

Л.В.Марцонь, к.м.н., Н.О.Корнута, к.б.н., Н.В.Толстова

ВИВЧЕННЯ ЕМБРІОТОКСИЧНОГО ТА ТЕРАТОГЕННОГО ЕФЕКТІВ КАРБОФУРАНУ НА ЩУРАХ WISTAR

Інститут екогієни і токсикології ім.Л.І.Медведя, м.Київ

Карбофуран (2,3-дигідро-2,2-диметил-7-бензофураніл метилкарбомат) відноситься до групи карбаматів, похідних карбамінової кислоти. Механізм токсичної дії похідних карбамінової кислоти добре вивчений. Карбофуран (КФ) та його препаративні форми відносяться до високотоксичних хімічних речовин при ентеральному та інгаляційному шляхах надходження в організм, мають слабо виражену резорбтивно-токсичну і подразнюючу дію на слизові оболонки очей. Сенсibiliзуючі властивості у КФ не проявляються. В умовах хронічного впливу КФ призводить до загально токсичної дії на організм з переважним впливом на холінореактивні системи, проявляє канцерогенну та ембріотоксичну активність, репродуктивну токсичність [1–3].

На протязі багатьох років в різних лабораторіях вивчався вплив КФ на ембріональний розвиток [4–6]. Експерименти проводились на трьох видах лабораторних тварин — мишах, щурах, кролях. Аналіз опублікованих даних по вивченню ембріотоксичної і тератогенної активності КФ свідчить про вплив на вагітну самицю, наявність ембріолетального і ембріотоксичного ефектів, порушень розвитку плоду. Але безпечні рівні доз (NOEL) не визначені ні для одного виду тварин. Крім того, в експериментах були використані зразки КФ різних виробників, не вказана чистота препарату, дослідження були проведені за різними методичними підходами. Отримані дані не дозволяють науково обґрунтувати рівні NOEL для розвитку майбутніх поколінь при використанні КФ. Також слід враховува-

ти, що більшість представників групи карбаматів в експериментах на лабораторних тваринах проявляють тератогенну та ембріотоксичну дію [2,7, 8]. Враховуючи вказані обставини, а також те, що на ринок України запропоновано інсектицидний препарат Адифур (виробник "Адика", Італія), який містить 97% технічного КФ, нами були проведені дослідження по встановленню недіючого рівня доз для вагітних самиць і впливу на розвиток плоду КФ в експерименті на щурах Wistar.

Матеріали і методи

Дослідження виконані на 62 статевозрілих самицях щурів Wistar (маса тіла 190–210 г), які пройшли карантин на протязі 2 тижнів.

Тварин утримували в клітках по 6 осіб в умовах природнього освітлення при температурі повітря 20–25 °С і відносній вологості 40–70 % на підстилці з дерев'яної стружки. Тварини отримували збалансований корм з дотриманням встановленого режиму харчування. Питну воду одержували без обмеження.

Методичні підходи по вивченню ембріотоксичної і тератогенної активності КФ технічного 97% відповідають вимогам [9–11].

Вагітні самиці були розподілені на три групи: 1 - контроль, 2 і 3 - експериментальні. Водну суспензію КФ готували щодня ex tempore. Препарат вводили натще зондом внутрішньошлунково в дозах 0,5 мг/кг маси тіла (2 група) і 1,0 мг/кг маси тіла (3 група) з 6 по 15 дні вагітності. Дозу препарату корегували у відповідності з масою тіла вагітних самиць.

Досліджувані показники. Перелік досліджуваних показників, які підлягали контролю під час експерименту, представлені в табл. 1.

Таблиця 1

Строки дослідження показників

Параметри	Дні вагітності
Маса тіла самиць	0, 1, 6, 13 та 21
Загальний стан самиць	0–21
Евтавнзія самиць та їх розтин	21
Показники ембріогенезу:	
- кількість жовтих тіл у яєчниках	21
- кількість місць імплантації	21
- кількість резорбованих ембріонів	21
- кількість живих плодів	21
- кількість мертвих плодів	21
Параметри розвитку плоду:	
- маса тіла живих плодів	21
- співвідношення самиць і самців у посліді	21
- аномалії розвитку, які реєструються при зовнішньому огляді плоду	21
- аномалії розвитку внутрішніх органів плодів [9,13]	21
- аномалії розвитку лицьового черепу і головного мозку	після фіксації в розчині Буена за методом Вільсона [14]
- аномалії розвитку кісткової системи	після фіксації алізарином червоним за методом Даусона [15]

Протягом всього періоду вагітності проводили клінічні спостереження за загальним станом тварин. Клінічні спостереження за вагітними самицями проводили через день на протязі тижня до початку введення препарату (з 1 по 6 день вагітності), декілька разів протягом дня в період введення (з 6 по 15 день вагітності) і щоденно після припинення введення препарату (з 16 по день вагітності). Маса тіла вагітних самиць фіксували на 0, 1, 6, 13 та 21 дні вагітності. На 21 день вагітності самиць знеживлювали в камерах парами дітилового ефіру. Усі піддослідні самиці під час розтину піддавались макроскопічному обстеженню. При розтині реєстрували основні показники ембріогенезу: кількість жовтих тіл у яєчниках, кількість місць імплантації та їх розташування в матці, кількість ранніх та пізніх резорбцій, кількість живих і мертвих плодів.

