

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ СМАЗОЧНО-ОХЛАЖДАЮЩИХ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СОСТАВОВ НА АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ТЕСТ-МОДЕЛЯХ

ТРЕЙЛИБ В.В., ПОЛОВИНКИН Л.В., ГОМОЛКО Т.Н., ДРОЗДОВА Е.В.

ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены»

Резюме. В статье приводятся результаты изучения острой токсичности смазочно-охлаждающих технологических составов на минеральной и синтетической основах на тест-объектах *Tetrahymena pyriformis*, ракообразных и одноклеточных водорослях, сперме крупного рогатого скота и люминесцентном бактериальном тесте. На основании проведенных исследований констатируется, что они не соответствуют экспериментальным данным, полученным на лабораторных животных.

Ключевые слова: смазочно-охлаждающие технологические составы, токсичность, альтернативные тест-модели, тест-объекты, *in vitro*.

Abstract. The results of studying acute toxicity of lubricating and cooling technological compositions on mineral and synthetic bases on test objects of *Tetrahymena pyriformis*, crustaceans and unicellular algae, cattle sperm and the luminescent bacterial test are presented in this article. On the basis of the performed studies it has been noted that they don't correspond to the experimental data obtained on laboratory animals.

Key words: lubricating and cooling technological compositions, toxicity, alternative test models, test objects, *in vitro*.

Проблема химической безопасности в настоящее время приобрела глобальное значение. Многообразие химических веществ, обращающихся в среде обитания, разнообразие их химической структуры и физико-химических свойств, сложность управления рисками превратили химические соединения в реальную угрозу выживания человека и природы. В этой связи основным элементом предотвращения негативного воздействия на человека является получение максимально полной информации об их токсических эффектах [1].

Принимая во внимание обоснованно сложившуюся в последние годы тенден-

цию применения скрининговых методов оценки токсичности, по возможности исключение из токсикологического эксперимента теплокровных животных, ВОЗ и UNEP рекомендуют использование низкорганизованных тест-моделей [2-4].

В этом аспекте интерес представляют смазочно-охлаждающие технологические составы (СОТС), которые имеют многокомпонентный состав и достаточно полно изучены в токсикологическом плане на теплокровных животных [5, 6], что позволит сделать заключение о правомочности использования тест-моделей при оценке их токсичности и опасности.

Целью работы было изучить и сопоставить особенности токсического действия СОТС на минеральной и синтетической основах в опытах *in vitro* на тест-объектах *Tetrahymena pyriformis*, ра-

кообразных и одноклеточных водорослях, сперме крупного рогатого скота и люминесцентном бактериальном тесте.

Методы

Экспериментально-токсикологическому исследованию подвергали СОТС на минеральной «ЭК-2М» (масло рапсовое и минеральное, триэтаноламин, моноэтаноламин, калия гидроокись, вода) и синтетической «СК-1» (борная кислота, калий едкий, моноэтаноламин, триэтаноламин, нитрит натрия, олеиновая кислота, неол, вода) основах.

Для проведения исследований из испытуемых СОТС на дистиллированной воде готовили серию разведений от 0,01 до 500 мг/мл, а также использовались нативные композиции.

Токсичность СОТС на тест-объекте *Tetrahymena pyriformis* изучали в острых и подострых экспериментах согласно методическим рекомендациям [7, 8]. Во флаконы объемом 10 мл вносили 1 мл каждой концентрации СОТС, а затем добавляли инокулят инфузории в стандартной фазе роста (2000/мл). В качестве контроля использовали дистиллированную воду. Пробы инкубировали при 25°C в течение 3 часов (острый опыт) и 24 часа (подострый опыт). По истечении сроков инкубации под микроскопом в счетной камере Фукса-Розенталя подсчитывали число погибших инфузорий до фиксации и их общее число после фиксации. На основании расчета % летальности установлены основные параметры токсичности - $ЛД_{16}$, $ЛД_{50}$, $ЛД_{84}$, $K_{кум}$.

Класс токсичности устанавливали согласно классификационным характеристикам, приведенным в таблице 1.

Острую токсичность СОТС с использованием батареи тестов на основе водных тест-объектов (ракообразные – *Daphnia magna*, *Cypridopsis vidua* и *Heterocypris incongruens*; одноклеточные водоросли – *Chlorella vulgaris* и *Chlorella sp.*) проводили согласно стандартизованных методик [9-11].

В ходе исследования ракообразные в течение 48 часов (дафнии), 72 часа (*Heterocypris incongruens*) и 96 часов (*Cypridopsis vidua*) подвергались воздействию различных концентраций СОТС в трех повторностях по 10 особей в группах.

В качестве контроля использовали дистиллированную воду. На основании полученных экспериментальных данных рассчитывались среднеэффективные концентрации $ЭК_{16}$, $ЭК_{50}$, $ЭК_{84}$.

