

УДК 303.447.32 + 57.081.2 + 57.084.1 + 615.9

## СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ОСТРОЙ ИНГАЛЯЦИОННОЙ ТОКСИЧНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ВОЗДУШНОЙ СРЕДЕ НА ПРИМЕРЕ ПРОИЗВОДНОГО ГИДРОКСИКУМАРИНА

Сафандеев В.В., Белоедова Н.С., Порошин М.А., Сеницкая Т.А.

ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

*Стремление России вступить в ОЭСР, объединившую 37 наиболее развитых стран мира, привело к «подтягиванию» отечественной научно-исследовательской и аналитической работы до мирового уровня [1]. Это, в частности, означало, что токсикологические исследования, «переживавшие кризис», заключающийся в отсутствии современной высокотехнологичной материальной базы и адекватной методологии исследований в российских испытательных центрах, наконец-то увидят просвет. В попытке быть наравне со странами-членами ОЭСР, аккредитованные испытательные центры стали стремительно приобретать современное высокотехнологичное и высокопрециозное оборудование. Это приобретение обнажило две важнейшие проблемы – отсутствие обученных специалистов, которые могли бы работать на закупленном оборудовании, и отсутствие методических подходов при работе на обозначенном оборудовании.*

**Цель** исследования состояла в разработке методических подходов при работе на ультрасовременном оборудовании для изучения токсичности химических веществ в воздушной среде на примере производного гидроксикумарина.

**Материалы и методы.** С помощью установки для экспонирования крыс по типу «голова-нос» было проведено исследование нескольких концентраций гликолевого раствора производного гидроксикумарина. Оценивали воздействие аэрозоля на животных с помощью методов фиксирующей инспекции (изменение внешнего вида, характера выделений и пр.), автоматической оценки/анализа моторной и исследовательской компонент поведения, посмертного вскрытия с фотофиксацией. Статистическую обработку данных для оценки однородности выборки и определения значимости различий проводили с помощью F-критерия и t-теста Стьюдента.

**Результаты исследования.** Был разработан оптимальный методический подход для токсикологических исследований гликолевого раствора производного гидроксикумарина в системе экспонирования по типу «голова-нос». На основе данных инспекции были описаны признаки интоксикации после ингаляционной заправки животных и случаи летальных исходов. Результаты показали, что  $ЛК_{50}$  гликолевого раствора производного гидроксикумарина для самок и самцов крыс составил  $2394 \pm 30$  мг/м<sup>3</sup> и  $3573 \pm 80$  мг/м<sup>3</sup> соответственно.

Проведенное исследование дополняет данные по ингаляционной токсичности родентицидов, а примененные в исследовании подходы могут быть адаптированы при оценке токсичности других групп веществ.

**Ключевые слова:** ингаляционная токсичность,  $LK_{50}$ , родентициды, производное гидроксикумарина, система экспонирования по типу «голова-нос», оценка поведения.

**Для цитирования:** Сафандеев В.В., Белоедова Н.С., Порошин М.А., Сеницкая Т.А. Современные подходы к оценке острой ингаляционной токсичности химических веществ в воздушной среде на примере производного гидроксикумарина. Медицина труда и экология человека. 2022;2:205-223.

**Для корреспонденции:** Сафандеев Виталий Васильевич, заведующий отделом ингаляционной токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, e-mail: Visa.doc@mail.ru

**Финансирование:** исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов:** авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

**DOI:** <http://dx.doi.org/10.24412/2411-3794-2022-10215>

## MODERN APPROACHES TO THE EVALUATION OF ACUTE INHALATION TOXICITY OF CHEMICALS IN THE AIR ENVIRONMENT (BASED ON THE HYDROXYCUMARIN DERIVATIVE)

V.V. Safandeev<sup>1</sup>, N.S. Beloedova<sup>1</sup>, M.A. Poroshin<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>F.F. Erisman Federal Scientific Center of Hygiene of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being

*Russia's desire to join the OECD, which unites 37 of the most developed countries of the world, brings about the need for domestic research and analytical work to achieve the world level [1]. This, in particular, meant that toxicological research, «surviving a crisis» consisting in the absence of a modern high-tech material base and an adequate research methodology in Russian biological testing laboratory, would finally improve their position. In an attempt to be on a par with OECD member countries, accredited biological testing laboratory have rapidly acquired modern high-tech and high-precision equipment. Its acquisition revealed two major problems – the lack of trained specialists who could work on the purchased equipment, and the lack of methodological approaches when working on the designated equipment. The purpose of the study was to develop methodological approaches when working on ultra-modern equipment for studying the toxicity of chemicals (e.g. hydroxycoumarin derivative) in the work environment air.*

**Materials and methods.** Several concentrations of a glycol solution of a hydroxycoumarin derivative were tested using a «head/nose-only» aerosol exposure system for rats. The impact of the aerosol on animals was assessed using the methods of fixing inspection (change in appearance, nature of secretions, etc.), automatic assessment/analysis of the motor and exploratory components of behavior, and post-mortem autopsy with photofixation. Statistical processing of

data to assess the homogeneity of the sample and determine the significance of differences was carried out using the F-test and Student's t-test.

**Research results.** An optimal methodological approach was developed for toxicological studies of a glycol solution of a hydroxycoumarin derivative on a «head/nose-only» aerosol exposure system. On the basis of inspection data, signs of intoxication after inhalation inoculation of animals and cases of lethal outcomes were described. The results showed that the  $CL_{50}$  of the glycol solution of the hydroxycoumarin derivative for female and male rats was  $2394 \pm 30 \text{ mg/m}^3$  and  $3573 \pm 80 \text{ mg/m}^3$ , respectively.

The conducted study complements the data on the inhalation toxicity of rodenticides, and the approaches used in the study can be adapted when assessing the toxicity of other groups of substances.

**Keywords:** inhalation toxicity,  $CL_{50}$ , rodenticide, hydroxycoumarin derivative, «head/nose-only» aerosol exposure system, behavioral testing.