Після оцінки життєздатності та зважування плодів проводили аналіз зовнішніх аномалій та вад розвитку. Одну групу плодів (2/3 від кількості плодів в кожному посліді) піддавали макроскопічному обстеженню, а потім фіксували в 96% етиловому спирті. Ця група плодів підлягала вивченню кісткового скелету за методом Даусона. При дослідженні кісткового скелету визначали кількисні (кількість центрів осифікації, розмір закладок) та якісні (ступінь забарвлення кісток алізарином червоним) показники осифікації, а також аналізували форму та положення кісток плодів. Голови плодів другої групи (1/3) фіксували в розчині Буена для подальшого вивчення аномалій розвитку лицьового черепу і головного мозку за методом Вільсона. Всі тулуби підлягали аналізу на наявність вродженої патології внутрішніх органів за допомогою "мікрохірургічного" методу *in situ*.

На кожну самицю у процесі проведення експерименту заповнювали окрему реєстраційну карту з інформацією, що дозволяла якісно і кількісно оцінити ембріотоксичний і тератогенний ефекти впливу КФ. Узагальнені таблиці складені по матеріалах 62 індивідуальних карток, в яких сконцентрована інформація по аналізу 659 плодів.

Статистичну обробку проводили методами параметричної і непараметричної статистики за Стьюдентом та Пірсоном [12].

Результати та обговорення

Вагітні самиці. При щоденному спостереженні за вагітними самицями не відмічено їх загибелі протягом експерименту в жодній з груп. Введення КФ не позначалось на тривалості вагітності самиць, не було зафіксовано абортів та передчасних пологів. В групі, де тварини отримували КФ в дозі 1,0 мг/кг, у вагітних самиць відмічались судоми протягом 10-15 хв після його введення. Спостерігалось статистично достовірне зниження маси тіла та приросту маси тіла вагітних самиць в період введення КФ (рис. 1). Так, приріст маси тіла з 6 по 13 дні вагітності в 3 групі становив 7,3 г (3,4%), а в контролі 18,0 г (8,2%) ($p < 0,05$). В цій же групі було відмічено збільшення кількості вагітних самиць з повною резорбцією ембріонів

(26,3%, в контролі 0%). З огляду на це, можна зробити висновок, що КФ в дозі 1 мг/кг викликає токсичний ефект у вагітних. В групі, де тварини отримували КФ в дозі 0,5 мг/кг, змін не виявлено.

Показники ембріогенезу. Такі показники ембріогенезу, як кількість жовтих тіл, кількість місць імплантації та передімплантаційна загибель (%) суттєво не відрізнялися в контрольній та експериментальних групах. Але наявність токсичного ефекту у вагітних самиць 3 групи позначилась на наступних показниках: постімплантаційна летальність, що вірогідно перевищувала таку в контролі (7,4% і 4,4%, відповідно) і як наслідок, зменшення кількості живих плодів на 1 самицю (9,8 проти 11,3 в контролі, $p < 0,01$) (табл.2).

Аналіз плодів. Середня маса тіла

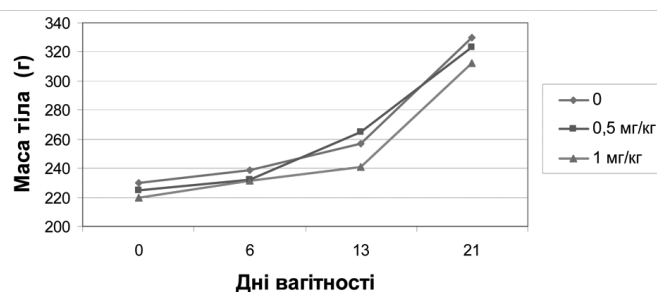


Рис. 1. Динаміка приросту маси тіла вагітних самиць при введенні Карбофурану з 6 по 15 дні вагітності

Таблиця 2

Показники ембріогенезу при введенні карбофурану технічного, 97% з 6 по 15 дні вагітності

Показники	Конт-роль	Карбофуран, 0,5 мг/кг	Карбофуран, 1,0 мг/кг
Кількість жовтих тіл на 1 самицю	13,0	11,8	11,7
Передімплантаційна загибель, %	9,2	8,6	10,3
Кількість місць імплантації на 1 самицю	11,8	10,7	10,6
Постімплантаційна загибель, %	4,2	3,0	7,4*
Кількість живих плодів на 1 самицю	11,3	10,4	9,8**
Середня маса плодів, г	4,11	4,10	3,62*
Співвідношення самиць і самців у посліді	5,3/6,0	5,1/5,3	4,9/4,9

Примітки: 1.* $P < 0,05$ у порівнянні з контролем; 2.** $P < 0,01$ у порівнянні з контролем

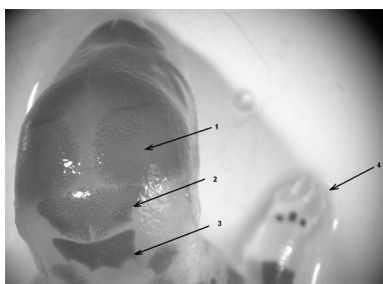


Рис. 2. Затримка осифікації кісток черепа та кінцівок плодів у самиць, що отримували Карбофуран в дозі 1 мг/кг з 6 по 15 дні вагітності. Забарвлення алізарином червоним. Збільшення $\times 16$. 1 - затримка осифікації тім'яної кістки, 2 - міжтім'яної кістки, 3 - надзатилочної кістки, 4 - фалангів пальців передньої кінцівки.

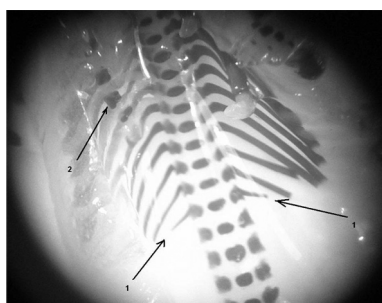


Рис. 3. Затримка осифікації кісток груднини та укорочення 13 пари ребер плодів у самок, що отримували Карбофуран в дозі 1 мг/кг з 6 по 15 дні вагітності. Забарвлення алізарином червоним. Збільшення $\times 16$. 1 - укорочення 13 пари ребер, 2 - затримка осифікації кісток груднини.

плодів від самиць 3 групи була вірогідно знижена (4,11 г в контролі і 3,62 г в дослідній групі, $p < 0,05$). Не виявлено впливу КФ на співвідношення самиць і самців у послідах експериментальних груп порівняно з контролем (табл.2).

Візуальний огляд та макроскопічне обстеження плодів контрольної групи і плодів 2 групи не виявили аномалій розвитку лицьового та мозкового черепа, кінцівок, хвоста. В 3 групі у одного плоду відмічено порушення розвитку кінцівок — вкорочення задньої лівої лапки. У окремих плодів з експериментальних груп відмічені небагато-

чисельні підшкірні гематоми та збільшення кількості випадків гідронефрозу, але ці показники суттєво не перевищували аналогічні показники в контрольній групі. Мікроанатомічна оцінка внутрішніх органів плодів експериментальних груп також не виявила достовірних змін, що могли б бути пов'язані з впливом КФ.

Кісткова система плодів контрольної групи та 2 групи знаходилась в межах анатомічної норми. В групі плодів, де самиці отримували КФ в дозі 1 мг/кг, відмічалось достовірне збільшення кількості плодів з ознаками затримки осифікації

кісток черепа та кінцівок (рис. 2), груднини, укорочення 13 пари ребер (рис. 3).

Висновки

1. Карбофуран технічний, 97 % в дозі 1,0 мг/кг викликає токсичний ефект у вагітних самиць (клінічні ознаки — судоми протягом 10-15 хв після введення препарату; зниження маси тіла та приросту маси тіла в період введення препарату; збільшення кількості вагітних самиць з повною резорбцією ембріонів), а також ембріотоксичний ефект (збільшення кількості постімплантаційної загибелі, зниження середньої маси тіла плодів, уповільнення процесів осифікації скелету). Тератогенний ефект не виявлено. Карбофуран в дозі 0,5 мг/кг не викликає токсичного ефекту у вагітних самиць, ембріотоксичний і тератогенний ефекти.
2. Карбофуран в дозі 0,5 мг/кг не викликає токсичний ефект у вагітних самиць, ембріотоксичний та тератогенний ефекти.
3. Недіюча доза (NOEL) для вагітних самиць — 0,5 мг/кг маси тіла, NOEL для розвитку плоду — 0,5 мг/кг маси тіла.
4. Карбофуран відноситься до 2-го класу небезпеки за параметрами токсичності для вагітних самиць та ембріотоксичного ефекту [16].

