

EDN: <https://elibrary.ru/wtvuyh>DOI: <https://doi.org/10.31089/1026-9428-2022-62-11-774-780>

УДК 615.9: 591.39

© Коллектив авторов, 2022

Шабашева Л.В., Протасова Г.А., Попов В.Б., Радилов А.С.

Использование диффузионных камер в эмбриотоксических исследованиях

ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, г.п. Кузьмоловский, корп. № 93, Ленинградская область, 188663

Введение. В настоящее время не существует стандартных методических подходов, позволяющих оценивать опасность для репродукции человека и животных малорастворимых химических веществ (промышленные отходы, продукты деградации ОБ, полимерные материалы), в том числе веществ, образующих комплексные малорастворимые системы с объектами окружающей среды. Использовать стандартные пути введения таких веществ и комплексов для оценки их репродуктивной опасности бывает невозможно или малоэффективно. Попытка найти экспериментальную модель для проведения токсикологических и эмбриотоксикологических исследований, позволяющих оценить опасность длительного взаимодействия малорастворимых соединений непосредственно с тканевыми жидкостями, явилась основной целью работы.

Цель исследования — изучить возможность использования диффузионных камер для оценки репродуктивной опасности малорастворимых химических веществ.

Материалы и методы. В экспериментах с химическими веществами навески сухих препаратов помещали во внутреннюю полость одного из колец; кольцо с обеих сторон заклеивали миллиметровыми мембранами. Полученные таким образом диффузионные камеры имплантировали в брюшную полость или под кожу в шейный отдел самкам крыс в наиболее чувствительные к патогенным воздействиям дни беременности.

Результаты. При имплантации животным диффузионных камер показана возможность оценки эмбриотоксических свойств малорастворимых химических веществ, таких как битумно-солевые массы, полимерные материалы и покрытия и т. п., а также загрязнённости почвы веществами потенциально опасными для репродуктивной функции человека и животных. С использованием диффузионных камер проведена оценка эмбриотоксической активности известных диморфогенов, циклофосамида, сульфата кадмия, а также ряда полимерных материалов (ди-параксилиленовая плёнка, сополимер акриловой кислоты, силиконовый каучук), оценено загрязнение почвы известным инсектицидом и акарицидом — эндосульфатом.

Ограничения исследования. В работе использовались диффузионные камеры с объёмом 400, 900 или 3000 мм³.

Выводы. В результате проведённых экспериментов было показано, что представленный метод может быть использован для оценки репродуктивной опасности малорастворимых химических веществ (продукты деградации ОБ, полимерные и эндопротезные материалы), при оценке опасности длительного нахождения в тканях инородных тел, при оценке загрязнённости почв в местах химических аварий, падения ракет, зон хранения и уничтожения химического оружия.

Этика. Исследование выполнено с соблюдением правил биоэтики, утверждённых Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (Протокол № 4 от 8.11. 2022 г.).

Ключевые слова: эмбриотоксикологические исследования; малорастворимые вещества; диффузионные камеры

Для цитирования: Шабашева Л.В., Протасова Г.А., Попов В.Б., Радилов А.С. Использование диффузионных камер в эмбриотоксических исследованиях. *Мед. труда и пром. экол.* 2022; 62(11): 774–780. <https://elibrary.ru/wtvuyh> <https://doi.org/10.31089/1026-9428-2022-62-11-774-780>

Для корреспонденции: Шабашева Лилия Владимировна, старший научный сотрудник лаборатории «Общей токсикологии и гигиенического регламентирования» ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России. E-mail: shabash69@gmail.com

Участие авторов:

Шабашева Л.В. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистический анализ, написание текста, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи;

Протасова Г.А. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистический анализ, написание текста, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи;

Попов В.Б. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистический анализ, написание текста, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи;

Радилов А.С. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистический анализ, написание текста, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Дата поступления: 01.12.2022 / Дата принятия к печати: 05.12.2022 / Дата публикации: 12.12.2022

Liliia V. Shabasheva, Galina A. Protasova, Vadim B. Popov, Andrey S. Radilov

The use of diffusion chambers in embryotoxic research

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, bldg. No. 93, Kuzmolovsky settlement, Leningrad Region, 188663

Introduction. Currently, there are no standard methodological approaches that allow assessing the danger to human and animal reproduction of poorly soluble chemicals (industrial waste, products of destruction of organic substances, polymer materials), including substances that form complex poorly soluble systems with environmental objects. It may be impossible or ineffective to use standard routes of administration of such substances and complexes to assess their reproductive hazard. An attempt to find an experimental model for conducting toxicological and embryotoxicological studies that allow assessing

the danger of prolonged interaction of poorly soluble compounds directly with tissue fluids was the main aim of the work.

