



## Оценка токсичности водных растворов нитроглицерина по гистологическим и цитологическим показателям на рыбах *Danio rerio*

Д-р биол. наук, профессор

**Ю.Г. Симаков** –

канд. биол. наук, доцент

**А.Л. Никифоров-Никишин**

канд. биол. наук, доцент

**Л.И. Бычкова**

аспирант **Н.М. Любовская** –

Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского (ПКУ)

@ usimakov@yandex.ru;

niknikdl@rambler.ru;

larabychkova@mail.ru;

lyubovskayanm@gmail.com

### Ключевые слова:

данио (*Danio rerio*), нитроглицерин, генотоксичность, гистологические и гематологические показатели у рыб, максимально допустимые концентрации МДК

### Keywords:

*Danio rerio*, nitroglycerine, gene toxicity, fish histological and hematological indices, maximal permitted concentrations

### ESTIMATION OF NITROGLYCERINE WATER SOLUTION TOXICITY BY HISTOLOGICAL AND CYTOLOGICAL INDICES USING *DANIO RERIO* AS A CASE STUDY

Simakov Yu.G., Doctor of Sciences, Professor, Nikiforov-Nikishin D.L., PhD, Associate Professor, Bychkova L.I., PhD, Associate Professor, Lyubovskaya N.M., postgraduate – Moscow State University of Technologies and Management, usimakov@yandex.ru; niknikdl@rambler.ru; larabychkova@mail.ru; lyubovskayanm@gmail.com

The results of laboratory experiments on nitroglycerine toxicity detected by histological and cytological indices are presented, using *Danio rerio* as a case study. For the first time, there are shown the changes in liver and kidneys, both at tissular and cellular levels, induced by administered concentrations of nitroglycerine. The results obtained appear to be important for water bodies' preservation and elaboration of MPC standards. The intake of nitroglycerine into water bodies is due, mainly, to discharge from pharmaceutical enterprises, demolition works, and outflow from explosives storehouses. Fish turned out to be sensitive to nitroglycerine as indicated by histological and hematological indices. Maximum permissible concentration, MPC, for *Danio rerio* is determined to be equal to 0.5 mg/l.

### ВВЕДЕНИЕ

Нитроглицерин – высокотоксичное вещество, которое может попадать в водоемы и нарушать у рыб структуру органов и тканей. Это вещество используется при производстве взрывчатых веществ, в фармацевтической промышленности при изготовлении лекарственных препаратов, а также при проведении взрывных работ. Попадая в водоемы со сточными водами, нитроглицерин может

оказать токсическое воздействие на рыб и других гидробионтов, входящих в биоценоз водоема. В природной среде он слабо подвержен разрушению, устойчив к биодеградации, но под воздействием солнечных лучей скорость его распада увеличивается в несколько раз. [2]. Ранее токсикологическими исследованиями установлено, что это соединение отличается более высокой токсичностью для позвоночных жи-

вотных и человека, чем для беспозвоночных животных [3; 4].

Цель работы – выявить наиболее чувствительные органы у рыб *Danio rerio* при хроническом воздействии водных растворов нитроглицерина по гистологическим и гематологическим показателям и найти максимально допустимую концентрацию, которую можно использовать при установлении рыбохозяйственного норматива ПДК<sub>рх</sub>.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе для исследований низких концентраций в хронических опытах (длительностью 30 дней) мы использовали стандартный водный раствор нитроглицерина (медицинский препарат для инфузий). Содержание нитроглицерина в одной ампуле объемом 10 мл с концентрацией 1,0 мг/мл. Рыбы (молодь до 2 см) по 5 особей были помещены в 2-х литровые аквариумы на 30 дней. Опыт поставлен в трехкратной повторности при исследовании 4-х концентраций нитроглицерина и контроль. В общей сложности исследование проведено в 15 аквариумах с рыбами без аэрации.

Кормление рыб осуществляли французским кормом «Esturgeon» (размер 300 мкм).

В нашем исследовании действие концентраций нитроглицерина определяли по степени воздействия на гистологическое строение некоторых органов: кишечник, гонады, жабры, почки рыб *Danio rerio*. Для этих целей, взятые от рыб, ткани фиксировались, заливались в парафин и резались на микротоме (толщина срезов 4 мкм). Затем они проводились через гистологическую проводку, окрашивались гематоксилин-эозином и заключались в канадский балзам [6]. Изменение гематологических показателей под влиянием нитроглицерина исследовали на препаратах крови рыб «давленная капля», окрашенных акридиновым оранжевым с последующей люминесцентной микроскопией [5]. Численность клеточных элементов в крови данио в контроле и опыте изучали на препаратах, окрашенных по Романовскому [6].

В предварительном остром опыте, при концентрациях нитроглицерина 5,0; 1,0 и 0,5 мг/л, было показано, что рыбы при концентрации 5,0 мг/л через 4 суток погибли. Исходя из этого, для проведения хронического эксперимента в течение 30 суток был взят спектр концентраций со следующими градациями: 1,0; 0,5; 0,2; 0,1 мг/л.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Гистологический анализ микропрепаратов, полученных из печени, кишечника, гонад, почек и жабр данио, показал следующие результаты:

**Печень.** В контрольных срезах печени данио отмечаются клеточные балки и просматривается сетчатое строение, характерное для нормального строения печени рыб. Срезы печени контрольных рыб представлены на рисунке 1.

При концентрации нитроглицерина 1,0 мг/л отмечается гиперплазия печеночных клеток (рис. 2). При более низких концентрациях изменений в гистологическом строении печени не отмечено. Следовательно, максимально допустимая

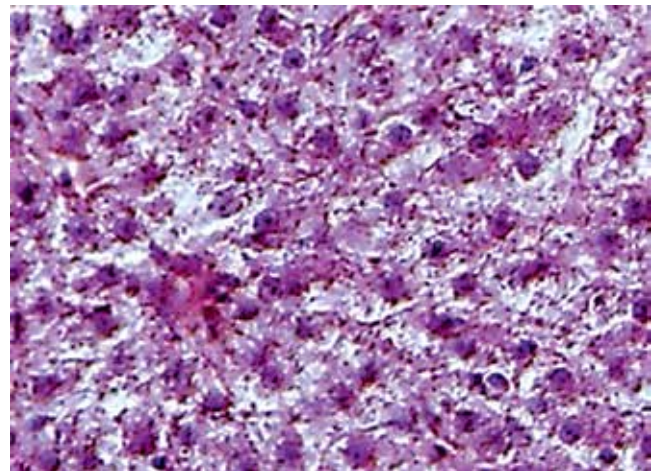
Экспериментальным путем получены результаты исследований по определению токсических свойств нитроглицерина на рыбах данио (*Danio rerio*), в лабораторных условиях по гистологическим и цитологическим показателям. Впервые показаны изменения на тканевом и клеточном уровне в печени и в почках при исследованных концентрациях нитроглицерина. Представленная работа актуальна для охраны водоемов и разработки рыбохозяйственных нормативов ПДК<sub>рх</sub> [1]. Нитроглицерин попадает в водоемы со стоками от фармацевтических предприятий, при проведении взрывных работ и со складов, где хранятся взрывчатые вещества. Рыбы оказались чувствительными к нитроглицерину по гистологическим и гематологическим показателям. Максимально допустимая концентрация (МДК) по этим показателям для данио равна 0,5 мг/л.

концентрация (МДК) для рыб по состоянию печени может быть принята равной 0,5 мг/л.

**Кишечник.** У молоди рыб *Danio rerio* исследовались поперечные срезы кишечника (рис. 3). Слизистая оболочка кишечника содержит складки и крипты, а в мышечном слое хорошо различимы циркулярные и продольные слои.