ЛІТЕРАТУРА

1. Haynes W.J., Laws E.R. Anticholinesterase carbamates and procarbamates: Carbofuran. In: Handbook of Pesticide Toxicology, Vol.3, Academic Press Inc., San Diego, California, USA, 1991.
2. Carbamate Pesticides: A General Introduction. — World Health Org.— Geneva, 1986.— 136 p.
3. Шепельська Н.Р., Петрашенко Л.П., Сапожнікова С.Д. Вплив інсектициду карбофурану на функцію гонад та фертильність щурів Wistar // Совр.проб. токсикол.—2001.— №3.— С.40-46.
4. Barron P., Giesler P., Rao G.N. Teratogenicity of Carbofuran in Rats.— Unpublish report from WARF Int submitted by the FMC Corporation to the World Health Organization, 1978.
5. McCarthy J.F., Fancher O.E., Kennedy G.I. et al. Reproduction and teratology studies with the insecticide carbofuran // Toxicol. Pharmacol. — 1971. — 19. — P.370-373.
6. Courtney D.K., Andrews J.E., Springer J., Dalley L. Teratogenic evaluation of the pesticides Baygon, Carbofuran, Dimethoame and EPN // J. Environ. Sci. Health. — 1985.— В 20(4).— P. 373-406.
7. Олифер А.И., Виноградова В.Х. Изучение эмбриотропного эффекта пестицидов севина и цирама // Врачебное дело. — 1968.— №11. — С. 103-106.
8. Торчинский А.М., Орлова Н.В., Смирнова Е.В., Макарова Л.Ф. Материалы к токсиколого-гигиенической характеристике пестицида из группы карбаматов - бенлата // Гиг. сан.- 1976.- №2.- С.35-39.
9. Методические указания по гигиенической оценке новых пестицидов, Киев.-1988.- С.55-67.
10. Principles for evaluating health risk to progeny associated with exposure to chemicals during pregnancy / Environmental health criteria. — 30. — 1984. — 155 p.
11. Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment: Notice/ federal register./ Environmental Protection Agency. Part 5. — 1991. — V.56, № 234. — P. 63798-63828.
12. Плохинский Н.А. Биометрия.- М.: Издательство Московского государственного университета, 1970. — 352 с.
13. Staples R.E. Detection of visceral alteration in mammalian fetuses// Teratology. — 1974. — № 3. — P. 9-37.
14. Wilson J.G. Teratology, Principles and Techniques. — The University of Chicago Press, 1965. — P. 262-277.
15. Dawson A.B. //Stain Tech. — 1926. — № 1. — P.123-124.
16. Гігієнічна класифікація пестицидів за ступенем небезпечності. — ДСанПіН 8.8.1.002-98. — Київ: МОЗ України, 1998.- 25 с.

Л.В.Марцонь, Н.А.Корнута, Н.В.Толстова

**ИЗУЧЕНИЕ ЭМБРИОТОКСИЧЕСКОГО И
ТЕРАТОГЕННОГО ЭФФЕКТОВ КАРБОФУРАНА
НА КРЫСАХ WISTAR**

Карбофуран при воздействии в дозе 1,0 мг/кг вызывает токсический эффект у беременных самок - снижение массы тела и прироста массы тела, увеличение количества беременных самок с полной резорбцией; эмбриотоксический эффект - увеличение количества постимплантационной гибели, снижение средней массы тела плодов, замедление процессов ossification скелета. Карбофуран в дозе 0,5 мг/кг не вызывает токсический эффект у беременных самок, не оказывает эмбриотоксического и тератогенного действия. В условиях проведенного эксперимента недействующей дозой (NOEL) для беременных самок и развития плодов является доза 0,5 мг/кг массы тела. Карбофуран относится ко 2-му классу опасности по параметрам токсичности для беременных самок и эмбриотоксическому эффекту.

L.V.Martson, N.O.Kornuta, N.V.Tolstova

**THE STUDY OF EMBRYOTOXIC AND TERATO-
GENIC EFFECTS OF KARBOFURAN
IN WISTAR RATS**

The aim of this investigation was to assess effects of oral administration of Carbofuran during the organogenesis phase of gestation upon the progress and outcome of pregnancy in the rat. For this purpose Carbofuran was administered by gavage at dose levels of 0,5 and 1 mg/kg/day to groups of pregnant rats Wistar from day 6 to day 15 of gestation inclusive. At 1 mg/kg/day, maternal weight gain was lower than those of the controls, and there was increase quantity of pregnant rats with all resorptions. The numbers of resorptions were increased at 1 mg/kg/day, with a consequent increase in post-implantation loss and a decrease in viable litter size. Foetal weight was lower than in the control group. Litter responses were unaffected at 0,5 mg/kg/day. The incidences of fetuses with reduced ossification of the skeleton were observed. The NOEL was considered to be dose tested 0,5 mg/kg for both maternal toxicity and developmental toxicity. This results have allowed to place Carbofuran into 2 class of hazard for maternal toxicity and developmental toxicity.