**Citation:** V.V. Safandeev, N.S. Beloedova, M.A. Poroshin. Modern approaches to the evaluation of acute inhalation toxicity of chemicals in the air environment (based on the hydroxycoumarin derivative). *Occupational health and human ecology*. 2022;2:205-223.

**Correspondence:** Vitaliy V. Safandeev, Head of the Department of Inhalation Toxicology, the Erisman Federal Scientific Centre of Hygiene. e-mail: Visa.doc@mail.ru

**Financing:** The study had no financial support.

**Conflict of interest:** The author declares no conflict of interest.

**DOI:** <http://dx.doi.org/10.24412/2411-3794-2022-10215>

Ежегодно синтезируется несколько тысяч и вводится в практику несколько сотен новых химических веществ (ХВ), используемых не только в быту, но и в сельском хозяйстве [2]. Разработка научно обоснованных методов анализа и оценки ингаляционной опасности ХВ, используемых в быту и сельском хозяйстве, включая пестициды, играет важную роль в сохранении не только здоровья населения, но и в защите окружающей нас среды [3, 4, 5]. Особое значение приобретает оценка опасности такого класса пестицидов, как родентициды, поскольку все яды для грызунов очень токсичны как при употреблении в пищу, так и при их вдыхании [6, 7]. Родентициды изготавливают преимущественно в виде приманок, которые привлекают к себе животных. Целью исследования явилась разработка методических подходов при работе на ультрасовременном оборудовании для изучения токсичности химических веществ в воздухе рабочей зоны на примере родентицида, производного гидроксикумарина. Производное гидроксикумарина относится к группе ХВ, которые останавливают нормальное свертывание крови [8].

Для достижения цели необходимо было решить ряд задач: подготовить тест-объекты, провести оценку и анализ их поведения для распределения и нормирования групп, провести затравку (экспозицию) ХВ животных, оценить состояние животных после затравки. По окончании эксперимента, а также если в процессе него фиксировали гибель животных, оценивали макроскопические изменения внутренних органов с последующим

установлением класса опасности гликолевого раствора в соответствии с Гигиенической классификацией пестицидов [8].

#### **Материалы и методы**

**Тест-система.** В качестве тест-системы были использованы белые аутбредные крысы (филиал питомника «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Животные после прибытия из питомника находились в помещении карантина вивария в течение 7 суток. После карантина животные в течение 5 суток были акклиматизированы к условиям содержания вивария.

**Условия содержания.** Животных после прибытия из питомника содержали в полипропиленовых клетках (Италия), обогащенных средой, в соответствии с ГОСТ 33216-2014 [9]. Акклиматизация животных проходила в стандартных условиях вивария под контролем установленных диспетчерской системой параметров (температура  $22\pm 2^\circ\text{C}$ , влажность 40-60%) с 12-часовым искусственным световым циклом день/ночь ( $6^{00}/18^{00}$ ) при доступе к воде и пище *ad libitum* [10]. Поставщик гранулированного стандартизированного корма – ООО «Лабораторкорм» (Москва), вода – из станции водоочистки (Miele, Италия).

В каждой клетке до рассадки находилось шесть животных, после рассадки – по три животных одного пола, в совокупности занимавших менее 5% от объема всей клетки.

Эксперименты выполняли в промежутке с 12 до 16 ч. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с национальными [11] и международными [12, 13, 14] руководствами и положениями протокола, утвержденного комитетом по биоэтике Института гигиены, токсикологии пестицидов и химической безопасности ФНЦГ им. Эрисмана Роспотребнадзора.

**Выборка и идентификация животных.** Для рандомизации и выравнивания групп животных в настоящем исследовании были приручены, а затем оценены с помощью анализа поведения 32 животных, промаркированных нетоксичным цветным маркером (ID), в автоматизированном тесте «открытое поле» (Columbus Instruments, США) и «норковом тесте» (Columbus Instruments, США), снабженных автоматическими анализаторами (Opto-Varimex-5 Auto-Track, США).

Исходя из проанализированных данных, для последующей оценки двух концентраций гликолевого раствора производного гидроксикумарина было отобрано 12 животных ( $n=6\text{♂}/6\text{♀}$ ), по три самки и три самца на каждую концентрацию (первая и вторая группы животных). Все самки были нерожавшими и небеременными.

Каждая клетка была промаркирована так, чтобы можно было понять основные детали эксперимента: номер клетки, пол животных и их количество, концентрацию использованного раствора.

**Контрольные животные.** Контрольная группа животных в эксперименте участия не принимала, так как в качестве растворителя была использована дистиллированная вода.

**Тестирование поведения.** Этологическую оценку проводили с помощью автоматизированных камер (Columbus Instruments, США) с анализаторами активности (Opto-Varimex-5 Auto-Track, США) моторной и исследовательской компонент, а также последующей

автоматизированной программной постобработкой (на базе пакета Microsoft Office, Excel, 2019).

Камера автоматизированной оценки моторного поведения (рис. 1) позволила оценить эффективность аэрозоля родентицида по параметрам пройденного пути (см), времени без движения (сек), времени стереотипных и амбулаторных движений (сек), отношению времени пребывания в центре и на периферии (сек). Наиболее важным параметром среди них мы считали оценку пройденного пути, которая характеризует общую степень моторной активности животных.

Камера автоматизированной оценки исследовательского поведения (рис. 2) позволила подсчитать количество вертикальных стоек и количество «ныряний» в «норковом тесте». В данном случае наиболее важным параметром среди перечисленных мы считали количество «ныряний» в «норковом тесте», поскольку этот параметр зависит исключительно от исследовательского настроения (любопытности) животных.

