

Московский ордена Трудового Красного Знамени и
ордена Ленина государственный университет им. Ломоносова

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Слава Эйжен Эйженович

БИОФИЗИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВОДНОЙ ТОКСИКОЛОГИИ

Д и с с е р т а ц и я
на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель

Кандидат биологических наук

М. М. Т е л и т ч е н к о

Москва - 1973

С о д е р ж а н и е

Введение

1 Обзор литературы

1. Основные направления токсикологических исследований ... 3
2. Структура мембран эритроцитов и факторы, определяющие ее стабильность 8
3. Теоретические предпосылки гемолиза эритроцитов.....13
4. Окислительные процессы в биосубстратах17
5. Механизм высвечивания биолюминесценции и хемиллюминесценции20
6. Общая характеристика гербицидов монурона, диурона (производные мочевины) и 2,4 Д натриевой соли 29

II М а т е р и а л и м е т о д ы 40

- а) метод кислотных эритрограмм и его модификации 43
- б) люминесцентная измерительная установка 46
- в) измерение хемиллюминесценции люминольной системы.... 48
- г) порядок измерения системы люциферин-люцифераза 49
- д) метод определения активности дрожжевой гексакиназы в присутствии монурона, диурона и 2,4 Д Na 50
- е) статистическая обработка результатов 52

III Экспериментальная часть

- 1 Влияние монурона, диурона и 2,4 Д Na на эритропоэз карпов и деструктивное действие гербицидов на эритроциты человека и рыб.....53
 - а) влияние гербицидов монурона, диурона, 2,4 Д Na на эритроциты карпа60

б) гемолиз эритроцитов под влиянием γ -капролактама...	65
2. Изучение действия монурона, диурона и 2,4 D Na на хе- миллюминесцентную модельную систему люминола	66
3. Влияние монурона, диурона и 2,4 D Na на мембраны клеток хлореллы	78
4. Действие монурона, диурона и 2,4 D Na на билюмине- сцентную реакцию люциферин - люцифераза и на отдель- ные ее компоненты	82
5. Влияние монурона, диурона и 2,4 D Na на ингредиенты реакции фосфорилирования глюкозы	86

1У Обсуждение результатов..91

Выводы

Список литературы

В В Е Д Е Н И Е

Загрязнение внутренних водоемов гербицидами является неизбежным следствием широкого применения их в сельском хозяйстве. По мере накопления фактов становится ясным, что воздействие пестицидов обнаруживается на уровнях экологическом, организменном, клеточном и, наконец, молекулярном. Видимо, первым наиболее уязвимым звеном являются нарушения в течении молекулярных процессов и ультраструктурных превращений в клетках.

Вот почему изучение воздействия пестицидов осуществляется водной токсикологией преимущественно на трех уровнях, и, как следствие, на уровне экосистемы (Брагинский Л.П., 1972). Сейчас уже можно с уверенностью утверждать, что водные экосистемы более устойчивы к токсикантам, чем отдельные входящие в них организмы. Сказанное отражает история развития водной токсикологии. Первые эксперименты в этой области приводили по прямому отравлению рыб (Jones I., 1957, Hughes J. Davis I. 1963). Затем, изучали воздействие токсических агентов на разные стадии онтогенеза (Поликарпов Г.Г., Иванов В.Н., 1961, Hiltibran R., 1967 Самылин А.Ф., 1970, Корде Б.А., 1971) размножение (Шербань Э.П., 1971, Кокина И.Я., 1971), эритропоэз и систему крови рыб (Строганов Н.С., Пажитков А.Т., 1941, Телитченко М.М., Говорова М.Ф., 1962, Комаровский Ф.Я., Попова Г.В., 1969), на физиологические механизмы (Дукьяненко В.И., 1963-1967) и процессы дыхания (Буря В.Ф., 1967, Веселов Е.Н., 1967,

Kretschmar G. Günter G. 1970).

Наконец, констатировали изменения в биохимических процессах (Звиргзде Ю. и др., 1971) и структурных компонентах клеток — белках, липидах, АТФ (Балтбарядис З.Я. и др., 1968, Сидоров В.С. и др. 1969, Фреймане Т.Х. и др. 1971).

Особую остроту приобретают определения ранних симптомов токсикозов и обнаружение связи между химической структурой пестицида и степенью его токсичности.

В этой связи, целью нашей работы было выяснение на моделях механизма действия на рыб гербицидов—монурона, диурона и 2,4D_{Na}, а также определение общих закономерностей влияния токсикантов.

Выбор гербицидов в значительной мере определялся незначительными различиями в их химической структуре, позволяющей определить существует ли зависимость между последней и токсичностью препаратов. Следует отметить, что указанные вещества широко применяются в практике, а механизм их биологического действия далеко не ясен.

Обзор литературы

I. ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате широкого использования пестицидов в сельском хозяйстве происходит их усиленная миграция и накопление в природных средах, в том числе в гидросфере (Брагинский Л.П., 1972).

Имеются многочисленные работы, посвященные изучению токсического действия пестицидов на разных уровнях организации жизни (Edson E. 1958, Maloney T.E. 1958, Frank P.A. Grizzel R. Hambrig R.N. Holden A. 1962, Брагинский Л.П., 1963, Строганов Н.С. 1964, Walker C.R. 1965, Lüdemann D. 1966, Lüdemann D. Kayser H. 1966, Smith O.E. 1967, Ball J. 1968, Swarson C.R. 1968, Zweig O. et al. 1968, Pierce M.F. 1969, Комаровский Ф.Я. Попова Г.В. 1969, Лесников Л.А. 1970, Брагинский К.К. 1970 и др.). Однако обилие методик и объектов исследования не позволяет создать четкое представление о размерах опасности, которую представляет широкое распространение в природе токсических веществ как для биосферы в целом, так и для физиологических, биохимических и биофизических процессов в каждом конкретном организме. Кроме того используемые обычно методы не раскрывают специфики механизма действия токсикантов. Попутно заметил, что понятие "Механизмы действия" изменяется в зависимости от уровня, на котором проводятся исследования. Вполне закономерно говорить о механизмах действия токсикантов на уровнях популяции, биоценоза и экосистем. На каждом из них взаимосвязь между токсикан-

том и объектом исследования подчиняется своим законам и определяется специфическим для данного уровня механизма. Следует подчеркнуть, что законы высшего уровня сопряжены с законами нижестоящего уровня. Так, взаимоотношения видов в биоценозе, подвергшемся воздействию токсических факторов, во многом зависят от степени отравления составляющих его популяций, а резистентность последних в свою очередь обусловлена различной чувствительностью к яду отдельных организмов.

Однако организменный уровень далеко не является функциональным и структурным пределом в изучении действия токсикантов. Все проявления жизнеспособности организма (адаптивность, размножение) находятся в самой непосредственной зависимости от различных физиологических процессов, основа которых — комплекс биохимических, биофизических и ультраструктурных превращений в клетках организма. Поэтому первичный механизм действия токсикантов следует искать на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях. Любое вещество, начиная с поваренной соли и кончая сложнейшими органическими соединениями, попадая в организм, не остается нейтральным. Оно включается в разнообразные биохимические системы и в зависимости от концентрации и химической структуры влияет на них, вызывая ряд последовательных превращений. Диапазон действия инкорпорированного вещества чрезвычайно широк, он охватывает сотни биохимических и биофизических реакций: процессы синтеза белка, выделения энергии: функционирования ферментных систем, транспорта ионов через мембраны, ультраструктуру самих мембран и т.д. Влияние токсических веществ может быть стимулирующим или

ингибирующим, специфическим или неспецифическим, обратимым или необратимым. Изменения и сдвиги на молекулярном уровне последовательно отражаются на жизненных процессах вышестоящих уровней. Конечный результат - подавление или вымирание одного вида и бурное развитие другого. Нарушение естественного равновесия в биоценозе, глубокие изменения в продуктивности и санитарном состоянии водоемов (Звиргзде Ю., Андрушайтис Г. 1970).

Действие токсического агента может быть разнообразным, однако совокупность первичных реакций организма характеризуется общими закономерностями.

Учение Г.Селье (Selye H., 1950) позволяет установить четкие закономерности в ответных реакциях организма на различные воздействия - специфический синдром. Последний складывается из неспецифических изменений в биологической системе. Теория стресса представляет собой экспериментально обоснованное положение об общем адаптационном синдроме, который включает в себя как неспецифическое повреждение, так и неспецифические защитные реакции. В основе развития общего адаптационного синдрома Г.Селье различает три фазы: 1) реакцию тревоги, которая представляет собой комплекс реакций, развивающихся в неадаптированном организме под влиянием стрессора; 2) повышенную устойчивость организма, в связи с возникновением адаптационных процессов; 3) истощение, наступающее при длительном воздействии стрессоров. Автор указывает, что клетки способны лишь к ограниченному числу качественно различных реакций (дистрофия, некроз, митотическая активность, изменение разме-

ров и функций). В зависимости от патогенности агента специфичность реакций варьирует от наиболее неспецифической, вызываемой любым патогенным агентом, до наиболее высоко специфичной. Однако патогенный агент не вызывает принципиально "новой" реакции, для которой не существовало бы постоянного механизма в нормально функционирующей клетке. Следовательно как нормальные, так и патологические реакции могут осуществляться различными комбинациями стимуляции и угнетения уже имеющихся биологических механизмов. Адаптационная энергия, определенным запасом которой обладает любая биосистема всегда имеет предел. Она может расходоваться медленно или быстро, от этого зависит жизнеспособность системы в изменившихся условиях. Теория стресса не только позволяет рассматривать любой процесс интоксикации как единство между реакцией защиты и повреждения, но и раскрывает фазность в изменениях резистентности организма и обнаруживает факторы, влияющие на его защитно-адаптационные процессы. Анализ экспериментальных данных по токсикологии рыб в свете теории стресса позволяет увязать их с представлением о гомеостазе. (Лукьяненко В.И., 1967).

Интоксикация затрагивает все системы организма вплоть до изменения структур, связанных с определенной функцией. Однако информация о ней интегральна и не отделяет первичные процессы от вторичных явлений. Для получения частной конкретной информации о состоянии организма следует моделировать основные жизненные процессы. Например, биоокисление - главный источник энергии; автоокисление - сопровождающееся образованием патологических метаболитов, ферментативные реакции и т.п.

2. СТРУКТУРА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ И ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ЕЕ СТАБИЛЬНОСТЬ

Поскольку эритроциты были избраны нами в качестве модели для решения поставленных задач, необходимо кратко остановиться на литературных данных о факторах обеспечивающих их нормальное функционирование и определяющих устойчивость их мембран. Следует отметить, что нас не интересует механизм проницаемости мембран. Они рассматриваются нами лишь как структуры, на которые действуют чужеродные вещества. По современным представлениям основным элементом мембранных структур являются два монослоя белковых молекул толщиной около 25 \AA , между которыми расположен бимолекулярный слой липидов 55 \AA (Uhlenbruck G., 1967). Таким образом, общая толщина "элементарной мембраны" составляет около $70-80 \text{ \AA}$. Для оболочек эритроцитов показано наличие элементарных мембран указанного выше типа, поэтому мембраны эритроцитов могут служить прототипом мембран других клеток (Sjöstrand F., 1959) (S. Bakerman, 1967). Указанные авторы определили, что в липогликопротеиновой мембране эритроцитов содержится 55% протеина, 35% липидов и 10% углеводов. Липидная часть в мембранах эритроцитов состоит преимущественно из фосфолипидов, а также холестерина, гликолипидов и нейтральных жиров. Полярные, гидрофильные группы этих молекул образуют наружные поверхности бимолекулярной структуры. Гидрофобные группы плотно примыкают друг к другу по средней линии. По обе стороны бимолекулярного слоя расположены

белковые молекулы с растянутыми цепями (β - конфигурация), связанные с полярными гидрофильными группами липидных листов. Эти ионные связи стабилизируют всю структуру мембран эритроцитов (O'Brien J.S., 1967, Van Deenen L., 1967). Из всех мембранных протеинов 90% составляют гликопротеины (Rosenberg S.A. et al. 1968).

Исследования мембран эритроцитов методом ядерного магнитного резонанса подтверждает наличие в них групп разных липидов и протеинов. Чепмен с сотрудниками (Chapman D et al., 1968 Chapman D. Kamat V., 1968) показали, что в препаратах мембран эритроцитов некоторой свободой обладают группировки $-N(CH_3)_3$ лецитина, кольцевые протоны углеводов; очень слабо проявляются сигналы от протонов $-HC=CH-$ группы; $-CH_2 - CH_3 -$ группы дают широкие неинтенсивные сигналы. Авторы приходят к выводу, что свобода движения углеводородных цепей липидов в мембране, вследствие их взаимодействия с белками мембраны очень ограничена. При действии на мембрану эритроцитов трифторуксусной кислоты упорядоченность организации мембран в целом нарушается и на спектрах ЯМР выявляются пики от аминокислот и углеводородных цепей. Мочевина высвобождает только некоторые из аминокислоты, не влияя на подвижность алкильных цепей.

Недавно удалось получить разрешение спектры ЯМР на нефрагментированных мембранах эритроцитов, повысив температуру образца до $80^{\circ}C$. Эти спектры позволили сделать вывод о некоторой пространственной обособленности липидов и белков и предположить, что около 25% липидов находятся в контакте с белком (Glaser M. et al., 1970).

Многие авторы придают важное значение ионам K^+ , Na^+ , P^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} и Fe^{2+} в процессах, происходящих в мембранах эритроцитов. Имея определенный заряд, эти ионы создают меняющийся градиент электрического поля и играют важную роль в транспортировке веществ через мембраны, а также создают условия энергетического обмена в самой мембране. Наличие концентрационных градиентов K^+ и Na^+ связано с ферментативными процессами аккумуляции энергии как в мембране, так и в самой клетке. Присутствие ионов во многом определяет такие существенные показатели, как стабильность структуры и резистентность мембраны эритроцитов (Hübel O. Passow H., 1960; Heard D, Seaman G., 1960; Seeman P. Weinstein I., 1966; Funder I., Wieth I., 1967; Blaue A., Leader D., Whittam R., 1967; Benesh R. Benesh R.E., 1968; Lent A., Whittam R., 1968; Bowdler A. et.al., 1969; Olson E. Cazort R., 1969; Konopka et al. 1969).

Одним из факторов, определяющих стабильность мембран эритроцитов и ее гемолитическую стойкость, является разность между рН клетки и среды (Seeman P., 1966). Способность связывания кислорода эритроцитами меняется в зависимости от величины рН. Электрофоретические исследования показали, что эритроциты, характеризующиеся большой разницей в рН внутренней и внешней среды, содержат гемоглобин повышенной мобильности (Steen I.B. Turitzin S.T., 1968). рН изменяется также от возраста клеток, при этом во всех случаях молодые клетки имеют меньшую разницу в рН, чем старые эритроциты. Экспериментально показано (Inglot A., Wolna E., 1968), что изменения внешнего рН влечет за собой изменение стабильности мембраны

и ее гемолитической стойкости. Е.Бютлер и О.Дирон (Beutler E. Duron O., 1965) при помощи биолуминесцентного метода обнаружили корреляцию между защитными свойствами эритроцитов и содержанием АТФ. Стойкость их зависит от рН крови.

Изменения количества АТФ в клетках может служить показателем цитолитической активности (Nungster W et.al., 1969).

Структура и функции мембран зависят от активности ферментов (Gardos G. et.al., 1966; Mirserova et.al., 1968).

Некоторые авторы указывают на возможность появления повышенных количеств H_2O_2 в эритроцитах в присутствии разных агентов, например, ацетилфенилгидразина, фенилгидразина, гидрохина и каталазы, глюкозы, глутатиона (Funaki H., 1957; Hochstein P., Cohen G., 1964; Cohen G., 1966; A.Funaki et.al., 1967; Paniker N. et.al., 1969).

Все вышеуказанные факторы имеют прямое отношение к объяснению гемолитической стойкости эритроцитов и указывают на то, что нормальное развитие и согласованность биохимических процессов в клетках зависят от физико-химического состояния структуры липопротеиновой мембраны (Kavanaugh J., 1966). В настоящее время многие исследователи проводят эксперименты с поверхностно активными веществами, что позволяет определить изменения в структуре мембран эритроцитов (Tsen C., Collier H., 1960; Dou Douste-Blazy L. et.al., 1962; Soula G. et.al. 1964; Lenar I., Singer S., 1968; Seeman P., 1966; Cornwell D., 1968), их пигментации (Hodge H. et al., 1967), гемолитической стойкости в гипертонических и гипотонических растворах (Chmiel J., 1960; Desjorges J., 1965; Good W. Rose S., 1968) и метаболизме в за-

зависимости от возраста (Bertolini A., 1962). Эритроциты использовали многие исследователи, как очень удобную модель для выявления токсичности различных веществ (Телитченко М., Говорова М., 1962; Wurster D., Shapiro P., 1963; Кудряшов Ю.Б. 1964, Телитченко Д.А., Бойченко М.М. 1971 г. и . . . Аркадьева Г.Е., 1965.)

3. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ

Использование эритроцитов в качестве тест-объекта заставляет разобраться в том, что именно является "Ахиллесовой пятой" в мембране эритроцитов, обуславливающей их распад или стойкость.

Терсков и Гительзон (Терсков И.А., Гительзон И.И., 1960) предложили формулу $\frac{y}{1-y} = kt^n$ (1), удовлетворяющую экспериментальным данным. В соответствии с указанной формулой количество эритроцитов, выраженное в долях единицы, принятой за полный гемолиз, есть сложная функция времени. Авторы справедливо отмечают, что это уравнение является эмпирическим. Действительно, коэффициенты k и n не имеют ясного физического смысла.

Согласно понятию экспоненциальной зависимости, количество веществ в эритроцитах с течением времени убывает, но никогда не исчезает полностью, следовательно гемолиз не возможен, что явно противоречит фактам. Если рассматривать гемолиз как бимолекулярную реакцию при постоянной концентрации гемолитика, а не вещества оболочки, получим: $C = C_0 e^{-kt}$ (2), где C - убывающее количество вещества оболочки эритроцитов в момент времени, а C_0 - первоначальное количество этого вещества.

Очевидно, для того, чтобы происходил гемолиз эритроцитов, нет необходимости в полном разрушении вещества оболочки, которое по уравнению (2) вообще никогда не наступает. Достаточно, чтобы количество этого вещества достигало некоторого порогового значения C_r . Таким образом, гемолиз происходит при условии $C = C_r = C_0 e^{-kt}$. C_r имеет следующий физический смысл

Эритроциты испытывают в среде влияние различных сил - токов жидкости, столкновений со стенками сосудов и пр. Этих сил оказывается достаточно для разрушения истонченной оболочки эритроцитов.

Очевидно, что если бы все эритроциты одновременно разрушились, гемолиз не был бы процессом во времени. Не одинаковая скорость гемолиза эритроцитов может быть обусловлена различными первоначальными значениями S_0 .

Вероятно, и значения химической резистентности эритроцитов укладывается в гауссовское распределение, как это установлено для их диаметра, объема и т.д. (И.А.Подрабинек, И.И.Каменский, 1966). Упомянутые авторы делают вывод, что дифференциальная кривая распределения эритроцитов по резистентности является удобным методом анализа гемолитических систем. Резистентность эритроцитов меняется от вида и возраста индивидуума (Vertolini A., 1962).

Анализ кислотных эритрограмм, показал, что они не являются распределением эритроцитов по форме, объему, диаметру, содержанию гемоглобина. Известно, что трипсин поверхностно повреждает активные белки эритроцитов (Ponder E., 1948), ускоряет предлитическую фазу гемолиза, уменьшает объем клетки (К.С.Тринчер, Э.И.Гинзбург, 1962), вместе с тем трипсинизация эритроцитов не изменяет форму кислотной эритрограммы. Для выяснения роли липидов в распределении эритроцитов на кислотной эритрограмме был применен метод издирательного их удаления из стромы эритроцитов окисью алюминия (Lovelock I. E., 1955). Ловелок показал, что при отмывании эритроцитов фи-

физиологическим раствором со взвешенной окисью алюминия, клетки теряют главным образом липиды. Кислотная стойкость поврежденных окисью алюминия эритроцитов падает. Пик эритрограммы смещается за счет уменьшения молодых - осмотически резистентных эритроцитов. Следовательно повреждения не являются беспорядочными. Кислотная эритрограмма в норме и в патологии характеризует липидную разнокачественность эритроцитов (М.Д. Бриллиант, А.И.Воробьев, 1967). Необходимо отметить, что отмывание окисью алюминия не вызывает непосредственного гемолиза эритроцитов и это свидетельствует о целостности каркаса - прочных липопротеиновых комплексов стромы. Участие липидов в образовании сложных комплексов с белками определяет антигенную специфичность эритроцитов. Вещества, обладающие липотропным свойством, нарушают тонкую структуру клетки эритроцита, обмен веществ и приводят к разрушению эритроцита - гемолизу (Э.М.Семенцева, 1966).

Несомненно, было бы неправильным односторонне подходить к проблеме стойкости эритроцитов, рассматривая ее как функцию, зависящую только от мембраны и компонентов ее структуры (Г.В.Полова, 1971). Существует мнение, что проницаемость обусловлена и состоянием внутриклеточных процессов (Трошин А.С., 1964).

Одной из причин резкого уменьшения стойкости эритроцитов к гемолитикам может являться заметное снижение количества SH-групп в крови и угнетения активности тиоловых ферментов, защищающих гемоглобин эритроцитов от окисления. Экспериментально данные о снижении SH-групп в крови и селезенке при внут-

рибритинном введении животным гидроперекиси изопропилбензола получены Н.В. Прохольской с соавторами (1964). Исследования пероксидазной активности крови обнаружили ее резкое торможение при интоксикации. Обычно же, поступающие в организм, перекиси разрушает пероксидаза и этим преграждает распространение их в различных органах (О.И. Смирнова, 1966).

Рассмотренные в настоящей главе работы дают нам основание предполагать, что осмотический гемолиз эритроцитов является показателем: 1. Состояния структурных компонентов мембран, в основном липидной природы. 2. Уровня внутриклеточных процессов, тесно связанных с функцией мембран. Следовательно солянокислый гемолиз в опытах "in vitro" отражает изменения непосредственно в мембране эритроцитов, а "in vivo" дает информацию и о ходе внутриклеточных процессов в целом.

4. ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В БИОСУБСТРАТАХ

Развитие биоэнергетики выдвинуло на первый план мембранные аспекты проблемы биологической трансформации энергии. Установлено, что два основных процесса энергообеспечения живых систем: фотосинтез и дыхание - локализованы в мембранах внутриклеточных органелл высших организмов, а у бактерий - клеточной мембране. Разрушение мембран сопровождается потерей способности к аккумуляции энергии, освобождаемой при использовании энергетических ресурсов. Даже небольшое увеличение ионной проницаемости мембран приводит к утечке энергии, рассеивающейся в виде тепла. В этих процессах огромное значение имеют сопряженные реакции переноса электронов при участии разнообразных ферментативных систем (Скулачев В.П., 1972). Биоокисление, являющееся основным источником энергии, сложный процесс, тесно связанный с физико-химической регуляцией жизнедеятельности живой клетки. При патологии нарушается соотношение двух основных типов окислительных процессов:

а) ферментативного многоступенчатого биологического окисления, исключаящего, как правило, непосредственное присоединение кислорода к окисляющемуся субстрату. Подавляющая часть энергии биологического окисления освобождается малыми порциями (по 6-10 ккал на каждой ступени электронного каскада). Конечными продуктами биологического окисления являются малоактивные молекулярные соединения - чаще всего вода и углекислый газ;

б) ~~неферментативного~~ ферментативного, свободнорадикального окисления, при котором непрерывно генерируются свободные радикалы. Происходит прямое присоединение кислорода к окисляющемуся субстрату. При подобном "коротком замыкании" образуются токсические, кислородсодержащие продукты (перокси-радикалы, перекиси, альдегиды, кетоны и др.). Значительная часть их находится в электронно-возбужденном состоянии, последующий переход в основное состояние сопровождается хемилюминесценцией в видимой или близкой ультрафиолетовой области (Журавлев А.И., 1968). На общебиологическое значение свободнорадикального окисления в живых организмах впервые указал Б.Н.Тарусов (1954) при рассмотрении патогенеза лучевого поражения. Основным субстратом неферментативного окисления при патологических процессах являются жирные кислоты (Тарусов Б.Н., 1954; Кудряшов Ю.Б., 1966; Козлов Ю.П., 1969). Автооксидация ненасыщенных жирных кислот происходит по свободнорадикальной схеме с накоплением перекисей. Известно (Владимиров Ю.А., 1966, Владимир Ю.А., Арчаков А.И., 1972), что липидные перекиси всегда присутствуют в определенных количествах в тканях животных и являются неизменным продуктом нормального метаболизма (Рапопорт С.М., 1966). Перекиси образуются из активированных коэнзимом А ненасыщенных жирных кислот, возникающих в ходе их β -окисления. Активация кислот коэнзимом А с использованием энергии АТФ необходима как для начала β -окисления, так и для образования перекисей в процессе окислительного фосфорилирования. Активированные кислоты могут вступать в реакции дальнейшего ферментативного окисления или непосредственно окис-

ляться молекулярным кислородом. Эти два процесса находятся в конкурентном отношении. Предположение о том, что интенсивность неферментативных процессов (в частности, свободнорадикальной оксидации) обуславливает сопротивляемость организма и возможность адаптирования к изменениям внешней среды было высказано многими авторами (Панюшкин Ю.Н., Тарусов Б. Н., 1968; Козлов Ю.П., 1968, Якубов С.М., Чернышев В.И., 1971; Чернышев В.И., Телитченко М.М., 1973).

Наличие в окислительных реакциях свободнорадикальных состояний, перекисных соединений и как результат их образования — хемилюминесценция, заставляет подробнее остановиться на более общих закономерностях возникновения люминесценции, модельные системы которой использованы в настоящей работе.

5. МЕХАНИЗМ ВЫСВЕЧИВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Под биолюминесценцией в широком смысле слова подразумевается свечение живых организмов и биосубстратов за счет энергии экзотермических, биохимических или химических процессов, способных протекать в живом организме и биосубстрате. Биолюминесценция подразделяется на несколько видов. Основные из них следующие:

I) видимая биолюминесценция, описанная в многочисленных работах Гарвея и его учеников (Harvey E.N., 1920, 1952, 1957). По определению Гарвея, это видимое глазом свечение некоторых живых организмов и их биосубстратов, имеющих специализированный ферментный аппарат. Более детальные исследования феномена проводили Стрелер, Макэлрой и Селинджер (Strehler B.L., 1955, McElroy W.D., Seliger H.H. 1961, 1962). Фундаментальные исследования в этой области позволили обнаружить около двух десятков возможных реакций биолюминесценции в живых организмах. Однако химическая структура ингредиентов реакции и механизм реакции полностью изучен только у некоторых светящихся организмов (Johnson F.H., Sie E., 1961). Определенный интерес представляет предложения Макэлроем и Селинджером схема возникновения биолюминесценции у светляка. (Рис. I)

Авторы утверждают, что непосредственным источником свечения является комплекс люциферин-люцифераза + АТФ и необходимым условием возникновения свечения следует считать окисление данного комплекса. Явление биолюминесценции широко используется

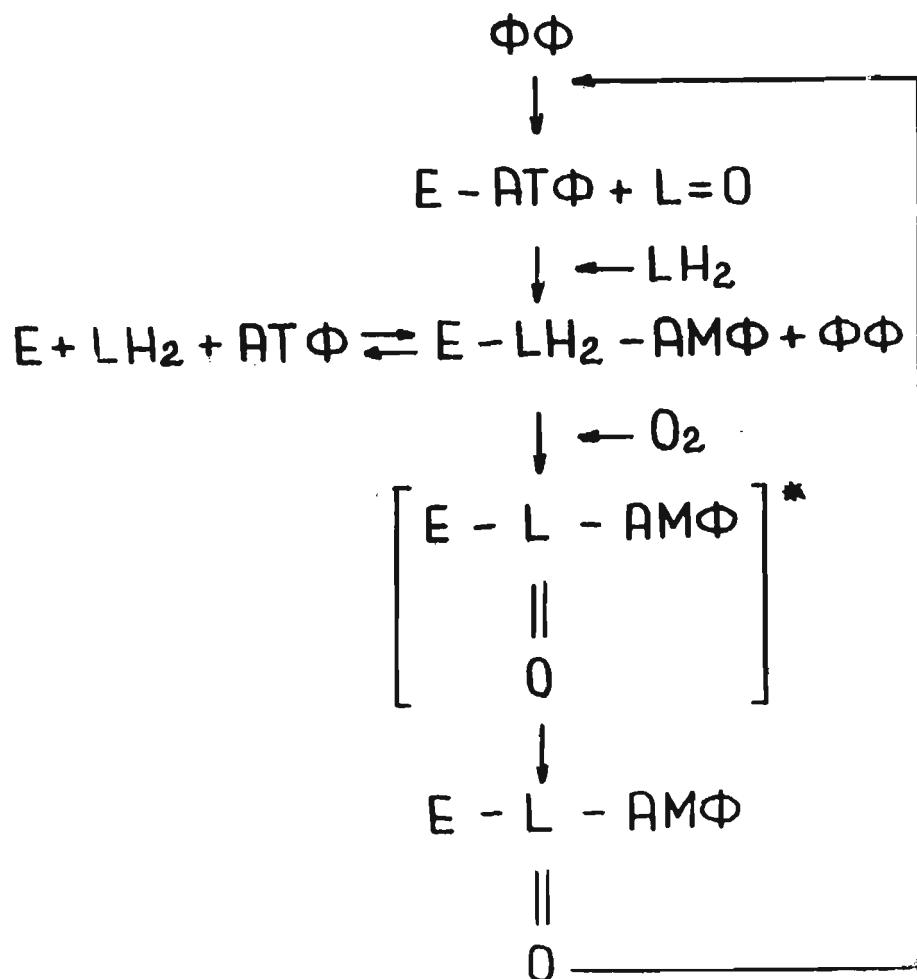


Рис. 1. Схема биолюминесцентной реакции люциферин-люцифераза (McElroy W.D., Seliger H.H., 1961).

LH_2 - люциферин

АТФ - аденозинтрифосф.

$\Phi\Phi$ - пирофосфат

E - люцифераза

для исследований энергетических процессов связанных с определением количества АТФ (Strehler V.L., 1965, Даников Ю., Мильман Л., 1966; Тумерман Л., Федорович И., 1967; Stanley P., Williams S., 1968) как показатель потребления кислорода (Гительзон И.И., Чумакова Р.И., Фин Н.М., 1965, 1967; Гительзон И.И., Чумакова Р.И., 1968) и некоторых теоретических исследований (Comier M.J., 1961, 1964; McCarr F., 1968; Carlson A.D., 1968);

2) митогенетическое излучение, открытое А.Ф.Гуревичем, по концепции автора и его учеников является универсальным излуче-

нием в области коротковолнового ультрафиолета, испускаемого растительными и животными клетками (Гурвич А.Г., 1934);

3) фотосинтетическая биохемилюминесценция, открытая Стрелером и Арнольдом (Arnold W., Strehler B.L., 1951) представляет индуцированное послесвечение живых организмов и биосубстратов, возникающее после облучения биосубстратов или живых организмов. Энергию фотосинтетической биохемилюминесценции поставляют реакции фотопродуктов, образовавшихся в процессе освещения, т.е. обратные фотохимические реакции;

4) биотермолюминесценция - индуцированное свечение, возникающее в предварительно освещенном биосубстрате после прекращения фотосинтетической биохемилюминесценции. Только после нагревания оно представляет собой хемилюминесценцию, сопровождающую обратные фотохимические реакции с более высоким активационным барьером, для преодоления которого необходимо нагревание. Биотермохемилюминесценция была открыта в 1957 году Арнольдом и Шервудом (Arnold W., Scherwood H., 1957);

5) сверхслабая биохемилюминесценция - универсальное явление свечения сложных многокомпонентных нативных биосубстратов. Исследованием сверхслабого свечения, которое может служить источником информации об окислительных процессах в клетках и метаболизме в целом занимаются многие ученые (Владимиров Ю.А., Литвин Ф.Ф., 1959; Тарусов Б.Н., Поливода А.И., Журавлев А.И., 1961; Владимирова Ю.А., Львова О.Ф., 1964, 1965, 1967; Тарусов Б.Н. и др., 1967, 1968; Журавлев А.И., 1964, 1965, 1968, 1970; Конев С.В., 1965). Свечение высших организмов отличается от классической, видимой биохемилюминесценции по

крайней мере тремя особенностями:

а) оно очень слабое и в нормальных условиях не может быть зафиксировано невооруженным глазом. Для изучения необходима чувствительная и сложная фотоэлектронная установка (Щелков Л. С. и др., 1965; Шляпнотх В.Я. и др., 1968);

б) это свечение чрезвычайно распространено и, очевидно, свойственно всем живым организмам (Журавлев А.И., 1965);

в) не всегда связано со специфической ферментативной системой (Журавлев А.И., 1968).

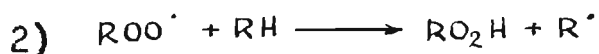
Сверхслабое свечение является, видимо, следствием реакции рекомбинации пероксирадикалов, образующихся в тканях при окислительно-восстановительных процессах (Тарусов Б.Н., Журавлев А.И., 1965; Владимиров Ю.А. и др., 1971).

Биоломинесценция клеток может быть использована в качестве чувствительного детектора для оценки повреждающих воздействий и границ адаптации биологических систем к внешним воздействиям, т.е. выявлению тех конечных порогов, в пределах которых возможно существование динамического равновесия химических реакций в клетках (Тарусов Б.Н., 1968).

Поскольку изучение механизма явления биоломинесценции клетки требует еще тщательной расшифровки, следует обратить внимание на те работы, в которых изучена хемилюминесценция в более простых, чем организм системах. Этой проблеме посвящен целый ряд работ Васильева (Васильев Р.Ф., Витутинский А.А., 1962; Васильев Р.Ф., 1962, 1962а, 1963, 1963а, 1964, 1964а) и других авторов (Audubert R., 1939; Stauff J. et.al., 1963; Jorthner et.al., 1963; White E.H. et.al., 1965; Berger et.al.

1965; Аллабутаев К. и др. 1965).

Существенно для хемилюминесценции, что она чаще всего, наблюдается в реакциях окисления молекулярным кислородом или другими веществами, легко выделяющими молекулярный кислород (Васильев Р.Ф., Витутанский А.А., 1962). Точку Аналогичной точки зрения придерживается С.Рид (1960). При введении кислорода в радикальную реакцию (Васильев Р.Ф. и др., 1962) происходит усиление хемилюминесценции:



Высокие выходы свечения являются следствием рекомбинации перекисных радикалов в четвертой реакции, поскольку только эта реакция зависит от концентрации O_2 . В данном примере наблюдается значительное сходство с механизмом возникновения биолюминесценции. Надо полагать, что биолюминесценция превратится в эффективный физический метод исследования биологических и биохимических процессов. Однако очень важно сначала выяснить механизм хемилюминесценции в более простых модельных системах (Васильев Р.Ф., 1964). Промежуточным звеном подобных исследований можно считать работы с применением метода ингибирования хемилюминесценции, позволяющие регистрировать изменения биологической активности веществ на молекулярном уровне (Клипсон Н.А., Мамедов Т.Г., 1963; Чернышев В.И., Телитченко М.М., Козлов Ю.П., 1968; Тамбиев А.Х., Телитченко М.М., 1968).

В связи с трудностью изучения механизма биолюминесценции

сложных биологических систем, почти все известные механизмы ее заимствованы из представлений о хемиллюминесценции тщательно очищенных веществ. Наиболее характерным и хорошо изученным в этом отношении является люминол: 3-аминофталъциклогидразид. Всякое объяснение механизма свечения люминола должно учитывать следующие факты:

1) для высвечивания люминола необходимы как кислород, так и перекись водорода, они не заменяют друг друга (Langenbeck W., Ruge U., 1937; Steigman A., 1942; Maunard W. et al., 1955; Cormier M., Prichard, 1968);

2) в реакции несомненно принимают участие свободные радикалы, так как ингибиторы свободнорадикальных состояний тушат хемиллюминесценцию люминола (White E., 1961);

3) для светоиспускания необходимы металлосодержащие катализаторы (Maunard W., 1955);

4) хемиллюминесценция имеет максимум в щелочной среде при $\text{pH} = 11$ и наиболее интенсивна в области 430 нм, что соответствует 68 ккал/моль (Seliger H., 1961; Калинин Е.И., 1967).

В процессе реакции происходит разрушение как перекиси водорода, так и самого люминола, о чем свидетельствует выделение свободного азота.

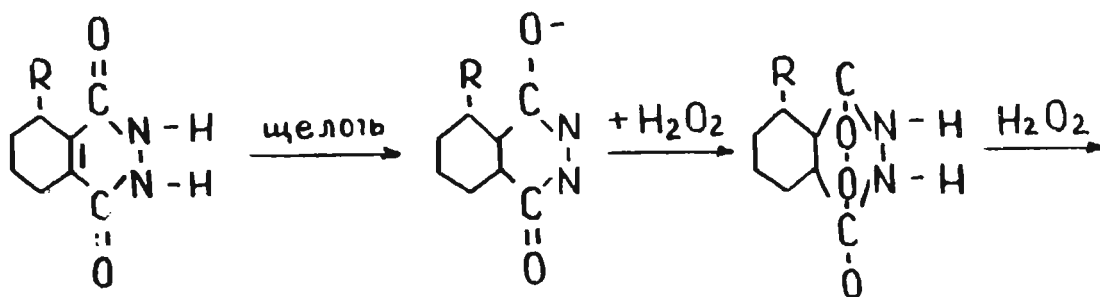
Таким образом, свечение люминола происходит только в сложной смеси, состоящей из следующих компонентов: 1) энергетического субстрата-поставщика энергии возбуждения, каковым является перекись водорода; роль перекиси водорода, очевидно сопоставима с ролью люциферина в биологических системах; 2) катализатора-ферроцианида или металла переменной валентно-

сти; 3) люминесцирующего вещества - люминола или продуктов его превращения; в биологических системах люцифераза очевидно, совмещает функции как катализатора, так и высвечивающего агента; 4) среды - водного раствора щелочи; 5) кислорода (Журавлев А.И., 1965).

Удаление или даже недостаток одного из компонентов реакции снижает интенсивность или полностью подавляет хемилюминесценцию.

Механизму возникновения хемилюминесценции 3-аминофталевого гидразида посвящена работа Свешникова (Свешников Б.Я., 1938). Основным выводом из этой работы, что все процессы окисления гидразида сопровождаются свечением, при этом окислению подвергаются продукты гидролиза гидразида.

Перекисный механизм хемилюминесценции люминола, предложенный Глянном и Петцем (Glenn K., Petsch W., 1935) учитывает щелочность среды и действие перекиси водорода. Существенным моментом является постулирование выделения кислорода в момент образования возбужденной молекулы:



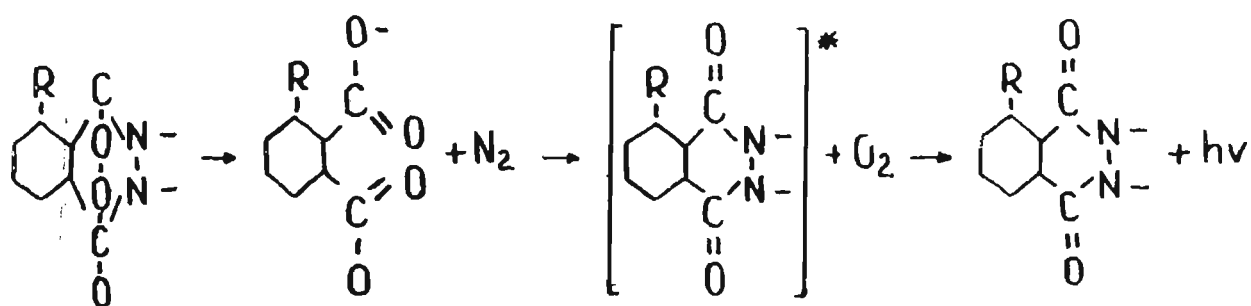


Рис. 2. Схема возникновения хемилюминесценции люминола.

В приведенной схеме есть ряд недостатков: она не отражает действия катализаторов и кислорода, имеет энергетическое несоответствие. Рабочую гипотезу окисления люминола в водных растворах предложили также Уайт (White, 1961)



Рис. 3. Схема окисления люминола в водных растворах. (White E.H., 1961)

Приведенная схема учитывает роль среды, радикалов, перекиси и катализатора. Учитывается также различная роль кислорода и перекиси водорода. Однако сама схема недоработана, поскольку предполагает ряд неизвестных ступеней.

Учитывая возможные механизмы и факторы возникновения люминесценции, есть основания предполагать, что люминесцентные реакции в целом однотипны. Они сводятся к образованию органических радикалов, их взаимодействию с кислородом с рождением пероксирадикалов и их последующей рекомбинации с образованием возбужденных продуктов, что сопровождается высвечиванием (Журавлев А.И., 1965). Практическое приложение реакции окисления люминола в водной токсикологии показано в работах Синельникова (Синельников В.Е., 1965, 1968, 1969, 1971).

6. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕРБИЦИДОВ МОНУРОНА,
ДИУРОНА (ПРОИЗВОДНЫЕ ПОЧЕВИНЫ) И 2,4 Д НАТРИЕВОЙ СОЛИ.

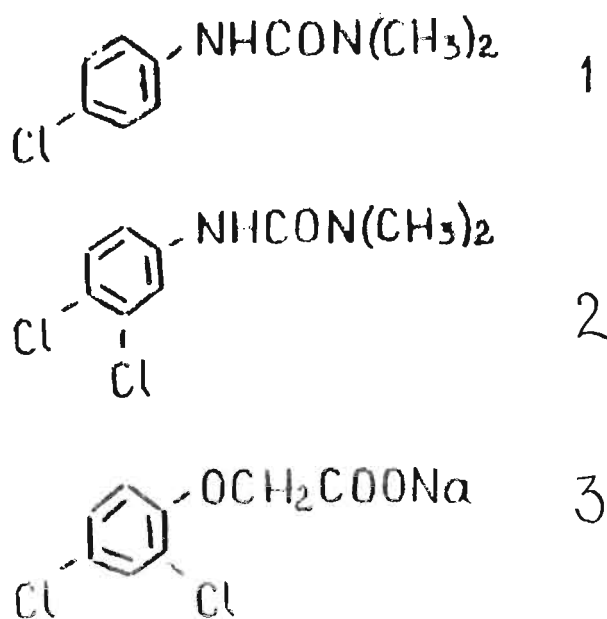
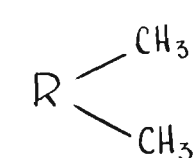


Рис.4. Строение молекул гербицидов монурона⁽¹⁾, диурона⁽²⁾
и 2,4 ДNa⁽³⁾

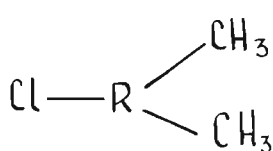
Мочевина является одним из продуктов жизнедеятельности животных. Она применяется в сельском хозяйстве в качестве прекрасного удобрения. Практически все растения переносят применение сравнительно больших доз этого вещества без каких-либо повреждений. Но уже простейшее производное мочевины - биурет обладает заметной фитотоксичностью и при нормах расхода 40-70 кг/га подавляет рост многих однодольных и двудольных растений. При систематическом изучении токсических свойств производных мочевины установлено, что инсектицидные и фунгицидные свойства их незначительны; Многие соединения этого класса яв-

ляются активными гербицидами. В литературе встречается множество книг и статей посвященных как чисто химическому аспекту воздействия производных мочевины, так и неспецифической "деятельности" упомянутых препаратов (James I., 1957, Edson E., 1958, Walker C.R., 1961, 1963, Мельников Н.Н. Баскаков Ю.А. 1962, Калинин Ф.Л., Мережинский Ю., 1965; Walker C.R., 1965; Воронков М.Г. и др., 1967; Лукьяненко В.И., 1967; Брагинский Л.П., 1968, 1972; Мельников Н.Н., 1968, 1970; Врочинский К.К., 1970; Mullison W.R., 1970; Muirhead-Thomson R.C., 1971, Строганов Н.С., 1971; Метелев В.В. и др., 1971; Пайер-Боде, 1972).

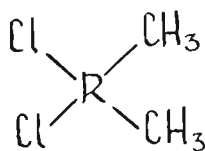
Наиболее интересными, на наш взгляд, являются гербициды, строение молекул которых незначительно отличается друг от друга. Это позволяет судить о влиянии отдельных замещенных групп и выявить менее токсичные для окружающей среды препараты, имеющие однако одинаковую эффективность при применении по назначению. Такими гербицидами являются:



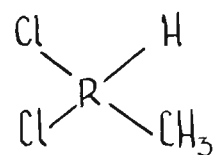
фенурон



монурон



диурон



небурон

Одной из важных характеристик гербицидов, вносимых в почву или водоем, является их растворимость. По данным Е.З.Журавлева и др. (1969) растворимость монурона в воде при 10° в 2,4, а при 50° в 1,8 раза больше; чем диурона. При температуре 25° растворяется 230 мг/л монурона и 42 мг/л диурона. Дифференциальные теплоты растворения и их температурные коэффициенты для диу-

рона в интервале температур 10⁰С - 50⁰С больше, чем для монурона. Известно, что молекулы замещенных мочевины, имеющие хотя бы один атом водорода и азота, способны к образованию межмолекулярных водородных связей (Марков В.В. 1967). Следовательно большая эндотермичность растворения диурона обусловлена тем, что на разрыв связей между молекулами диурона требуется больше энергии, чем при растворении монурона.

Скорость движения замещенных мочевины (электрофорез на бумаге) увеличивается по мере снижения концентрации водородных ионов. Гербициды по этому признаку образуют следующий ряд:

фенурон > Монурон > диурон > небурон

Токсичность же препаратов в почве обратна. На скорость движения гербицидов влияет адсорбция их молекул бумагой. Она зависит также от концентрации водородных ионов (Freed V.H., 1953).

Другой ряд производных мочевины по их токсичности к ячменю приводит Коггин (Coggins C.W., 1959)

диурон > монурон > небурон > фенурон

Поскольку замещенные одной метильной группой атомом водорода, или бутильной группой снижает фитотоксичность, указанный автор считает, что максимум токсичности зависит от атомов хлора в ароматическом кольце и метильных групп у 2-го атома азота.

При постоянных алкильных заместителях включение одного атома хлора в кольцо повышает фитотоксичность, а двух - в еще большей степени. Изучая эти производные, Фрид (Freed V.H., 1953) показал, что пара-замещение наиболее эффективно по сравнению с мета- и тем более орто- замещением. Однако попытки упомянутых авторов связать физико-химические свойства и токсичность

со строением молекул препаратов ограничены тем, что нет единого критерия токсичности. Это приводит к противоречивым выводам. Очевидно, следует выяснить механизм действия гербицидов на уровне позволяющем фиксировать ответные реакции непосредственно. Это даст возможность установить общие закономерности токсического действия. Из множества теорий, объясняющих действие гербицидов, на наш взгляд, следует выделить гипотезу ауксинного действия гербицидов Ван Овербека (J. van Overbeek 1959). По его мнению молекула регулятора роста должна отвечать следующим условиям: 1) поддерживать кислотную группу, 2) иметь ароматическое кольцо, 3) кислотная группа должна иметь возможность находится за пределами плоскости кольца, 4) молекула характеризуется определенным гидрофильно-липофильным равновесием.

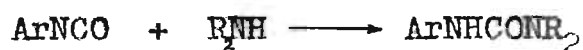
В соответствии с этой схемой молекула ауксина играет в основном биофизическую роль. Она не участвует в осуществлении характерных физиологических реакций. Легко связывается цитоскелетом и должна вытесняться замещением или мягкой химической обработкой. Последняя денатурирует белок цитомембраны. Молекула не включается в метаболизм и, следовательно, должна быть совершенно стабильной. Эти характеристики можно признать вполне подходящим для объяснения биологического действия многих синтетических гербицидов.

N -4-хлорфенил- N^1-N^1 -диметилмочевина (монурон).

Более кристаллическое вещество с температурой плавления $170,5-171,5^{\circ}C$. Технический препарат обычно плавится при температуре не ниже $164^{\circ}C$. Плохо растворим в керосине, спирте, пет-

ролейном эфире и бензоле, лучше в галоидопроизводных углеводородов и диоксане. Монурон устойчив при обычных условиях хранения и выдерживает без разложения нагревание до температуры плавления. При продолжительном кипячении со щелочами и минеральными кислотами он разлагается с выделением диметиламина, хлоранилина или их солей. Для получения монурона и других производных этой группы известны три способа:

1) конденсация арилизонатов с диалкиламинами



Этот способ наиболее универсален и позволяет получить различные арилдиалкилмочевины высокой степени чистоты и с хорошим выходом.

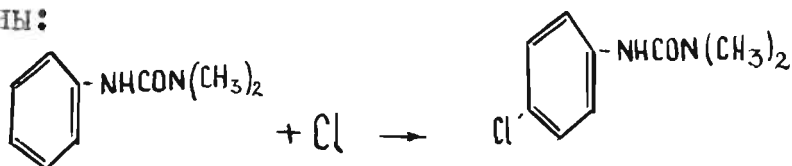
2) реакция диалкилкарбамоилхлорида с анилином



3) взаимодействие диалкиламина с диарилмочевинной при повышенной температуре:



Кроме того, монурон можно получить прямым хлорированием Фенилдиметилмочевины:



(Мельников Н.Н., 1968)

На основе многократных определений Версоновой К.А. (1968) составлена схема распределения монурона в воде: в слое до 2 см 0,1 мг/мл, 2-5 см 0,5 мг/мл, в придонном слое 0,5-1,0 мг/мл, т.е., основная масса гербицида находится в нижних слоях водоема.

Почвой монурон удерживается. Вымывание происходит медленно, однако основная часть препарата теряется в течении первого года (Sheets T.J., 1964, Frank P.A., 1966).

Чернышова В.И. (1967) изучала влияние монурона на рыб и на гидрохимический режим водоема. Установлено, что кроме прямого и косвенного токсического влияния на организм рыб, указанные пестициды уменьшают концентрацию кислорода в воде ниже пороговых величин. Брагинский Л.П. (1972) указывает на связь между кислородным режимом обработанного монуроном водоема и численностью синезеленых и протокочковых водорослей. Исследовавшая влияние монурона на физиолого-биохимические процессы синезеленых водорослей, Богданова Т.Л. (1965) полагает, что производные мочевины блокируют флавиновые ферменты и ингибируют процесс фотосинтеза. На подавлении фотосинтеза монуроном указывает также Бишоп (Bishop N.J., 1957). Монурон как ингибитор фотосинтеза использован в модельных опытах Свиитсера П. (1961) и Каурова Б.С. (1972).

Изучая влияние монурона как ингибитора фотосинтеза на водорослей методом индуцированной флуоресценции авторы (Sweetser P.V., Todd C.W., Hersh R.T., 1961) приводят схему объясняющую возможную локализацию повреждения в общей схеме фотосинтеза. (Рис.2).

В водоемах монурон более токсичен для водорослей и высших водных растений, чем для рыб (Брагинский и др. 1963), Придчайко М. Шербань Э. (1970; 1971) и Малоней (Maloney T.E., 1958) наблюдали снижение биомассы синезеленых водорослей под влиянием монурона. Монурон эффективно разлагается в листьях *Rumex*

conglomeratus, но ингибирует фотохимические реакции в клетках (Allaway W.G., Mansfield T.H., 1967) и с трудом десорбируется (Hance R.I., 1967). Повышенная температура, достаточное количество влаги и присутствие органических веществ ускоряют разложение монурона. Некоторые авторы наблюдали участие монурона в метаболизме животных (Ernst W., Bohme C., 1965) и растений (Swanson R., Swanson H., 1968). При инкубации дисков листьев *Plantago major* в монуроне образуется I (p-хлорфенил) 3 метилмочевина, I (P-хлорфенил) мочевины и p-хлоранилин. В аэробных условиях в культуре *Scenedesmus* с монуроном отмечается слабая флуоресценция в области 480 нм (Gingras G. Lavorel J., 1965). Изучение влияния УФ (ультрафиолета) на производные мочевины показало, что наибольшие изменения и потери наблюдаются в дальнем УФ (Jordan et.al., 1965)

N-3,4 дихлорфенил-N¹, N¹-диметил мочевины (диурон).

Белое кристаллическое вещество с температурой плавления 158 - 159⁰C. Плохо растворим в большинстве органических растворителей. При нагревании до 180-190⁰C препарат разлагается на диметиламин и дихлорфенилизоцианат. При кипячении в растворах едких щелочей и минеральных кислот диурон разлагается с выделением диметиламина и 3,4 дихлоранилина или их солей. В промышленности диурон получают, главным образом, синтезом 3,4 дихлорфенилизоцианата с диметиламином. Диурон применяется в виде водных суспензий. В нормах 1-2 кг/га он дает вполне удовлетворительные результаты (Мельников Н.Н. 1968).

Производное мочевины - диурон по своему назначению мало отличается от монурона. Диурон также применяют для уничтожения водной растительности, но худшая растворимость делает диурон более устойчивым и трудновываемым из почвы препаратом. В полевых опытах с диуроном обнаружилась, что кислородный эффект и сопряженные с ним явления зависят от биомассы растений. В бедных растительностью водоемах под влиянием гербицида кислородный эффект ограничен. Гидрохимический режим существенно не изменяется (Брагинский Л.П., Буртная И.Л. 1969, Hambrig R.N., 1969). Гибель рыб при обработке водоемов диуроном наблюдали многие авторы (Pierce P., 1966, Комаровский Ф.Я. 1969, 1970, Комаровский Ф.Я., Попова Г.В. 1969, 1972. Попова Г.В. 1970, 1972, Брагинский Л.П. и др. 1972). Пиирс считает, что постепенная гибель рыб в водоемах обработанных диуроном вызвана низкой насыщенностью воды кислородом. Комаровский и Попова связывает гибель рыб с необратимыми изменениями в крови и отдельных ее компонентах. Существует мнение, что снижение прироста в весе у карпов в прудах, обработанных диуроном - следствие недостаточного развития кормовых организмов (Vougenberg de Jong C.M., 1969). При попадании в растения диурон может превратиться в I-(3,4 дихлорфенил) 3 метилмочевину и I (3,4 дихлорфенил) мочевины (Swanson C.R., 1968). По данным Бома (Bohme C., 1965) LD₅₀ для теплокровных составляет 3400 мг/кг. При этом наблюдается сильно измененная пигментация крови и усиление эритропоэза (Hodge H.C.et.al., 1967). Диурон ингибирует выделение кислорода на разных уровнях организации живого, начиная с первичных реакций фотосинтеза

(Рубин Л.Б., Дубровин В.Н., 1968; Кауров Б.С., 1972). Влияние диурона на окислительное фосфорилирование изучал Вайтхаус (Whitehouse M.W., 1964), на дыхание и активность окислительно-восстановительных ферментов прорастающих семян хлопчатника и щирцы Исламов И. (1969). Указанные исследования показали, что интенсивность дыхания проростков хлопчатника составляет 164%, а у щирцы 71% от контроля. Это связано с биологической особенностью растений. Снижается активность окислительных ферментов-пероксидазы и особенно полифенол-оксидазы, что является результатом нарушения обмена веществ. Диурон ингибирует выделение кислорода у *Chlorella pyrenoidosa* непосредственно в момент прибавления, но при стиривании гербицида выделение O_2 возобновляется (Zwaig O., Hitt I., McMahon R., 1968). Показано, что длинноволновая часть спектра УФ заметно влияет на диурон, а ближняя менее выражено (Jordan L.S. et al., 1965).

Токсичность диурона для растений при внесении в почву или водоем мало отличается от токсичности монурона. Но для рыб обнаружена значительная разница (Jones J., 1964, Walker S.R., 1965). Диурон в концентрации 16 мг/л вызвал 50% смертность кижуча в течении 48 часов, аналогичные результаты получались с монуроном лишь в дозе 110 мг/л. Немаловажную роль при оценке токсичного действия пестицидов играет явление синергизма (комбинированное действие). Производные мочевины, в том числе диурон, смешанные с другими гербицидами, проявляют в большинстве случаев более выраженную токсичность, чем каждый из них в отдельности (Walker S.R., 1965). Имеются указания на то, что производные тиомочевины действуют более избирательно, чем диу-

рон (Vasilev G. et. al., 1967).

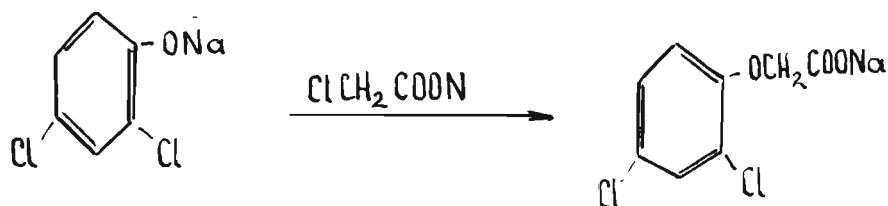
2,4-Дихлорфеноксиксусная кислота (2,4-D - Na)

Белое кристаллическое вещество с температурой плавления 141°C . Чистая 2,4D -Na практически не имеет запаха, технический препарат в большей или меньшей степени пахнет дихлорфенолом. В 100 г эфира растворяется 243 г 2,4D - Na. Для растворения такого же количества необходимо 0,67 г толуола, а этилового спирта - 130 г. Гербицид растворим также в бензоле, ацетоне и четыреххлористом углероде.

2,4D -Na устойчива при хранении как в растворах, так и в кристаллическом состоянии. При облучении УФ разлагается незначительно. С неорганическими и органическими основаниями образует устойчивые соли.

Для млекопитающих 2,4D -Na является веществом средней токсичности. При пероральном введении LD_{50} для животных находится в пределах 375-1000 мг/кг. Предполагают, что для человека смертельная доза 2,4D -Na около 15 г. В промышленности 2,4D Na производится двумя методами:

I) конденсация солей монохлоруксусной кислоты с 2,4 дихлорфенолятами щелочных металлов или аммония в водной или безводной среде (Мельников Н.Н. 1968).



Ядохимикаты этой группы используют для химической обработки водоемов с целью уничтожения высшей и низшей водной растительности.

Летальной концентрацией 2,4 D-На для карпов является 100 мг/л.

Хроническое отравление вызывает концентрации 50-30 мг/л (Метелев В.В. 1971).

Рыбы проявляют разную чувствительность к гербициду. 2,4D -Na более токсичная для форели и щуки, менее чувствительны к ней карпы (Luedeman D., Kayser H., 1966) и окуни. LD₅₀ для последних составляет 350-375 мг/л (Jones I., 1964).
Обширные наблюдения по влиянию 2,4 D-На на водную фауну и качество воды опубликовал Шмит (Smith G.E., Isom B.C., 1967).
Изучение воздействия 2,4D -Na на выживаемость икры и темп раннего эмбрионального развития рыб, выявило активное влияние препарата (Hiltibran F.C., 1967, Корде Б.А., 1971). Показано, что гербицид в концентрации 2,5 мМ вызывает разобщение окислительного фосфорилирования. Поглощение кислорода митохондриями подавляется примерно шесть раз меньшей концентрацией. Увеличение содержания гербицида в среде до 5,0 мМ вызывает резкое падение интенсивности потребления кислорода. Предполагают, что наблюдаемый эффект вызван спонтанным набуханием митохондрий, облегчающим проникновение яда (Звиргзис Ю.К., 1969, 1971).
Исследование количественных сдвигов в липидных фракциях скелетной и сердечной мускулатуры карпа обнаружили, что под влиянием гербицида повышается количество фосфолипидов, триглицеридов и эфиров холестерина. При этом, количество свободного холестерина и неэстерифицированных жирных кислот не изменяется (Фреймане Т.Х., Платица В.П., 1971).

II. Материал и методы

В качестве биологических объектов использовали эритроциты крови человека и карпа чешуйчатого (*Cyprinus Carpio L.*). Кровь человека получали на Рижской станции переливания крови.

Карпов в возрасте 2-х лет весом 300-350 грамм содержали по 5 особей в стеклянных 20-литровых аквариумах в интервалах концентраций нестацидов 40-10 мг/л и аэрировали микрокомпрессорами в течение 12 дней. Взвесь эритроцитов брали у рыб из заберной вены через 24 часа и сохраняли в 1,2% физиологическом растворе. Интактных карпов содержали в 400-литровых бассейнах при температуре 4-7°C и не кормили. Контрольных карпов в отсутствие гербицидов содержали в аналогичных опыту условиях.

Хлореллу (*Chlorella pyrenoidosa* 82) выращивали на среде тамия в специальной установке при стандартных условиях (Владимирова М.Т., Семенов В.Е., 1972 г.) с круглосуточным освещением лампами ЛБ-40 интенсивностью 0,03 кал/см²/мин при температуре 26±0,1°C и непрерывном продувании 1 л/мин на 1 л суспензии 1% углекислого газа с воздухом. Исходная плотность суспензии составляла 2·10⁶ кл/мл. В работе использовали взвесь хлореллы в 4 мл кювете с оптической плотностью (Д)=0,05, определяемой на фотоэлектрокалориметре-нефелометре (ФЭКН-56).

Люциферин-люцифероза

Суспензию люциферин-люцифероза получали из светляков *Luciola mingrelica* Men., собранных в районе гор Сухуми.

Материал обрабатывали в институте экспериментальной патологии АН СССР. После вакуумной сушки отделяли светящуюся часть светляка и сохраняли в холодильнике в запаянных ампулах при температуре 20°C. Для работы экстракт приготавливали ежедневно из 4-6 светящихся частей жука и пропорционально весу добавляли буфер арсената натрия.

Раствор аденозинтрифосфата (АТФ)

Раствор аденозинтрифосфата приготавливали в небольшом количестве (3-5 мл) из препарата фирмы "Reanal". Концентрация раствора 10^{-2} М. При хранении раствор АТФ замораживали.

Гексокиназа

Раствор гексокиназы фирмы "Schuchardt-München" приготавливали непосредственно перед экспериментом в концентрации 2 мг/л бидестиллята.

Люминол

Гидразид 3-аминофталевой кислоты

В работе использовали химически чистый препарат люминола производства фабрики имени Войкова. Люминол в зависимости от постановки опыта растворяли в бидестилляте или в физиологическом растворе в концентрации 0,001%.

Буферные растворы

1. Растворяли 42,5 г $\text{Na}_3 \text{AsO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и 10 г $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл дистиллированной воды. Получали 0,1 м буферный раствор арсената натрия с рН 7,4. Осадок, образовавшийся после отстоя буфера, отфильтровывали через бумажный фильтр.

Буферный раствор использовали в системе люциферин-люцифераза - АТФ.

2. Буферный раствор бората, используемый в системе люцинол - H_2O_2 готавливали растворением 12,404 г борной кислоты в дистиллированной воде с добавлением 100 мл 1 н NaOH до метки 1000 мл. 7 мл раствора бората и 3 мл 0,1 NCl составляют буферный раствор с pH 8,68.

Применяли следующие гербициды и вещества:

монурон - технический препарат, содержащий 80% хлорфенилдиметил мочевины. Растворимость монурона в воде при 15°C составляет 230 мг/л;

диурон - светлый порошок с 80% содержанием действующего начала. При 25°C в одном литре воды растворяется 42 мг препарата;

2,4-дихлорфеновая соль - 2,4 Д Na - белое кристаллическое вещество без запаха с температурой плавления 215°C. В работе использовали очищенный препарат. Часть экспериментов проведена с техническим препаратом, содержащим примеси фенола. Растворимость в воде при 20°C 335 г/л;

прометрин - использовали технический препарат, содержащий 50% действующего вещества 2-метилтио - 4,6 бис(изопропиламино)-1,3,5-триазин. Растворимость прометрина в воде при 20°C - 0,048%;

антикислители - цистеамин (соль соляной кислоты) - химически чистый. Производные пиридина синтезированные в Институте Органического синтеза АН Латв.ССР:

pp-171 мол.вес 533,8

pp-148 мол.вес 215,2

pp-134 мол.вес 168

ε-капролактam - использовали перекристаллизованный ε-капролактam с температурой затвердения 69°C, перманганатным числом 12000 и летучими основаниями 0,0. Препарат получен с Даугавпилсского завода синтетического волокна.

Метод кислотных эритрограмм и его модификации

Методом кислотных эритрограмм, рекомендованным Л.А.Терсковым и И.И.Гительзоном, можно точно определить закономерное распределение эритроцитов по их гемолитической (осмотической) резистентности (Талитченко М.М., Кокин К.А., 1968). Суть метода заключается в следующем: фотоэлектроколориметрическими измерениями определяют динамику разрушения эритроцитов, если действовать на них гемолитиком. Гемолиз должен протекать при постоянной температуре и концентрации гемолитика. Кривую распределения эритроцитов по их стойкости к гемолитику называют эритрограммой. Форма эритрограммы дает возможность определить количество эритроцитов определенной резистентности. В результате фотоколориметрических измерений получают ряд показаний уменьшения оптической плотности. Кинетика уменьшения оптической плотности взвеси эритроцитов характеризует интенсивность распада эритроцитов при воздействии гемолитического вещества.

Порядок измерения следующий: несколько капель крови разбавляют 8-10 мл физиологического раствора и центрифугируют 3 минуты при 1500 об/мин. После центрифугирования отсасывают прозрачный слой раствора над осевшими эритроцитами. Отмывание плазмы повторяют 2-3 раза. К приготовленным эритроцитам доливают 2 мл физиологического раствора и ставят в термостат. Перед анализом проверяют температуру в кювете с физиологическим раствором, которая должна быть 24°C.

Суспензию эритроцитов разбавляют до стандартной концентрации следующим образом: шунт чувствительности гальванометра включают в положение "I". Левую шкалу устанавливают на отметке 0,700 по шкале оптической плотности, стрелка гальванометра в этом случае отклоняется в левую сторону. Из пробирки, которая находится в термостате, пипеткой берут кровь и вносят в рабочую кювету с физиологическим раствором. Кровь добавляют до тех пор, пока стрелка гальванометра устанавливается на нулевой отметке. После этого выключают гальванометр и пипеткой отсасывают точно 2 мл суспензии эритроцитов, остаток взвеси отсасывают, а взятые пипеткой 2 мл выливают обратно в рабочую кювету. Пипеткой набирают 2 мл соляной кислоты и добавляют к взвеси эритроцитов, одновременно включая секундомер. Поворачивая диск отсчета, стрелу гальванометра устанавливают на нулевой отметке и ровно через 30 секунд проводят первый отсчет. В дальнейшем наблюдается постепенное уменьшение оптической плотности, поэтому стрелка гальванометра смещается от "0" отметки.

Плавню поворачивая диск отсчета, удерживают указатель гальванометра в нулевом положении и через каждые 30 сек. фиксируют показания оптической плотности, до окончания реакции гемолиза.

Об окончании гемолиза свидетельствует остановка стрелки гальванометра в течение одной минуты. Оптическая плотность в этом случае соответствует величине 0,020-0,060. Остаточную абсорбцию порождает гемин, который образуется при реакции HCl с гемоглобином.

Шунт чувствительности гальванометра переключают в положение "0". Жидкость отсасывают и кювету два раза тщательно прополаскивают физиологическим раствором. После этого кювету опять наполняют физиологическим раствором, проверяют "0" фотоколориметра и установка готова к следующему измерению.

Модификация

1. Взвесь эритроцитов инкубировали вместе с исследуемым препаратом при 37°C 15 минут, затем эритроциты отмывали физиологическим раствором и проводили измерение на резистентность как описано выше (Кудряшов Ю.М., Какушкина М.Л. 1959).

2. В рабочей кювете к двум мл взвеси эритроцитов прибавляли 1 мл раствора гербицида и через 15 минут туда же добавляли 1 мл HCl.

3. В кювету взвесью эритроцитов (оптическая плотность 0,700) добавляли 2 мл раствора гербицида и измеряли гемолиз эритроцитов под действием токсината.

Люминесцентная измерительная установка

Изучение модельных люминесцентных систем проводили на универсальной измерительной установке (рис.6), оборудованной для регистрации слабых световых потоков, принцип работы которой описан ранее (Colli L et al. , 1954, Владимирев Ю.А., 1959 Васильев Р.Ф., Карпухин О.Н., Шляпинткод В.Я. 1961, Тарусов Б.Н., Журавлев А.И. 1961).

Термостатируемая живота помещена в светонепроницаемой камере. Над животой установлен фотоэлектронный умножитель ФЭУ-39А, который питается от высоковольтного стабилизированного выпрямителя. Сигнал от катодного повторителя, вмонтированного в светонепроницаемый кожух вместе с ФЭУ, подается на широкополосный импульсный усилитель и далее на автоматический дифференциальный дискриминатор. От дискриминатора сигналы поступают на измеритель скорости счета и параллельно на блок управления. Показания измерителя скорости счета регистрировали на электронном самопишущем приборе.

ФЭУ-39А имеет следующие характеристики:

диаметр рабочей площади катода 34 мм

область спектральной чувствительности 160-600 нм

область максимальной спектральной чувствительности 380-420 нм

постоянный ток на выходе умножителя 10 мка

интегральная чувствительность катода - 90 мка/нм

темновой ток при напряжении питания 1020 в - 4×10^{-8}

катодный повторитель для улучшения соотношения сигнал/фон с малошумящей лампой 6 ЖЗП

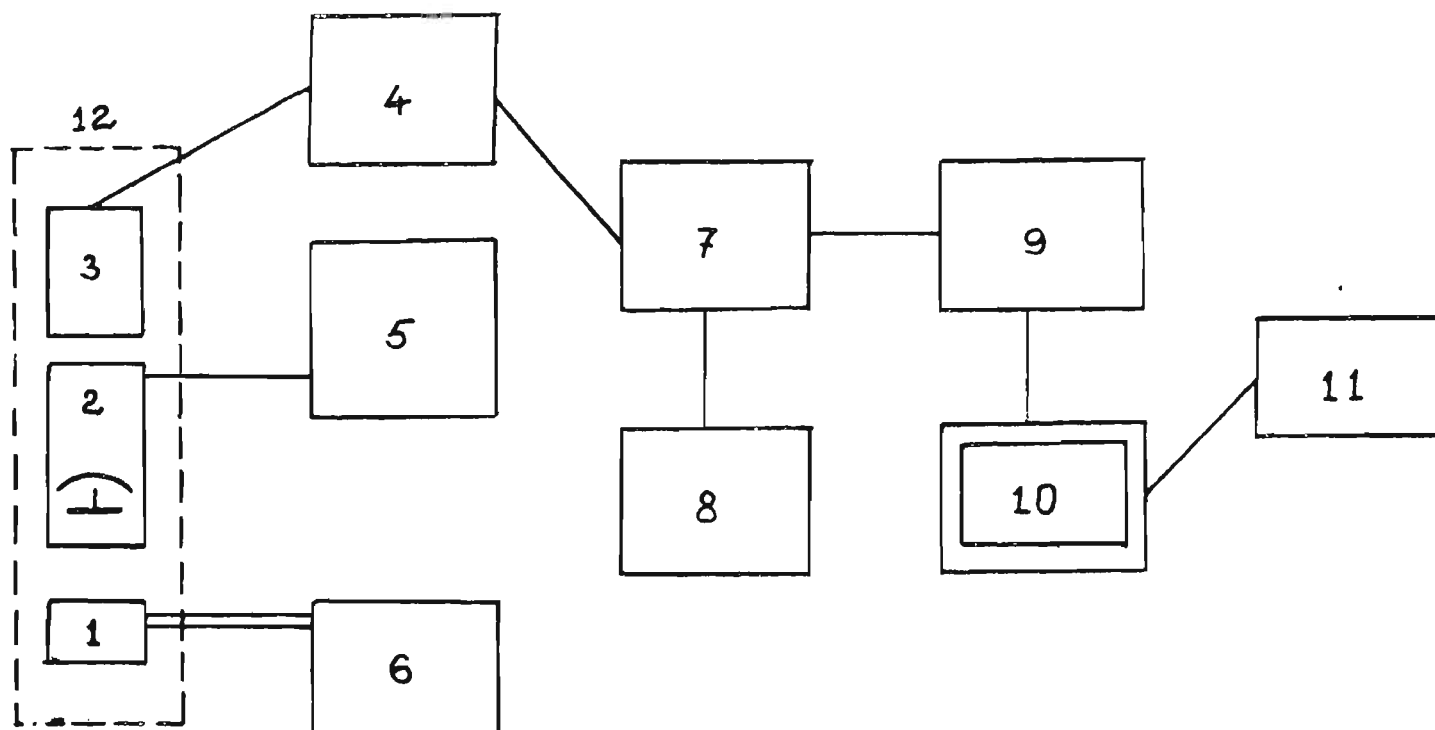


Рис.6. Схема установки для регистрации хемилюминесценции и биолюминесценции^м

- 1 - термостатируемая клетка; 2 - фотоэлектронный умножитель ФЭУ-39А; 3 - катодный повторитель;
 4 - широкополосный усилитель УШ-1; 5 - высоковольтный стабилизированный выпрямитель ВСВ-2с;
 6 - термостат У-10; 7 - автоматический дифференциальный дискриминатор;
 8 - декаэлектронный пересчетный прибор ПС-1; 9 - измеритель скорости счета ИСС-1;
 10 - электронный самопишущий прибор ЭП-09; 11 - автоматическая печатная машина

Измерение хемилюминесценции люминольной системы

Включали установку для измерений слабых световых потоков и термостат для поддержания температуры в рабочей кювете. После прогрева устанавливали режим работы. Напряжение на ФЭУ-39А от высоковольтного усилителя - 1100 в. Порог дискриминации на автоматическом дифференциальном дискриминаторе-20. Время нарастания на измерителе скорости счета - 80 сек. Вид работы на блоке управления на отметку "сек". При пуске установки 5-10 мин измеряется фон, когда он достигает пределов 6-9 имп/сек, аппарат готов к работе. Порядок приготовления люминольной системы: в кювету наливаем 0,001%-ный раствор люминола в количестве, которое подбирается экспериментально и для отдельных модификаций системы колеблется в пределах 0,2-0,5 мл, ~~к которой к люминолу добавляем 0,001% раствора~~

Через 15 сек. добавляется буфер в количестве, необходимом для того, чтобы в течение всех измерений в кювете было равное количество раствора. Следует отметить, что люминол очень чувствителен к изменениям pH. Спустя 30 сек добавляется вещество, служащее катализатором высвечивания, в данном случае - это АТФ или суспензия крови. Последней приливается перекись водорода (H_2O_2), которая служит как бы энергетическим субстратом - генератором радикалов. Перекись водорода прибавляется по истечении одной минуты. Кювету устанавливаем под ФЭУ в светонепроницаемом кожухе и через минуту и 15 сек с начала отсчета времени открываем шторку между кюветой и ФЭУ.

На электронном самопишущем приборе образуется кривая, каждая точка которой соответствует определенной величине имп/сек, которую можно определить при помощи автоматического печатного устройства. Устанавливая соответствующий режим работы на блоке управления, печатное устройство печатает количество световых импульсов за 10, 100, 1000 секунд. Длительность измерения зависит от постановки эксперимента. После снятия "фона" вносим второй компонент системы - изучаемое вещество. Прибавление его к люминолу проявит свойства вещества, как ингибитора или катализатора свечения последнего.

Порядок измерения системы

Люциферин-люцифераза

В ступке растирали 3-4 светящиеся части светляка с 2-3 каплями буферного раствора арсената натрия. При получении гомогенного мутного раствора доливали его указанным буфером из расчета 0,5 мл буфера на 5 мл сухого веса тела светляка. Мутный раствор центрифугируют (центрифуга К-23) 5 минут при 2000 об/мин и использовали в работе прозрачный супернатант. Поскольку излучение фиксируется главным образом от поверхности не следует использовать большие количества раствора, если конечно интенсивность высвечивания достаточна.

В кювету наливают 0,5 мл раствора люциферин-люциферазы АТФ и исследуют антиокислительные свойства изучаемого вещества, в данном случае монурона, диурона или 2,4Д Na .

В контрольных измерениях вместо гербицидов в кювету наливают дистиллированную воду.

Учитывая, что настоящая система состоит из трех компонентов и свечение меняется во времени, все подготовительные работы нуждаются в хронометрировании.

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ДРОЖЖЕВОЙ
ГЕКСОКИНАЗЫ В ПРИСУТСТВИИ МОНУРОНА, ДИУРОНА
и 2,4 D Na**

Дрожжевая гексокиназа способна фосфорилировать ряд сахаров, главным образом α и β формы D -глюкозы, D -фруктозы, D -маннозы. Молекулярный вес дрожжевой гексокиназы 97000. Возможно она является гликопротеидом, содержащим в качестве полисахарида маннозу.

$ATP + D$ -глюкоза \rightarrow ADP + D -гексоз-6-фосфат. Для каталитического действия фермента необходимо присутствие ионов магния (Mg^{2+}).

Необходимые реактивы:

1. ATP
2. Глицил - глицин
3. D -глюкоза
4. Магний хлористый ($Mg Cl_2$)
5. Натрий едкий ($NaOH$)
6. Вода дистиллированная
7. Суспензия из светляка

Приготовление растворов

1. 1,8% р-р $Mg Cl_2$
1,8 г $Mg Cl_2$ на 100 мл дист. H_2O
2. 0,1 н р-р $NaOH$
4 г $NaOH$ на 1 л дист. H_2O

3. 0,1 М р-р АТФ

0,05 г АТФ на 10 мл дист. H_2O

4. 0,1 М глицил-глицин

0,6606 г глицил-глицина растворяет в 20 мл дист. H_2O с 0,1 н NaOH доводят до pH 9,0. Затем доливают до 50 мл с H_2O

5. 0,2 М р-р глюкозы

3,6 г D -глюкозы на 100 мл H_2O

6. 0,01 р-р HCl

1 ампула фиксана на 1 л воды. Этот раствор разбавляют 10 раз.

Все реактивы можно хранить в холодильнике в течение 2 недель.

7. Суспензия из светляка.

Постановка опыта

Перед измерениями приготавливаем смесь реактивов.

Растворы 2 мл АТФ, 5 мл глицил-глицина, 5 мл 10% $CaCl_2$,

NaOH доводят pH до 8,5 (\approx 7,4 мл) и доливаем до 50 мл дистиллированной водой. 2,5 мл смеси реактивов наливают в кювету, добавляют 0,4 мл 0,2 М глюкозы и 0,2 мл фермента. Кювету устанавливают под фотоэлектроумножителем ФЭУ-39 А и производят измерение как описано выше. В основе указанной методики лежит работа Р.Даррова и С.Коловика (R.Darrow, S. Colowick , 1963 год).

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты подвергали статистической обработке (Вознесенский В.А., 1969; Плохинский Н.А., 1970).
Динамику изменений осмотической резистентности эритроцитов, инкубированных в растворах мовурона, диурона и 2,4 D Na , определяли в трех сериях опытов по 3 повторности.

Определяли среднее квадратическое значение ошибки по формуле:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum \varepsilon_i^2}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{\sum (M - x_i)^2}{n(n-1)}}$$

где $M = \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n}}$ среднее квадратическое значение величины x в n опытах и критерий достоверности разности

где $td = \frac{d}{m_d} \geq t_s$ ($\nu_d = n_1 + n_2 - 2$)
где $m_d = \sqrt{m_1^2 + m_2^2}$ - ошибка выборочной разности.

Стандартное значение критерия, определяемое по таблице критериев Стьюдента для заданного порога вероятности безошибочных прогнозов в зависимости от числа степеней свободы, численности сравниваемых выборок и числа степеней свободы для разности двух средних. Исходя из полученных данных было определено, что количества повторностей в наших экспериментах достаточно для 95% достоверности результатов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Влияние монурона, диурона и 2,4 D Na на эритропоэз карпов и деструктивное действие гербицидов на эритроциты человека и рыб

Одним из наиболее благоприятных объектов для изучения действия биологически активных веществ на мембраны служат эритроциты. Гемоглобин, содержащийся в их цитоплазме, позволяет применить объективные фотоколориметрические измерения скорости гемолиза эритроцитов, вызываемые разными активными веществами, в том числе и гербицидами.

Для определения действия на мембраны клеток монурона, диурона, 2,4 D Na и прометрина использовали эритроциты человека. В норме они устойчивы к солянокислому гемолизу.

В таблице № I приведены средние арифметические значения времени 50% гемолиза взвеси эритроцитов, вызываемого гербицидами, взятыми в разных концентрациях. Непосредственный гемолиз эритроцитов без добавления гемолизика 0,004 M NaCl вызывает только 2,4 D Na соль. Растворимость ее на два порядка выше чем у остальных препаратов. Монурон и диурон и прометрин вызывают значительные отклонения в осмотической резистентности эритроцитов только после предварительной 30 минутной инкубации их в растворах гербицидов.

Дифференциальные эритрограммы (распределение эритроцитов по их резистентности) и интегральные кривые разрушение оболочек эритроцитов человека изображены на рис.7.

Таблица № I

Время (в минутах) 50% гемолиза эритроцитов человека при воздействии на них гербицидов

Гербицид	Концентрация					
	насыщенный раствор	I/2 насыщенный раствор	I/4 насыщенный раствор	2%	2%	0,5%
1. Прометрин	4,6±0,8	6,1±0,4	17,5±0,7	-	-	-
2. Прометрин с предварительной инкубацией после прибавления 0,04 HCl	5,2±0,2	5,2±0,2	4,4±0,4	-	-	-
3. Монурон	30,0±4,8	-	-	-	-	-
4. Монурон с предварительной инкубацией после прибавления 0,04 HCl	4,6±0,2	4,5±0,1	4,5±0,2	-	-	-
5. Диурон	30	-	-	-	-	-
6. 2,4-Динатриевая соль	-	-	-	1,5±0,1	2,3±0,5	15,0
7. Гемолиз интактных эритроцитов	4,4±0,2	-	-	-	-	-

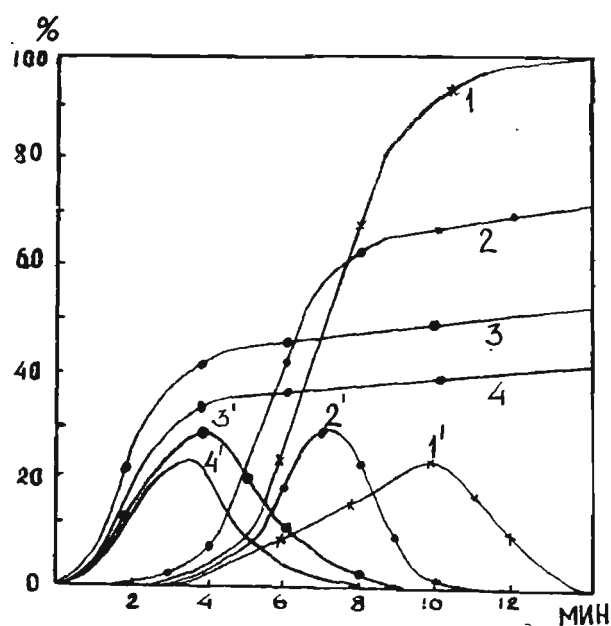


Рис.7. Дифференциальные ($1^I - 4^I$) и интегральные кривые гемолиза эритроцитов человека под влиянием гербицидов.

Гемолиз эритроцитов под воздействием:

- 1) 0,004 М HCl ($1, 1^I$)
- 2) насыщенного раствора прометрина ($2, 2^I$)
- 3) 0,5% ($3, 3^I$) и 2% раствора 2,4 Д Na ($4, 4^I$)

Дифференциальная эритрограмма 2 свидетельствует, что насыщенный раствор прометрина способен разрушить оболочки клеток только у группы малорезистентных эритроцитов. По кривой (2) видно, что процесс гемолиза в присутствии насыщенного раствора прометрина начинается на 2,5 минуте и до 4,5 минуты он протекает довольно медленно. В интервале от 4,5 до 8-ой минуты гемолиз достигает максимума, от 8 до 10-ой минуты интенсивность гемолитического процесса снижается.

Гемолиз прекращается на 12-й минуте. Процентное распределение эритроцитов по их резистентности в процессе гемолиза отражает интегральная S-образная кривая 2. Видно, что в течение 4,5 минут гемолизировало меньше, чем 10% взвеси эритроцитов. Затем гемолиз быстро нарастает и на 8-й минуте становится больше, чем 60%. В дальнейшем процесс замедляется.

В указанных концентрациях 2,4 D Na соль также способна разрушить клеточные оболочки. Кривая 3 изображает воздействие 0,5% раствора 2,4 Д- Na на эритроциты человека и по своему характеру напоминает кривую, проанализированную выше, но гемолиз в данном случае протекает быстрее. По интегральной кривой (3) видно, что уже на 2-й минуте число разрушенных эритроцитов достигает 20%. В дальнейшем клетки гемолизуют медленнее и на 15 мин. количество их составляет 40%.

Увеличение концентрации раствора 2,4 Д - Na сопровождается ускорением гемолиза. 2% раствор 2,4 Д- Na (кривая 4) разрушает эритроциты в первые две минуты на 40%. Дальше процесс гемолиза замедляется. 50% разрушение взвеси наступает только через 15 минут.

Контрольной эритрограмме, где гемолитиком является 0,04M соляная кислота, соответствуют кривые I и I'. В контроле через 15 минут отмечается 100% разрушение эритроцитов.

Стойкость эритроцитов к препарату 2,4Д Na явно меньшая, чем к действию прометрина. Под влиянием 2,4Д Na гемолиз начинается непосредственно после прибавления гербицида, однако, затем наблюдается уменьшение скорости гемолиза. Гемолиз эритроцитов под действием прометрина аналогичен таковому, вызванному соляной кислотой.

Об этом свидетельствует время 50% гемолиза эритроцитов, которое является одним из критериев оценки токсичности препаратов. По результатам таблицы можно судить о разнице в скорости распада эритроцитов при непосредственном действии на них гербицидов и после предварительной инкубации их в растворах гербицидов. Однако, предварительная инкубация взвеси эритроцитов с приметрином не снижает резистентности клеток. Наблюдается даже некоторое повышение стойкости.

Анализ эритрограмм позволяет думать, что распад мембраны эритроцитов под действием гербицидов может быть связан с процессами окисления. В этой связи были проведены эксперименты по выяснению влияния антиоксидантов на процесс разрушения оболочек эритроцитов. В качестве ингибиторов окислительного процесса использовали цистеамин и синтезированные в институте Органического синтеза АН Латвийской ССР вещества PP^{I34} , PP^{I48} и PP^{I71} . На рисунке № 8 показано влияние названных антиоксидантов на гемолитическую активность 2% раствора 2,4Д Na (интегральные кривые I-5). Кривая (I) показывает процесс гемолиза двухпроцентного раствора 2,4Д Na без антиокислителя. Кривая (2) отражает влияние 10^{-2} М цистеамина на реакцию гемолиза, вызванную гербицидом. В данном случае скорость распада клеток намного замедляется и процесс гемолиза начинается только с 7-й минуты. Через 15 минут количество распавшихся клеток составляет 4,5%, а в контроле 58%.

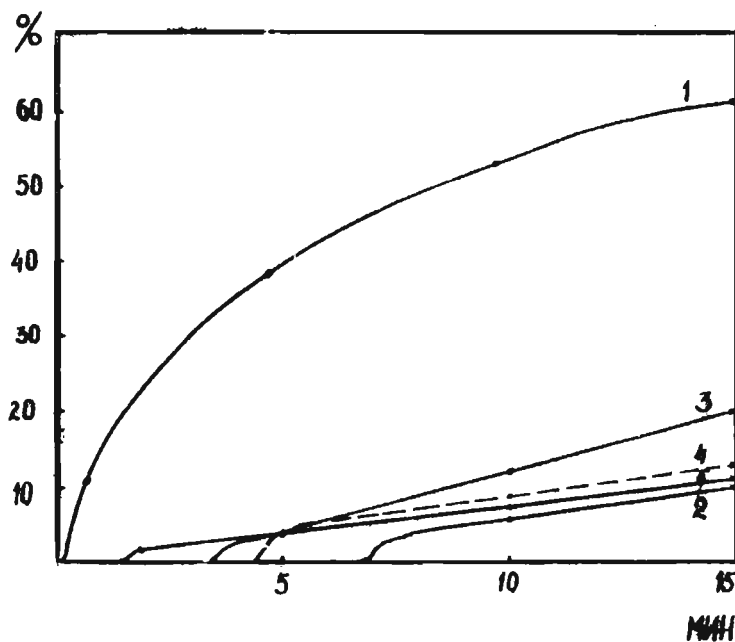


Рис.8. Влияние антиокислителей на гемолитическую активность 2% раствора 2,4Д Na :

- 1 - динамика гемолиза эритроцитов под влиянием 2% 2,4Д Na
- 2 - влияние 10^{-2} М раствора цистеина на гемолитическую активность 2,4Д Na
- 3 - влияние насыщенного раствора PP^{I7I} на гемолитическую активность 2,4Д Na
- 4 - влияние 10^{-2} М раствора PP^{I48} на гемолитическую активность 2,4Д Na
- 5 - влияние 10^{-2} М раствора PP^{I34} на гемолитическую активность 2,4Д Na

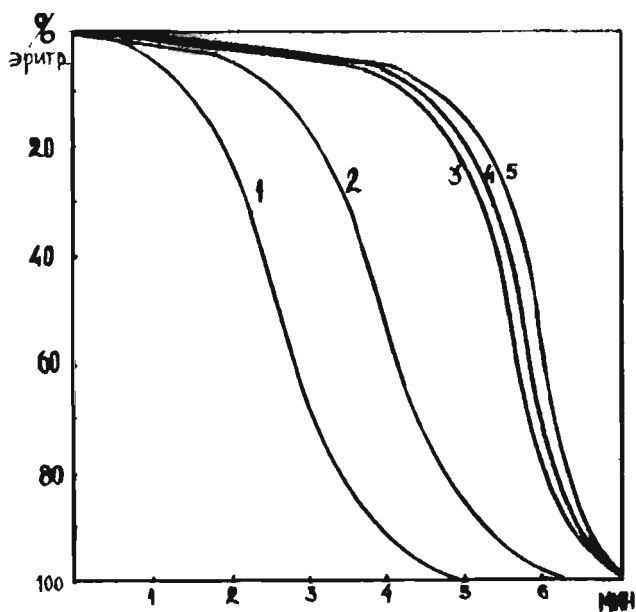


Рис.9. Изменения гемолитической активности монурона, длительно инкубированного в водном растворе (конц. 40 мг/л)

- 1 - после 3 суток
- 2 - после 5 суток
- 3 - после 7 суток
- 4 - после 14 суток
- 5 - после 16 суток

Сравнивая антиоксиданты по их ингибирующей активности на процесс гемолиза, отмечаем, что наиболее эффективным является цистеамин, затем PP^{I34} , PP^{I48} и PP^{I71} .

Констатировали, что химически чистая соль 2,4 ДNa и ее технический препарат обладают одинаковым действием на эритроциты.

Гемолитическая активность монурона при длительной инкубации в воде падает. Это отражают интегральные кривые (I-5), представленные на рисунке № 9.

Влияние гербицидов монурона, диурона 2,4 ДNa
на эритроциты карпа

Эритроциты человека являются весьма удобным объектом для исследования явлений, протекающих на поверхности клеток, т.к. распределение их по стойкости в норме является константной величиной. Для всех других объектов, включая рыб, резистентность и распределение по стойкости зависят от вида, времени года, интенсивности питания и ряда других факторов (Ezell G.H., Sulya L.L. Dodgen C.L., 1969). Поэтому, применяя в качестве критерия скорость гемолиза эритроцитов, невозможно сравнить действие гербицидов на разные виды рыб. Однако, вполне возможно сопоставить результаты в пределах одного вида. В опытах у интактных карпов брали кровь из жаберных вен и определяли изменения в распределении по стойкости эритроцитов, предварительно инкубированных в растворах монурона, диурона и 2,4 ДNa.

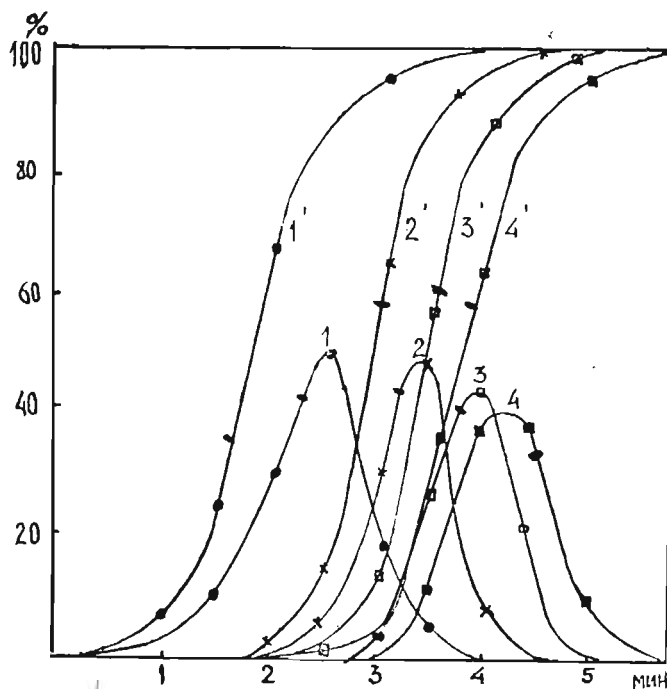


Рис. 10. Интегральные (I' - 4') и дифференциальные (I - 4)

эритрограммы эритроцитов интактных карпов:

- 1) Гемолиз эритроцитов после 15 мин. предварительной инкубации в растворе монурона - 40 мг/л;
- 2) гемолиз эритроцитов после 15 мин. предварительной инкубации в растворе 2,4А - Na - 40 мг/л;
- 3) гемолиз эритроцитов после 15 мин. предварительной инкубации в растворе диурона - 40 мг/л;
- 4) контроль.

На рисунке № 10 показано влияние на эритроциты рыб монурона и диурона в концентрациях 40 мг/л. Монурон оказался более сильным гемолитиком, чем диурон. Дифференциальная эритрограмма сужена и заметно сдвинута влево по отношению к контролю. Это свидетельствует об изменениях у всех групп эритроцитов независимо от их возраста и физиологического состояния. Влияние диурона в сравнении с контролем незначительно, но, учитывая свойство диурона адсорбироваться на поверхности, возможны функциональные помехи, которые не выявляются данным методом. Гербицид 2,4 ДNa оказался менее выраженным гемолитиком, чем монурон и более активным, чем диурон (интегральные и дифференциальные кривые 2, 2').

Если непосредственное влияние гербицидов на эритроциты могут отражать структурные изменения их мембран, то действие гербицидов на гемопоэз можно установить по стойкости эритроцитов у рыб, инкубированных в растворах гербицидов, т.к. молодые эритроциты более устойчивы, чем старые. Учитывая выше сказанное, нами были поставлены опыты с карпами, которых содержали в аквариумах с пестицидами, а затем определяли изменения в распределении эритроцитов по их гемолитической резистентности. Результаты измерений представлены в таблице № 2.

При более длительной инкубации рыб в гербицидах изменения, отмеченные в первые сутки, приводят их к летальному исходу. В опытах с диуроном в первые сутки наблюдается заметное снижение резистентности эритроцитов, а в последующие два дня — повышение их стойкости.

Таблица 2

Время 50% гемолиза взвеси эритроцитов и инкубированных в растворах монурона, диурона и 2,4 D Na карпов (ед. измерения 0,5 мин)

Сут-ки	Контроль				Монурон 40 мг/л				Достов. разл. контр./монур.	2,4 D Na 40/мг/л				Достов. разл. контр./2,4DNa	Диурон 40 мг/л				Дост. разл. контр./диурон
	X_i	ε_i	$\sum \varepsilon_i$	$M \pm \frac{\sum \varepsilon_i}{n}$	X_i	ε_i	$\sum \varepsilon_i$	$M \pm \frac{\sum \varepsilon_i}{n}$		X_i	ε_i	$\sum \varepsilon_i$	$M \pm \frac{\sum \varepsilon_i}{n}$		X_i	ε_i	$\sum \varepsilon_i$	$M \pm \frac{\sum \varepsilon_i}{n}$	
1.	7,5	0,05	0,35	7,45±0,11	7,4	+0,25	0,55	7,15±0,18	<0,99	7,0	-0,05	0,25	7,05±0,08	$t = \frac{0,4}{0,08} = 5$	6,5	+0,15	0,35	6,65±0,11	$t = \frac{0,8}{0,024} = 35$
	7,6	+0,15			7,2	-0,05				6,9	-0,15				6,7	-0,05			
	7,3	-0,15			6,9	-0,25				7,2	+0,05			<0,95	6,8	-0,15			<0,95
2.	7,1	-0,36			9,0	-0,33				6,9	-0,15				10,8	+0,5			
	7,8	+0,34	0,7	7,46±0,23	9,4	+0,07	0,67	9,33±0,22	$t = \frac{0,87}{0,24} = 6$	7,1	+0,05	0,2	7,05±0,07	$t = \frac{0,41}{0,03} = 13$	10,4	-0,1	1,5	10,2±0,5	$t = \frac{2,7}{0,5} = 5$
	7,5	+0,04			9,6	+0,27			<0,99	7,1	+0,05			<0,95	9,5	-0,7			<0,95
	7,3	-0,1			7,9	-0,16				7,2	+0,1				10,8	+0,5			
3.	7,3	-0,1	0,4	7,4±0,13	8,2	+0,14	0,34	8,06±0,11	$t = \frac{0,6}{0,06} = 60$	7,1	±0	0,2	7,1±0,07	$t = \frac{0,3}{0,012} = 24$	10,1	-0,1	1,5	10,2±0,2	$t = \frac{2,8}{0,1} = 28$
	7,6	+0,2			8,1	+0,04			<0,99	7,0	-0,1			<0,99	9,9	-0,5			<0,999
	7,5	+0,1			10,3	+0,5				7,5	±0				10,4	+0,2			
6.	7,6	+0,2	0,5	7,4±0,17	9,9	+0,1	1,1	9,8±0,37	$t = \frac{2,8}{0,3} = 9$	7,7	+0,2	0,2	7,5±0,07	$t = \frac{0,1}{0,3} = 0,3$					
	7,2	-0,2			9,3	-0,5			<0,99	7,3	-0,2			>0,95					
	7,4	0			8,6	+0,47				7,0	-0,2								
9.	7,7	+0,3	0,6	7,4±0,2	8,0	-0,13	0,99	8,13±0,33	$t = \frac{0,73}{0,3} = 21$	7,3	+0,1	0,4	7,2±0,13	$t = \frac{0,2}{0,4} = 0,5$					
	7,1	-0,3			7,8	-0,33			<0,95	7,3	+0,1			>0,95					
	7,6	+0,08			9,3	+0,24				7,1	-0,17								
10.	7,7	+0,18	0,48	7,52±0,16	9,0	-0,06	0,46	9,06±0,15	$t = \frac{1,44}{0,07} = 20$	7,5	+0,22	0,47	7,3±0,15	$t = \frac{0,22}{0,4} = 0,5$					
	7,3	-0,22			8,9	-0,16			<0,999	7,2	-0,08			>0,95					
	7,8	+0,24			9,2	+0,13				7,2	-0,08								
12.	7,4	-0,16	0,46	7,56±0,15	9,0	-0,7	0,21	9,06±0,07	$t = \frac{1,5}{0,2} = 7,5$	7,3	+0,03	0,014	7,27±0,05	$t = \frac{0,29}{0,3} =$					
	7,5	-0,06			9,0	-0,7			<0,99	7,3	+0,03			>0,95					

Обозначения: n - число измерений

 X_i - результаты измерений

M - среднее арифметическое значение

 $\varepsilon_i = M - x_i$ - отклонение измерения от среднего значения $\frac{\sum \varepsilon_i}{n}$ - средняя абсолютная ошибка t_{α} - критерий достоверности разности

Сутки	Контроль	Монурон	2,4Д Na	Диурон	Контроль	10 мг/л	10 мг/л	2,4Д Na
:	:	мг/л	20 мг/л	20 мг/л	:	МОНУРОН	ДИУРОН	1,6 г/л
1.	7,7±0,15	7,7±0,15	7,7±0,15	7,7±0,15	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2
2.	7,6±0,2	7,5±0	7,2±0,25	6,8±0,2	7,1 ± 0,2	8,0 ± 0,15	9,2 ± 0,15	6,4 ± 0,1
3.	7,57±0,2	9,8±0,15	6,8±0,3	19,14±0,4	7,3 ± 0,15	9,1 ± 0,3	9,6 ± 0,3	5,3 ± 0,3
6.	7,5±0,2	8,0±0,2	7,1±0,15	-	7,5 ± 0,2	9,2 ± 0,4	8,2 ± 0,15	7,2 ± 0,25
9.	7,4±0,2	7,8±0,15	7,3±0,2	-	7,4 ± 0,3	9,8 ± 0,4	8,0 ± 0,2	8,1 ± 0,3
10.	7,2±0,15	7,9±0,2	7,4±0,15	-	7,8 ± 0,3	10,1 ± 0,3	8,1 ± 0,3	8,7 ± 0,36
12.	7,3±0,2	7,9±0,2	7,6±0,3	-	7,8 ± 0,25	9,8±0,3	8,2 ± 0,25	9,5±0,4

Следует отметить, что при концентрации диурона в 40 мг/л через 72 часа карпы погибали. В аквариуме с монуроном в концентрации 40 мг/л в первые 24 часа также наблюдались изменения в стойкости эритроцитов, но менее выраженные, чем с диуроном. Через 48 часов отмечается повышение резистентности. Затем она остается постоянной в течение всего опыта. При данной концентрации монурона не наблюдалось гибели карпов даже при длительности инкубации до 30 дней.

На рисунке № II показана динамика изменения резистентности эритроцитов карпа в течение 12 дней. При снижении концентрации диурона ниже 40 мг/л через 24 часа наблюдается повышение стойкости эритроцитов. Через 48 часов она достигает максимума, затем имеет тенденцию к снижению.

Концентрация диурона в 10 мг/л,возможна, является пороговой. В этой концентрации диурона осуществляется адаптация рыб к яду, одним из признаков чего является постоянство распределения эритроцитов по гемолитической стойкости при поступающей инкубации. При дальнейшем снижении концентрации монурона, в крови рыб за 24 часа инкубации не наблюдается каких-либо изменений. Через 48 часов резистентность их эритроцитов даже повышается.

В опытах "in vitro" более сильным гемолитиком, чем диурон был монурон. В опытах "in vivo" наблюдалась обратная картина.

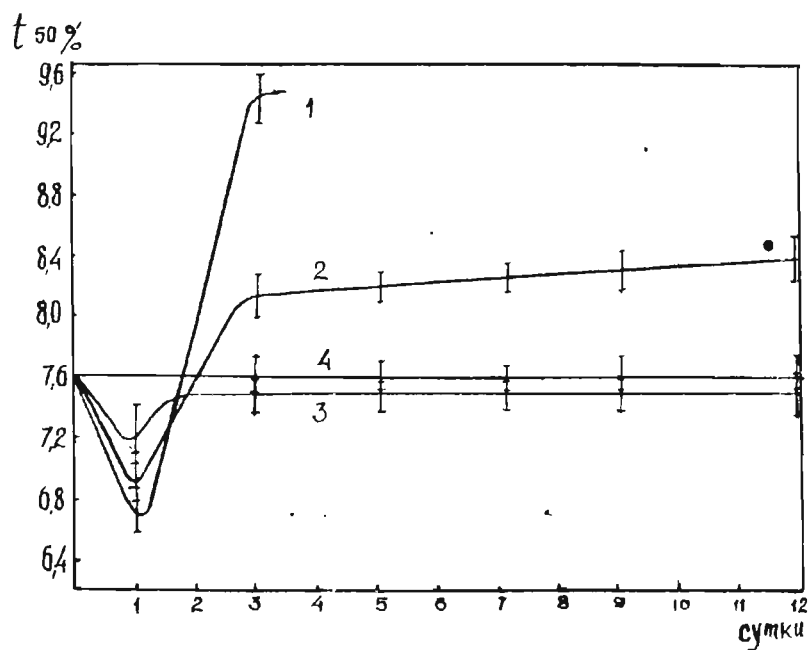


Рис. II. Изменения гемолитической устойчивости эритроцитов у карпов, инкубированных в растворах гербицидов:

	конц.
1) диурона	40 мг/л
2) монурона	40 мг/л
3) 2,4 д Na	80 мг/л
4) контроль	

Это можно объяснить тем, что опыты "in vitro" дают информацию о способности гербицидов поражать структурные элементы клеточных мембран непосредственно, чего нельзя получить в опытах "in vivo", когда это действие демпфируют защитные системы организма.

Гемолиз эритроцитов под влиянием ϵ -капролактама

Разность изменений резистентности эритроцитов при воздействии гербицидов очевидно является ответной реакцией на раздражитель. Свойственна ли ϵ -капролактама только гербицидам или же это универсальное явление? Для выяснения этого вопроса использовали индифферентное вещество - ϵ -капролактама. Определяли изменения резистентности эритроцитов в зависимости от концентраций вещества и продолжительности инкубации эритроцитов в растворе ϵ -капролактама.

На рис. № 12 видно как изменяется форма эритрограмм под влиянием ϵ -капролактама, 2 мл взвески эритроцитов (оптической плотности $D_{540} = 1,00$) инкубировали при 37° в капролактаме. Гемолиз intactных эритроцитов протекает постепенно. Максимальное число разрушенных за единицу времени клеток отмечается в конце процесса. Напротив, гемолиз эритроцитов, предварительно инкубированных в растворе ϵ -капролактама, происходит быстрее и с ярко выраженным максимумом (кривая I). Следовательно, резистентность эритроцитов под воздействием ϵ -капролактама снижается. Некоторое представление о механизме воздействия ϵ -капролактама дают кривые (рис. 13), изображающие зависимость времени полураспада эритроцитов от длительности их инкубирования и от концентрации ϵ -капролактама.

"Плато" на графике свидетельствует о преодолении какого-то защитного механизма мембраны клеток. Конечным результатом этого процесса является резкое снижение резистентности эритроцитов. После 4 часов инкубации эритроцитов в 2% растворе α -капролактама наступает полный гемолиз клеток. 1% раствор α -капролактама вызывает гемолиз эритроцитов в течение 11 часов.

В водном растворе биологическая активность α -капролактама не остается постоянной. На 4-5 день отмечается ее постепенное повышение. При этом в α -капролактаме не установлено каких-либо химических превращений и концентрация его остается постоянной.

Результаты измерений гемолитического действия 4% α -капролактама показали, что свежеприготовленный раствор медленно разрушает эритроциты и полный гемолиз взвеси наступает через 50 минут (рис. 14). Тот же раствор после 4-дневной инкубации разрушает взвесь эритроцитов за 25 минут.

Начиная с 5-го дня инкубации проявляется постепенное снижение гемолитического действия α -капролактама на эритроциты.

Изучение действия монулона, диулона и 2,4 Д. Na на хемиллюминисцентную модельную систему люминола

Люминол обладает высоким выходом хемиллюминесценции и потому удобен для изучения факторов, влияющих на окислительный процесс. Необходимым условием хемиллюминесценции люминола является присутствие кислорода.

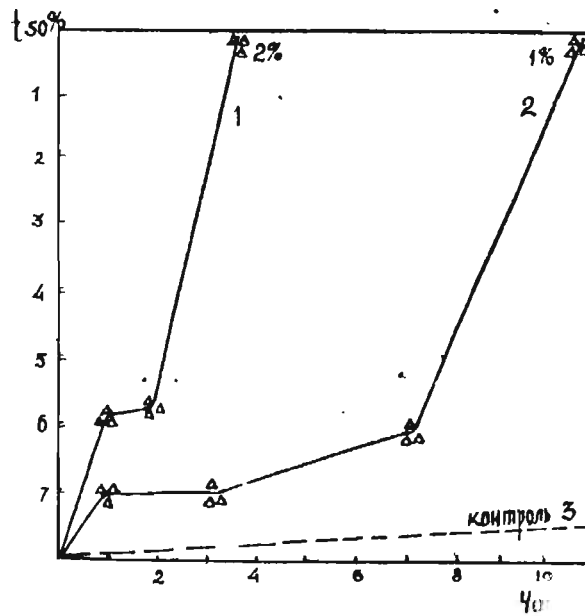


Рис. 13. Зависимость времени 50%-ного гемолиза эритроцитов человека от длительности их инкубирования в ϵ -капролактаме и от концентрации последнего

- 1) изменения 50% гемолиза во время инкубации взвеси эритроцитов в 2% растворе ϵ -капролактама
- 2) изменения 50% гемолиза во время инкубации взвеси эритроцитов в 1% растворе ϵ -капролактама
- 3) контроль

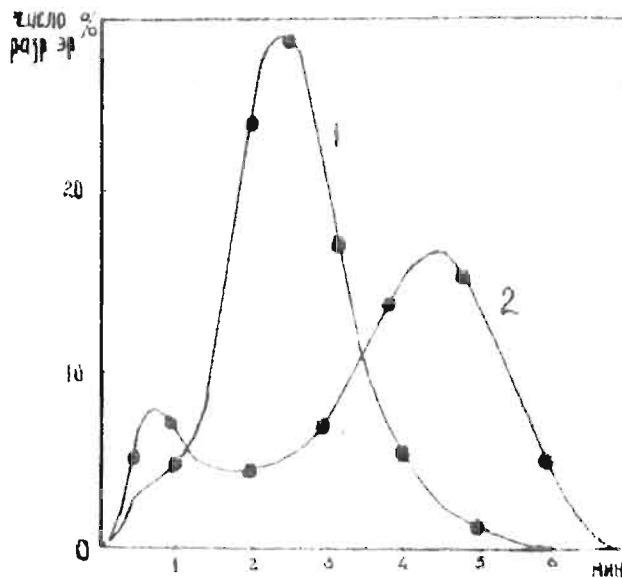


Рис. I2

Изменение формы эритрограммы под влиянием ϵ -капролактама:

- 1) гемолиз эритроцитов, предварительно инкубированных в 2% растворе ϵ -капролактама
- 2) гемолиз интактных эритроцитов

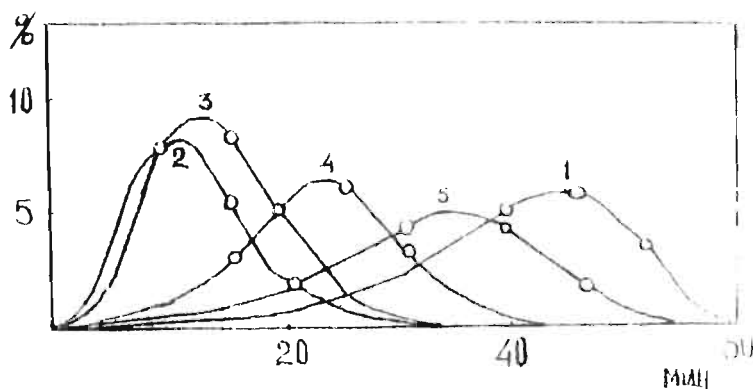


Рис. I4

Изменения эритрограммы в зависимости от продолжительности инкубации эритроцитов в растворах ϵ -капролактама:

- 1 - 1 суток, 2 - 3 суток, 3 - 4 суток, 4 - 5 суток,
5 - 6 суток

Наличие в среде перекиси водорода резко усиливает интенсивность свечения люминола. Для реакций окисления люминола с участием перекиси водорода квантовый выход составляет $6-7 \cdot 10^{-3}$, а для реакций с участием окислителей и катализаторов квантовый выход равен $10^{-4} - 10^{-5}$ фотонов/моль.

(Калиниченко, 1967). В присутствии H_2O_2 люминол полностью окисляется в соединении, излучающее свет, т.е. в анион 3-аминофталевой кислоты.

Хемилюминесцентная система люминола, моделирующая ферментативное окисление, на которой изучали влияние моноурона, диурона и 2,4 Д На, состояла из следующих компонентов: 1) люминол, 2) H_2O_2 , 3) кислород и буфер.

Интенсивность высвечивания подобной системы зависит от концентрации компонентов и величины рН буфера. Максимум высвечивания наблюдается в свежей смеси, затем интенсивность свечения снижается.

Через 5-8 минут достигается постоянный уровень высвечивания, что свидетельствует о равновесном состоянии реакции окисления люминола. При введении в систему гербицидов моноурона, диурона и 2,4 Д На, наблюдается замедление окисления (рис.15).

Кривая I отражает уровень высвечивания модельной системы окисления люминола (контроль). Для сохранения постоянного объема люминесцирующей смеси в образцы, в которые не вводятся гербициды, добавляют 1 мл дистиллированной воды.

Кривые 2 и 3, отличающиеся по высоте пика от кривой (1), свидетельствуют о торможении окисления. Наиболее сильным ингибитором свечения изучаемой системы является монурон. Максимум интенсивности ее свечения в присутствии этого гербицида составляет $1/4$ контроля. Введение в систему ингибиторов может вызвать замедление или прекращение реакции окисления. В данном случае мы наблюдаем торможение окислительного процесса, что объясняется заменой активного переносного радикала малоактивным радикалом молекулы гербицида.

В дальнейшем было обнаружено, что введение в систему люминола аденозинтрифосфата (АТФ) увеличивает интенсивность ее свечения. АТФ известен как универсальный трансформатор и переносчик энергии в биологических процессах (Бреслер С., 1966). Влияние АТФ на систему свидетельствует о существовании некоторых общих механизмов размена энергии в химической модели люминола и в биологических объектах.

В кювете, наполненной в определенной последовательности люминолом, АТФ, буферным раствором и перекисью водорода, возникает свечение (рис.16), максимум которого 225 имп/сек. достигается через 2 мин. Если в данной системе не присутствует АТФ, интенсивность свечения значительно ниже и составляет примерно 97 имп/сек. в точке максимума (рис.16, кривая 3). Эти две кривые являются исходными параметрами светящейся системы. По их изменению можно обнаружить свойства гербицида тушить или усиливать свечение системы.

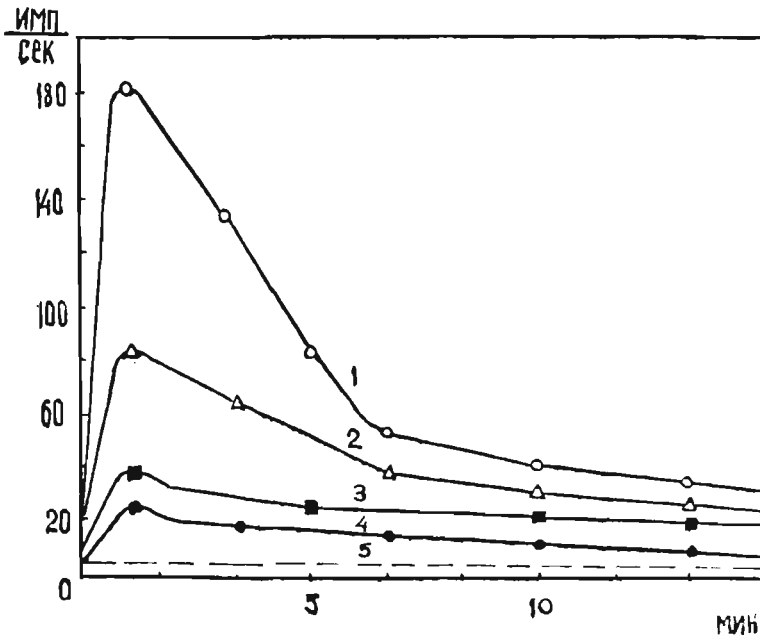


Рис.15. Динамика высвечивания модельной системы окисления люминола в присутствии гербицидов в конц.40 мг/л:

- 1) люминол + H_2O_2 + I_0 См. H_2O_2 + буфер (контроль)
- 2) люминол + H_2O_2 + I_0 2,4Д Na + буфер
- 3) люминол + H_2O_2 + I_0 Одурон + буфер
- 4) люминол + H_2O_2 + I_0 монурон+ буфер
- 5) фон

Рис. 16 Высвечивание модельной системы люминола в присутствии АТФ, монурона, диурона и мочевины:

- 1/ 0,5 люминол + 0,5АТФ + 1,0 мл.буфер + 0,5 Н₂О₂;
- 2/ 0,5 люминол + 0,5АТФ + 0,5 мочевины + 0,5 буфер + 0,5 Н₂О₂;
- 3/ 0,5 люминол + 1,0 мл.буфер + 0,5 мл.мочевина + 0,5 Н₂О₂;
- 4/ 0,5 люминол + 0,5АТФ + 0,5 диурон + 0,5 буфер + 0,5 Н₂О₂;
- 5/ 0,5 люминол + 0,5АТФ + 0,5 монурон + 0,5 буфер + 0,5 Н₂О₂.

Добавление мочевины, которая является химической основой производных гербицидов, типа монурон и диурон, незначительно влияет на высвечивание, которое через 2,5 мин после момента включения мочевины, достигало 180 имп/сек. Исследуемые гербициды монурон и диурон оказали более выраженное влияние на данную систему. Так, диурон снизил интенсивность свечения всей системы примерно наполовину, а монурон настолько подавил высвечивание, что уже через 2-3 минуты уровень высвечивания мало отличался от фона.

Если к указанной смеси добавляли монурон и диурон непосредственно перед измерением высвечивания, то (на рис. 17 показано влияние монурона и диурона на подобную систему с той лишь разницей, что оба гербицида добавляли к системе в момент, когда наступало равновесное состояние реакций и интенсивность высвечивания сохранялась постоянной во времени). Диурон оказывался менее активным ингибитором хемиллюминесценции, чем монурон.

Используемая система является хемиллюминесцентной, поскольку ни один из ее компонентов не может считаться биологической природы. Присутствие большого количества компонентов не позволяет с достаточной точностью объяснить все возможные пути индукции или ингибирования люминесценции системы. Однако, есть основания считать главным выводом из полученных данных, что оба гербицида подавляют процесс неферментативного окисления. Об этом несомненно свидетельствует уменьшение хемиллюминесцентного свечения люминола.

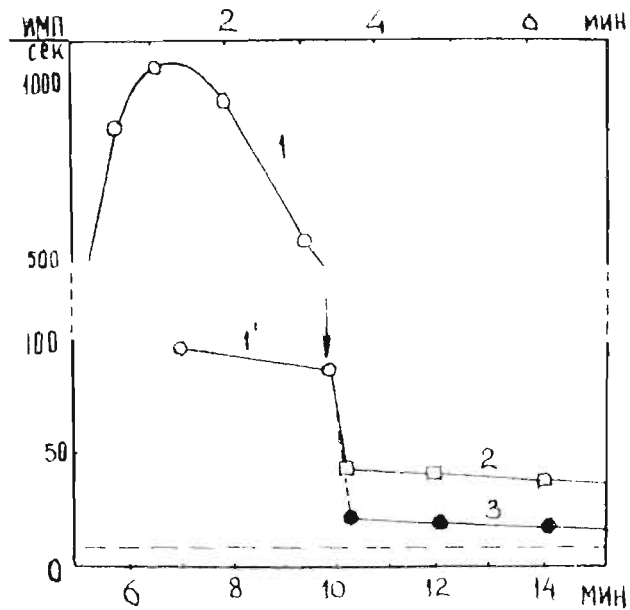


Рис.17. Влияние монурона и диурона на интенсивность свечения модельной системы (люминола + АТФ + H_2O_2) в момент ее относительного равновесия:

- 1) максимальный уровень высвечивания I
- 2) уровень относительного равновесия I'
- 3) уровень высвечивания при введении диурона 40 мг/л - 2
- 4) уровень высвечивания при введении монурона 40 мг/л - 3

Момент введения гербицидов указан стрелкой

Если в люминольной системе заменить АТФ взвесью крови карпа, то присутствие органического вещества существенно изменит цепь реакций, ответственных за высвечивание.

Имеется ряд косвенных данных, указывающих на то, что свечение связано не с разложением перекиси непосредственно, а с последующим образованием перекисных радикалов из молекул органических соединений, присутствующих в растворе (Владимиров Ю., 1966). Вероятно, каталитическое разложение перекиси приводит к образованию радикалов, которые взаимодействуют с органическими соединениями и образуют перекисные радикалы последних. Рекомбинация этих радикалов сопровождается хемилюминесценцией.

Учитывая сказанное выше, можно проследить на системе люминол-эритроциты как действует монурион, диурион и 2,4Д натриевая соль на генезис радикалов органической природы. На рис.18 показана интенсивность и длительность свечения системы без добавления гербицидов. Свечение не начинается моментально после смешения всех компонентов, а через некоторый латентный период. Рис.18.

Кривая 2 показывает изменение интенсивности свечения системы в присутствии монуриона. По мере снижения концентрации гербицида наблюдается постепенное уменьшение интенсивности свечения. При концентрации монуриона 1/4 и 1/8 насыщенного раствора достигается наименьший уровень свечения данной системы.

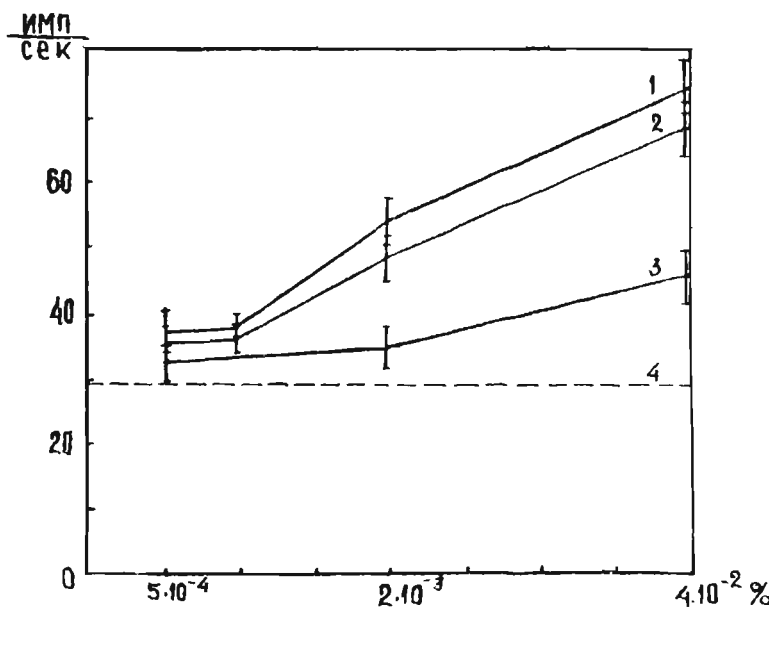


Рис.18. Изменения интенсивности высвечивания системы (люминол + H_2O_2 + эритроциты) в зависимости от концентрации гербицидов:

- 1) 2,4Д Na соль,
- 2) монурон,
- 3) диурон,
- 4) контроль

Кривая 3 отражает влияние диурона на люминесцентную систему. В отличие от монурона диурон не способствует образованию радикалов и только при наибольшей его концентрации наблюдается некоторое отклонение от нормы.

Менее выражено действует 2,4Д Na соль, влияние которой показано на кривой I. Существенной особенностью в действии 2,4Д Na является то, что максимум интенсивности высвечивания наступает раньше, чем у монурона и диурона, а именно на 2-3 минуте с начала измерений. При концентрациях соли 0,001 и 0,005% высвечивание не отличается от контрольного.

Данные по влиянию монурона и 2,4Д Na на люминольную систему, моделирующую ферментативное окисление через образование свободных органических радикалов, свидетельствует о различной степени воздействия названных пестицидов. Очередность, в которой можно поставить диурон, монурон и 2,4Д Na, по их способности индуцировать высвечивание люминольной системы, противоположна их токсичности:

2,4Д Na < монурон < диурон - токсичность для рыб;
2,4Д Na > монурон < диурон - способность индуцировать высвечивание люминольной системы.

Данные о влиянии монурона, диурона и 2,4Д Na на свечение модельной хемиллюминесцентной системы люминола не коррелируют с результатами, полученными на системе, включающей взвесь эритроцитов. Если все компоненты системы - химические соединения, высвечивание подавляется монуроном сильнее, чем диуроном.

В присутствии же органической субстанции (эритроцитов) диурон проявляет ингибирующую активность более выражено, чем монурон и 2,4Д Na . Это подтверждает наше предположение о том, что процессы окисления в упомянутых системах, сопровождающиеся свечением, имеют разные механизмы. Если принять во внимание незначительное отличие в строении монурона, диурона и 2,4Д Na и вполне определенную разницу в воздействии их на организм рыб и на систему люминола, моделирующую неферментативное окисление, станет очевидным, что эти гербициды нарушают цепь реакций дыхания. В частности, реакции окисления через радикальные состояния, это может сопровождаться гибелью рыб.

Влияние диурона, монурона и 2,4Д Na на мембраны
клеток хлореллы

Высокая проницаемость для веществ, растворимых в липидах, аномальная для воды, наличие механизма активного переноса ионов Na^+ и K^+ свойственны мембранам почти всех клеток (Хаггис Дж., 1967).

Применяя хемилюминесцентную систему окисления люминола, можно обнаружить влияние диурона, монурона и 2,4Д Na на процессы, протекающие на поверхности мембран клеток хлореллы.

Люминесцирующая система, содержащая только люминол и H_2O_2 , имеет незначительный уровень свечения, т.к. отсутствует катализатор реакции окисления люминола.

Если в нее внести взвесь хлореллы, свечение значительно усилится. Это обусловлено тем, что хлорелла содержит ионы Mg^{++} и Fe^{+++} , являющиеся составными частями питательной среды (Владимирова М.Г., 1962). Они могут действовать, как катализаторы окисления люминола перекисью. Ввиду разности концентраций ионов Mg^{++} и Fe^{+++} в клетках хлореллы и люминольной системе происходит их выделение в раствор, содержащий люминол и перекись, что сопровождается свечением. В отличие от эритроцитов хлорелла имеет "жесткую" оболочку, в люминольной системе не распадающуюся.

На рис.19 показано влияние 2,4Д Na на интенсивность свечения люминольной системы с хлореллой (кривая 2). В отсутствии гербицида свечение более интенсивно и превышает 600 имп/сек. (последовательность наполнения кюветы: люминол + H_2O_2 + хлорелла).

Если ввести 2,4Д Na в систему через 5 минут после возникновения свечения, происходит быстрое снижение интенсивности высвечивания (рис.20).

Уровень свечения зависит от концентрации добавляемого гербицида. Однако оно не прямо пропорционально концентрации последнего. Причина этого кроется в ионной проницаемости мембраны хлореллы.

Рис. 19. Интенсивность свечения системы (люминол + H_2O_2 + гербицид + хлорелла):

- 1) система без добавления гербицидов;
- 2) в присутствии 2,4 Д_кконц. 40 мг/л;
- 3) в присутствии монурона 40 мг/л;
- 4) в присутствии диурона 40 мг/л.

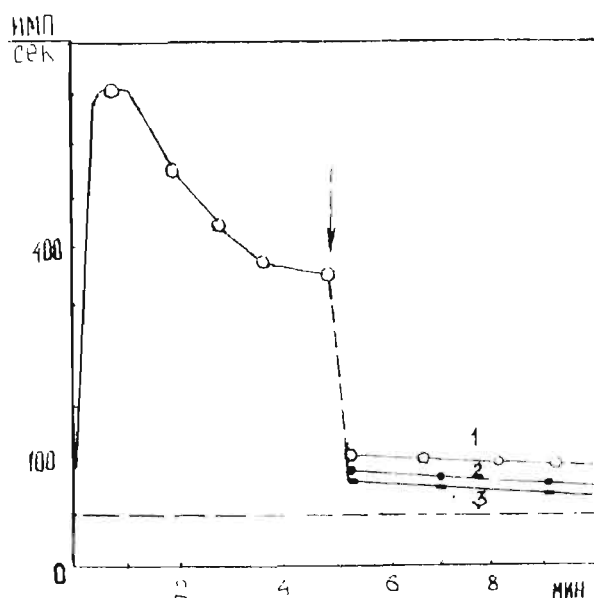


Рис.20. Изменение уровня высвечивания люминесцентной системы (люминол + H_2O_2 + хлорелла):

- 1) Стрелкой указан момент добавления 1,0 мл 2,4ДNa в конц. 0,004%
- 2) Уровень высвечивания после добавления 1 мл монурона в конц. 40 мг/л
- 3) Диурона - 40 мг/л

Действие монурона, диурона и 2,4 Д На на
биоломинесцентную реакцию люциферин люцифераза
и на отдельные её компоненты

Молекулярный механизм свечения у светляков в настоящее время хорошо изучен (Mc Elroy W.D. Seliger H.H 1962 г.). Установлено, что окисление люциферина требует не только взаимодействия с люциферазой, но и образования комплекса с АТФ. При окислении указанного комплекса возникает свечение. Именно эта часть в цепи реакции являлась моделью для исследования влияния диурона и монурона на процесс био-окисления. Следует отметить, что процесс высвечивания протекает в две фазы: первая развивается за 2-3 минуты; вторая - устойчивая и продолжительная. Такое разделение условно, поскольку в основе высвечивания лежат одни и те же реакции. Однако, насыщенность смеси кислородом в момент приготовления, очевидно, вызывает начальную вспышку. На рис. 21-23 приведенные кривые, отражающие ингибирующее воздействие гербицидов на биоломинесценцию в системе люциферин-люцифераза-АТФ. При этом диурон (рис. 21) оказался более сильным агентом именно в начальной стадии высвечивания, а во второй фазе реакции оба гербицида снижали интенсивность (рис. 22) высвечивания в равной степени. Для определения влияния монурона, диурона и 2,4 Д На на отдельные компоненты светящейся смеси (рис. 23) суспензию из светляка и АТФ отдельно инкубировали.

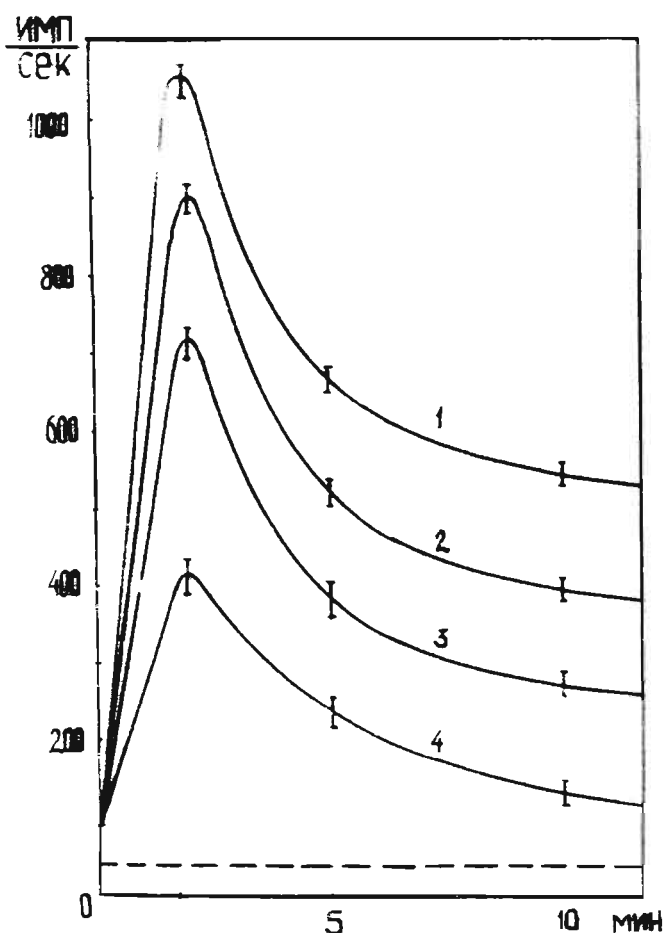


Рис. 21. Выявление чувствительного к действию диурона компонента биоломинесцентной реакции люциферин-люцифераза:

- 1) 0,2 мл + 1,0 Н₂О + 0,2 АТФ;
- 2) 0,2 мл + (0,2 АТФ + 1,0 диурон) инкубированы 10 мин;
- 3) (0,2 мл + 0,1 диурон) 10 мин. инк. + 0,2 АТФ;
- 4) (0,2 мл + 1,0 диурон) 1 час инк. + 0,2 АТФ.

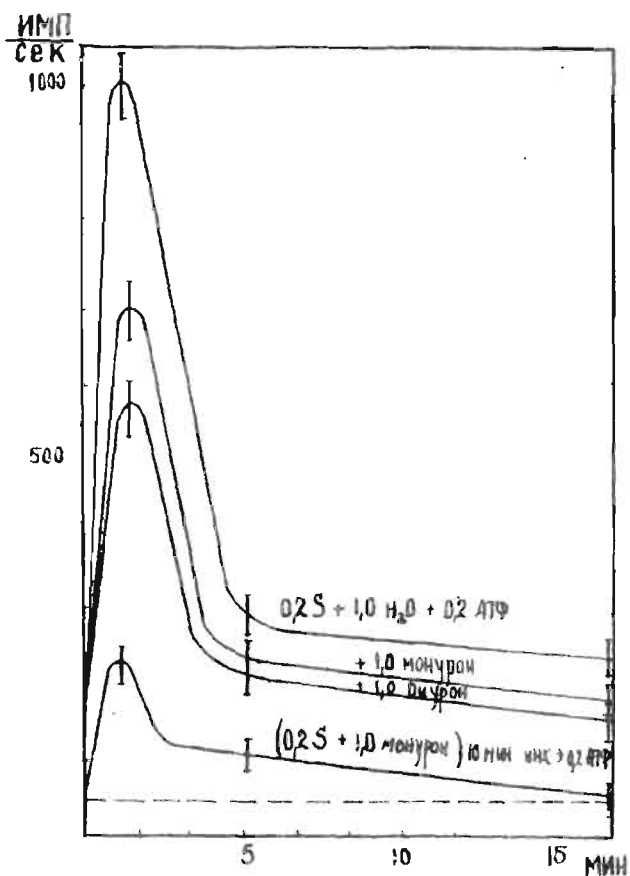


Рис. 22. Влияние гербицидов на биолуминесценцию реакции люциферин-люцифераза и отдельные её компоненты:

- 1) контроль;
- 2) монурон 40 мг/л;
- 3) диурон 40 мг/л;
- 4) инкубация суспензии из светляка в монуроне (40 мг/л).

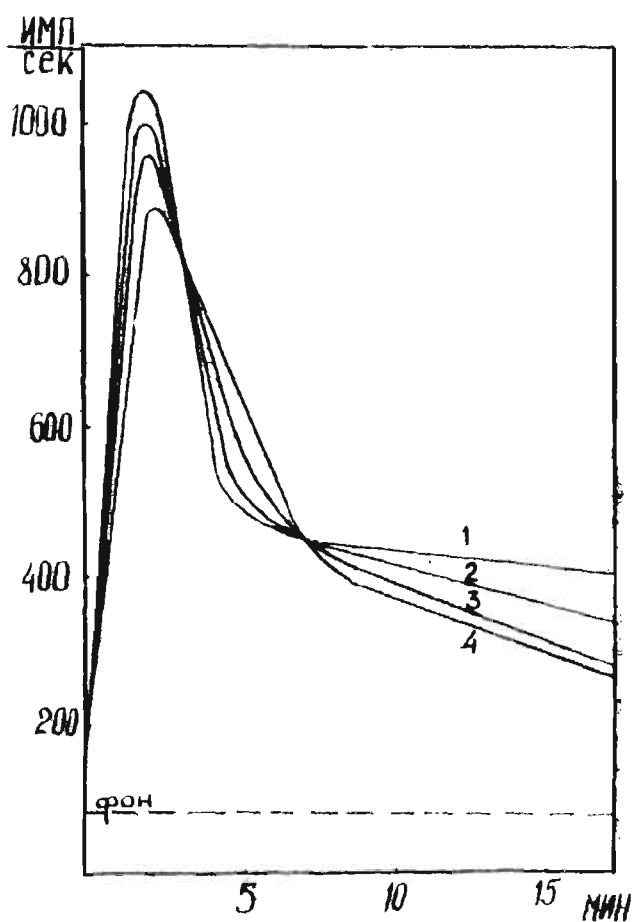


Рис. 23. Влияние гербицидов на биолуминесцентную реакцию

люциферин-люцифераза:

1) контроль;

2) 2,4 Д Na 10 мг/л;

3) монурон 10 мг/л;

4) диурон 10 мг/л.

Опыты показали (рис. 22), что наиболее чувствительным к присутствию гербицидов является комплекс люциферин-люцифераза. Заметное снижение интенсивности высвечивания системы наблюдается уже при 10 мин. инкубации, в то время как инкубация АТФ не вызывает существенных отклонений от контроля. Активность отдельных гербицидов распределяется в том же порядке: более выраженное воздействие диурона (рис. 23) и монурона (рис. 23) менее - 2,4Д Na (рис. 23). При снижении концентрации монурона и диурона наблюдается постепенное сглаживание имеющейся небольшой разницы в подавлении люминесценции гербицидами. Показано, что изучаемые гербициды ингибируют биолюминесценцию. Как известно, в основе этой реакции лежит окисление люциферина с образованием комплекса. Интенсивность высвечивания пропорциональна количеству последнего.

Влияние монурона, диурона и 2,4 Д Na на ингредиенты
реакции фосфорилирования глюкозы

Из светляка одновременно экстрагируются люциферин и люцифераза, что не позволяет изучать действие гербицидов на фермент и субстрат отдельно.

Применяя в качестве модели фосфорилирование глюкозы, можно определить влияние гербицидов непосредственно на фермент гексокиназу. Реакцию фосфорилирования глюкозы проводили в присутствии суспензии из светляка. Это позволило

вскрыть изменения в активности фермента, поскольку интактная гексокиназа проявляет конкурирующие свойства по отношению к АТФ, участвующему в реакции фосфорилирования и полностью тушит свечение.

Наполняем кювету в определенной последовательности: 0,2 мл АТФ, 0,5 мл глицил-глицина, 0,2 мл $MgCl_2$, 0,2 мл глюкозы, 1,0 мл H_2O , 0,4 мл суспензии из светляка. Возникает свечение, которое достигает интенсивности в 800 имп/сек и сохраняется относительно постоянным после 5-8 минут. Если в систему ввести 0,1 мл раствора интактной гексокиназы, интенсивность свечения быстро снижается (рис.24).

Перед тем, как вводить в систему гексокиназу инкубированную в растворах диурона, монурона и 2,4 Д Na, необходимо убедиться, как действуют названные гербициды на систему в отсутствии гексокиназы.

На рис. 25 показаны изменения интенсивности высвечивания модельной системы в присутствии диурона, монурона и 2,4 Д Na. Это свечение является контрольным. Если гербициды инактивируют гексокиназу, интенсивность свечения системы будет соответствовать контрольному уровню. Следует так же учитывать, что гексокиназа после инкубирования не отделяется от монурона, диурона и 2,4 Д Na. Уменьшение общего количества испускаемого света в системе в присутствии гербицидов свидетельствует об ингибирующем действии диурона, монурона и 2,4 Д Na непосредственно в момент протекания реакции фосфорилирования глюкозы.

Чтобы определить влияние инактивированной гексокиназы на свечение системы, некоторый объем её подвергли кипячению. Гексакиназа инактивированная термически не влияет на интенсивность высвечивания системы (рис. 26). Система продолжает светиться даже с некоторым усилением.

Инкубация гексакиназы в растворах монурона, диурона и 2,4 Д Na в концентрациях 40 мг/л в течение 10 мин, 30 мин и 60 мин не выявила каких-либо изменений в её активности, так как она тушила свечение системы во всех случаях.

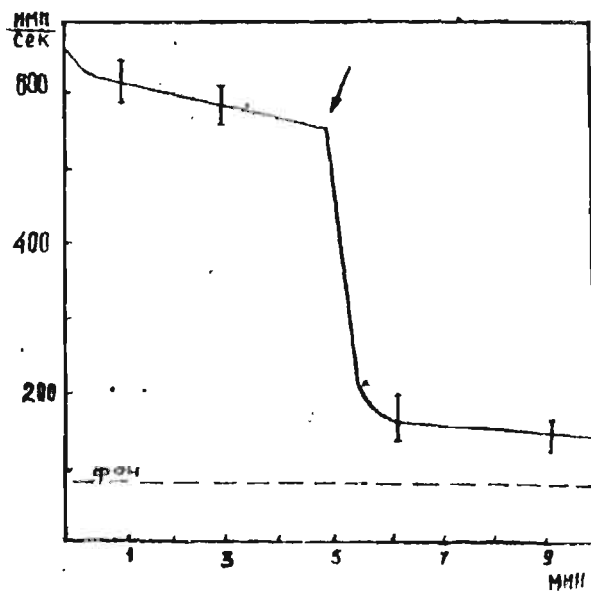


Рис. 24.