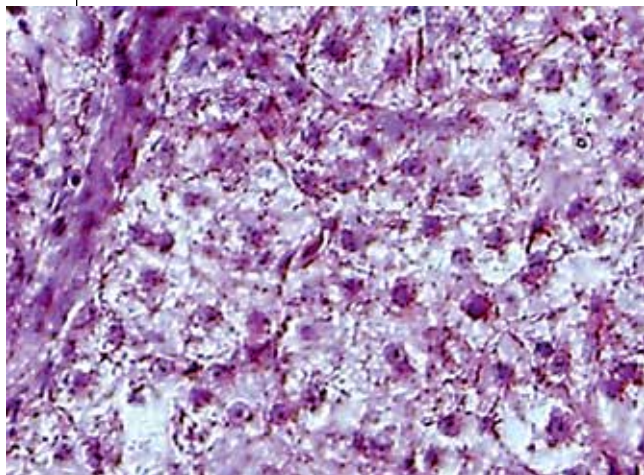
Строение кишечника рыб, которые содержались в указанных ранее концентрациях нитроглицерина, практически не отличаются от контроля. Поэтому за допустимую концентрацию можно принять наибольшую из исследованных, а именно 1,0 мг/л.

**Почки.** Строение мезонефрических почек исследовали в контроле и после воздействия нитроглицерина с концентрациями 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мг/л. На срезах почек, полученных от рыб, содержащихся в растворах 1,0 мг/л, отмечается изменение размеров пространства вокруг мальпигиевого клубочка до капсулы Боумена (на препарате в опыте это пространство в два-три раза



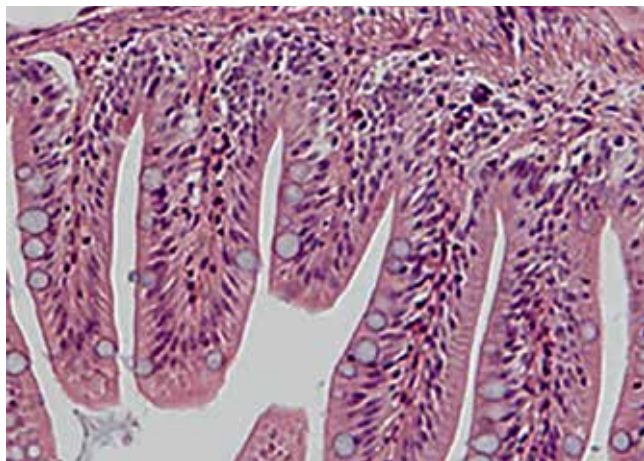
**Рисунок 1.** Гистологическое строение печени рыб *Danio rerio* (контроль) (гематоксилин эозин)

**Figure 4.** Histological structure of *Danio rerio* liver (control) (hematoxylin eosin)



**Рисунок 2.** Гистологическое строение печени рыб *Danio rerio* после нахождения в растворах нитроглицерина с концентрацией 1,0 мг/л. (гематоксилин-эозин, ув. 40 x 15)

**Figure 2.** Histological structure of *Danio rerio* liver after exposition in nitroglycerine solution at 1.0 mg/l concentration (hematoxylin eosin, 40 x 15 magnification)



**Рисунок 3.** Гистологическое строение кишечника *Danio rerio* в контроле и опыте не отличается по строению при действии исследованных концентраций нитроглицерина (гематоксилин эозин, ув. 15 X 20).

**Figure 3.** Histological structure of *Danio rerio* intestine in experiment and control does not differ under exposition to studied nitroglycerine concentrations (hematoxylin eosin, 15 x 20 magnification)

больше, чем в контроле), что указывает на токсическое воздействие указанной концентрации на почки. Концентрацию нитроглицерина 1,0 мг/л в этом случае следует считать действующей. Гистологическое строение почки рыб *Danio rerio* в контроле представлено на рисунке 4, а после воздействия нитроглицерина при концентрации 1,0 мг/л на рисунке 5.

Хронический опыт в течение 30 дней при применении концентрации нитроглицерина 0,5 мг/л

показал, что в почках рыб не происходят изменения по сравнению с контролем. Не отмечено изменений в гистологических препаратах почки и при более низких концентрациях.

За максимально допустимую концентрацию нитроглицерина, при которой отсутствуют гистологические изменения в почке рыб *Danio rerio*, следует принять величину равную 0,5 мг/л.

**Половые железы.** В семеннике рыб *Danio rerio* не отмечено отклонений от контроля при воздействии концентраций нитроглицерина 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 мг/л. В яичнике рыб, находящихся в тех же концентрациях нитроглицерина, также не отмечено отклонений по сравнению с контролем.

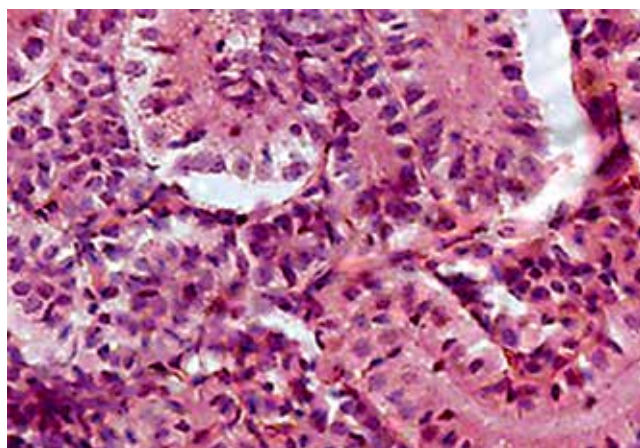
За допустимую концентрацию в этом случае предлагается принять 1,0 мг/л.

**Жабры.** Не отмечено гистологических изменений в жабрах рыб под влиянием того же спектра концентраций. Жаберный эпителий лепесточков не изменен. Растворы нитроглицерина в исследованных концентрациях не влияют на жаберный эпителий и хлоридные клетки. За допустимую концентрацию по гистологическим показателям состояния жабр следует принять 1,0 мг/л.

Гематологический анализ крови рыб проводили при тех же концентрациях нитроглицерина, так как кровь бралась у тех же рыб, которые использовались при гистологических исследованиях в хроническом опыте.

В более ранних работах показано, что нитроглицерин может влиять на клеточные элементы крови [9], однако сравнительного анализа по действию концентраций этого соединения на клеточные элементы красной и белой крови рыб *Danio rerio* проведено не было. Данные о количестве эритроцитов в опыте и контроле представлены таблице 1

Анализ полученных результатов показывает, что при концентрации нитроглицерина 1,0 мг/л досто-



**Рисунок 4.** Гистологическое строение почки рыб *Danio rerio* (контроль) видны почечные канальцы и нормальные капсулы Шумлянського (гематоксилин-эозин, ув. 15 x 40)

**Figure 4.** Histological structure of *Danio rerio* kidney (control). Kidney tubules and normal Shumlyansky capsules are visible (hematoxylin eosin, 15 x 40 magnification)

**Таблица 1.** Эритроциты периферической крови взрослых рыб *Danio rerio* при действии различных растворов нитроглицерина за 30 дней опыта / **Table 1.** Erythrocytes of peripheral blood of adult *Danio rerio* under exposure to different nitroglycerine solutions during 30 days of the experiment

Концентрации, мг/л	Количество эритроцитов, млн/мм <sup>3</sup>		Незрелые эритроциты в %			
	M±m	t <sub>d</sub>	незрелые эритроциты		зрелые эритроциты	
			M±m	t <sub>d</sub>		t <sub>d</sub>
Контроль	1,25±0,22		5,2±0,7		94,8	
0,05	1,20±0,20	1,37	5,5±0,15	1,83	94,5	0,97
0,1	1,11±0,17	1,45	5,1±0,32	2,02	93,3	1,65
0,2	1,25±0,25	1,10	5,3±0,22	1,24	95,2	1,23
0,5	1,22±0,16	2,12	5,5±0,27	1,87	94,5	1,14
1,0	0,43*±0,25	2,93	1,3*±0,36	3,46	57,7*	4,20

Примечание: \* – достоверная разница между контролем и опытом при (P≤0,05)

Для зрелых эритроцитов – t<sub>к</sub> = 2,57; t<sub>d</sub> = 2,93; – в % для зрелых эритроцитов – t<sub>d</sub> = 3,4; для незрелых эритроцитов – t<sub>d</sub> = 4,20

**Таблица 2.** Лейкоцитарная формула крови рыб *Danio rerio* после воздействия различных концентраций нитроглицерина (продолжительность опыта 30 дней) / **Table 2.** Leukogram of *Danio rerio* blood under exposure to different nitroglycerine solutions (30 days of the experiment)

Концентрации, мг/л	Лейкоцитарная формула					
	лимфоциты, %	t <sub>d</sub>	моноциты, %	t <sub>d</sub>	нейтрофилы, %	t <sub>d</sub>
Контроль	96,2		2,0		1,8	
0,05	95,7	1,80	2,1	1,63	2,2	1,03
0,1	96,8	2,06	2,0	0,87	2,2	0,75
0,2	96,7	1,44	1,7	2,23	1,6	1,57
0,5	95,1	1,25	2,4	1,78	2,5	2,16
1,0	83*±6	3,46	2,3	1,12	14,5*	4,70

Примечание: \* – достоверная разница между контролем и опытом при (P≤0,05; t<sub>к</sub> = 2,57)

**Таблица 3.** МЯТ в эритроцитах *Danio rerio* и состояние структуры ДНК в ядрах эритроцитов после хронического опыта (средняя в 2000 клеток, %) / **Table 3.** Micronucleus formation rate in *Danio rerio* erythrocytes, and DNA structure in erythrocyte nuclei after chronic exposure (mean for 2000 cells, %)

Концентрация, мг/л	Контроль	0,1	0,5	1,0
Частота встречаемости микроядер на 100 эритроцитов	0,45	0,50	0,48	0,43
Флуоресценция ДНК в ядрах эритроцитов	Зеленая	Зеленая	Зеленая	Зеленая

верно падает количество эритроцитов в периферической крови и число незрелых эритроцитов. При более низких концентрациях нарушений не отмечено. За допустимую концентрацию следует принять 0,5 мг/л.

Для выявления воздействия растворов нитроглицерина на белую кровь данио, был проведен подсчет лейкоцитов на окрашенных препаратах и показано процентное соотношение различных форменных элементов при действии различных концентраций в хроническом опыте (табл. 2).

Таким образом, под влиянием нитроглицерина в концентрации 1,0 мг/л, число лимфоцитов падает, а количество нейтрофилов возрастает в периферической крови молоди рыб *Danio rerio*. За максимально допустимую концентрацию по численности лейкоцитов в периферической крови следует принять 0,5 мг/л. Этот показатель близок по своему значению к оценке токсичности нитроглицерина, установленной по изменению клеточных элементов крови на других видах рыб [7; 8].

### ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ИССЛЕДУЕМЫХ РАСТВОРОВ НИТРОГЛИЦЕРИНА

Исследования *in vivo* и *in vitro* с использованием систем млекопитающих и бактериальных клеток показали, что нитроглицерин не является генотоксикантом. При проведении теста Эймса нитроглицерин

даже может давать ложно-положительные результаты [12], поэтому мы этого теста не проводили.

Однако для уточнения отсутствия генотоксичности нитроглицерина на хромосомном уровне для *Danio rerio* мы провели микроядерный тест (МЯТ) на эритроцитах при окрашивании клеток крови акридиновым оранжевым.

Для выявления возможной генотоксичности на эритроцитах рыб был взят спектр концентраций 0,1; 0,5 и 1,0 мг/л (от допустимой концентрации (МДК) для рыб в сторону завышения и занижения). Результаты подсчета микроядер в эритроцитах крови рыб и данные о состоянии структуры ДНК в ядрах эритроцитов даны в таблице 3.

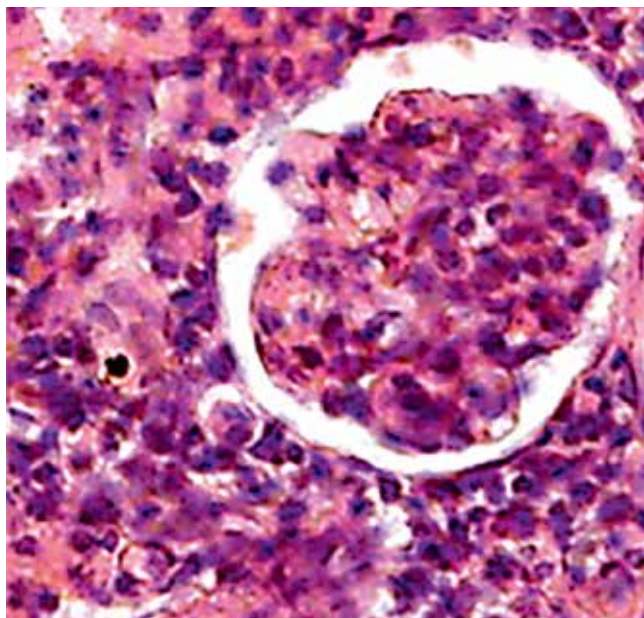
Ни одна из исследованных концентраций не вызывает увеличения частоты встречаемости микроядер эритроцитов и изменение флуоресценции ядер в контроле и опыте, что указывает на отсутствие мутагенности и сохранение в них структуры ДНК [11; 12].

Таким образом, за МДК, не вызывающую мутагенность на хромосомном и геномном уровне, следует принять концентрацию > 1,0 мг/л.

Ниже приводится сводная таблица 4, где указаны данные установленных МДК в органах и крови рыб *Danio rerio* по гистологическим и гематологическим показателям.

**Таблица 4.** Максимально допустимые концентрации растворов нитроглицерина в различных органах рыб при гистологических и гематологических исследованиях / **Table 4.** Maximum permissible concentration of nitroglycerine solutions in different fish organs determined by histological and hematological studies

Гистологические исследования после 30 суток:		Гематологические исследования после 30 суток:	
для печени	0,5 мг/л	Эритроциты периферической крови	0,5 мг/л
кишечника	1,0 мг/л	Лейкоцитарная формула (нейтрофилы)	0,5 мг/л
для почек	0,5 мг/л		
для жабр	1,0 мг/л		



**Рисунок 5.** Почечный клубочек у *Danio rerio* после воздействия в хроническом опыте нитроглицерина в концентрации в 1,0 мг/л (гематоксилин-эозин, ув. 15x 40)

**Figure 5.** Malpighian glomerulus of *Danio rerio* after chronic exposition to nitroglycerine at 1.0 mg/l concentration (hematoxylin eosin, 15 x 40 magnification)

### ВЫВОДЫ

1. Попадание нитроглицерина в естественные рыбохозяйственные водоемы может приводить к негативным последствиям для рыб, вызывая изменения органов и тканей, а также влиять на численность клеточных элементов в периферической крови рыб.

2. Наиболее чувствительными к действию нитроглицерина у данио являются печень и почки, в печени отмечаются гиперплазии печеночных клеток, а в почках – появление жидкости между почечным сосудистым клубочком и капсулой Боумена.

3. Показано, что водные растворы нитроглицерина не обладают генотоксичностью в исследуемых концентрациях на хромосомном уровне, и не вызывают увеличения количества микроядер и изменения структуры ДНК в ядрах эритроцитов.

4. Определенная в данной работе максимально допустимая концентрация (МДК) для нитроглицерина, равная 0,5 мг/л, одинаково может применяться для оценки токсичности, установленной как по гистологическим, так и по гематологическим показателям, и использованная при разра-

ботке ПДКрх нитроглицерина в воде рыбохозяйственных водоемов.

5. Необходимо разработать четкие методы контроля над поступлением нитроглицерина в водную среду, так как вероятность загрязнения водоемов нитроглицерином высока из-за его широкого применения в промышленности, фармакологии и обороне промышленности.

### ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ

1. Методические указания по установлению эколого-рыбохозяйственных нормативов ПДК и ОБУВ, (Приказ Росрыболовства от 04.08.2009 N 695 "Об утверждении Методических указаний по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения»), ВНИРО, 2009.

1. Metodicheskie ukazaniyam po ustanovleniyu ekologo-rybohozyajstvennyh normativov PDK i OBUV, (Prikaz Rosrybolovstva ot 04.08.2009 N 695 "Ob utverzhdenii Metodicheskikh ukazaniy po razrabotke normativov kachestva vody vodnykh ob'ektov rybohozyajstvennogo znacheniya»), VNIRO, 2009.

2. Husserl J - Biodegradation of nitroglycerin as a growth substrate: a basis for natural attenuation and bioremediation. Ph.D. Dissertation, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA. 2011.

3. Oketani, Y., Mitsuzono T, Ichikawa K., Itono Y, Gojo T, Gofuku M, Nagayoshi S., and. Kono N. - Toxicological studies on nitroglycerin //in book: Wildlife Toxicity Assessments for Chemicals of Military Concern, 1982. pp. 239-255.

4. Burton, D. T., Turley, S. D., and Peters, G. T.: Toxicity of Nitroguanidine, Nitroglycerin, Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine (RDX), and 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) to Selected Freshwater Aquatic Organisms.// University of Maryland, , Volume 76, pp 449-457, 1994.

5. Пирс Э. Гистохимия. М.: И.Л. 1962. 962 с.

5. Pirs E. Gistohimiya. M.: I.L. 1962. 962 p.

6. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: И.Л. 1954. 718 с.

6. Romejs B. Mikroskopicheskaya tekhnika. M.: I.L. 1954. 718 p.

7. Bardai C.K. Developmental toxicity of glyceryl trinitrate in quail embryos //Clin. Mol. Teratol. № 4: 2011.-p. 230-240.

8. Nipper M., Carr R.S, and Lotufo G.R. The release of explosives into the environment can occur during several stages of. // Aquatic Toxicology of Explosives. CRC Press. 2014, pp. 77-115.

9. Lotufo G. R - Ecotoxicity of Explosives// The available literature on the effects of explosive compounds to soil organisms. is scarce and has focused on the toxicity of TNT and its transformation.. U.S. Army Engineer Research and Development Center, Vicksburg, MS, USA. Article Outline. 2015.-109 с.

10. Kaplan, JH. Cornell, AM. Kaplan, Biodegradation of glycidol and glycidol nitrate.// Appl. Environ. Microbiol. 44, 1982, pp. 144-150.

11. Симаков Ю.Г. Методические рекомендации по определению мутагенности веществ при разработке ПДК в рыбохозяйственных водоемах. – М.: ВНИРО, 1997. 115 с.

11. Simakov YU.G. Metodicheskie rekomendacii po opredeleniyu mutagenosti veshchestv pri razrabotke PDK v rybohozyajstvennyh vodoemah. – M.: VNIRO, 1997. 115 p.

12. Симаков Ю.Г. Омельчук Н.Н. Воздействие бихромата калия на эритроциты *Brachydanio rerio*. Инновации и инвестиции. № 3, 2014. С. 239-241.

12. Simakov YU.G. Omel'chuk N.N. Vozdejstvie bihromata kaliya na eritrocit Brachydanio rerio. Innovacii i investicii. № 3, 2014. pp. 239-241.