Методика биотестирования с использованием пресноводных одноклеточных водорослей *Chlorella vulgaris* и *Chlorella sp.* основана на установлении различий между интенсивностью роста тест-культур в анализируемой пробе с различными концентрациями СОТС (опыт) и культуральной среде (контроль).

Критерием острого токсического действия СОТС является снижение на 50% и более численности клеток водорослей в опыте по сравнению с контролем за 72 часа биотестирования («острая токсичность») при условии, что в контрольной группе снижение численности клеток не превышает 10%.

Для количественной оценки токсичности СОТС устанавливали медианную

Таблица 1

Классификация вредных веществ по степени токсичности по результатам острых и подострых экспериментов на *Tetrahymena pyriformis*

Показатель	Классы по убывающей степени токсичности и опасности			
	1	2	3	4
$ЛД_{50}$, мг/мл	менее 0,1	0,1-1,0	1,1-20	более 20
Ккумас	менее 0,1	0,10-0,30	0,31-0,50	более 0,50

эффективную концентрацию за 72 часа ($ЭК_{50-72}$).

Интерпретация полученных данных проводилась в соответствии с критериями, установленными в Согласованной на глобальном уровне системе классификации и маркировки химических веществ: острая 1 – $ЭК_{50} \leq 1$, острая 2 – $ЭК_{50} > 1 - \leq 10$, острая 3 – $ЭК_{50} > 10 \leq 100$.

Расчет смертельных и эффективных концентраций проводили методом пробит-анализа Литчфилда-Уилкоксона в изложении М.Л. Беленького с использованием программы Microsoft Excell и доверительным интервалом 95%.

Определение острой токсичности СОТС с использованием клеточного тест-объекта спермы крупного рогатого скота (прибор «Анализатор изображения АТ-05», Россия) и люминесцентного бактериального теста (прибор «Биотокс-10М», Россия) проводили в соответствии с требованиями, изложенными в нормативно-методических документах [12, 13]. Результаты исследований оценивали по индексам токсичности – до 69 (нетоксичное вещество), 70-120 (допустимый интервал токсичности) и свыше 121 (токсическое вещество) для спермы крупного рогатого скота и для люминесцентного бактериального теста – допустимая степень токсичности

вещества при индексе токсичности I_{tox} меньше 20; вещество токсично, когда I_{tox} равен или больше 20 и меньше 50; сильно токсичное – I_{tox} равен или более 50.

Результаты и обсуждение

В острых и подострых экспериментах на тест-объекте *Tetrahymena pyriformis*, установлено, что воздействие СОТС «ЭК-2М» в концентрации 1-100 мг/мл и СОТС «СК-1» ($C=1$ мг/мл) вызывают заметные изменения формы тела и характера движений организмов и их обычную гибель. При увеличении концентрации СОТС «ЭК-2М» до 500 мг/мл (время инкубирования 24 часа) и СОТС «СК-1» ($C=10$ мг/мл, инкубация 3 часа) наблюдалась 100% гибель популяции тест-объекта *Tetrahymena pyriformis*.

Параметры токсикометрии СОТС «ЭК-2М» и «СК-1», рассчитанные по результатам острых и подострых экспериментов на *Tetrahymena pyriformis* представлены в таблице 2.

Анализируя данные, представленные в таблице, можно констатировать, что в условиях острого воздействия на *Tetrahymena pyriformis* по величине $ЛД_{50}$ СОТС «ЭК-2М» относится к умеренно токсичным веществам (3 класс), а СОТС

Таблица 2

Параметры и класс токсичности СОТС «ЭК-2М» и «СК-1» при остром и подостром воздействиях на *Tetrahymena pyriformis*

Показатель токсичности	Величина токсичности		Класс токсичности	
	«ЭК-2М»	«СК-1»	«ЭК-2М»	«СК-1»
Острый эксперимент				
$ЛД_{16}$, мг/мл	1,81	0,03	-	-
$ЛД_{50}$, мг/мл	4,75 0,01	0,35 ±	3	2
$ЛД_{84}$, мг/мл	7,68	0,68	-	-
Подострый эксперимент				
$ЛД_{50}$, мг/мл	1,56 ±	0,17 ±	-	-
$ЛД_{84}$, мг/мл	3,78	0,59	-	-
$K_{кум}$	0,33	0,49	3	3

«СК-1» – высокотоксичным (2 класс). По результатам подострого воздействия обе композиции обладают умеренными кумулятивными свойствами.

