

УДК 615.9 - 615.099

МЕТОД ОЦЕНКИ ЭМБРИОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ БИОИНСЕКТИЦИДОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Л.Н. Орленкович¹, И.М. Ремез²

¹ООО «Медицина труда» НИИ охраны труда и здоровья окружающей среды Рижского медицинского университета Паула Страдыня, LV-1007, г. Рига, Латвия

²НИИ охраны труда и здоровья окружающей среды Рижского медицинского университета Паула Страдыня, LV-1007, г. Рига, Латвия

Изучено влияние биоинсектицидов боверина, энтомофторина и лепидоцида на клеточные и субклеточные элементы эффекторов иммунитета плода крыс. Выявлен иммунотоксический эффект препаратов на эмбрион на клеточном и субклеточном уровне.

Ключевые слова: биоинсектициды, эмбрион, иммунотоксичность, эмбриотропный эффект.

Введение. Применение производственных штаммов энтомопатогенных микроорганизмов требует санитарной стандартизации готовых форм препаратов на их основе для теплокровного организма. Споры гриба *Beauveria bassiana* (штамма-продуцента боверина) выделяют токсины, вызывающие у работников производства боверина головную боль, субфебрилитет, фолликулярный конъюнктивит, чешуйчатый блефарит, токсический дерматит, суб- и гипертрофические ринофарингиты, вазомоторные риниты, бронхиальную астму, угнетение функции мерцательного эпителия слизистой оболочки носа у 50 % рабочих с большим трудовым стажем. В этой же группе у 40 % рабочих выявлен конъюнктивит. Аллергизация организма у рабочих зависела от трудового стажа: от года до 5 лет отмечена у 15% рабочих, при большем стаже – у 65 %. Это подтверждено увеличением числа лизированных и агломерированных лейкоцитов, замедлением СОЭ, снижением показателей клеточного и гуморального иммунитета, завершенностью фагоцитоза (54-56 %). У инженерно-технического персонала таких заболеваний не выявлено [1, 2, 3, 4]. В США в производстве энтомофторина на основе гриба *Entomophthora corono-nata* у 16 мужчин отмечен ринофикомироз в виде опухолевидных образований на лице без поражения костей лицевого черепа. Диссеминация вы-

явлена после оперативных вмешательств [5]. Энтомофторин на основе гриба *E.thaxteriana* изучали при планировании производства с оценкой токсичности и опасности в эксперименте [6,7].

Большая занятость женщин в сфере биотехнологии требует от токсикологов обоснования санитарных стандартов с учетом влияния на генеративную функцию, плод и потомство. Регламентация биопрепаратов с учетом количественной и качественной оценки токсического эффекта на плод – главная задача профилактической токсикологии, которая решает вопросы о возможности использования труда женщин в их производстве и применении.

Цель работы – изучение действия биоинсектицидов на клеточные и субклеточные элементы эффекторов иммунитета плода крыс.

Материал и методы исследования. Объектом исследований явились биоинсектициды, созданные на основе энтомопатогенных грибов: энтомофторин (титр препарата $(2,5 \div 5) \cdot 10^7$ спор/г), боверин (титр препарата $(1,5 \div 2) \cdot 10^9$ спор/г) и лепидоцид (титр препарата $2 \cdot 10^9$ спор /г), созданный на основе бактерий *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*. Грибные биопрепараты обладают выраженным токсическим действием на репродуктивную функцию насекомых [8, 9]. Лепидоцид, обладающий общетоксическим действием на насекомых, был использован для сравнительной оценки грибных и бактериаль-

Орленкович Лилия Наумовна (Orlenkovich Liliya Naumovna), кандидат медицинских наук, микробиолог-гигиенист ООО «Медицина труда» НИИ Охраны труда и здоровья окружающей среды Рижского университета Паула Страдыня, LV-1007, г. Рига, Латвия, orlenkovich@inbox.ru

Ремез Инесса Моисеевна (Remez Inessa Moiseevna), кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник НИИ охраны труда и здоровья окружающей среды Рижского университета Паула Страдыня, LV-1007, г. Рига, Латвия, remezinessa@mail.ru.

ных биоинсектицидов при изучении их возможного эмбриотропного эффекта с использованием иммунологических и биохимических показателей.