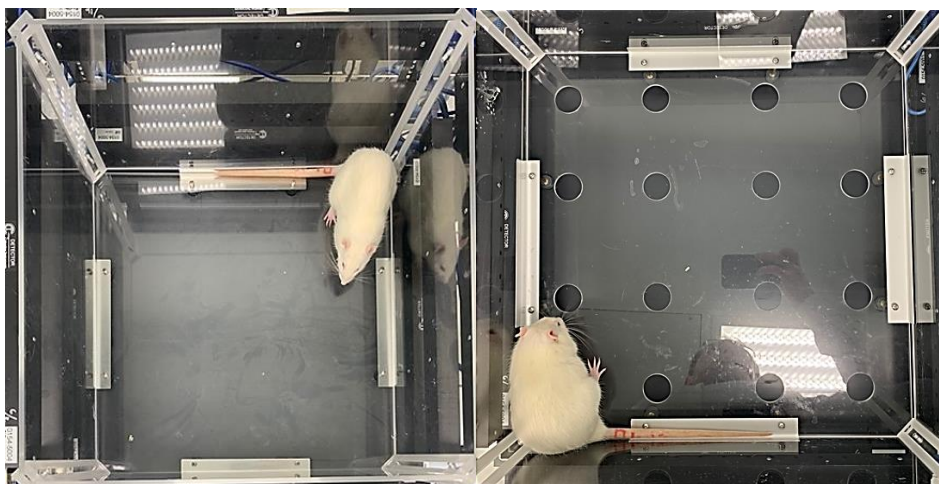


Рис. 1. Клетка теста «открытое поле»

Figure 1. Open field test cell

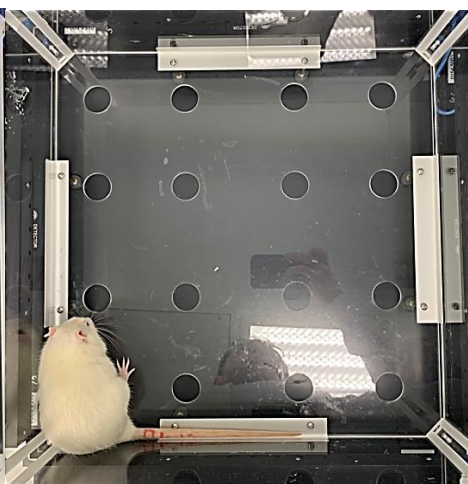


Рис. 2. Клетка «норкового теста»

Figure 2. Mink dough cage

Все показатели в тесте «открытое поле» и в «норковом тесте», согласно ранее описанному методу [15], регистрировали в течение 15 минут. Показатели фиксировали три раза: за сутки до эксперимента, на следующие сутки и через 14 суток после эксперимента.

**Путь введения и подбор доз.** Экспериментальные работы были начаты с подбора дозы и создания режима постоянной концентрации аэрозоля. Для этого после разведения аэрозоля до 70% концентрации фиксировали время оседания действующего вещества в емкости (стабильность приготовленного раствора производного гидроксикумарина).

В данной работе был выбран ингаляционный путь введения, согласно возможному пути поступления раствора производного гидроксикумарина воздушным путем при его контакте с человеком.

Подбор доз производного гидроксикумарина для затравки осуществляли исходя из литературных данных и затем экспериментально. В соответствии с инструкцией по



использованию камеры была произведена калибровка затравочного блока ингаляционной установки начальной дозой раствора ( $1000 \text{ мг/м}^3$ ), которая достигалась и выверялась гравиметрическим методом.

В настоящем исследовании, исходя из литературных данных, испытывали две концентрации раствора -  $1100 \pm 30$  и  $2800 \pm 80 \text{ мг/м}^3$ .

**Ингаляционная затравка.** Воздействие гликолевого раствора производного гидроксикумарина осуществляли в специализированной сертифицированной системе экспонирования «голова-нос» (TSE Systems, Германия; см. рисунок 3).

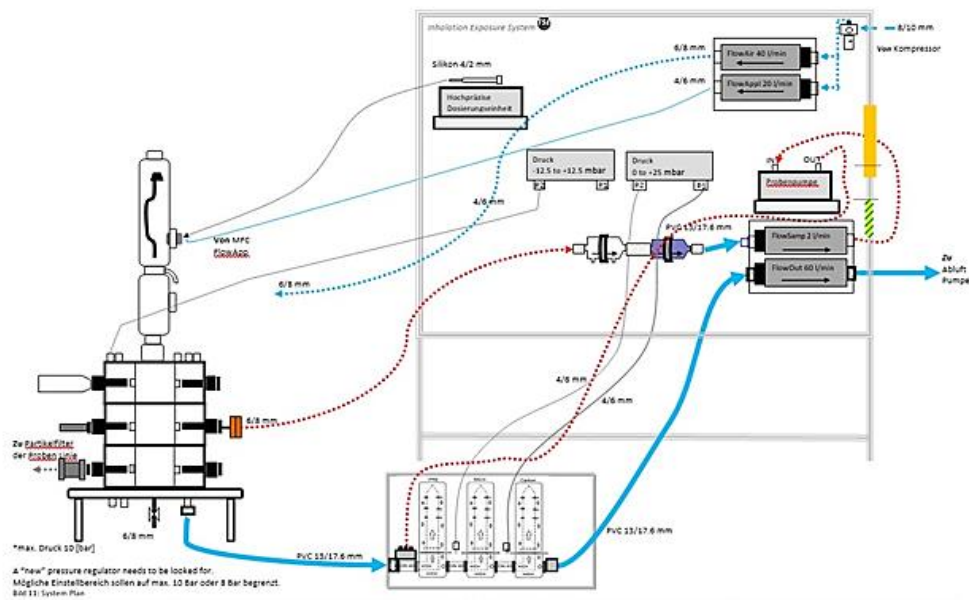


Рис. 3. Схема камеры «голова-нос» (TSE Systems, Германия)

Figure 3. Diagram of a head and nose chamber (TSE Systems, Germany)

**Генерирование аэрозоля и введение исследуемых концентраций препарата.**

Необходимой концентрации достигали в ходе предварительных испытаний без лабораторных животных. В рамках предварительных испытаний устанавливался расчетный параметр для генерирования аэрозоля ( $V_{dose}$ ), который затем корректировали в зависимости от фактической концентрации, относительно предыдущей попытки до тех пор, пока не будет достигнуто необходимое значение концентрации (табл. 3).

Данные о фактической концентрации и размере частиц были получены при помощи каскадного импактора. Фактическая концентрация ( $C_{fact}$ ) аэрозоля была рассчитана с учетом поправки на концентрацию гликолевого раствора производного гидроксикумарина.

**Воздушные потоки в камере.** Характеристики камеры приведены в таблице 1.

В камеру подавали чистый сухой воздух со скоростью 16,5 л/мин (из них 15 л/мин для смешивания с раствором (Flow Appl) и 1,5 л/мин для создания равномерного ламинарного потока аэрозоля (Flow Air). Воздушные потоки, а также температура в камере в течение

четырёхчасового воздействия фиксировались ПО DACO (Германия) ежеминутно. Время экспозиции на крысах составило 4 ч.

**Гранулометрический состав.** Данные о фактической концентрации и размере частиц были получены при помощи каскадного импактора. Отбор проб осуществляли в течение 10 минут при скорости отбора проб 0,5 л/мин. Исследовали 70% раствор производного гидроксикумарина в эксперименте №1 (первая группа животных) и 90% раствор в эксперименте №2 (вторая группа животных).

**Симптомы интоксикации и летальные исходы животных.** У животных оценивали проявления интоксикации и при наличии фиксировали летальные исходы (см. таблицу 4) в различные интервалы: во время экспозиции, на протяжении суток после экспозиции и в течение последующих 14 суток дважды (утром и вечером). Оценивали следующие проявления: изменения шерсти и кожных покровов, состояние органов зрения и слизистых оболочек, изменения со стороны дыхательной, сердечно-сосудистой и нервной систем, моторное и исследовательское поведение. Особое внимание обращали на возможность появления тремора, конвульсий, саливации, диареи, летаргии и комы. Фиксировали появление, прогрессирование и исчезновение симптомов интоксикации.

Изменение поведения оценивали на первые и четырнадцатые сутки с момента затравки в «открытом поле» (моторная компонента) и «норковом тесте» (исследовательская компонента).

**Некропсия и гистопатология.** После гибели животных проводили их вскрытие и макроскопическую оценку с фотофиксацией.

**Статистика и расчет среднесмертельной концентрации.** Полученные данные обрабатывали статистически с помощью F-теста для оценки однородности выборки и t-теста Стьюдента для определения достоверности различий. Для этого использовали ПО GraphPad Prism (Version 5.0, GraphPad Software, США) и Excel (Microsoft Corporation, 2019, США).

Расчет среднесмертельной концентрации осуществляли с использованием пробит-анализа Литчфилда-Уилкоксона в модификации Прозоровского [16].

## Результаты

**Изучение стабильности препаративной формы.** Исследованный гликолевый раствор не выпадал в осадок по истечении четырехчасового периода наблюдения.

**Параметры затравочной камеры.** Значения скорости потока воздуха, температуры и относительной влажности приведены в таблице 1. Воздушные потоки в камере определяли исходя из значений Flow Appl и Flow Air (л/мин). В течение четырехчасового воздействия были получены следующие значения:

Таблица 1

## Параметры затравочной камеры

Table 1

## Parameters of the seed chamber

Группы животных	Температура, °С	Влажность, %	Flow Appl, л/мин	Flow Air, л/мин
№1	22,0±0,3	62,0±2,8	14,97±0,05	1,50±0,01
№2	22,0±0,2	67,0±2,9	14,98±0,04	1,50±0,01

**Гранулометрический состав и фактическая концентрация.** По результатам отбора проб во время экспозиций были получены параметры гранулометрического состава. Распределение медианы аэродинамического диаметра масс частиц (MMAD) для двух диапазонов измерений составил 1,27 и 1,30 мкм. Геометрическое стандартное отклонение (GSD) составило 1,64 и 2,06 соответственно (табл. 2).

Таблица 2

## Гранулометрический состав и достигнутая концентрация

Table 2

## Particle size distribution and concentration achieved

Группы	Достигнутая концентрация, мг/л	Медианы аэродинамического диаметра масс частиц (MMAD, мкм)	Геометрическое стандартное отклонение (GSD)
Основной эксперимент №1	1,1	1,27	1,64
Основной эксперимент №2	2,8	1,30	2,06

Для проведения исследования после предварительных испытаний были выбраны скорости введения вещества ( $V_{dose}$ ): 1,903 мл/мин для достижения концентрации  $1100 \pm 30$  мг/м<sup>3</sup> (см. таблицу 3А) и 7,402 мл/мин для достижения концентрации  $2800 \pm 80$  мг/м<sup>3</sup> (см. таблицу 3Б).



Таблица 3А

Анализ концентрации и размера частиц

Table 3A

Particle concentration and size analysis

Основной эксперимент №1. Целевая концентрация 1000 мг/м <sup>3</sup>					
№ ступени	Диаметр форсунок, мкм	Корректирующий коэффициент			
		1,000	0,615	0,544	1,088
		Масса нетто инъекционных тарелок, мг			
1	4,9	0,1	0	0	0,1
2	3,9	3,5	1,5	1,5	2,0
3	1,4	4,9	3,2	2,6	3,0
4	1,3	2,8	1,9	1,3	1,5
5	0,63	1,6	1,3	0,8	1,1
6	0,49	0,4	1,3	0,2	0,1
7	0,15	0,1	0	0	0
Фильтр	0,00	0,3	0	0	0,1
C <sub>fact</sub> , мг/м <sup>3</sup>		2749	1288	0896	1092
V <sub>dose</sub> , мл/мин		3,661	2,253	1,749	1,903

Таблица 3Б

## Анализ концентрации и размера частиц

Table 3B

## Particle concentration and size analysis

Основной эксперимент №2. Целевая концентрация 3000 мг/м <sup>3</sup>			
№ ступени	Диаметр форсунок, мкм	Корректирующий коэффициент	
		1,000	1,219
		Масса нетто инъекционных тарелок, мг	
1	4,9	0	0,2
2	3,9	0,4	2,2
3	1,4	1,5	2,8
4	1,3	0,9	2,1
5	0,63	0,5	0,6
6	0,49	0,2	0
7	0,15	0	0,1
Фильтр	0,00	0,2	0
C <sub>fact</sub> , мг/м <sup>3</sup>		2460	2800
V <sub>dose</sub> , мл/мин		6,072	7,402

**Симптомы интоксикации.** В течение первых суток у крыс, получивших аэрозоль в концентрации 1100±30 мг/м<sup>3</sup> (группа животных №1), отмечали покраснение глаз, окрашивание мордочки, носа и шерсти околоносовой части в синий цвет, чихание и активное умывание (груминг). Окрашивание и покраснение глаз нивелировалось на вторые сутки наблюдения после экспозиции.

В группе животных №2, получивших аэрозоль в концентрации 2800±80 мг/м<sup>3</sup>, сразу после экспозиции наблюдали: покраснение глаз, вялость, малоподвижность, скученность в углу клетки, окрашивание мордочки, носа и шерсти околоносовой части в синий цвет. Окрашивание и покраснение глаз нивелировалось на вторые сутки наблюдения после экспозиции.

Других симптомов интоксикации не наблюдали ни в один из дней эксперимента.

**Анализ поведения.** Автоматизированный анализ поведения показал увеличение моторной активности животных группы №1 (N1) на следующие сутки после затравки (S2) по

сравнению с днем до затравки (S1,  $p \leq 0,05$ ). К 14-м суткам после затравки (S3) оцениваемые показатели вернулись к контрольным значениям (доэкспозиционным). При этом реципрочно снизилось исследовательское поведение (H2,  $p \leq 0,05$ ) животных данной группы (рис. 4).

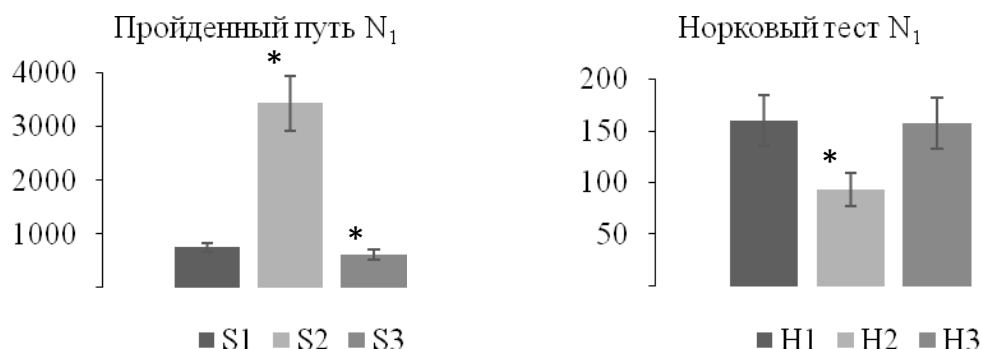


Рис. 4. Пройденный путь и «норковый тест» животных группы №1

\* –  $p \leq 0,05$  – значимые различия результатов второй (S2/H2) и третьей (S3) оценок поведения по отношению к первой (фоновой, S1) оценке результатов.

N<sub>1</sub> – группа крыс с экспозицией препарата 1100±30 (мг/м<sup>3</sup>); N<sub>2</sub> – группа крыс с экспозицией препарата 2800±80 (мг/м<sup>3</sup>); S1 – пройденный путь до экспозиции (см); S2 – пройденный путь на следующие сутки после экспозиции (см); S3 – пройденный путь на 14-е сутки после экспозиции (см); H1 – «норковый тест» до экспозиции (количество событий); H2 – «норковый тест» на следующие сутки после экспозиции (количество событий); H3 – «норковый тест» на 14-е сутки после экспозиции (количество событий).

Figure 4. Distance traveled and mink test of Group 1 animals

\* -  $p \leq 0,05$  - significant differences in the results of the second (S2 / H2) and third (S3) assessments of behavior in relation to the first (background, S1) assessment of the results.

N1 – group of rats with drug exposure 1100±30 (mg/m<sup>3</sup>); N2 – group of rats with drug exposure 2800±80 (mg/m<sup>3</sup>); S1 is the distance traveled to the exposure (cm); S2 is the distance traveled on the next day after exposure (cm); S3 is the distance traveled on the 14th day after exposure (cm); H1 – mink test before exposure (number of events); H2 – mink test on the next day after exposure (number of events); H3 – mink test on day 14 after exposure (number of events).

В группе животных №2 (N<sub>2</sub>) моторное и исследовательское поведение снижалось неуклонно, вплоть до 14 суток после экспозиции (см. S3 и H3, рисунок 5, оценено для выживших животных).

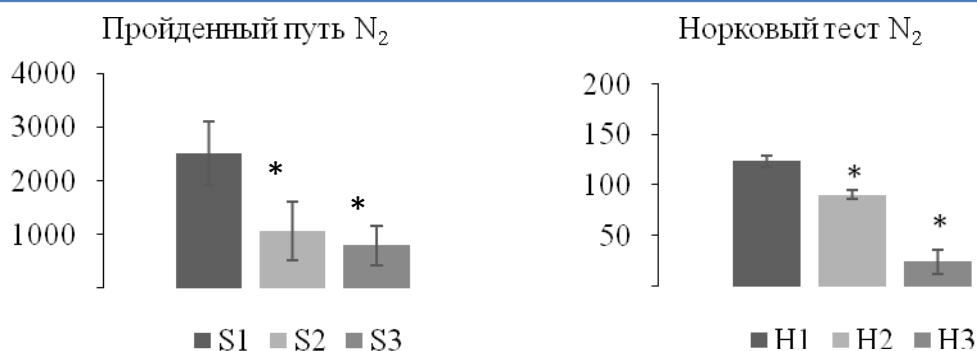


Рис. 5. Пройденный путь и «норковый тест» животных группы №2

\* –  $p \leq 0,05$  – значимые различия результатов второй (S2/H2) и третьей (S3) оценок поведения по отношению к первой (фоновой, S1) оценке результатов.

N<sub>1</sub> – группа крыс с экспозицией препарата 1100±30 (мг/м<sup>3</sup>); N<sub>2</sub> – группа крыс с экспозицией препарата 2800±80 (мг/м<sup>3</sup>); S1 – пройденный путь до экспозиции (см); S2 – пройденный путь на следующие сутки после экспозиции (см); S3 – пройденный путь на 14-е сутки после экспозиции (см); H1 – «норковый тест» до экспозиции (количество событий); H2 – «норковый тест» на следующие сутки после экспозиции (количество событий); H3 – «норковый тест» на 14-е сутки после экспозиции (количество событий).

Figure 5. Distance traveled and mink test of group 2 animals

\* -  $p \leq 0,05$  - significant differences in the results of the second (S2 / H2) and third (S3) assessments of behavior in relation to the first (background, S1) assessment of the results.

N1 – group of rats with drug exposure 1100±30 (mg/m<sup>3</sup>); N2 – group of rats with drug exposure 2800±80 (mg/m<sup>3</sup>); S1 is the distance traveled to the exposure (cm); S2 is the distance traveled on the next day after exposure (cm); S3 is the distance traveled on the 14th day after exposure (cm); H1 – mink test before exposure (number of events); H2 – mink test on the next day after exposure (number of events); H3 – mink test on day 14 after exposure (number of events).

**Летальные исходы.** После экспозиции аэрозоля в концентрации 1100±30 мг/м<sup>3</sup> гибель животных не отмечали, а в концентрации 2800±80 мг/м<sup>3</sup> наблюдали гибель животных (1 ♂ / 2 ♀) на третьи сутки после экспозиции (табл. 4).

Таблица 4

## Летальные исходы животных

Table 4

## Lethal outcomes of animals

Концентрация, мг/м <sup>3</sup>	Количество животных в группе (n)	Количество погибших животных в разные сроки проведения эксперимента			
		В процессе ингаляции и сразу после экспозиции	В постэкспозиционный период		Всего погибло животных
			1-е сутки	2-14 сутки	
1100	6	0	0	0	0
2800	6	0	0	3	3

**Данные некрпсии и гистопатологии.** Все исследуемые животные были вскрыты. Явных патологических макроскопических признаков у животных в группе №1 не выявлено.

В группе животных №2 были выявлены: изменения со стороны печени – множественные геморрагии, очаги ишемии и фиброза (рис. 6), ишемия надпочечников, почек и селезенки, геморрагические очаги в корнях легких (рис. 7).

Большая часть полученных данных соответствует механизму действия производного гидроксикумарина, остальная часть полученных результатов нуждается в дополнительных исследованиях.



Рисунок 6. Печень животных группы №2

Figure 6. Group 2 liver



Рисунок 7. Легкие животных группы №2

Figure 7. Group 2 lungs



**Расчет среднесмертельной концентрации.** Результаты расчета среднесмертельной концентрации, который осуществлялся с использованием пробит-анализа по методу Прозоровского, представлен в таблице 5.

Таблица 5

## Расчет среднесмертельной концентрации

Table 5

## Calculation of the mean lethal concentration

Параметр, мг/м <sup>3</sup>	Самки	Самцы
LC <sub>16</sub>	1450	1775
LC <sub>50</sub>	2394	3573
LC <sub>84</sub>	3337	5370
LC <sub>100</sub>	3809	6269

**Обсуждение.** С каждым годом работы, в которых можно встретить использование животных в токсикологических экспериментах, становятся ценнее, поскольку в большинстве развитых стран ученые постепенно уходят от концепции использования большого числа животных, вплоть до отказа их использования. Однако животные по-прежнему являются единственной альтернативой эксперименту на людях [17]. Общепринято мнение, что использование животных в качестве моделей для оценки безопасности пестицидов предоставляет достоверную информацию, которая помогает сохранить здоровье всего населения [18].

В данном эксперименте для оценки острой ингаляционной токсичности были использованы крысы, которые являются вторыми по распространенности использования в токсикологических экспериментах после мышей [19]. Крысы являются удобными моделями для изучения острой ингаляционной токсичности: они более обучаемы, менее агрессивны и менее тревожны по сравнению с мышами.

Проведенные эксперименты на крысах были стандартизированы как контролированием однородности состава и качества принимаемых животными пищи и воды, так и достижением стандартизации абиотических факторов (света, скорости, влажности и температуры) их среды обитания и ингаляционного воздействия.

Объектом исследования был выбран гликолевый раствор производного гидроксикумарина, поскольку он широко используется в быту и сельском хозяйстве, а препараты на его основе преимущественно не имеют запаха и, следовательно, не могут быть вовремя распознаны работающими с ним лицами. Кроме того, у производного гидроксикумарина есть особенность – отдаленный эффект токсического воздействия [20].

Вот почему чрезвычайно важно определить полулетальную концентрацию производного гидроксикумарина в воздухе.

Ингаляционное воздействие на животных предполагало их предварительный трехдневный хендлинг для снижения стрессированности, а также обучение нахождению в стеклянных конусовидных цилиндрических камерах – пеналах для затравки. Однако, основываясь на литературных данных [21], было принято решение не обучать грызунов предварительному нахождению в стеклянных пеналах.

Как показали наши исследования, правильное использование ингаляционной системы от компании-производителя (TSE Systems, Германия) и адекватный подбор животных позволяет уберечь крыс от стресса и перегревания в процессе четырехчасового экспонирования в пеналах. Кроме того, светопрозрачная система позволяет фиксировать любые изменения, происходящие с животными, во время ингаляционной затравки.

Стоит отметить, что во время ингаляционной затравки для достаточного проникновения аэрозольных частиц в легкие подопытных животных важно подобрать оптимальный размер частиц аэрозоля (1-4 мкм). Такой подбор осуществляется изменением параметров системы (скорости воздушного потока, давления и пр.) в предварительном эксперименте и выверяется гравиметрическим методом, что и было проделано нами. Более того, указанные выше параметры размеров частиц аэрозоля укладываются в рекомендованный методикой OECD диапазон [14].

Использование после затравки, помимо фиксирующей инспекции, 15-минутной оценки поведения крыс позволило определить эффективность воздействия на них аэрозоля производного гидроксикумарина. Метод автоматизированной оценки поведения животных является объективным, поскольку не зависит от оператора, и обязательным, поскольку позволяет нормировать выборку животных до эксперимента, адекватно оценить недоступные глазу отклонения при проведении санитарно-токсикологической характеристики родентицидов.

Наш эксперимент показал, что аэрозоль в концентрации  $2394 \pm 30$  и  $3573 \pm 80$  мг/м<sup>3</sup> для самок и самцов соответственно вызывает гибель половины животных. Результаты, полученные в процессе патологоанатомического вскрытия и оценки состояния внутренних органов, свидетельствуют о соответствии механизма действия производного гидроксикумарина литературным данным.

**Заключение.** Были разработаны методические подходы при работе на современном оборудовании для изучения токсичности химических веществ в воздухе рабочей зоны на примере родентицида, производного гидроксикумарина. Основываясь на полученных результатах, был произведен расчет среднесмертельных концентраций (LC<sub>50</sub>) для особей крыс мужского и женского пола. Среднесмертельная концентрация гликолевого раствора производного гидроксикумарина в условиях однократного четырехчасового ингаляционного воздействия составила  $2394 \pm 30$  и  $3573 \pm 80$  мг/м<sup>3</sup> для самок и самцов соответственно, что соответствует 3 классу опасности, согласно действующей «Гигиенической классификации пестицидов по степени опасности» (Методические рекомендации № 2001/26 от 16.04.2001).

**Список литературы:**

1. Министерство цифрового развития, связи и массовых коммуникаций Российской Федерации. Организация экономического сотрудничества и развития (ОЭСР). URL: <https://digital.gov.ru/ru/activity/directions/307> (дата обращения: 05.05.2022). Текст: электронный.
2. Vera Barrantes. Национальные регистры и перечни химических веществ: преимущества и подходы к созданию. Copenhagen: Европейское региональное бюро ВОЗ. 2018; 96.
3. Choudri B.S., Charabi Y. Pesticides and herbicides. 2019; 91: 1342-1349. DOI: 10.1002/wer.1227.
4. Сафандеев В.В. Экологическое воспитание дошкольников: Учебно-методическое пособие: МАСКА. 2015; 250. ISBN 978-5-9906617-2-1.
5. Сафандеев В. В., Угрюмов М.В. Новый подход к оценке степени деградации нигростриатной дофаминергической системы на экспериментальной модели болезни Паркинсона. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова: ООО «ИКЦ «Академкнига». 2019; 69(3): 382-392. DOI: 10.1134/S00444467719030122.
6. Analysis of rodenticide bait use; U.S Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, U.S. Government Printing Office: Washington, DC. 2004. URL: <http://npic.orst.edu/factsheets/rodenticides.pdf> (дата обращения: 30.01.2022). – Текст: электронный.
7. Сеницкая Т.А. Изучение заболеваемости населения в условиях комбинированного воздействия пестицидов и тяжелых металлов. Проблемы гигиенической безопасности и управления факторами риска для здоровья населения. Научные труды ФНЦГ им.Ф.Ф. Эрисмана. Нижний Новгород. 2004; 14: 177-181.
8. Гигиеническая классификация пестицидов и агрохимикатов. Доступ из справ.-правовой системы Гарант. Текст: электронный. (дата обращения: 30.01.2022).
9. ГОСТ 33216-2014. Межгосударственный стандарт. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. Доступ из справ.-правовой системы Гарант. Текст: электронный. (дата обращения: 01.03.2022).
10. Сафандеев В.В., Лопатина М.В. Влияние ограниченного и неограниченного употребления корма на массу линейных и нелинейных животных. Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2019; 7: 71-75. DOI: 10.26155/vet.zoo.bio.201907011.
11. ГОСТ 33044-2014. Межгосударственный стандарт. Принципы надлежащей лабораторной практики. Доступ из справ.-правовой системы Гарант. Текст: электронный. (дата обращения: 01.03.2022).
12. Directive 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on the protection of animals used for scientific purposes, of 22 September 2010. URL: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF> (дата обращения: 30.01.2022).
13. OECD series on principles of Good Laboratory Practice and compliance monitoring, Number 1, ENV/MC/CHEM (98)17. «Principles on Good Laboratory Practice». URL:

- [https://one.oecd.org/document/ENV/MC/CHEM\(98\)17/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/MC/CHEM(98)17/en/pdf) (дата обращения: 30.01.2022).
14. OECD (2009), Test №436: Acute Inhalation Toxicity – Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. URL: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264076037-en.pdf?expires=1643612894&id=id&accname=guest&checksum=ED5DE61CED205C6DAC6A956C2A36F6E1> (дата обращения: 30.01.2022).
  15. Сафандеев В.В., Колачева А.А. Хронические модели доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона на мышах. Программа и научные труды Научной конференции молодых ученых по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА. Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства». 2016; 126-127.
  16. Прозоровский В.Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований. ПФБН.2007; 3-4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-farmakologicheskikh-issledovaniy> (дата обращения: 31.01.2022).
  17. Walker R.L. Virtue Ethics and Laboratory Animal Research. ILAR Journal. 2019; 60(3): 415-423. DOI:10.1093/ilar/ilaa015.
  18. Jang Y. Towards a strategic approaches in alternative tests for pesticide safety. Toxicology Research. 2014; 30: 159-68. DOI: 10.5487/TR.2014.30.3.159.
  19. Feldman S.H., Easton D.N. Occupational Health and Safety: in The Laboratory Rat (Second Edition): American College of Laboratory Animal Medicine. 2006; 565-586. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120749034500200> (дата обращения: 31.01.2022).
  20. Яковлев А.А., Бабич Н.В. Родентициды. Классификация, происхождение, особенности применения. Санкт-Петербург: ВИЗР. 2011; 63.
  21. Phillips J.E., Zhang Xu., Johnston J.A. Dry Powder and Nebulized Aerosol Inhalation of Pharmaceuticals Delivered to Mice Using a Nose-only Exposure System. Journal of Visualized Experiments. 2017; 122: 10. DOI: 10.3791/55454.

#### References:

1. Ministry of Digital Development, Communications and Mass Media of the Russian Federation. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). URL: <https://digital.gov.ru/ru/activity/directions/307>. Text: electronic.
2. Vera Barrantes, et al. National registers and lists of chemicals: advantages and approaches to creation. WHO Regional Office for Europe, 2018; 96.
3. Choudry B.S., Charabi Y. Pesticides and herbicides. 2019; 91: 1342–1349. DOI: 10.1002/wer.1227.
4. Safandeev V.V. Ecological education of preschoolers: Educational and methodological manual: MASK. 2015; 250. ISBN 978-5-9906617-2-1.
5. Safandeev V.V., Ugryumov M.V. A new approach to assessing the degree of degradation of the nigrostriatal dopaminergic system in an experimental model of Parkinson's disease.

- ZhurnalVyshey Nervnoy Deyatelnosti I.P. Pavlova: LLC «ECC» Akademkniga». 2019; 69 (3): 382-392. DOI: 10.1134/S0044467719030122.
6. Analysis of rodenticide bait use; U.S Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, U.S. Government Printing Office: Washington, DC. 2004. URL: <http://npic.orst.edu/factsheets/rodenticides.pdf>. Text: electronic.
  7. Sinitskaya T.A. The study of the incidence of the population under the conditions of combined exposure to pesticides and heavy metals. Problems of hygienic safety and management of risk factors for public health. Nauchnye trudy FNTSG im. F.F. Erismana. Nizhny Novgorod. 2004; 14: 177-181.
  8. Hygienic classification of pesticides and agrochemicals. Access from the legal system Garant. Text: electronic.
  9. GOST 33216-2014. Interstate standard. Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for the maintenance and care of laboratory rodents and rabbits. Access from the legal system Garant. Text: electronic. (date of access: 03/01/2022).
  10. Safandeev V.V., Lopatina M.V. Influence of limited and unrestricted food intake on the mass of linear and non-linear animals. Veterinariya, zootekhnika i biotekhnologiya. 2019; 7: 71-75. DOI: 10.26155/vet.zoo.bio.201907011.
  11. GOST 33044-2014. Interstate standard. Principles of Good Laboratory Practice. Access from sprav.-legal system Garant. Text: electronic. (date of access: 03/01/2022).
  12. Directive 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on the protection of animals used for scientific purposes, of 22 September 2010. URL: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF> (accessed 01/30/2022).
  13. OECD series on principles of Good Laboratory Practice and compliance monitoring, Number 1, ENV/MC/CHEM (98)17. «Principles on Good Laboratory Practice». URL: [https://one.oecd.org/document/ENV/MC/CHEM\(98\)17/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/MC/CHEM(98)17/en/pdf) (accessed 30.01.2022).
  14. OECD (2009), Test №436: Acute Inhalation Toxicity – Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, URL: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264076037-en.pdf?expires=1643612894&id=id&accname=guest&checksum=ED5DE61CED205C6DAC6A956C2A36F6E1> (accessed 01/30/2022).
  15. Safandeev V.V., Kolacheva A.A. Chronic models of preclinical and early clinical stages of Parkinson's disease in mice. Program and scientific papers of the Scientific Conference of Young Scientists in Medical Biology of the Federal State Budgetary Institution Federal Scientific and Practical Center for Physical and Chemical Medicine of the Federal Medical and Biological Agency. Moscow: Federalnoe gosuchrezhdenie «Federalny nauchny i klinicheskiy tsentr fizicheskoy i khimicheskoy meditsiny Federalnogo Meditsinskogo i Biologicheskogo Agentstva», 2016; 126-127.
  16. Prozorovsky V.B. Statistical processing of the results of pharmacological studies. PFBN.2007; 3-4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-farmakologicheskikh-issledovaniy>.



17. Walker, R.L. Virtue Ethics and Laboratory Animal Research. *ILAR Journal*. 2019; 60(3): 415-423. DOI:10.1093/ilar/ilaa015.
18. Jang Y. Towards a strategic approach in alternative tests for pesticide safety. *Toxicology Research*. 2014; 30: 159-68. DOI: 10.5487/TR.2014.30.3.159.
19. Feldman S.H., Easton D.N. Occupational Health and Safety: in *The Laboratory Rat (Second Edition)*: American College of Laboratory Animal Medicine. 2006; 565-586. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120749034500200> (accessed 31.01.2022).
20. Yakovlev A.A., Babich N.V. *Rodenticides. Classification, origin, application features*. St. Petersburg: VIZR. 2011; 63.
21. Phillips J.E., Zhang Xuxia, Johnston J.A. Dry Powder and Nebulized Aerosol Inhalation of Pharmaceuticals Delivered to Mice Using a Nose-only Exposure System. *Journal of Visualized Experiments*. 2017; 122:10. DOI:10.3791/55454.

Поступила/Received: 11.05.2022

Принята в печать/Accepted: 19.05.2022