Изучение острой токсичности СОТС с использованием батареи тестов на основе водных тест-объектов (ракообразные и одноклеточные водоросли) показало, что при воздействии СОТС «ЭК-2М» в концентрации 100 мг/мл к концу срока экспозиции отмечается 100% эффект у всех тест-организмов. Аналогичная картина наблюдается и под влиянием композиции СОТС «СК-1» в концентрации 50 мг/мл, за исключением дафний. Начало проявления токсического эффекта под влиянием СОТС «ЭК-2М» на дафнии регистрируется в концентрации выше 0,1 мг/мл, а на остальные тест-организмы – 1 мг/мл.

Концентрации СОТС «СК-1» свыше 10 мг/мл вызывали 100% гибель ракообразных в первые сутки эксперимента. В отношении водорослей СОТС «СК-1» проявляет несколько меньшую токсичность, что выражается 100% эффектом к концу

периода экспозиции в концентрации 100 мг/мл.

Результаты расчета средних эффективных концентраций СОТС после воздействия на ракообразных и одноклеточных водорослях представлены в таблице 3.

Исходя из значений ЭК₅₀ и согласно классификационным характеристикам СОТС «ЭК-2М» относится к категории «острая 3» по наиболее чувствительной тест-модели водоросли *Chlorella vulgaris* (ЭК₅₀₋₇₂ 11,5 мг/л), а СОТС «СК-1» – категории «острая 2» *Daphnia magna* (ЭК₅₀₋₄₈ 2,5 мг/л).

В результате исследования острой токсичности СОТС на сперме крупного рогатого скота установлено, что по значению индекса токсичности на уровне – 80,3 СОТС «ЭК-2М» является композицией с допустимым уровнем токсичности, а СОТС «СК-1» (Itox 128,8) – токсичной.

Экспрессное определение (период экспозиции – 5 минут) острой токсичности СОТС «СК-1» и «ЭК-2М» с помощью люминесцентного бактериального теста проводили по изменению интенсивно-

Таблица 3

Параметры и категории токсичности СОТС «ЭК-2М» (I) и «СК-1» (II) при остром воздействии на батарею тестов на основе водных тест-объектов

Параметры острой токсичности, мг/мл	Наименование тест-объекта				
	Ракообразные			Одноклеточные водоросли	
	<i>Daphnia magna</i>	<i>Cypridopsis vidua</i>	<i>Heterocypris incongruens</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Chlorella sp.</i>
ЭК ₁₆					
I	0,8	7,8	9,4	3,0	1,8
II	0,2	1,9	0,9	2,8	0,7
ЭК ₅₀					
I	12,1 ± 0,0	16,4 ± 0,0	26,2 ± 0,0	11,5 ± 0,0	11,9 ± 0,0
II	2,5 ± 0,0	2,6 ± 0,0	2,7 ± 0,0	11,7 ± 0,0	6,1 ± 0,0
ЭК ₈₄					
I	90	34,4	35,4	45,2	54,0
II	4,8	3,5	6,1	50,2	50,9
Категория острой токсичности					
I	3				
II	2				

сти биоллюминесценции биосенсора при воздействии испытуемых композиций по сравнению с контролем и вычислением индекса токсичности. Согласно классификационным критериям, СОТС «ЭК-2М» имеет допустимую степень токсичности при $I_{tox}=6,09 \pm 4,81$, а СОТС «СК-1» при $I_{tox}=99,5 \pm 0,06$ относится к веществам с высокой токсичностью.

Сравнительный анализ результатов исследований позволяет констатировать, что по значению показателей острой токсичности на изученных тест-объектах более выраженную токсичность проявляет СОТС на синтетической основе «СК-1» по сравнению с СОТС на минеральной основе «ЭК-2М». Более выраженные токсичные эффекты СОТС «СК-1» обусловлены, вероятнее всего, особенностями компонентного состава указанной композиции, в рецептуру которой до 15% входит триэтанолламин. Аналогичную закономерность по степени выраженности неблагоприятного действия СОТС «СК-1» по отношению к СОТС «ЭК-2М» установлены в экспериментах на животных (белые крысы и мыши) в условиях повторного воздействия (эпикутанного, внутрижелудочного и ингаляционного) композиций [5, 6].

Вместе с тем, следует отметить, что использованные в эксперименте тест-объекты (*Tetrahymena pyriformis*, ракообразные и одноклеточные водоросли, сперма крупного рогатого скота и люминесцентный бактериальный тест) и полученные результаты по оценке токсичности и кумулятивного действия (*Tetrahymena pyriformis*) не соответствуют данным экспериментальных исследований на лабораторных животных, согласно которым по параметрам острой внутрижелудочной токсичности СОТС «ЭК-2М» и «СК-1» относятся к 4 классу опасности ($LD_{50} > 5000$ мг/кг) и не обладают способностью к кумуляции на уровне проявления смертельных эффектов ($K_{кум} > 5,0$) [5].

Использованные в острых опытах тест-модели в большей степени применимы в экологической токсикологии для оценки токсичности водных объектов и почвы.