Эксперименты проведены на белых нелинейных самках крыс массой 250-290 г, содержащихся в стандартных условиях вивария при естественном освещении на стандартном пищевом рационе. Статистическая группа состояла из 15-20 особей. Исследования проведены в соответствии с методическими рекомендациями [10] согласно правилам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей (Страсбург, 1986). Введение препаратов проводили при повторном ингаляционном поступлении в течение всей беременности на уровне недействующей ($1,1 \pm 0,1$ мг/м³), подпороговой ($4,1 \pm 0,2$ мг/м³), пороговой ($8,0 \pm 0,4$ мг/м³) и действующей ($19,0 \pm 2,4$ мг/м³) концентраций энтомофторина, ПДК ($0,3 \pm 0,05$ мг/м³) и действующей ($5,0 \pm 0,3$ мг/м³) дозы боверина, ПДК ($0,7 \pm 0,08$ мг/м³) и действующей ($6,0 \pm 0,3$ мг/м³) концентрации лепидоцида. Вышеуказанные концентрации препаратов получены по изменениям общетоксических показателей в 4-месячных хронических эксперимен-

тах при изучении функционального состояния нервной системы и внутренних органов, а также иммунной системы и микрофлоры кишечника при санитарной стандартизации биопрепаратов [4,6,7,10].

Извлечение эмбрионов осуществляли на 20 день беременности после декапитации беременных самок. Для проведения исследований у 15-20 плодов из опытной группы и параллельного контроля выделяли тимус и селезенку. Оценка состояния иммунокомпетентных органов эмбриона проводили разработанным нами «Способом определения эмбриотропного действия микробных препаратов». Содержание Т-лимфоцитов в тимусе определяли методом розеткообразования лимфоцитов, активированных ФГА, которые соединяли с эритроцитами барана [11]. Вс₃-лимфоциты в селезенке плода определяли активированными ФГА лимфоцитами, соединяя с маркерами В-клеток – зернами зимозана, обработанными жидким компонентом сыворотки крови морской свинки [12]. Для оценки влияния биопрепаратов на субклеточном уровне изучали показатели содержания ДНК и РНК в тимусе плода [13].

В настоящее время оценка эмбриотропного действия проводится общепринятыми мето-

Показатели содержания Т-лимфоцитов в тимусе, Вс₃-лимфоцитов в селезенке, ДНК и РНК в тимусе эмбрионов самок, подвергавшихся воздействию биоинсектицидов в течение всей беременности (M ± m, n = 15-20)

Концентрация препарата, мг/м ³	Т-лимфоциты в тимусе %	Вс ₃ -лимфоциты в селезенке, %	Содержание ДНК в тимусе, мг/г ткани	Содержание РНК в тимусе, мг/г ткани
Контроль	14,0 ± 0,3	29,4 ± 0,4	13,2 ± 0,4	9,7 ± 0,2
Энтомофторин:				
1,1 ± 0,1	12,9 ± 1,3	33,0 ± 1,7	10,8 ± 0,7	8,2 ± 0,9
4,1 ± 0,2	12,5 ± 0,3	20,6 ± 1,3**	7,9 ± 0,3**	7,6 ± 1,0
8,0 ± 0,4	11,3 ± 1,2	17,2 ± 1,1**	6,3 ± 0,3**	5,6 ± 0,6**
19,0 ± 2,4	11,0 ± 1,2	12,0 ± 1,1**	3,2 ± 0,3**	3,8 ± 0,5**
Боверин:				
0,3 ± 0,05	12,2 ± 0,8	26,3 ± 2,3	13,7 ± 0,8	9,2 ± 0,8
5,0 ± 0,3	12,5 ± 2,8	22,9 ± 1,9**	11,3 ± 0,6	7,7 ± 0,7
Лепидоцид:				
0,7 ± 0,08	12,6 ± 1,4	27,1 ± 1,2	11,5 ± 0,5	8,1 ± 0,8
6,0 ± 0,3	11,2 ± 1,5	23,3 ± 2,2*	6,2 ± 0,9**	4,5 ± 1,1**

Примечание. Различия между группами достоверны при * - P < 0,02; ** - P < 0,001.

дами исследования с применением морфометрических, микроанатомических, гистохимических методов исследования эмбриона [14,15, 16].

Результаты и обсуждение. При изучении общего токсического действия в 20-дневном эксперименте установлено, что особенностью патогенеза энтомофторина, боверина и лепидоцида является преимущественное поражение иммунной системы как у взрослых особей, так и у потомства [17, 18]. Выявление иммунотоксического действия препаратов на эмбрион является одним из ранних признаков проявления эмбриотропного эффекта у млекопитающих. Этот малоизученный вопрос представляет научную новизну и ценность.

Как следует из данных таблицы, не выявлено изменений содержания Т-лимфоцитов в тимусе при воздействии всех препаратов. Снижение показателей содержания Vc_3 -лимфоцитов в селезенке наблюдалось на всех уровнях воздействия энтомофторина, кроме наименьшего. Воздействие боверина и лепидоцида вызывало снижение содержания Vc_3 -лимфоцитов в действующей концентрации.

Для установления эмбриотропного действия наряду с показателями содержания Т-лимфоцитов в тимусе и Vc_3 -лимфоцитов в селезенке использованы биохимические методы оценки содержания ДНК и РНК в тимусе эмбрионов.

В пороговой и действующей концентрациях энтомофторина, а также в действующей дозе лепидоцида выявлено снижение содержания РНК в тимусе эмбрионов опытных групп. На всех уровнях воздействия энтомофторина, кроме минимального, установлено снижение содержания ДНК в тимусе эмбрионов в зависимости «доза-эффект».

Снижение содержания ДНК и РНК без изменения содержания иммунокомпетентных клеток свидетельствует о формировании лимфоцитов со сниженным содержанием нуклеиновых кислот. Это может существенно влиять на их функциональную активность [19]. Снижение содержания ДНК и РНК с параллельным уменьшением количества Vc_3 -лимфоцитов свидетельствует об иммунотоксическом эффекте энтомофторина, что в процессе пост-

натального развития потомства проявилось в виде неполноценности гуморального иммунитета [17,18].

Исследование показателей функционального состояния иммунокомпетентных органов плода является новым дополнением к комплексной оценке эмбриотропного действия с применением морфометрических, микроанатомических, гистохимических методов исследования эмбриона. Ранее нами был выявлен эмбриотропный эффект энтомофторина в системе «мать – потомство» [17]. Для выявления возможного эмбриотропного действия энтомофторина на более ранних этапах развития нами в качестве экспериментальной модели был использован эмбрион.

Таким образом, нами установлено, что проявление эмбриотропного действия возможно устанавливать на ранних этапах эмбриогенеза.

В отличие от дорогостоящих методов оценки негативного воздействия на клеточные мембраны лимфоцитов, например, по методу ELISA [20], проточной цитометрии [21], наш метод является общедоступным для лабораторий, связанных с гигиеническим нормированием препаратов биологической и химической природы.

Заключение. Данный способ оценки эмбриотропного действия биоинсектицидов позволяет проводить комплексную оценку их вредного действия на клеточном (мембранный аппарат клетки) и субклеточном (ДНК и РНК клетки) уровне. Проведенное исследование показателей функционального состояния иммунокомпетентных органов эмбриона является чувствительным показателем при оценке токсичности и опасности биопрепаратов и новым дополнением к комплексной оценке с применением морфометрических, микроанатомических, гистохимических методов исследования развивающегося эмбриона.

Мы полагаем, что все новые биоинсектициды с выраженным эмбриотоксическим и гонадотоксическим действием на насекомых подлежат обязательной гигиенической регламентации с целью выявления возможного эмбриотропного и гонадотропного эффектов в эксперименте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Израйлет Л. И., Эглите М. Э. Промышленность и иммунологическое состояние организма: Научный обзор. М.: ВНИИМИ. Медицина и здравоохранение, 1978; 1.
2. Чечура А. Н., Джагинян А. И., Шляхецкий Н. С., Андреева Л. Н. Особенности изменения иммунологических показателей у рабочих при контакте с биологическими факторами

производственной среды. Гигиена труда и профзаболевания. 1986; 10: 17-20.
3. Израйлет Л. И., Безлюдова Е. П., Берзиня Л. А. и др. Гигиена труда и состояние здоровья рабочих в производстве микробиологических средств защиты растений. Гигиена и профзаболевания. 1974; 1: 172-76.
4. Израйлет Л. И., Эглите М. Э., Дроздова Л. В. Гигиеническая оценка

боверина и некоторые перспективы применения микробиологических средств защиты растений. Гигиена и санитария. 1975; 11: 91-4.
5. Garrison R.G., Nariot F.A., Byyd K.S., Tally G.R. Ultrastructure and electron cytochemical studies of Entomophthora coronata. Annales de Microbiologie. 1975; 126 (21): 149-73.
6. Спруджа Д. Р., Слинько В. Н.,

Устиненко А. Н., Калинина Л. Н. Характер биологического-го действия миоинсектицида энтомофторина. Гигиена и санитария. 1987; 3: 76-7.
7. Слинько В. Н., Спруджа Д. Р., Квятковская И. Я., Калинина Л. Н. Влияние биопрепарата энтомофторина на теплокровный организм. В кн.: Материалы конференции «Вопросы гигиены труда,

профпатологии и охраны окружающей среды в микробиологической промышленности». М.: 1986; 41-4.

8. Жданова Т. Д. Репродуктивное поведение насекомых. Доступен в: http://uchit.net/catalog/Biologiya_i_himiya/86925/.
9. Чударе З. П. Патогенность энтомофторных грибов. Известия АН Латвийской ССР. 1982;10: 99-1
10. Саноцкий И. В., ред. Методические рекомендации по токсикометрии. М.: Секрета-риат СЭВ; 19
11. Novak I.T., Cabral H.R. Rosette formation by macrophages with adhered T-lymphocytes is precluded by inhibitors of antigen processing and presentation. Biocell. 2008; 32 (2): 169-
12. Калинин Л. Н., Ремез И. М. Векслер Х. М., Иващенко М. Е. Способ

- определения эмб-риотропного действия микробных препаратов. А.С. № 1561036 (СССР): Бюллетень изобретений. 1990; 16.
13. Gallagher S.R. Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. Current Protocols in Molecular Biology. 2011; Appendix 3D. Available at: <http://www.10.1002/0471142727.mba03ds>
14. Wilson J.G. Present status of drugs as teratogen in man. Teratology. 1970; 50: 1140-45.
15. Дыбан А. П., Баранов В. С., Акимова И. М. Основные методические подходы к тести-рованию тератогенной активности химических веществ. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1970; 10: 89-99.

16. Каспаров А. А., Саноцкий И. В. ред. Токсикометрия химических веществ, загрязняю-щих окружающую среду. М.: Центр Международных Проектов ГКНТ; 19
17. Ремез И. М., Орленкович Л. Н. Влияние биоинсектицида энтомофторина на показа-тели иммунитета беременных самок крыс и их потомства. В кн.: Материалы XLVI кон-ференции «Современные проблемы медицины труда, гигиены и экологии человека». Кемерово: 2011; 54-
18. Ремез И. М., Орленкович Л. Н. Оценка риска воздействия биоинсектицидов боверина и лепидоцида на иммунную систему материнского организма и потомства в экспери ме-н-

- те. В кн.: Материалы XLVII конференции «Влияние окружающей и производ-ственной среды на здоровье человека, пути решения и проблемы». Кемерово: 2012; 169-
19. Хайтов Р. М. Иммунология. М.: Медицина; 20
20. Kolosova A.Y., Park J-H., Eremin S.A., Park S-J., Kang S-J., Shim W-B. et al. Compara-tive study of three immunoassays based on monoclonal antibodies for detection of the pesti-cide parathionmethyl in real samples. Analytica Chimica Acta. 2004; 511: 323-31.
21. Mittar D., Paramban R., McIntyre C. Flow Cytometry and High-Content Imaging to Iden-tify Markers of Monocyte-Macrophage Differentiation. BD Biosciences. 2011; 1: 1-18.

REFERENCES:

1. Izraylet L. I., Eglite M.E. Industrial and immunological condition of organism: Scientific review. M.: VNIIMI. Meditsina i zdravookhraneniye, 1978; 1 (in Russian).
- Chechura A.N., Jaghinyan A.I., Shlyahetsky N.S., Andreeva L.N. Changes of immunological parameters of workers in contact with working biological factors. Gigiyena truda i prof-zabolevaniya. 1986; 10: 17-20 (in Russian).
2. Izraylet L.I., Bezlyudova E.P., Berzinya.L.A. Occupational and health status of workers in the production of microbial plant protection products. Gigiyena i profzabolevaniya. 1974; 1: 172-76 (in Russian).
3. Izraylet L.I., Eglite M.E., Drozdova L.V. Boverin hygienic evaluation and some prospects for the application of microbial plant protection preparations. Gigiyena i sanitariya. 1975; 11: 91-4 (in Russian).
4. Garrison R.G., Nariot F.A., Byyd K.S., Tally G.R. Ultrastructure and election cytochemi-cal studies of Entomophthora coronata. Annales de Microbiologie. 1975; 126 (21): 149-73.
5. Sprudzha D.R., Slinko V.N., Ustinenko

- A.N., Kalinina L.N. Fungus insecticide entomo-ftorin biological action character. Gigiyena i sanitariya. 1987; 3: 76-7 (in Russian).
6. Slinko V.N., Sprudzha D.R., Kyvatkovskaya I.Y., Kalinina L.N. Biopreparation entomofto-rin influence on warm-blooded animals organism. In: Issues of occupational health, occupa-tional diseases and environmental protection in the microbiological industry: Materials of the conference. M.: 1986; 41-4 (in Russian).
7. Zhdanova T.D. Reproductive behavior of insects. Available in: http://uchit.net/catalog/Biologiya_i_himiya/86925/.
8. Chudare Z.P. Entomophthorales fungi pathogenicity. Latvian SSR Sciences Academy Proceedings. 1982; 10: 99-104.
9. Sanotskiy I.V., ed. Methodical recommendations in toxicometry. M.: Sekretariat SEV; 1987 (in Russian).
10. Novak I.T., Cabral H.R. Rosette formation by macrophages with adhered T-lymphocytes is precluded by inhibitors of antigen processing and presentation. Biocell. 2008; 32 (2): 169-

11. Kalinina L.N., Remez I.M., Veksler H.M., Ivashchenko M.E. Method of microbial prepara-tions embryotropic effect definition. Patent USSR, Nr. 1561036; 1990 (in Russian).
12. Gallagher S.R. Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. Current Protocols in Molecular Biology. 2011; Appendix 3D. Available at: <http://www.10.1002/0471142727.mba03ds>
13. Wilson J.G. Present status o f drugs as teratogen in man. Teratology. 1970; 50: 1140-45.
14. Dyban A.P., Baranov V.S., Akimova I.M. The main methodical approaches of chemical substances teratogenic activity testing. Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii. 1970; 10: 89-99 (in Russian).
15. Kasparov A.A., Sanotskiy I.V. ed. Toxicometry of chemicals, polluting the environment. M.: Tsentr Mezhdunarodnykh Proektov GKNT; 1986 (in Russian).
16. Remez I.M., Orlenkovich L.N. Bioinsecticide entomoforin influence at immunity indi-ces of pregnant females

- rats and their posterity. In: Occupational hygiene and human eco-logy modern problems: XLVI Confer. Kemerovo, 2011; 54-7 (in Russian).
17. Remez I.M., Orlenkovich L.N. Bioinsecticides boverin and lepidocid risk influence esti-mation on the immune system of the females organism and posterity in the experiment. In: Environmental and occupational influence on human health, solutions and problems: XLVII Confer. Kemerovo, 2012; 169-73 (in Russian).
18. Khaitov R.M. Immunology. M.: Meditsina; 2011 (in Russian).
19. Kolosova A.Y., Park J-H., Eremin S.A., Park S-J., Kang S-J., Shim W-B. et al. Compara-tive study of three immunoassays based on monoclonal antibodies for detection of the pesti-cide parathionmethyl in real samples. Analytica Chimica Acta. 2004; 511: 323-31.
20. Mittar D., Paramban R., McIntyre C. Flow Cytometry and High-Content Imaging to Iden-tify Markers of Monocyte-Macrophage Differentiation. BD Biosciences. 2011; 1: 1-18.

L.N. Orlenkovich¹, I.M. Remez²

ASSESSMENT METHODS OF EMBRYOTROPIC ACTION OF BIO INSECTICIDES IN EXPERIMENTS

¹Limited Liability Company «Institute of Occupational Health», Institute of Occupational Safety and Environmental Health, P.Stradins Riga Medical University, LV-1007, Latvia

²Institute of Occupational Safety and Environmental Health, P.Stradins Riga Medical University, LV-1007, Latvia

The impact of bio-insecticides Boverin, Entomophthora and Lepidicide on cellular on sub-cellular immune effectors elements in rat fetuses was investigated. Preparations immunotoxic effect on embryos at the cellular and sub-cellular levels was found out.

Keywords: bio-insecticides, embryo, immunotoxicity, embryotropic effect.

Переработанный материал поступил в редакцию 07.11.2014 г.