The study aims to investigate the possibility of using diffusion chambers to assess the reproductive hazard of poorly soluble chemicals.

Material and methods. In experiments with chemicals, the researchers placed samples of dry preparations in the inner cavity of one of the rings. Experts sealed the ring on both sides with millipore membranes. The diffusion chambers obtained in this way were implanted into the abdominal cavity or under the skin in the cervical region of female rats during the most sensitive days of pregnancy to pathogenic effects.

Results. When implanting diffusion chambers to animals, the possibility of assessing the embryotoxic properties of poorly soluble chemicals, such as bitumen-salt masses, polymer materials and coatings, etc., as well as soil contamination with substances potentially dangerous to the reproductive function of humans and animals is shown. With the help of diffusion chambers, experts assessed the embryotoxic activity of known dysmorphogens, cyclophosphamide, cadmium sulfate, as well as a number of polymer materials (di-paraxylene film, acrylic acid copolymer, siloxane rubber). Scientists assessed soil contamination with a known insecticide and acaricide — endosulfan.

Limitations. In the work, the experts used diffusion chambers with a volume of 400, 900 or 3000 mm³.

Conclusion. As a result of the experiments conducted, scientists determined that the presented method can be used to assess the reproductive hazard of poorly soluble chemicals (products of destruction of organic matter, polymer and endoprosthesis materials), when assessing the risk of prolonged presence of foreign bodies in tissues, when assessing soil contamination in places of chemical accidents, rocket crashes, storage and destruction of chemical weapons.

Ethics. The study was carried out in compliance with the rules of bioethics approved by the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Experimental and Other Purposes (Protocol No. 4 of 8.11. 2022).

Keywords: *embryotoxicological studies; poorly soluble substances; diffusion chambers*

For citation: Shabasheva L.V., Protasova G.A., Popov V.B., Radilov A.S. The use of diffusion chambers in embryotoxic research. *Med. truda i prom. ekol.* 2022; 62(11): 774–780. <https://doi.org/10.31089/1026-9428-2022-62-11-774-780> <https://elibrary.ru/wtvuyh> (in Russian)

For correspondence: Lilia V. Shabasheva, the Senior Researcher at the Laboratory of Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology. E-mail: shabash69@gmail.com

Information about the authors: Shabasheva L.V. <https://orcid.org/0000-0003-0131-5111>

Protasova G.A. <https://orcid.org/0000-0002-5754-3204>

Popov V.B. <https://orcid.org/0000-0001-8239-0345>

Radilov A.S. <https://orcid.org/0000-0002-6223-8589>

Contribution:

Shabasheva L.V. — concept and design of research, collection and processing of material, statistical analysis, writing, editing, approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article;

Protasova G.A. — concept and design of research, collection and processing of material, statistical analysis, writing, editing, approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article;

Popov V.B. — concept and design of research, collection and processing of material, statistical analysis, writing, editing, approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article;

Radilov A.S. — concept and design of research, collection and processing of material, statistical analysis, writing, editing, approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Funding. The study had no funding.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Received: 01.12.2022 / Accepted: 05.12.2022 / Published: 12.12.2022

Введение. В настоящее время не существует стандартных методических подходов, позволяющих оценивать опасность для репродукции человека и животных малорастворимых химических веществ (промышленные отходы, продукты деструкции ОБ, полимерные материалы), в том числе веществ, образующих комплексные малорастворимые системы с объектами окружающей среды. Такие системы создаются в местах падения ракет, при взрывах, химических катастрофах, при уничтожении химического оружия. Использование стандартных путей введения таких веществ и комплексов для оценки их репродуктивной опасности бывает невозможно или малоэффективно. Разработка экспериментальной модели для проведения токсикологических и эмбриотоксикологических исследований, позволяющих оценить опасность длительного взаимодействия малорастворимых соединений непосредственно с тканевыми жидкостями, явилась основной целью работы. В качестве такой модели выбраны диффузионные камеры (ДК) [1, 8]. В простом варианте ДК представляют собой кольца из органического стекла или тефлона, во внутреннее пространство которых помещают испытуемое вещество, а стенки с обеих сторон заклеиваются (медицинский клей «Клеол») миллиметровыми мембранами (Millipore, диаметр пор 0,22–0,45 мкм). Такая конструкция позволяет проникать ткане-

вой жидкости через поры мембран в камеру с исследуемым веществом, контактировать с ним и в стерильном состоянии поступать в организм животного. В работе использовались ДК с объёмом 400, 900 или 3000 мм³.

Цель исследования — изучить возможность использования диффузионных камер для: оценки репродуктивной опасности малорастворимых химических веществ (продуктов деструкции ОБ, полимерных и эндопротезных материалов); опасности длительного нахождения в тканях инородных тел, например, осколков различного рода происхождения (боевые действия, технологические взрывы, производственные и бытовые травмы); загрязнённости почв в местах химических аварий, падения ракет, зон хранения и уничтожения химического оружия.

Материалы и методы. Работа проводилась на половозрелых самках крыс линии Wistar, полученных из питомника «Рапполово» (Всеволожского района Ленинградской области). Содержание и кормление лабораторных животных производилось в соответствии с Правилами лабораторной практики в Российской Федерации, утверждёнными приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003 г. № 267.

В экспериментах с химическими веществами, такими как циклофосфамид (ЦФА), сульфат кадмия, битум и

битумно-солевые массы (БСМ), содержащие продукты детоксикации смеси иприта и люизита (600 мг, максимально переносимая доза) навески сухих препаратов помещали во внутреннюю полость одного из колец; кольцо с обеих сторон заклеивали как описано выше. Полученные, таким образом, ДК, имплантировали в брюшную полость или под кожу в шейный отдел самкам крыс в наиболее чувствительные к патогенным воздействиям дни беременности (ДБ): на 10-й ДБ в экспериментах с ЦФА и сульфатом кадмия, на 2-й и 8-й ДБ в экспериментах с битумом и БСМ — иприта и люизита. В контроле в шейный отдел крыс соответствующего дня беременности имплантировали ДК без вещества. На 20-й ДБ проводили эвтаназию самок крыс дислокацией шейных позвонков, изымали ДК. Яичники и матку с плодами вырезали, подсчитывали количество жёлтых тел, мест имплантаций зародышей, количества погибших и живых плодов. У живых плодов оценивали состояние развития внешних органов, определяли массу тела и плаценты, а также теменно-копчиковый размер.

Статистическую обработку материала проводили на основе парных или множественных сравнений данных различных групп. Парные сравнения производили, используя *t*-критерий Стьюдента. При проведении множественных сравнений, используя тест Бартлета, предварительно оценивали однородность дисперсий в изучаемых выборках. При подтверждении однородности использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующей коррекцией уровней различий между контролем и подопытными группами по *t*-тесту Бонферрони или *q*-тесту Даннета; при отсутствии однородности дисперсий для сравнения средних величин в группах применяли непараметрический критерий Крускала-Уоллиса с коррекцией по тесту Данна [6]. Для оценки различий дискретных параметров (до- и постимплантационная гибель, суммарная гибель) использовали критерий хи-квадрат или точный метод Фишера. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Введение ДК в экспериментах по оценке эмбриотоксических свойств химических веществ, требовало на первом этапе изучения возможных патологических изменений в органах самок, связанных с длительным нахождением в организме камер, оценки влияния этих изменений на эмбриогенез крысы. Для выявления возможных патологических изменений в органах животных, крысам на 2-й ДБ под эфирным наркозом в брюшную полость или п/к в область шеи имплантировали одну или две ДК. Через 1, 2, 3, 5, 10 или 18–20 дней камеры изымали, оценивали наличие и количество тканевой жидкости, патоморфологические изменения в местах имплантации камер и во внутренних органах крыс. Для оценки эмбрионального развития основную часть самок подвергали эвтаназии на 20-й ДБ.

Основными патологическими изменениями в брюшной полости самок являлись соединительнотканые разрастания вокруг камеры с образованием спаек с брыжейкой, чаще с кишечником, маткой. Такие изменения наблюдались в основном после длительного пребывания камер в организме животного. В шейном отделе чаще отмечалась гиперемия тканей, соприкасающихся с камерой, что возможно связано с её перемещениями во время движения животного. В редких случаях отмечались местные воспалительные процессы, на что сразу же реагировала селезёнка — размерами, цветом. В остальных органах заметных патологических проявлений — как реакции на нахождение диффузионных камер — не отмечалось. Присутствие

одной или двух ДК в течение всей беременности крысы не увеличивало общие эмбриональные потери и не влияло на ростовые процессы плодов. Доказательством того, что вещества, помещённые в камеру, диффундируют из неё вместе с тканевой жидкостью, являлись патологические изменения во внутренних органах подопытных животных (в частности высокие дозы ЦФА и кадмия вызывали гибель животного в течение суток, на вскрытии отмечалась жировая дистрофия печени, резкое полнокровие сосудов внутренних органов, мелкие кровоизлияния в лёгких, экссудат в грудной полости, спленомегалия), патогенные, в том числе эмбриопатогенные эффекты, индуцируемые этими веществами. В камеры были помещены препараты, обладающие заведомо эмбриотоксическим действием. Это противоопухолевый препарат, цитостатик, тератоген циклофосфамид (ЦФА в дозах — 25 и 15 мг на крысу) и сульфат кадмия (1–10 мг) — известный дисморфоген, продуцирующий аномалии нервной трубки, экзенцефалию, черепно-лицевые аномалии, аномалии развития скелета и конечностей [3, 7].

Оба препарата, помещённые в ДК в заведомо летальных для эмбрионов дозах и имплантированные самкам на 10-й ДБ, оказали ожидаемые эффекты: все плоды в матке к 13-му ДБ были мертвы, результаты экспериментов представлены в **таблице 1**. Снижение дозы сульфата кадмия до 1 мг приводило к высоким постимплантационным (2,3 эмбриона на помет) потерям, и индукции у значительной части живых плодов (1,7 живых плодов в помете) макропатологических эффектов. По сути дела, 6 из 8 плодов в каждом помете (в среднем) в результате действия сульфата кадмия или погибали, или имели серьёзные дефекты развития. Основными формами патологии плодов являлись генерализованный отёк тела, анофтальмия, укорочение передних конечностей — аномалии характерные для действия кадмия.

БСМ иприта и люизита, образуются на конечном этапе двухстадийного процесса детоксикации ФОВ и предназначены для захоронения на спец полигонах [5]. Поскольку существует риск проникновения заключённых в БСМ продуктов разрушения ОВ в почву и грунтовые воды необходимы исследования их возможного токсического действия на человека и животных, в том числе влияния на репродуктивную функцию. Для оценки эмбриотоксических свойств битума и БСМ- иприта и люизита крысам на 2-й и 8-й ДБ в брюшную полость или в шейный отдел вшивали диффузионную камеру, содержащую навеску из битума, БСМ-иприта и люизита (600 мг на камеру). Результаты проведённых экспериментов с имплантацией диффузионных камер самкам в различные сроки беременности, соответствующие доимплантационному и постимплантационному развитию эмбрионов, чётко демонстрируют высокую эмбриолетальную активность данной дозы битума и БСМ, результаты представлены в **таблице 2**.

При этом в доимплантационные сроки (со 2-го по 20 ДБ) более высокий эмбриолетальный эффект оказывал битум, а в постимплантационные сроки — БСМ. При имплантации обоих веществ в сроки органогенеза (с 8-го по 20 ДБ) оба препарата выявляли выраженное фетолетальное действие без существенных различий в уровне их действия.

В последующих экспериментах были оценены эмбриотоксические свойства полимерных материалов, таких как ди-параксилиленовая плёнка (ППК) и сополимер акриловой кислоты (САК). ППК — полимер с толщиной 2 мкм,

Таблица 1 / Table 1

Эмбриолетальный и тератогенный эффекты циклофосфамида и сульфата кадмия, помещённых в диффузионные камеры и имплантированных беременным самкам крысы
Embryolethal and teratogenic effects of cyclophosphamide and cadmium sulfate placed in diffusion chambers and implanted in pregnant female rats

Параметры развития эмбрионов	Исследуемые вещества						
	Контроль без ДК	Контроль с ДК		ЦФА 12–25 мг	CdSO ₄		
		одна	две		10 мг	5 мг	1 мг
Количество самок	9	10	9	4	1	3	3
Дни беременности и имплантации диффузионных камер	—	2	2	10	10	10	10
Дни беременности и вскрытия самок	20	20	20	13	13	13	20
Количество жёлтых тел всего в среднем на самку	126 14,0±0,6	117 11,7±0,8	101 11,2±0,6	100% Гибель эмбрионов			29 9,7±1,2
Количество мест имплантации всего в среднем на самку	119 13,2±1,0	110 11,0±1,1	90 10,0±0,7				25 8,3±0,3
Доимплантационная гибель всего % в среднем на помёт	7 5,5 0,8±0,6	7 6,0 0,7±0,5	11 10,9 1,2±0,3				4 20,7 2,0±0,6
Постимплантационная гибель всего % в среднем на помёт	1 0,8 0,1±0,1	5 4,5 0,5±0,3	4 12,2 0,4±0,3				9 28,0 2,3±0,3
Количество живых эмбрионов всего % в среднем на помёт	118 93,7 13,1±1,0	105 89,7 10,5±1,1	86 85,1 9,6±0,9	100% Гибель эмбрионов			16 55,2 5,3±0,9
Количество плодов с патологией в среднем на помёт	—	—	—				5 1,7±0,3
Суммарный эмбриотоксический эффект всего % в среднем на помёт	8 6,7 0,9±0,6	12 10,3 1,2±0,5	15 14,9 1,7±0,5				18 62,1 6,0±0,6
Масса плодов, г	2,6±0,04	2,8±0,22	2,7±0,17				2,7±0,16
Теменно-копчиковый размер, см	3,1±0,02	3,1±0,13	3,1±0,09	100% Гибель эмбрионов			3,0±0,04
Масса плаценты, г	0,6±0,03	0,7±0,03	0,7±0,02				0,7±0,02

Примечание: ДК — диффузионная камера, $\bar{X} \pm m$ — среднее значение и стандартная ошибка среднего значения.

Note: ДК — is a diffusion chamber, $\bar{X} \pm m$ is the average value and the standard error of the average value.

может быть использована для дозирования заключённых в оболочку лекарств или для покрытия эндопротезов. Плёнки полимеров подклеивали под миллиметровые фильтры так, чтобы контакт с тканевой жидкостью был двусторонним. Потенциальную эмбриотоксическую активность ППК изучали в предельно жёстких экспериментальных условиях с применением диффузионных камер. Диффузионные камеры с ППК (площадь 500 мм²) имплантировали в брюшную полость или подкожно в шейный отдел самок крыс 1-го дня беременности. Для оценки дозной зависимости, площадь ППК (количество диффузионных камер) удваивали. Интактным животным имплантировали пустые камеры. Анализ развития плодов производили на 21 день беременности в соответствии со стандартным тератологическим протоколом [2]. Результаты свидетельствуют, что ни собственно имплантация диффузионных камер, ни имплантация камер с ППК не вызывали влияния на развитие плодов. Оцениваемые параметры развития: до- и

постимплантационная смертности, теменно-копчиковый размер плодов, масса их тела и плаценты, состояние развития внешних и внутренних органов, скелета — полностью соответствовали нормальному развитию. Это позволяет сделать вывод об отсутствии эмбриолетальных, тератогенных и ингибирующих ростовые процессы свойств у ППК.

Сополимер акриловой кислоты (САК) представляет собой плёнку, нерастворимую в воде, этаноле, метаноле и диметилсульфоксиде при нормальной температуре, а также при $t=37^\circ\text{C}$. Оценку его эмбриотоксической активности проводили, используя ту же технику имплантации диффузионных камер с вложенными кусочками САК в брюшную полость беременных крыс. Полученные результаты свидетельствуют, что ни собственно введение диффузионных камер, ни наличие в них САК в количестве 100 или 200 мг не оказывало патогенного влияния на эмбриональное развитие крысы. Все параметры, по которым оценивалось развитие эмбрионов, соответствовали

Таблица 2 / Table 2

Оценка эмбриотоксической активности битума и БСМ, помещенных в диффузионные камеры и имплантированных беременным самкам крысы**Evaluation of the embryotoxic activity of bitumen and BSM placed in diffusion chambers and implanted in pregnant female rats**