Заключение

– в условиях острого и подострого экспериментов на *Tetrahymena pyriformis* СОТС «ЭК-2М» и «СК-1» относятся соответственно к 3 (умеренно токсичное вещество) и 2 классу токсичности (высоко-токсичное вещество) и обладают умеренно выраженными кумулятивными свойствами;

– по величине среднесмертельных доз, установленных в остром опыте на батареях тестов из водных тест-организмов (ракообразные и одноклеточные водоросли), СОТС «ЭК-2М» и «СК-1» относятся к веществам категории «острая 3» и «острая 2»;

– согласно классификационным критериям в условиях острого опыта по значению индексов токсичности на сперме крупного рогатого скота СОТС относятся к композициям с допустимым уровнем токсичности («ЭК-2М») и токсической («СК-1»), а в люминесцентном бактериальном тесте соответственно как вещества с допустимой и высокой токсичностью;

– более выраженная острая токсичность СОТС «СК-1» по сравнению с «ЭК-2М» на изученных тест-моделях обусловлена рецептурным составом (содержание триэтанолламина до 15%);

– использованные тест-модели для изучения острой токсичности СОТС не приемлемы, так как полученные результаты не соответствуют таковым, установленным в опытах на лабораторных животных.

Литература

1. Лукьянов, А.С. Биозтика. Альтернативы экспериментам на животных / А.С. Лукьянов. – М., 1996. – 84 с.
2. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: a critical review / T.H. Hutchinson [et al.] // Aquatic toxicol. – 2006. – Vol. 76. – P. 69-92.
3. Combes, R.D. Some thoughts on the use of replacement alternatives for toxicity testing and risk assessment / R.D. Combes // Arch Toxicol. – 2009. – № 83 (3). – P. 199-201.
4. Derksen, J.G.M. Microbiotests, possibilities and limitations / J.G.M. Derksen. – Amsterdam: AquaSense, 2002. – 75 p.
5. Сравнительная токсиколого-гигиеническая оценка смазочно-охлаждающих технологиче-

- ских составов на минеральной и синтетической основах / В.В. Трейлиб [и др.] // Здоровье и окружающая среда: сб. науч. тр. / Респ. науч.-практ. центр гигиены; гл. ред. Л.В. Половинкин. – Минск, ГУ РНМБ, 2011. – Вып. 17. – С. 142-148.
6. Влияние смазочно-охлаждающих технологических составов и продуктов термодеструкции в условиях повторного ингаляционного воздействия на организм экспериментальных животных / В.В. Трейлиб [и др.] // Здоровье и окружающая среда [Электронный ресурс]: сб. науч. тр. Респ.науч.-практ.центра гигиены; гл.ред. Л.В. Половинкин. – Минск: РНПЦГ, 2012. – Вып. 21. – Электрон. дан. и прогр. – 1 электрон.опт. диск (CD-ROM): зв., цв.
7. Комплексная биологическая оценка объектов природного и искусственного происхождения *Tetrahymena pyriformis*: метод. рекомендации / разработ.: Белорус. науч.-иссл. сан-гиг. ин-т; авт. сост. А.С. Богдан. – Минск, 1996. – 19 с.
8. Инструкция № 2.1.7.11-42-2004. Определение токсичности отходов, содержащих органические вещества: утв. Гл. гос. сан. врачом РБ 2004. – Минск, 2004.
9. ИСО 6341:1996. Качество воды. Определение иммобилизации *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Тест на острую токсичность.
10. ИСО 8692:2012. Качество воды. Испытание на торможение роста водорослей в пресной воде с применением одноклеточных зеленых водорослей.
11. OECD/OCDE 202. Руководство OECD для тестирования химических веществ. *Daphnia* sp. Острый иммобилизационный тест.
12. МУ 1.1.037-95. Биотестирование продукции из полимерных и других материалов: утв. Гл. гос. сан. врачом РФ 20.12.1995. – М., 1995.
13. Инструкция по применению № 090-0610. Определение токсичности химических соединений, полимеров, материалов и изделий, ПКП и объектов окружающей среды с помощью люминесцентного бактериального теста: утв. Гл. гос. сан. врачом РБ 28.06.2010. – Минск, 2010.

Поступила 13.06.2013 г.

Принята в печать 05.09.2013 г.

Сведения об авторах:

Трейлиб В.В. – научный сотрудник лаборатории микробиологии ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены»;

Половинкин Л.В. – д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории промышленной токсикологии ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены»;

Гомолко Т.Н. – научный сотрудник лаборатории профилактической и экологической токсикологии ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены»;

Дроздова Е.В. – к.м.н., доцент, заведующий лабораторией питьевого водоснабжения и санитарной охраны водоемов ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены».