increase the mass body of neonatal and yonger animals, of proteins syntesis. P and E activate the process of cell proliferation both *in vivo* and *in vitro*, which manifeste in the increase of the index of mytotic activity, guicken passing the

cellular stages of mitosis, reinforcement of DNA synthesis. P and E in mean doses considerably reduce the spontaneous level of pathological mitosis in the epithelium cripts of small intestine under chronic influence, which testify that these preparates presence defenite antimutagenic effects. There were elaborated the hygiene standart of P and E in the environmental units.

КОС, 1996 г.
Замов.- 510 тир.- 60

440895

AB 35.931

AB 35.931