Параметры развития эмбрионов	Исследуемые вещества				
	Контроль	Битум	БСМ	Битум	БСМ
Длительность воздействия, ДБ	2–20	2–20	2–20	8–20	8–20
Количество самок	5	8	7	6	7
Количество жёлтых тел всего в среднем на 1 самку	49 9,8	79 9,9	88 12,6	63 10,5	70 10,0
Количество мест имплантаций всего в среднем на 1 самку	45 9,0	62 7,8	72 10,3	54 9,0	59 8,4
Доимплантационная гибель всего в среднем на помёт	4 0,9±0,3	17 2,1±0,5*	16 1,8±0,4	9 1,4±0,4	11 1,6±0,4
Постимплантационная гибель всего в среднем на помёт	4 0,9±0,4	8 1,3±0,4	21* 2,9±0,5	15* 2,8±0,6	20* 3,4±0,6
Количество живых эмбрионов	41	54	51	39	39
Суммарный эмбриотоксический эффект всего в среднем на помёт	8 1,6±0,5	25 3,2±0,5	37* 4,2±0,5	24 3,8±0,6	31* 4,4±0,6
Масса плодов, г	2,53±0,04	2,51±0,05	2,56±0,04	2,62±0,04	2,51±0,07
Теменно-копчиковый размер, см	3,18±0,03	3,16±0,03	3,18±0,03	3,15±0,03	3,12±0,04
Масса плаценты, г	0,86±0,03	0,82±0,03	0,70±0,01	0,74±0,02	0,83±0,04

Примечание: *, **, *** — уровни достоверности различий с контролем, соответственно $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$; *, **, *** — соответствующие уровни различий между группами в одном опыте (битум и БСМ).

Note: *, **, *** — the levels of reliability of differences with the control, respectively, $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$; *, **, *** are the corresponding levels of differences between groups in the same experiment (bitumen and BSM).

значениям этих параметров в контроле с учётом их возможных вариаций.

Мы испытали также возможность использования диффузионных камер для оценки эмбриотоксической активности химических загрязнителей почвы. Нам представляется важным иметь методический приём, позволяющий оценивать токсичность не только водных вытяжек, но и всей композиции веществ, содержащихся в почве, что необходимо, например, при оценке загрязнённости почв в местах химических аварий, падения ракет, зон хранения и уничтожения химического оружия. Проведённые эксперименты выявили определённые ограничения использования такого приёма: органическая часть почвы через несколько дней начинала проявлять признаки брожения, что нарушало целостность диффузионных камер и приводило к неблагоприятным для животных последствиям — вплоть до гибели. В связи с этим, оптимальным являлся эксперимент, продолжительность не более 3–5 дней, для проведения более длительных экспериментов необходима предварительная обработка почвы (стерилизация).

Для максимального приближения условий эксперимента к реальным, мы поместили в диффузионные камеры почву, содержащую примеси известного инсектицида и акарицида эндосульфана, эмбриотоксические свойства которого изучены нами ранее [4]. Навески препарата (2, 4 и 10 мг) были перемешаны с почвой и имплантированы в брюшную полость или область шеи самок 10-го ДБ (наиболее чувствительный срок эмбриогенеза). Через 3–5 су-

ток камеры изымали, рану зашивали и крыс оставляли до 20-го ДБ. Результаты эксперимента представлены в **таблице 3**.

Смесь почвы с эндосульфатом продуцировала достоверное усиление эмбриотоксического эффекта в 2–2,3 раза — постимплантационные потери. При этом среди части живых плодов отмечена макрпатология — не сращение нёбных полок, редукция нижней челюсти, деформация передних конечностей. Та же патология наблюдалась и в экспериментах с эндосульфатом, заключённым в диффузионные камеры. Результаты проведённых экспериментов свидетельствуют о том, что использование диффузионных камер может способствовать выявлению эмбриотоксического потенциала примесей, загрязняющих почву.

В заключительной части работы была показана принципиальная возможность выявлять с помощью диффузионных камер не только эмбриотоксическую активность химических веществ, материалов, загрязнителей почвы, но и суммарное их влияние на репродуктивную функцию, в частности самцов.

Для этой цели в диффузионные камеры помещали кусочки силиконового каучука, используемого для эндопротезирования, в количествах 285 мг и 570 мг. Камеры имплантировали самцам под кожную складку шеи со стороны спины сроком на 3 недели. В конце срока самцов спаривали с интактными самками. Оценка развития плодов производили на 21-й день беременности самок.

