

Отделение физиологии и радиологии Института по применению ядерной энергии  
сельском и лесном хозяйстве и ветеринарии,

З е м у н

*в кооперации с*

Лабораторией молекулярной биологии и эндокринологии

Института ядерной науки "Борис Кидрич"

В и н ч а – Б е л г р а д

и

Кафедрой судебной ветеринарной медицины Ветеринарного факультета

Белградского Университета,

Б е л г р а д

## **ОТЧЕТ ОБ ИССЛЕДОВАНИИ ПРЕПАРАТА АГРОСТЕМИН НА ТОКСИЧНОСТЬ**

*Декабрь 1978 года.*

**Р Е П Р И Н Т**

На основании результатов собственных исследований, документации производителя и информации из специальной литературы, получены следующие результаты и соображения о токсикологических свойствах препарата АГРОСТЕМИН.

**Название препарата:** АГРОСТЕМИН (описание патента № 32 749, Союзное патентное ведомство, СФРЮ).

**Состав препарата:** АГРОСТЕМИН является коммерческим названием препарата, состоящего из порошка куколя (*Agrostemma githago*) (50%) и других растений (культурных и сорняков).

Препарат представляет собой порошок желтовато-серого цвета. В воде растворяется слабо.

**Химический состав:**

|                               |                      |
|-------------------------------|----------------------|
| Алантион, %.....              | 25,90 <sup>*)</sup>  |
| Триптофан, %.....             | 10,90                |
| Фолиевая кислота, %.....      | 1,60                 |
| Глицин, %.....                | 0,42                 |
| Аланин, %.....                | 0,25                 |
| Аспарагиновая кислота, %..... | 0,51                 |
| Треонин, %.....               | 0,21                 |
| Серин, %.....                 | 0,24                 |
| Глутаминовая кислота, %.....  | 1,09                 |
| Пролин, %.....                | 0,24                 |
| Валин, %.....                 | 0,24                 |
| Изолейцин, %.....             | 0,18                 |
| Лейцин, %.....                | 0,35                 |
| Фенилаланин, %.....           | 0,20                 |
| <hr/>                         |                      |
| Алантииновая кислота, %.....  | 33,00 <sup>**)</sup> |
| Орциаланин, %.....            | 2,50                 |
| Аденин, %.....                | 5,00                 |

**Назначение:** АГРОСТЕМИН предназначен для стимуляции роста и развития растений алантиинового типа с целью количественного и качественного улучшения урожая.

**Производитель:** Лесоохотничье хозяйство «Олень», предприятие "Биопдукт", Князя Милоша 55, 11000, г. Белград, СФРЮ.

<sup>\*)</sup> Отчет № 15496 от 23 августа 1976 года от CIENTEC - FUNDACAO DE CIENCIA E TECNOLOGIA, Porto Alegre, Brazil.

<sup>\*\*)</sup> Описание патента № 32 749, Союзное патентное ведомство, СФРЮ.

**Цель исследования токсикологических свойств:** Вследствие того, что АГРОСТЕМИН плохо растворяется в воде, необходимые исследования с подопытными животными и клеточными культурами проведены быть не могли. Поэтому для исследований в основном применялся лиофилизированный водный экстракт АГРОСТЕМИНа. Этим путем был получен стерильный и легко растворимый в воде препарат. Количество этого препарата выражена в граммах начального веса препарата АГРОСТЕМИН.

Растворение препарата осуществлялось в стерильном бидистиллате воды непосредственно перед использованием. рН раствора во всех опытах составляла 6,9.

В отдельных исследованиях, как например, исследовании аккумуляции в пищевой цепи и деградации окружающей среды, препарат АГРОСТЕМИН смешивался с тальком в качестве наполнителя. Для исследования токсичности на рыбах АГРОСТЕМИН использовался без наполнителя.

## СО Д Е Р Ж А Н И Е

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ТОКСИКОЛОŠKA SVOJSTVA .....</b>   | <b>6</b>  |
| <b><i>ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ.....</i></b>  | <b>6</b>  |
| Определение ЛД <sub>50</sub> препарата, введенного крысам перорально .....   | 6         |
| Определение ЛД <sub>50</sub> препарата, введенного мышам перорально .....  | 6         |
| Определение ЛД <sub>50</sub> препарата, введенного кроликам через кожу .....                                       | 7         |
| Определение ЛД <sub>50</sub> препарата после однократной ингаляции в течении 1 часа крысам.....                    | 8         |
| <b><i>ХРОНИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ .....</i></b>  | <b>8</b>  |
| Исследование раздражающего действия препарата на глаза кролика .....   | 8         |
| Исследование раздражающего действия препарата на кожу кролика.....   | 9         |
| Исследование изменений в легких крысы и токсичности вследствие ингаляции аэрозоля препарата в течении 1 часа ..... | 9         |
| Исследование токсичности препарата, введенного перорально.....   | 10        |
| Исследование аккумуляции в пищевой цепи (токсическое действие деградированного продукта).....                      | 10        |
| Определение химическим путем содержания алантоина в люцерне, сое и подсолнечнике, обработанных АГРОСТЕМИНОМ .....  | 10        |
| Исследование токсичности люцерны, сои и подсолнечника, обработанных АГРОСТЕМИНОМ, на крысах .....                  | 11        |
| <b>ТЕСТИРОВАНИЕ ПРЕПЕРАТА НА МУТАГЕННОСТЬ И КАНЦЕРОГЕННОСТЬ .....</b>  | <b>12</b> |
| <b>ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРАТОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРЕПЕРАТА НА ЭМБРИОНЫ КРЫС .....</b>                                     | <b>14</b> |
| <b>ЧЕТЫРЕХДНЕВНЫЕ СТАТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТОКСИЧНОСТИ АГРОСТЕМИНА НА РЫБАХ (ŠARAN – КАРП) .....</b>               | <b>17</b> |
| <b>ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ АГРОСТЕМИНА НА ПОЧВУ .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>РАССМОТРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>  | <b>20</b> |
| <b>ОБЗОР РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРЕПЕРАТА АГРОСТЕМИНА НА ТОКСИЧНОСТЬ .....</b>                                   | <b>22</b> |
| <b>ВЫВОДЫ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>   | <b>24</b> |
| <b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>  | <b>25</b> |

**ТАБЛИЦЫ**

|   |    |
|---|----|
| <b>Таблица 1:</b> Исследование воздействия препарата на <i>S. typhimurium</i> TA100 «тарелочным» тестом                       | 13 |
| <b>Таблица 2:</b> Исследование воздействия препарата на <i>S. typhimurium</i> TA98 «тарелочным» тестом                        | 13 |
| <b>Таблица 3:</b> Результаты воспроизводства самок крыс, обработанных препаратом на 9 день и вскрытых на 21 день беременности | 15 |
| <b>Таблица 4:</b> Исследование влияния препарата, введенного внутривбрюшинно самкам на 9 день беременности на плод            | 16 |
| <b>Таблица 5:</b> Исследование химического состава почв обработанных и не обработанных АГРОСТЕМИНОМ                           | 19 |

## ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

### ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ

#### Определение ЛД<sub>50</sub> препарата, введенного крысам перорально

**Животные.** Крысы, Wistar, самки, живым весом  $227 \pm 14$  граммов. После адаптационного периода в 14 дней составлены 1 контрольная и 7 экспериментальных групп по 10 крыс. Во время эксперимента экспериментальные и контрольные животные содержались в отдельных помещениях.

**Обращение.** Животным однократно с помощью пластикового зонда в пустой желудок вводился раствор препарата дозами в 220, 440, 880, 1760, 3520, 7040 и 14080 мг на 1 кг живого веса.

С учетом растворимости препарата, большие объемы из числа вышеприведенных, не могли быть введены перорально крысам указанного живого веса.

Контрольным животным было введено соответствующее количество стерильной дистиллированной воды.

**Результаты.** В течение 14 и 30 дней не обнаружено изменений общего состояния, уменьшения живого веса или мертвых новорожденных у экспериментальных и контрольных крыс.

В конце опыта при вскрытии животных видимых изменений внутренних органов и тканей не обнаружено.

Патогистологическое исследование подопытных животных показало, что в большинстве внутренних органов и тканей подопытных крыс патологических изменений не имеется, за исключением нескольких экземпляров из экспериментальной и контрольной групп. У них обнаружены ограниченные дистрофические изменения на печени, распространение limforatikulohistiocitnih элементов в кишках или признаки хронической дистрофии наружной части коры (англ.: "cortex") с цилиндров почечных канальцев.

#### Определение LD<sub>50</sub> препарата, введенного перорально мышам

**Животные.** Мыши, самки, белые, живой вес  $26 \pm 2,1$  грамм. После адаптационного периода в 14 дней составлены 1 контрольная и 8 экспериментальных групп по 10 мышей.

**Обращение.** Животным однократно с помощью пластикового зонда в пустой желудок вводился раствор препарата дозами в 384, 768, 1536, 3072, 6144, 12288, 24576 и 49152 мг на 1 кг живого веса.

Контрольным животным было введено соответствующее количество стерильной дистиллированной воды.

**Результаты.** В течение 14 и 30 дней не обнаружено изменений общего состояния, уменьшения живого веса или мертвых новорожденных у экспериментальных и контрольных крыс.

В конце опыта при вскрытии животных видимых изменений внутренних органов и тканей не обнаружено.

Патогистологическое исследование животных показало, что в большинстве внутренних органов и тканей подопытных мышей нет патологических изменений, за исключением нескольких экземпляров, которые получили наименьшую дозу препарата – 384 мг на 1 кг живого веса. Ограниченные дистрофические изменения отмечены в печени и почках, а также отмечено распространение limfo–retikulohistiocitnih элементов, что нельзя приписать токсическому воздействию испытываемого препарата.

#### **Определение LD<sub>50</sub> препарата, введенного кроликам через кожу**

**Животные.** Кролики, самки, живой вес 2820 ± 230 грамм. После адаптационного периода в 14 дней шерсть на коже шеи со стороны спины побрита на поверхности примерно 25 см. Были составлены 1 контрольная и 4 экспериментальные группы по 10 кроликов.

**Обращение.** Водный раствор препарата, а также стерильная дистиллированная вода для контроля были нанесены на побритую кожу животных. Количество препарата, нанесенного на кожу животных составляла: 0,5, 1,0, 2,0 и 4,0 грамм, соответственно 173, 346, 692 и 1384 мг на 1 кг живого веса.

**Результаты.** В течении 1, 14 и 30 дней на обработанной коже экспериментальных и контрольных животных видимых патологических изменений, изменений общего состояния, уменьшения живого веса или гибели не обнаружено.

В конце эксперимента на коже, подкожных тканях, а также на внутренних органах препарированных животных видимых патологоанатомических и гистологических изменений не обнаружено.

Водный раствор препарата в течении 24 часов на кожу кролика раздражающего воздействия не оказал.

Способом абсорбции через кожу кролика препарат классифицирован как практически нетоксичный.

### **Определение LD<sub>50</sub> препарата после однократной ингаляции крысам в течение 1 часа**

**Животные.** Крысы Wistar, самки, живой вес  $236 \pm 28$  грамм. После адаптационного периода в 14 дней составлены 1 контрольная и 4 экспериментальные группы по 10 крыс.

**Методика.** Животные были обработаны аэрозолем препарата, растворенного в 10 мл стерильной дистиллированной воды. В течении 1 часа животные содержались в камере, концентрация препарата в которой составили: 0 (контрольная группа), 145, 290 и 580 мг на 1 м<sup>3</sup> воздуха. Мелкие капли раствора препарата и воды вводились в камеру при помощи аппарата "Fogmaster" модель 6208, производства США.

**Результаты.** В течении 14 и 30 дней после обработки изменения общего состояния или гибель контрольных и экспериментальных крыс не обнаружены.

В конце эксперимента на легких и внутренних органах препарированных животных видимых патологических изменений не обнаружено.

Гистологические исследования экспериментальных и контрольных животных показали, что в легких и других внутренних органах, а также тканях крыс патологических изменений нет. Однако, в тонком кишечнике экспериментальных и контрольных животных имеется распространение limfo-retikulohistiocitnih элементов.

### **ХРОНИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ**

#### **Исследование раздражающего действия препарата на глаза кролика**

**Животные.** Кролики, самки, живой вес  $2740 \pm 185$  грамм. После адаптационного периода в 14 дней, составлены 1 контрольная и 2 экспериментальные группы по 14 животных.

**Методика.** Животные обрабатывались один раз в день ежедневно в течении 15 дней стерильным 1 и 10% водным раствором препарата. Раствор препарата и дистиллированная вода (контрольная группа) всегда наносились в левый глаз, в то время как правый глаз служил для автоконтроля. В трех каплях жидкости находилось примерно 1 и 10 мг препарата.

**Результаты.** За время применения, а также последующих 60 и 180 дней, внешний вид конъюнктивы (*conjunctiva palpebralis*) и дна глазного яблока обработанного глаза экспериментальных и контрольных животных был нормальный.

После 2,5 и 6 месяцев с начала обработки по 7 животных из каждой группы было je препарировано. Патологоанатомические и гистологические



исследования показали, что на обработанном и контрольном глазах, как и на внутренних органах обработанных и необработанных животных видимых изменений нет.

### **Исследование раздражающего действия преперата на кожу кролика**

**Животные.** Кролики, самки, живой вес  $2910 \pm 215$  грамм. После адаптационного периода в 10 дней обрита шерсть с кожи спинной части шеи на участке размером примерно  $25 \text{ см}^2$ . Были созданы 1 контрольная и 4 экспериментальные группы по 14 кролика в каждой.

**Методика.** Водный раствор преперата, а также стерильная дистиллированная вода для контроля, наносились через день равномерно на обритую кожу животных. При каждой обработке количество преперата, нанесенного на кожу животных составляло: 0,5, 1,0, 2,0 и 4,0 грамма или, соответственно, 172, 344, 688 и 1376 мг на 1 кг живого веса. Животные были обработаны 8 раз.

**Результаты.** За время обработки в течении 16 дней, а также последующих 60 и 180 дней, на обработанной коже не обнаружены видимые патологические изменения, а также изменения общего состояния и живого веса экспериментальных и контрольных животных.

После 2,5 и 6 месяцев с начала обработки по половине животных из каждой группы была препарирована. На коже, подкожных тканях и внутренних органах видимых патологоанатомических и гистологических изменений не обнаружено.

### **Исследование изменений на легких крыс и токсичности вследствие ингаляции аэрозоля преперата в течении 1 часа**

**Животные.** Крысы Wistar, самки, живой вес  $265 \pm 16$  грамм. После адаптационного периода в 14 дней, созданы 1 контрольная и 4 экспериментальные группы по 20 животных.

**Методика.** Группы по 10 животных были обработаны аэрозолем преперата, растворенного в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Животные помещались на 1 час в камеру, концентрация препарата в которой составляла: 0 (контрольная группа), 145, 290 и 580 мг на  $1 \text{ м}^3$  воздуха. Крысы обрабатывались через день 8 раз.

**Результаты.** В ходе обработки и в течение последующих 60 и 180 дней, изменения общего состояния, уменьшение живого веса или гибель контрольных и экспериментальных животных на зафиксированы.

После 2,5 и 6 месяцев с начала обработки, препарированием животных видимых патологических изменений на легких и других внутренних органах не обнаружено.

Гистологические исследования показали, что в легких и других внутренних органах и тканях патологических изменений нет. Однако, в тонком кишечнике некоторых экспериментальных и контрольных животных имеется распространение limfo–retikulohistiocitnih элементов.

### **Исследование токсичности препарата, введенного цыплятам орально**

**Цыплята.** Для исследования использовались цыплята гибрида Ross в возрасте 8 дней, живой вес  $132 \pm 14$  грамм. Были созданы 1 контрольная и 4 экспериментальные группы 20 цыплят.

**Методика.** Водный раствор препарата вводился цыплятам орально с помощью резинового зонда, через день в течении 16 дней. Единичная доза препарата составляла: 0 (контрольная группа), 769, 1538, 3076 и 6152 мг на 1 кг живого веса цыпленка.

**Результаты.** За время применения, а также в течении последующих 60 и 180 дней, изменений общего состояния, уменьшение живого веса или гибели экспериментальных и контрольных цыплят не зафиксировано.

После 2,5 и 6 месяцев с начала обработки в пищеварительном тракте и внутренних органах обработанных и контрольных цыплят видимых патологоанатомических и гистологических изменений не обнаружено.

### **Исследование аккумуляции в пищевой цепи (токсическое действие деградированного продукта)**

Исследование аккумуляции АГРОСТЕМИНа в почве и, соответственно, в культуре растения, используемого для питания человека и животных, осуществлено следующим путем:

1. Присутствие алантоина в люцерне, сое и подсолнечнике, обработанных АГРОСТЕМИНом, определялось химическим путем;
2. Токсичность этих растений проверялась на крысах.

### **Определение алантоина в люцерне, сое и подсолнечнике, обработанных АГРОСТЕМИНом, химическим путем**

**Материал.** Определение количества алантоина проводилось на люцерне, сое и подсолнечнике. Высушенные при температуре  $65^{\circ}\text{C}$  подсолнечник и люцерна перемолоты и диспергированы в дистиллированной воде в пропорции 1:10, а соевая мука – в пропорции 1:5. Экстракция проводилась в течении 2 часов при комнатной температуре при помешивании. Суспензия, после выжимания

через несколько слоев марли фильтрации, подвергнута центрифугированию на скорости 25.000 об/мин в течении 30 мин. Лиофилизированный материал был использован для определения содержания алантоина по методу Fink (1963) и Vrbaški (1974).

**Результаты.** Описанные исследования содержания алантоина в люцерне, сое и подсолнечнике, обработанных АГРОСТЕМИНОм, а также в контрольной группе, показали, что с использованием методик упомянутых авторов, в исследованных растениях не подтверждено увеличение содержания алантоина вследствие применения АГРОСТЕМИНА.

#### **Исследование токсичности люцерны, сои и подсолнечника, обработанных АГРОСТЕМИНОм, на крысах**

**Животные.** Крысы Wistar, самки, живой вес  $127 \pm 12$  грамм. После адаптационного периода в 14 дней созданы две группы – экспериментальная и контрольная, по 10 животных. Подготовленную пищу в виде порошка и воду животные принимали *ad libitum*.

Для приготовления пищи животным из экспериментальных групп были использованы обработанные соя, люцерна и подсолнечник. Они, как и растения, которые не были обработаны АГРОСТЕМИНОм (контрольная группа), сначала в течение двух дней были высушены при температуре  $65^{\circ}\text{C}$ . После этого соя была обработана при температуре  $105^{\circ}\text{C}$  в течение 2 часов. Остальная пища из рациона является продукцией комбикормовых заводов.

**Результаты.** Кормление крыс пищей, содержащей 30% продуктов, предварительно обработанных АГРОСТЕМИНОм в течение 6 месяцев, не привела к изменению состояния, уменьшению живого веса и гибели животных.

В конце эксперимента, во внутренних органах и тканях препарированных экспериментальных и контрольных крыс видимые патологоанатомические и гистологические изменения не обнаружены.

#### **Состав пищи:**

| <b>Продукты</b> | <b>%</b> |
|-----------------|----------|
| Кукуруза        | 55,0     |
| Соя             | 10,0     |
| Подсолнечник    | 10,0     |
| Люцерна         | 10,0     |
| Рыбная мука     | 10,0     |
| NaCl            | 0,5      |
| Премиксы        | 1,5      |
| Дрожжи          | 3,0      |

## ТЕСТИРОВАНИЕ ПРЕПЕРАТА НА МУТАГЕННОСТЬ / КАНЦЕРОГЕННОСТЬ

Мутагенное/канцерогенное действие препарата исследовалось применением микробиологического теста Ames (1971., 1973., 1975.). Тест на *Salmonella typhimurium* был адаптирован для обнаружения потенциальных канцерогенов/мутагенов добавлением в экспериментальную систему долей печени крыс, содержащих микросомальные ферменты, осуществляющие превращение потенциальных канцерогенов в активную форму (метаболическая трансформация), Ames, 1971.

Определение мутагенов без активации и с метаболической активацией осуществлено с помощью "spot"-теста, быстрого и качественного, а также качественного «тарелочного» теста.

**Методика.** Раствор препарата концентрацией 0,07, 0,7, 7,0 и 35,0 мг, добавлялся в смесь, содержащую микросомальные ферменты (+S9"mix"), или без них (-S9"mix"). После инкубации в течение 15 минут при температуре 37°C смесь добавлялась в агар-агар, который содержит необходимую культуру *S. typhimurium*. Количество мутантных бактерий определялось после 3 дней инкубации при 37°C. Количество спонтанных ревертантов определялось в чашках Петри, в которые препарат не добавлялся. Acetilaminofluoren (2AAF), использован для положительного контроля. Пробы дублированы и повторены три раза.

**Результаты.** Результаты, приведенные в таблицах **Таблица 1** и **Таблица 2**, указывают на мутагенную активность препарата при отсутствии метаболической активации. Большие концентрации препарата: 7 мг/чашка Петри индуцируют 915 His<sup>+</sup> ревертантов в сою TA100, что указывает на то, что препарат АГРОСТЕМИН является мутагеном типа "missense". Индукция ревертанта 80 Ris<sup>+</sup> с 35 мг/чашка Петри в сою TA98 показывает, что препарат весьма слабо мутагенен и относится к типу "frameshift". В присутствии энзима микросомальной фракции печени крыс и метаболической активации доходит до потери мутагенного действия препарата АГРОСТЕМИН и количество ревертанта снижается до уровня спонтанных ревертантов или незначительно растет.

В исследовании со "spot" – тестом получена положительная мутагенная реакция в присутствии и отсутствии S9"mix" с относительно низкими концентрациями препарата. В тесте "plate" мутагенная реакция констатирована для высоких концентраций в отсутствие метаболических активаций и сои, которая носит плазмид.

Препарат, в весьма высоких концентрациях, в промежутке от 0,7 до 35 мг/чашка Петри, при отсутствии метаболической активации, идентифицирован с помощью теста Ames как мутагенный агент.

Важно подчеркнуть исчезновение мутагенной активности препарата в присутствии метаболической активации, что демонстрирует весьма эффективную детоксификацию в клетках млекопитающих.

**Таблица 1:** Исследование на тесте "plate" действия препарата на *S. typhimurium* TA100

| Концентрация<br>мг/чашка Петри | Метаболическая<br>активация (S9"mix") | His <sup>+</sup> ревертант/чашка<br>Петри |
|--------------------------------|---------------------------------------|---|
| 0,07                           | –                                     | 20  |
|                                | +                                     | 5   |
| 0,70                           | –                                     | 74  |
|                                | +                                     | 16  |
| 7,00                           | –                                     | 915                                       |
|                                | +                                     | 66  |
| 35,00                          | –                                     | 2.736                                     |
|                                | +                                     | 27  |

Число His<sup>+</sup> ревертантов уменьшено на число спонтанных ревертантов.

**Таблица 2:** Исследование на тесте "plate" действия препарата на *S. typhimurium* TA98

| Концентрация<br>мг/чашка Петри | Метаболическая<br>активация (S9"mix") | His <sup>+</sup> ревертант/чашка<br>Петри |
|--------------------------------|---------------------------------------|---|
| 0,07                           | –                                     | 16  |
|                                | +                                     | 13  |
| 0,70                           | –                                     | 27  |
|                                | +                                     | 0   |
| 7,00                           | –                                     | 13  |
|                                | +                                     | 7   |
| 35,00                          | –                                     | 80  |
|                                | +                                     | 5   |

Число His ревертантов уменьшено на число спонтанных ревертантов.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРАТОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРЕПЕРАТА НА ЭМБРИОНЫ КРЫС

**Животные.** Крысы *Albino*, самки, живой вес  $235 \pm 16$  грамм.

**Методика.** исследования проводились на беременных самках. Препарат, растворенный в 0,9% NaCl, вводился внутривбрюшинно на 9 день беременности дозами в 10, 100 и 1.000 грамма, а также 10, 100 и 500 мг на 1 кг живого веса. Контрольной группе беременных самок вводился 0,9% раствор NaCl.

Экспериментальные и контрольные самки препарированы на 21 дне беременности, т.е. за день до ожидаемого появления жесткости. Была определена телесная масса, вес интактной матки, число желтых тел яичника (Cl) и имплантация плода (живых и мертвых). У плода определялся пол, живой вес, а также он внимательно осматривался на предмет обнаружения видимых наружных и внутренних пороков развития. Вычислены до- и послеимплантационные потери плода.

**Результаты.** Испытанные дозы препарата не продемонстрировали действия на выживаемость беременных самок, кроме дозы в 500 мг на 1 кг живого веса, которая привела к гибели около 50% беременных самок в течение 24 часов после введения препарата.

На основании данных из **Таблицы 3** и **Таблицы 4** можно заключить, что препарат не оказывает негативного эффекта на репродуктивные качества и собственно плод в дозах меньших, чем 500 мг/кг, а две беременные самки выжили, даже после обработки такой большой дозой. Отклонения, обнаруженные внутри обработанных и контрольных групп (мертвый плод, поздняя ресорбция) являются случайностью, а не эффектом действия введенного препарата.

| Доза на кг<br>живого<br>веса | Число<br>крыс | Среднее значение/беременные крысы |              |      |             |           |                |               |                  | %<br>смертности     |  |
|------------------------------|---------------|-----------------------------------|--------------|------|-------------|-----------|----------------|---------------|------------------|---------------------|--|
|                              |               | вес                               | вес<br>матки | CL   | имплантация | ресорпция | мертвы<br>плод | живой<br>плод | до<br>имплантац. | после<br>имплантац. |  |
| 10 грамм                     | 6             | 332                               | 58,5         | 11,7 | 10,0        | 1,2       | 0,3            | 8,5           | 14,28            | 11,67               |  |
| 100грамм                     | 6             | 301                               | 68,3         | 10,7 | 9,5         | 0,7       | 0,0            | 8,8           | 10,93            | 7,01                |  |
| 1000 грамм                   | 7             | 289                               | 59,5         | 10,7 | 10,0        | 0,1       | 0,0            | 9,9           | 6,67             | 1,43                |  |
| 10 мг                        | 7             | 303                               | 59,6         | 11,7 | 10,1        | 0,7       | 0,0            | 9,4           | 13,41            | 7,04                |  |
| 100 мг                       | 8             | 297                               | 63,8         | 12,1 | 11,0        | 0,4       | 0,0            | 10,6          | 9,27             | 3,41                |  |
| 500 мг                       | 2             | 362                               | 71,7         | 13,5 | 11,5        | 0,5       | 0,0            | 11,0          | 14,82            | 4,54                |  |
| NaCl 0,9%                    | 7             | 340                               | 62,3         | 11,4 | 9,5         | 0,1       | 0,0            | 9,4           | 16,25            | 1,49                |  |

**Таблица 3:** Результаты репродукции самок крыс, обработанных препаратом на 9 день и препарированных на 21 день беременности

| Доза на/кг<br>живого<br>веса | Число<br>крыс | Число зародышей |         |         |         | Вес плода,<br>Гр ±SD |          |
|------------------------------|---------------|-----------------|---------|---------|---------|----------------------|----------|
|                              |               | на крысу        |         | всего   |         | мужских              | женских  |
|                              |               | мужских         | женских | мужских | женских |                      |          |
| 10 грамм                     | 6             | 4,0             | 4,8     | 24      | 29      | 5,3±0,36             | 4,9±0,30 |
| 100 грамм                    | 6             | 4,7             | 4,2     | 28      | 25      | 4,9±0,85             | 4,6±0,62 |
| 1000<br>грамм                | 7             | 5,3             | 4,6     | 37      | 32      | 4,7±0,64             | 4,5±0,34 |
| 10 мг                        | 7             | 5,0             | 4,4     | 35      | 31      | 5,2±0,42             | 5,0±0,42 |
| 100 мг                       | 8             | 4,7             | 5,9     | 38      | 47      | 4,7±0,51             | 4,5±0,48 |
| 500 мг                       | 7             | 5,0             | 6,0     | 10      | 12      | 5,1±0,49             | 4,8±0,36 |
| NaCl 0,9%                    | 7             | 3,9             | 5,6     | 27      | 39      | 5,0±0,34             | 4,7±0,34 |

**Таблица 4:** Исследование влияния препарата, введенного внутривбрюшинно самкам на 9 день беременности, на плод



### ЧЕТЫРЕХДНЕВНЫЕ СТАТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТОКСИЧНОСТИ АГРОСТЕМИНА НА РЫБАХ (*Šaran* – КАРП)

Препарат АГРОСТЕМИН испытан на токсичность на карпе (*Cyprinus carpio*) живым весом  $104 \pm 12$  грамм.

**Методика.** Здоровая рыба содержалась в условиях эксперимента в течении 3 дней до его начала.

В одинаковые пластиковые ванны налито по 12,5 литров не хлорированной воды. В воду подан воздух так, что концентрация растворенного кислорода составила около 5 мг/л (5 ppm). Температура воды колебалась от 19 до 20°C. рН чистой воды равнялся 7,0, а воды в ваннах, в которые был добавлен АГРОСТЕМИН – от 7,4 до 7,6.

Суспензия малорастворимого АГРОСТЕМИНа была добавлена в воду в следующих концентрациях: 10, 100, 250 и 500 ppm.

Каждая группа состояла из 10 рыб.

Исследования регулярности дыхания, плавания, глотания воздуха, реакции на раздражение и смертности проводились через 1–6, 24, 48, 72 и 96 часов. По завершении эксперимента на рыбах проведено их патологоанатомическое исследование.

**Результаты.** За все время исследования рыбы, которые находились в воде с АГРОСТЕМИНОм, вели себя так же, как и в контрольной группе. Дозы препарата от 10 до 500 ppm не привели к гибели рыбы и не вызвали у нее видимых патологоанатомических изменений.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ АГРОСТЕМИНА НА ПОЧВУ

Образцы почвы взяты с необработанных и обработанных под посевы полей с большого количества точек, с одинаковой глубины и объединены в один репрезентативный образец.

Почва высушена воздухом, измельчена, хорошо перемешана, после чего взято 250 грамм для помола. Частицы перемолотой почвы были менее 0,2 мм.

Определение общего содержания азота проведено методом Къельдаля по Дж. М. Бремнеру (1965). Общее содержание азота выражено в процентах.

Определение минерального вида азота: аммиачный, нитратный и нитридный, выполнено на почве, предварительно подготовленной по методу Бремнера (1965).

Определение легкодоступного фосфора и калия в почве проведено по методу Егнера–Риема. Экстракция доступного фосфора и калия осуществлена с соответствующим раствором AL–аммония–лактата. В полученном экстракте содержание фосфора определено на спектрофотометре, а калия – на атомном абсорбере.

Определение рН почвы осуществлено в воде и 1N KCl. 10 гр воздушно–сухой почвы пролито 25 мл воды или 25 мл 1N KCl (1:2,5), затем перемешано в течение примерно 30 минут, после чего определено рН на рН – метре (27 радиометр Copenhagen со стеклянным и каломельным электродом).

**Результаты.** Результаты определения химического состава почвы (Таблица 5) показывают, что исследованный препарат в дозах до 1 грамма на гектар почвы, не привел к значительным изменениям в исследованных параметрах почвы, которая предварительно в течение примерно 2,5 месяцев обрабатывалась АГРОСТЕМИНОМ, по сравнению с необработанной.

| Наименование образца  | Глубина | Общий N<br>% | NH <sub>4</sub> -N<br>мг/кг | (NO <sub>3</sub> +NO <sub>2</sub> )-N<br>мг/кг | P <sub>2</sub> O <sub>5</sub><br>мг/100г | K <sub>2</sub> O<br>мг/100г | H <sub>2</sub> O<br>рН | (1:2,5)<br>KCl |
|-----------------------|---------|--------------|-----------------------------|--|--|-----------------------------|------------------------|----------------|
| Паприка обработанная  | 20      | 0,19         | 4,2                         | 6,3  | 18,0                                     | 38,5                        | 8,32                   | 7,39           |
| Паприка контрольная   | 20      | 0,18         | 4,3                         | 2,8  | 14,6                                     | 31,3                        | 8,32                   | 7,30           |
| Паприка обработанная  | 40      | 0,16         | 3,5                         | 2,8  | 11,9                                     | 33,3                        | 8,40                   | 7,40           |
| Паприка контрольная   | 40      | 0,17         | 5,7                         | 4,9  | 9,7                                      | 29,0                        | 8,30                   | 7,35           |
| Люцерна обработанная  | 20      | 0,23         | 6,4                         | 9,2  | 22,1                                     | 36,6                        | 8,15                   | 7,25           |
| Люцерна контрольная   | 20      | 0,20         | 4,9                         | 8,4  | 24,3                                     | 32,8                        | 8,28                   | 7,22           |
| Люцерна обработанная  | 40      | 0,20         | 5,3                         | 7,8  | 18,2                                     | 32,8                        | 8,20                   | 7,30           |
| Люцерна контрольная   | 40      | 0,20         | 5,4                         | 5,4  | 17,0                                     | 27,9                        | 8,25                   | 7,38           |
| Кукуруза обработанная | 20      | 0,22         | 4,2                         | 8,4  | 14,6                                     | 30,3                        | 8,18                   | 7,38           |
| Кукуруза контрольная  | 20      | 0,21         | 5,3                         | 3,5  | 13,0                                     | 31,3                        | 8,20                   | 7,30           |
| Кукуруза обработанная | 40      | 0,20         | 4,3                         | 8,1  | 7,4                                      | 26,0                        | 8,25                   | 7,45           |
| Кукуруза контрольная  | 40      | 0,20         | 4,3                         | 6,4  | 10,0                                     | 27,9                        | 8,30                   | 7,42           |

**Таблица 5:** Исследование химического состава  
**ца 5:** Исследование химического состава почвы,

## ОБЗОР РЕЗУЛЬТАТОВ И ДАННЫХ ИЗ ЛИТЕРАТУРЫ

АГРОСТЕМИН базируется на алапатическом действии, в первую очередь куколя, начиная от предварительных испытаний Харпера и Гаича (1961г.), которые показали, что при определенных условиях жизнеспособность куколя заметно больше, когда он растет вместе с пшеницей и сахарной свеклой. Это и другие исследования основаны на уже давно известных результатах и теориях De Candolle (1831), Schreiner (1909), Molisch (1937), Кнарр (1954), Grummer (1955) и Rademacher (1960), которые утверждают, что метаболиты из отдельных частей растений могут оказывать физиологический эффект на развитие и рост растительного сообщества.

**Метаболизм активного принципа.** Механизм химического алапатического взаимодействия в звене биотической системы – окружающая среда и наоборот выражается в успешном биогенезе в цепи химических веществ: алантоин – свободный триптофан– индол уксусной кислоты (Wightman, 1962). Такая цепь ведет к большему аккумулярованию алантоина, триптофана и  $P_2O_5$ , а также фитогенных экзометаболитов (Gajić и Vrbaški, 1972; Gajić, 1977). Это создает большую стабильность ценотических отношений (Margalef, 1962 – процитировано по Cum, 1971).

**Деградация окружающей среды.** С учетом того, что растения очень быстро поглощают АГРОСТЕМИН с его базовой субстанцией, не обнаружено присутствия его остатков в окружающей среде. По результатам исследований Gajić и сотрудников (1977), можно заключить, что алантоин и триптофан появляются в результате биогенеза в самой окружающей среде.

**Стойкость в окружающей среде.** Поскольку АГРОСТЕМИН очень быстро инкорпорируется в биотическую систему (например, в зародыши пшеницы – за 23 минуты) (Gajić, 1978), уже за относительно короткое время после применения его невозможно обнаружить.

**Токсичность деградированного продукта.** Проведены химические исследования наличия алантоина в люцерне, сое и подсолнечнике, которые после прорастания в раннем периоде были обработаны АГРОСТЕМИНОМ, а также исследования на крысах, которые потребляли пищу, содержащую 30% этих продуктов. Результаты отрицательные и не продемонстрировали токсического воздействия на подопытных животных.

**Токсикологические свойства препарата.** В своих исследованиях Živković (1976) и Soldatović (1976), на HeLa и клетках человеческой

эмбриональной ткани показали, что дозы АГРОСТЕМИНа в 1, 10 и 100 мг/мл токсического воздействия не оказали.

В многолетних исследованиях на опытных полях разных сортов пшеницы, обработанных АГРОСТЕМИНОм, на первом году эксперимента изменений морфологическо–сортовых свойств не обнаружено. Эксперименты проводились в Институте биологии в Белграде (Гајић и сотрудники).

Сортовые свойства еще более подчеркнул, мутагенно–тератогенных изменений нигде не обнаружено.

| <b>Название сорта:</b> | <b>Длительность испытаний</b> |
|------------------------|-------------------------------|
| Bankut 1205            | с 1956 по 1977 год            |
| Sava                   | с 1971 по 1976 год            |
| Bezostaja              | с 1971 по 1976 год            |
| Libelula               | с 1958 по 1960 год            |
| San Pastore            | с 1958 по 1960 год            |

**Специфические антитоды и меры первой помощи.** С учетом того, что препарат в исследованных дозах не показал токсических свойств, за исключением дисперсного действия на центральную нервную систему крыс, обработанных внутрибрюшинно большими дозами, и мутагенным действием на *Salmonella typhimurium* без метаболической активации, то кроме строгого применения санитарно–технических норм при производстве и применении препарата других терапевтических мер не требуется.

## ОБЗОР РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТА АГРОСТЕМИН НА ТОКСИЧНОСТЬ

1. **Острый оральный LD<sub>50</sub> на крысах.** Препарат даже в наибольшей исследованной дозе в 14.080 мг на кг живого веса не действовал летально.
2. **Острый оральный LD<sub>50</sub> на мышах.** Препарат даже в наибольшей исследованной дозе в 49.152 мг на кг живого веса не действовал летально.
3. **Острый LD<sub>50</sub> через кожу кролика.** Препарат даже в наибольшей исследованной дозе в 1.384 мг на кг живого веса не действовал раздражающе на кожу или летально на кроликов.
4. **Острый LD<sub>50</sub> при ингаляции крысам.** Однократная ингаляция аэрозоля препарата в течение 1 часа с наибольшей дозой в 580 мг на 1 м<sup>3</sup> воздуха не воздействовала токсично.
5. **Раздражающее действие на глаза кролика.** Нанесение водного раствора препарата в течение 15 дней дозой в 1 и 10 мг в день, не действовало раздражающее на глаза, а 6 месяцев испытаний не привели к патологическим изменениям.
6. **Раздражающее действие на кожу кролика.** Нанесение водного раствора препарата 8 раз в течение 16 дней при наибольшей исследованной дозе в 1.376 мг на кг живого веса не привело к патологическим изменениям на коже кролика.
7. **Токсическое действие при ингаляции крысам.** Ингаляция препарата 8 раз в течение 16 дней длительностью в 1 час при наибольшей испытанной дозе в 580 мг на 1 м<sup>3</sup> воздуха, не привела к патологическим изменениям у крыс.
8. **Токсическое действие препарата, введенного перорально цыплятам.** Препарат введен перорально 8 раз в течение 16 дней и при наибольшей исследованной дозе в 6.152 мг на кг живого веса не воздействовал токсично на цыплят.
9. **Исследование аккумуляции АГРОСТЕМИНА в пищевой цепи.** Химическим анализом люцерны, сои и подсолнечника, обработанных АГРОСТЕМИНОм в дозе в 1.000 мг на гектар почвы, не найдено повышенного содержания алантоина относительно необработанных растений.

Кормление крыс пищей с 30% содержанием люцерны, сои и подсолнечника, обработанных АГРОСТЕМИНОМ, за 6 месяцев эксперимента не привело к патологическим изменениям.

**10. Тестирование препарата на мутагенность/канцерогенность.**

Препарат в очень высоких концентрациях, от 0,7 до 35,0 мг/чашка Петри на *Salmonella typhimurium*, без метаболической активации, идентифицирован как мутаген. В присутствии микрозомальных энзимов печени крыс при метаболической активации мутагенная активность препарата исчезает.

**11. Тератогенный эффект на эмбрионы крыс.** Препарат вводился крысам внутривбрюшинно на 9 день беременности, и в наибольшей исследованной дозе в 500 мг на кг живого веса, не продемонстрировал тератогенного действия на эмбрионы крыс.

**12. Токсичность АГРОСТЕМИНА на рыбу,** четырехдневные статические исследования на карпе показали, что дозы АГРОСТЕМИНА в 10, 100, 250 и 500 ppm, летально не действовали.

**13. Действие АГРОСТЕМИНА на почву.** Исследование химического состава почвы (общего и минерального видов азота, фосфора и калия) показало, что АГРОСТЕМИН не привел к значительным изменениям в значениях исследованных параметров почвы, которая предварительно в течение примерно 2,5 месяцев обрабатывалась АГРОСТЕМИНОМ в количествах 1.000 мг на гектар, по сравнению с необработанной почвой.

## ВЫВОДЫ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов исследований, данных из документации производителя и использованной специальной литературы, можно сделать вывод, что исследованный препарат получен экстракцией из агростемина и лиофилизацией, как и натуральный агростемин, и в очень больших дозах не воздействует летально на использованных подопытных животных и не наносит вреда окружающей среде.

Считаем, что АГРОСТЕМИН, при строгом соблюдении норм гигиеническо-технической защиты во время производства и применения не представляет опасности для здоровья людей и животных.

По нашему мнению препарат может использоваться по назначению в количествах, рекомендованных производителем, т.е 1,0 грамм препарата без наполнителя на 1 гектар почвы.

г. Белград,  
25 декабря 1978 года.

РУКОВОДИТЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЙ,

  
др. Чедомир Русов, СНС



## ЛИТЕРАТУРА

- Ames, B.N., Ch. Yanofski:** *In Chemical Mutagens, ed. A. Hollander, I, 267, 1971.*
- Ames, B.N., W.E. Durston, E. Yamasaki, F.D. Lee:** *Proc. Natl. Acad. Sci., 70, 2281, 1973.*
- Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki:** *Mut. Res 33, 27, 1975.*
- Fink, K., Clino, R.E., Fink, M.R.:** *Anal. Chem. 35, 389, 1963.*
- Gajić, D.:** *Jour. for Scientific Agricultural Research 19, 66, 63:96, 1966.*
- Gajić D., Vrbaški, M., Vrbaški, S.:** *Fragmenta herbologica jugoslavica II, 5–16, 1977.*
- Gajić, D.:** *Usmeno saopštenje, 1977. i 1978.*
- Garzičić, B., Živković, S.:** *Izveštaj o dejstvu zoostemina na HeLa ćelije in vitro. Institut za biološka istraživanja, Univerzitet u Beogradu, 1976.*
- Grommer, G.:** *Die gegenseitige Beeinflussung hoherer Pflanzen–Allelopatie–Jena: Fischer, 1955.*
- Hartman, F.E. X. Levine, Z. Hartman, H. Berger:** *Science 172, 1058, 1971.*
- Hansen, E.O. Meyer:** *Toxicology 10, 195, 1978.*
- Harper, J.L., Gajić, D.:** *Weed Research 1,2, 91–104, 1961.*
- Knapp, R.:** *Experimentelle Sociologie der höheren Pflanzen, Stuttgart, 1954.*
- Molisch, H.:** *Der Einfluss einer Pflanze auf die andere: Allelopatie, Jena, 1937.*
- Cum, P.E.:** *Fundamentals of Ecology, 3th ed, New York, 1971.*
- Rademacher, B.:** *Fragen der Unkrautkonkurrenz, Tagungsberichte. Deutsche Akademie Landwirtschaftswissenschaften su Berlin, 33, 1960.*
- Schreiner, S., Reed, H.S.:** *The toxic action of certain organic plant constituents, Botanical Gazette, Chicago, 45, 73–102, 1908.*
- Schreiner, S., Shoory, E.C.:** *The isolation of harmful organic substances from soils, Botanic gazette, Chicago, 53, 1909.*
- Soldatović, B.:** *Izveštaj o ispitivanju efekta АГРОСТЕМИНА на sisarske ćelijske populacije in vitro. Institut za biološka istraživanja, Univerzitet u Beogradu, 1976.*
- Vrbaški, M.:** *Hemijsko–biološka identifikacija bioregulatora u semenu Agrostemma githago, magistarska teza, Prirodnomatematički fakultet, Univerzitet u Beogradu, 1974.*
- Wightman, F.:** *Can. J. Botany, 40, 689–718, 1962.*
- Wilsca, J. G., H. C. Jordan, R.L. Brent:** *An. J. Anat., 92, 153, 1953.*
- Wilson:** *In Teratology, Principles and Techniques, Ed. Univ. Chicago Press, 251, 1965.*  
*SIENFEC–Fundacao de ciencia e tecnologia, izveštaj № 15496, Porte Alegre, Brazil, 1976.*  
*Союзное патентное ведомство СФРЮ, №j 32749, 1974 г.*