3-недельная экспозиция различных количеств силиконового каучука, имплантированного в диффузионных

Таблица 3 / Table 3

Оценка эмбриотоксических свойств почвы, загрязнённой эндосульфатом (опыты с диффузионными камерами)
Evaluation of the embryotoxic properties of soil contaminated with endosulfan (experiments with diffusion chambers)

Параметры развития эмбрионов	Содержание диффузионных камер				
	контроль	почва	эндосульфат	почва + эндосульфат 2 мг	почва + эндосульфат 10 мг
Длительность воздействия (ДБ)	—	10–15	10–15	10–15	10–13
Количество самок	9	8	5	5	5
Количество жёлтых тел всего в среднем на 1 самку	101 11,2±0,6	91 11,4±0,6	63 12,6±0,7	57 11,4±0,8	100%-я гибель эмбрионов
Количество мест имплантаций в среднем на 1 самку	90 10,0±0,7	84 10,5±0,7	54 10,4±0,7	50 10,0±0,9	
Доимплантационная гибель всего в среднем на помёт	11 1,2±0,3	7 0,9±0,3	11 2,2±0,2	7 1,4±0,3	
Постимплантационная гибель всего в среднем на помёт	4 0,4±0,3	5 0,6±0,3	7 1,4±0,2	6 1,2±0,3	
Количество живых эмбрионов в среднем на помёт	86 9,6±0,9	79 9,9±0,6	45 9,0±0,8	45 9,0±1,0	
Количество плодов с макропатологией всего в среднем на помёт	—	—	3 0,6±0,4	6 1,2±0,5	
Суммарный эмбриотоксический эффект абсолютный в среднем на помёт	15 1,7±0,5	12 1,5±0,4	21* 4,2±0,4**	19** 3,8±0,4***	
Масса плодов, г	2,70±0,17	2,67±0,06	2,29±0,05	2,49±0,07	
Теменно-копчиковый размер, см	3,08±0,09	2,98±0,05	2,80±0,01	2,87±0,06	
Масса плаценты, г	0,68±0,02	0,72±0,05	0,64±0,02	0,74±0,05	

Примечание: *, **, +, ++ уровни достоверности ($p < 0,05$ и $p < 0,01$), соответственно с контролем и группой «почва».

Note: *, **, +, ++ confidence levels ($p < 0.05$ and $p < 0.01$), respectively, with the control and the "soil" group.

камерах самцам крыс, не отразилась на их репродуктивной функции: спаривание с интактными (не подвергавшимся воздействию) самками продуцировало нормальное развитие плодов.

Заключение. В задачу настоящей работы входило экспериментальное обоснование использования диффузионных камер для оценки репродуктивной опасности малоразводимых веществ. Для оценки эффективности предлагаемого приёма на первом этапе изучалась возможность длительного нахождения камеры (камер) в организме животного и, связанные с этим, возможные макропатологические изменения. В результате эксперимента выявлено, что присутствие одной или двух диффузионных камер в течение всей беременности крысы не увеличивало общие эмбриональные потери и не влияло на ростовые процессы плодов. Доказательством того, что вещества, помещённые в камеру, диффундируют из неё вместе с тканевой жидкостью, являлись патологические изменения во внутренних органах подопытных животных, патогенные, в том числе эмбриопатогенные эффекты, индуцируемые веществами, обладающими заведомо эмбриотоксическим действием (циклофосфамид и сульфат кадмия). Эксперименты с имплантацией диффузионных камер самкам в различные сроки беременности (со 2-го по 20-й ДБ и с 8-го по 20-й ДБ), способствующие оценке влияния веществ на доимплантационное и постимплантационное развитие эмбрионов, продемонстрировали высокую эмбриолетальную активность как битума, так и

БСМ. При этом в доимплантационные сроки более высокий эмбриолетальный эффект оказывал битум, а в постимплантационные сроки — БСМ. При имплантации обоих веществ в сроки органогенеза оба препарата выявляли выраженное фетолетальное действие без существенных различий в уровне их действия. В последующих экспериментах были оценены эмбриотоксические свойства полимерных материалов (ППК и САК). Ни в одном из экспериментов эмбриотоксический эффект не был выявлен. Оценена возможность использования диффузионных камер для выявления эмбриотоксической активности химических загрязнителей почвы, что необходимо, например, при оценке загрязнённости почв в местах химических аварий, падения ракет, районах хранения и уничтожения химического оружия. Проведённые эксперименты выявили определённые ограничения использования такого приёма: органическая часть почвы через несколько дней начинала проявлять признаки брожения, что нарушало целостность диффузионных камер и влекло неблагоприятные для животных последствия — вплоть до гибели. В связи с этим, оптимальным является эксперимент в течение 3–5 дней или длительный эксперимент, но с предварительной стерильной обработкой почвы. Вместе с тем испытания показали, что использование диффузионных камер позволяло выявлять эмбриотоксичность загрязняющих почву примесей, как, например, в экспериментах с эндосульфатом. В заключительной части работы была показана принципиальная возможность выявлять с помощью

диффузионных камер не только эмбриотоксическую активность химических веществ, материалов, загрязнителей почвы, но и суммарное их влияние на репродуктивную функцию, в частности сперматогенез. Трёхнедельная экспозиция различных количеств силиконового каучука, имплантированного в диффузионных камерах самцам, не отразилась на их репродуктивной функции: спаривание с интактными самками продуцировало нормальное развитие плодов.

Таким образом, результаты проведённых экспериментов показывают, что представленный подход может быть использован для оценки репродуктивной опасности малораспространяемых химических веществ (продукты деградации ОБ, полимерные и эндопротезные материалы), при оценке опасности длительного нахождения в тканях инородных тел, при оценке загрязнённости почв в местах химических аварий, падения ракет, зон хранения и уничтожения химического оружия.

Список литературы

1. Лурья Е.А. Метод культивирования тканей в диффузионных камерах и некоторые результаты по применению. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. 1963; 45(10): 79–87.
2. Методические указания по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и влияния их на репродуктивную функцию. М.: МЗ СССР, Фармакологический комитет; 1986.
3. Попов В.Б., Вайсман Б.Л., Пучков В.Ф. Эмбриотоксическое действие циклофосамида после его биотрансформации в культуре постимплантационных зародышей крысы. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 1981; 5: 613–5.
4. Попов В.Б., Протасова Г.А., Радиллов А.С. Изучение эмбрио- и генотоксических свойств двух форм эндосульфана (порошковой и микрокапсулированной) в культуре до- и постимплантационных зародышей крысы и мыши. *Онтогенез*. 1998; 29(6): 444–9.
5. Установление класса токсичности и степени опасности битумно-солевых масс как промышленных отходов. М.: Отчёт ГосНИИОХТ; 1999.
6. Glantz S.A. *Primer of Biostatistics*. 3rd ed. New York-Toronto: McGraw-Hill, Inc.; 1992.
7. Hovland D.N., Machado A.F., Scott W.J., Collins M.D. Differential sensitivity of the SWV and C57BL/6 mouse strains to the teratogenic action of single administrations of cadmium given throughout the period of anterior neuropore closure. *Teratology*. 1999; 60(1): 13–21.
8. Metcalf D. *Hemopoietic colonies, in vitro cloning of normal and leukemic cells*. Amsterdam; 1977.

References

1. Luria E.A. Method of tissue cultivation in diffusion chambers and some results of application. *Arkhiy anatomii, gistologii i embriologii*. 1963; 45(10): 79–87 (in Russian).
2. Guidelines for the study of the embryotoxic action of pharmacological substances and their influence on reproductive function. Moscow: Ministry of Health of the USSR, Pharmacological Committee; 1986 (in Russian).
3. Popov V.B., Vaysman B.L., Puchkov V.F. Embryotoxic effect of cyclophosphamide after its biotransformation in the culture of postimplantation rat embryos. *Byulleten' ehksperimental'noj biologii i meditsiny*. 1981; 5: 613–5 (in Russian).
4. Popov V.B., Protasova G.A., Radilov A.S. Study of the embryo- and genotoxic properties of two forms of endosulfan (powdered and microencapsulated) in the culture of pre- and post-implantation rat and mouse embryos. *Ontogenesis*. 1998; 29(6): 444–9 (in Russian).
5. Establishment of the toxicity class and the degree of danger of bitumen-salt masses as industrial waste. M.: Report of GosNIIOKhT; 1999 (in Russian).
6. Glantz S.A. *Primer of Biostatistics*. 3rd ed. New York-Toronto: McGraw-Hill, Inc.; 1992.
7. Hovland D.N., Machado A.F., Scott W.J., Collins M.D. Differential sensitivity of the SWV and C57BL/6 mouse strains to the teratogenic action of single administrations of cadmium given throughout the period of anterior neuropore closure. *Teratology*. 1999; 60 (1): 13-21.
8. Metcalf D. *Hemopoietic colonies, in vitro cloning of normal and leukemic cells*. Amsterdam; 1977.