Изменения интенсивности высвечивания модельной системы фосфорилирования глюкозы в момент (указано стрелкой) добавления интактной гексокиназы.

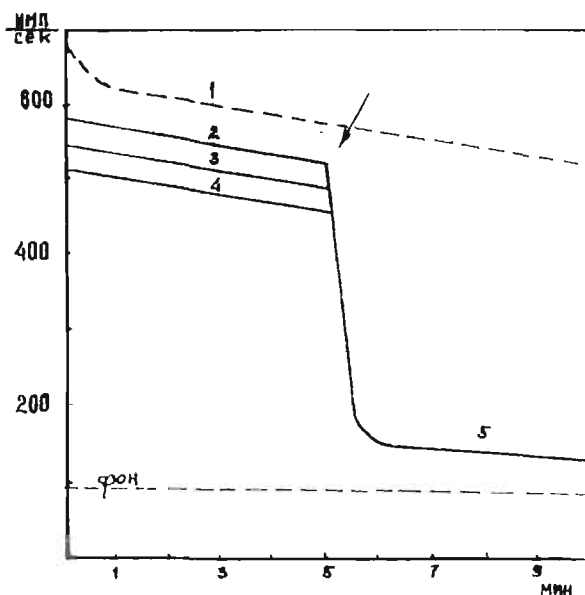


Рис. 25.

Схематическое изображение динамики высвечивания модельной системы фосфорилирования глюкозы при добавлении:

- 1) 1,0 мл H_2O ;
- 2) 1,0 мл 2,4Д Na ;
- 3) 1,0 мл монофурана;
- 4) 1,0 мл диурона;
- 5) уровень высвечивания после добавления интактной гексокиназы.

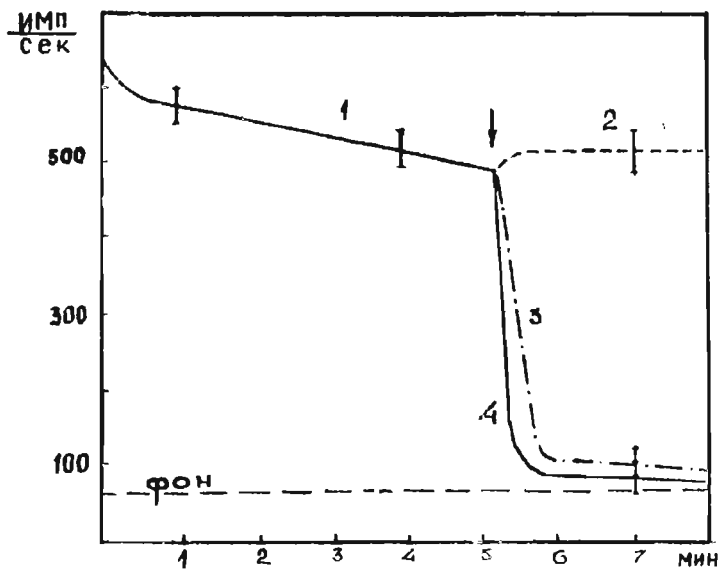


Рис. 26.

Изменения интенсивности свечения модельной системы фосфорилирования глюкозы (I) после добавления гексокиназы (указано стрелкой):

- а) термически инактивированной (2);
- б) инкубированной в растворах монурона, диурона и 2,4Д Na в концентрации 40 мг/л (3);
- в) интактной (4).

Обсуждение результатов

"Молекулярная биология ставит своей задачей изучение явлений жизни, оперируя объектами неживыми, лишенными жизни" - эта формулировка академика В. Энгельгардта (1971) сводится к вопросу о том, можно ли ожидать расширения наших познаний о проявлениях жизнедеятельности путем сведения тех сложных явлений, с которыми мы имеем дело в биологии, к элементарным уровням физики и химии. Положительный ответ на этот вопрос даёт принцип исследований, основанный на убеждении, что путь к познанию сложного лежит через расчленение этого сложного на все более и более простые составляющие с последующим изучением их природы и свойств. Указанные положения легли в основу настоящей работы.

Используя общий принцип биофизики - моделирование, мы изучали влияние гербицидов - монурона, диурона и 2,4д Na на разные уровни организации живого. Естественно, что методика и интерпретация, полученные с её помощью результатов раскрывают лишь один из аспектов в интоксикации гидробионтов. Однако, подбор соответствующих биофизических методов позволил получить информацию в широком диапазоне, начиная с изменений в структурных липидах мембран эритроцитов и кончая определением изменений в отдельных ингредиентах биохимических реакций.

Применение метода кислотных эритрограмм, предложенного Терсковым и Гительзоном (1959), обусловлено несколькими обстоятельствами. Во-первых, это объективный метод позволяющий

установить изменения осмотической устойчивости у разных "типов" эритроцитов. Во-вторых, благодаря наличию зависимости между солянокислым гемолизом и устойчивостью структурных липидов (Брилишант М.Д., Воробьев А.И. 1967) можно получить информацию о состоянии структуры мембран, при воздействии на них гербицидов. Наконец, в опытах "in vivo" метод кислотных эритрограмм даёт возможность изучать процесс гемолиза (Телитченко М.М., Кокин К.А., 1968). Использование для солянокислого гемолиза эритроцитов человека рациональнее чем эритроциты рыб, так как в связи с сезоном года, возрастом и питанием последние изменяются. Этим объясняется расхождение данных, полученных на эритроцитах человека и на эритроцитах карпа.

Михайлов Н.Е. показал, что однократное пероральное введение белым крысам монурона в дозе 720 мг/кг сопровождается летальным исходом, а диурона в концентрации 680 мг/кг нет. Однако у всех крыс уменьшается привес, количество эритроцитов и гемоглобина. Следовательно, ^{на} теплокровных животных оба гербицида действуют примерно одинаково. Для рыб, в частности для карпа, наблюдается строгое различие в к токсичности диурона и монурона. В насыщенном растворе диурона (40 мг/л) карпы погибали в течении 2 суток, в растворах монурона и 2,4Д Na той же концентрации летального исхода не отмечалось.

Аналогичная разница в действиях гербицидов наблюдается и при сравнении осмотической резистентности эритроцитов человека и карпа в опытах "in vitro". Следовательно,

причиной малой устойчивости эритроцитов карпа в сравнении с эритроцитами человека является очевидно липидная разнокачественность их мембран. Более сложно организованные структуры мембран эритроцитов человека имеют или специализированный механизм защиты или более широкую амплитуду адаптации к токсическим агентам. В литературе есть косвенные указания на то, что соотношения липидных компонентов эритроцитов человека отличаются от таковых в эритроцитах карпа (Cook R., 1965).

Ускоренный распад эритроцитов при воздействии гербицидов можно рассматривать, как следствие повреждения структурных компонентов липидной природы. Известно, что при воздействии $2,4\text{D Na}$ на растения усиливаются гидролитические процессы обмена углеводов, азота и фосфора (Калинин Ф., Мережинский Ю., 1965 г.), т.е. процессы для нормального протекания, которым необходима определенная локализация ферментов. Маловероятно, что $2,4\text{D Na}$ действует непосредственно на ферменты и подавляет процессы, которые по своей природе и по строению химических ингредиентов очень отличаются. С другой стороны, известны химические вещества, которые способны разрушить часть лизосом, содержащих протеолитические ферменты. В этом случае последние являются стимуляторами деления клеток. Воздействие же в концентрациях, сопровождающихся полным разрушением лизосом, вызывает гибель клеток. Поскольку $2,4\text{D Na}$ в малых концентрациях оказывает стимулирующее влияние, а в больших - токсическое, возможно, что первичные процессы действия $2,4\text{D Na}$

связаны с избирательным разрушением ультраструктуры клетки и липопротеиновой мембраны. В последнее время некоторые авторы приходят к выводу, что информация о состоянии липидных структур в значительной мере отражает устойчивость стационарного режима химических превращений в клетках (Kavanaugh, 1966, Кригер А.Ю., 1968). Антиоксиданты - ингибиторы окисления задерживали процесс гемолиза эритроцитов, вызванный гербицидами. Таким образом, стабилизирующая роль липидных структур зависит от процессов, которые находятся в сложной зависимости с биологическим окислением.

Для выявления общих закономерностей биологического действия токсических веществ было проведено определение осмотической резистентности эритроцитов карпов, длительно инкубированных в растворах гербицидов. Нарушение физиологического равновесия организма сразу же сказывается на гематологических показателях, а изучение их изменений позволяет диагностировать токсикозы задолго до появления первых клинических признаков интоксикации (Комаровский Ф.Я., Попович Н.А. 1971; Попова Г.В., 1970). Анализ экспериментальных данных, полученных на эритроцитах, в свете теории стресса (Селье Г., 1960) позволяет рассматривать токсический процесс как единство реакций защиты и повреждения. Защитно-адаптационный процесс у эритроцитов протекает в три фазы:

в первой фазе отмечается снижение осмотической резистентности взвеси эритроцитов;

во второй, когда защитные реакции (фаза резистентности) осмотическая резистентность взвеси эритроцитов возрастает и превышает норму;

в третьей фазе достигается определенный уровень резистентности, который остается постоянным вплоть до гибели карпа.

Подобная трехфазность ответных реакций эритроцитов человека при воздействии на них стрессующего фактора наблюдается при действии α -капролактама. В хроническом токсикозе основной защитной реакцией, вероятно, является усиление гемопоэза, поскольку повышение резистентности обусловлено появлением в кровяном русле большого количества молодых эритроцитов, резистентность которых выше чем у старых клеток (Телитченко М.М., Коклин К.А., 1968). Эритрограммы взвеси эритроцитов карпов длительно живших в гербицидах, отличались от эритрограмм крови человека. Для нормальной эритрограммы человека $D = 0,03 - 0,06$, а для карпа эта величина составляет $0,2 - 0,3$. Это свидетельствует о большом количестве разрушенных малопигментированных частиц, которые при приготовлении взвеси с оптической плотностью ~~$D=0,07$~~ $D=0,70$ не поглощают свет. В подтверждение указанного предположения можно привести наблюдения Поповой Г. (1970). Она установила, что при отравлении рыб диуроном наблюдаются большие изменения в крови. На 5-й день содержание гемоглобина снижается с 6,4% (в норме) до 3,8% у подошчатых рыб. Количество эритроцитов от $1,3 \text{ млн/мм}^3$ до $1,18 \text{ млн/мм}^3$ соответственно. Развивается острая форма анемии и лейкоцитоз. Анемия носит гипохромный характер, что является показателем ненасыщенности эритроцитов гемоглобином. Одновременно с этими процессами идет гемолиз эритроцитов, превращающихся в "тени". На 10-й день у рыб количество "теней" увеличивается, кровь наполняется осколками разрушенных клеток и на их фоне видны единичные эритроциты.

Снижение содержания гемоглобина влияет на методику определения резистентности, поскольку при снижении количества гемоглобина поглощение света в кювете обуславливается большим количеством малопигментированных клеток, что в свою очередь влияет на скорость их разрушения вследствие нарушения соотношения кол.клеток .
НСІ

У карпов, инкубированных в растворах гербицидов, наблюдали внешние признаки отравления: слипшиеся темно-синие жабры, слизь на теле рыб мутнела и через 3-5 часов скатывалась. Отмечалась периодическая двигательная активность, что косвенно свидетельствует о раздражении центральной нервной системы. Кроме того, кровь отравленных гербицидами карпов теряла обычный темно-красный цвет и становилась коричневой, уменьшалась её вязкость.

Опыты с эритроцитами показали возможность их использования в качестве тест-объекта для определения биологической активности пестицидов. При этом, получается информация об уровне эритропоэза, изменениях структуры мембран (осмотическая резистентность эритроцитов), о механизмах действия гербицидов (опыты с антиокислителями и ϵ -капролактамом).

В последующих опытах мы определяли влияние гербицидов монурона, диурона и 2,4Д Na на процессы окисления протекающие в модельных системах, поскольку они являются источником энергии для осуществления самых различных биологических реакций в организме. Интенсивность окисления люминола явилась основным критерием для определения ингибирующей активности гербицидов. Установлено, что химическую реакцию окисления люминола подавляют все исследованные гербициды, особенно монурон. 2,4 Д Na и мочевина (производные которой являются монурон и

и ддурон) влияют менее выражено. Это свидетельствует о том, что примененная модельная система "чувствительна" к веществам с разным строением молекул. Одновременно проявляется способность гербицидов ингибировать окисление, что указывает на некоторые общие принципы механизма окисления в химической реакции и в процессах биоокисления. Известно, что названные гербициды ингибируют выделение кислорода при фотосинтезе (Treharne R.W. et al., 1963; Рубин Л.Б., Дубровин В.Н., 1968). При введении в систему люминола нового компонента — аденозинтрифосфата, который известен как универсальный трансформатор и переносчик энергии в биологических объектах (Бреслер С., 1966), интенсивность её свечения увеличилась.

Действие АТФ — энергетически богатого соединения биогенного происхождения также свидетельствует о существовании некоторых общих механизмов размена энергии в химической модельной системе люминола и в биологических объектах. В присутствии гербицидов интенсивность свечения уменьшается, что связано с активным воздействием гербицидов на энергетические процессы.

Исследованные гербициды угнетают обмен веществ через клеточные мембраны. Такой вывод следует из данных о подавлении моноураном, ддуроном и 2,4Д Na хемиллюминесценции люминола со взвесью *Chlorella pyrenoidosa* 82. Добавление хлореллы в люминол в отсутствие гербицидов стимулировало свечение. Это объясняется выходом из водорослей ионов металлов переменной валентности, которые катализируют ~~химическое~~ высвечивание. Гербициды же угнетают процесс выхода ионов из клеток хлореллы,

т.е. препятствуют нормальному ионному обмену через мембраны. Аналогичные сведения о торможении выхода кислорода из клеток хлореллы в присутствии диурона приводят *Zweig G. et al.* (1968). Полученные нами данные о влиянии монурона, диурона и 2,4Д Na на модельные системы хемилюминесценции в разных модификациях выявили способность гербицидов ингибировать неферментативное окисление.

При введении в люминольную систему взвеси крови существенно изменяется цепь реакций ответственных за высвечивание. Вероятно разложение перекиси приводит не только к окислению люминола, но и к образованию перекисных радикалов органической природы. Поскольку рекомбинация этих радикалов сопровождается хемилюминесценцией, было рационально проследить, как действуют гербициды на образование перекисных радикалов органической природы. Следует отметить, что свечение системы не зависит от количества и качества крови (в широких пределах), а преимущественно от концентрации H_2O_2 .

Влияние гербицидов на упомянутую систему следует рассматривать в последовательности протекания разных процессов. В отличие от клеток хлореллы эритроциты в системе изменяются. Происходит их распад с высвобождением геминной группы (1), содержащей ион Fe^{++} , который является катализатором разложения перекиси. Затем происходит образование перекисных радикалов (2) и ~~и~~ окисление люминола (3). Очевидно, гербициды влияют на все три процесса.

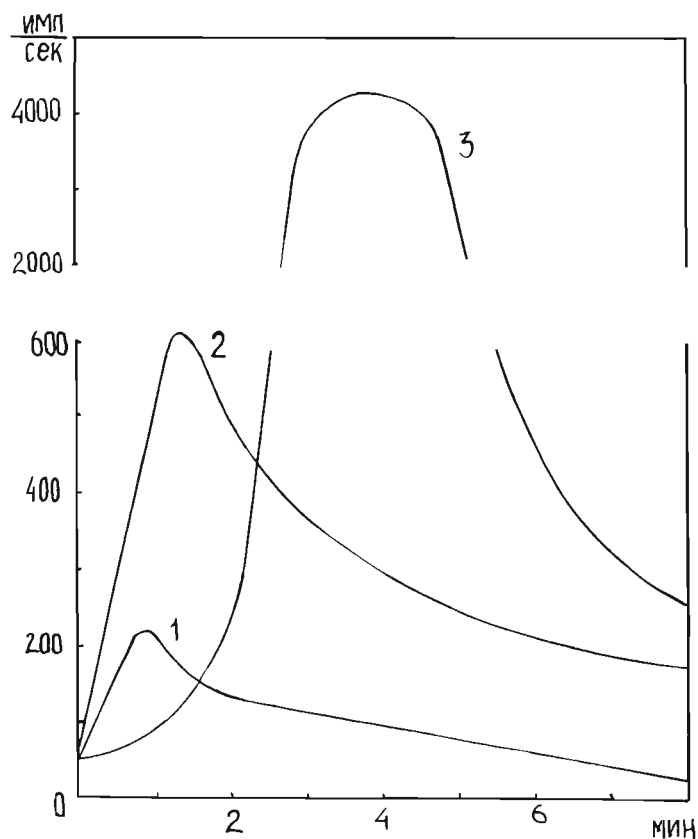


Рис.27. Различия интенсивности и динамики свечения при равных концентрациях люминола (0,001%) и H_2O_2 (1%) в модельных системах окисления:

- 1) люминола;**
- 2) люминола с хлореллой;**
- 3) люминола и эритроцитсв.**

Данные об интегральном влиянии гербицидов на люминесцентную систему со взвесью крови не коррелируют с данными о влиянии их на хемилюминесцентную систему без эритроцитов. Сила действия гербицидов на модельную хемилюминесцентную систему и на рыб одинакова и образует ряд:



Интенсивность и динамика свечения в модельных системах окисления: 1 - люминола, 2 - люминола с хлореллой, 3 - люминола и эритроцитов существенно отличается (рис. 27). Это дает основание полагать, что количество последующих реакций во всех системах неодинаково. Если принять во внимание незначительную разницу в строении монурона, диурона и 2,4Д Na, но неодинаковое при этом действие их на организм и модельную систему неферментативного окисления, станет очевидным, что цепь реакции биоокисления в присутствии гербицидов нарушается.

Гибель рыб под действием гербицидов, видимо, объясняется ингибированием цепного свободнорадикального окисления (Козлов Д.П., 1970, Якубов С.М. и др., 1971, Якубов С.М., 1972, Чернышов В.И., Телигченко М.М. (1973)).

В последующих опытах определяли влияние монурона, диурона и 2,4Д Na на биолюминесцентную модельную систему люциферин-люцифераза в присутствии АТФ. Выбор биолюминесцентной реакции обусловлен тем, что молекулярный механизм свечения у светлячка наиболее изучен (McElroy W.D. Seliger H.H., 1962).

В основе механизма высвечивания лежит реакция окисления люциферина. Интенсивность высвечивания этой реакции пропорциональна количеству образовавшегося комплекса $E-LH_2-AMФ$, который в присутствии кислорода является источником света.

К тому же, имеются указания, что молекулярный механизм биолюминесценции бактерий поразительно напоминает механизм сверхслабой хемилюминесценции белков в присутствии перекиси водорода (Владимиров Ю.А., 1966).

Исследуемые гербициды оказали заметное ингибирующее воздействие на люминесценцию экстракта из светляка. При более детальном изучении оказалось, что гербициды свою активность проявляют на суспензии светляка, но при этом они незначительно влияют на АТФ. Поскольку суспензия светляка содержит комплекс фермент-субстрат, подобному явлению можно дать несколько объяснений. Учитывая, что данный процесс осуществляется посредством переноса электрона, гербициды проявляют свойства донорно-акцепторных агентов и поэтому они не оказывают влияние на прединкубацию АТФ. С другой стороны, гербициды являются акцепторами кислорода в системе и препятствуют процессу окисления люциферина. Следует также учитывать возможность предотвращения образования комплекса $E-LH_2-AMФ$ (см.схему в лит.обзоре), окислением которого определяется интенсивность свечения.

Полученные данные свидетельствуют о том, что монурон, дидурон и 2,4Д Na являются ингибиторами и ферментативной реакции окисления, моделью которой можно считать биолюминесценцию светляка.

Добавление нескольких молекул пестицида к сбалансированной цитоплазменной системе клетки должно изменять всю систему и взаимоотношения составляющих ее молекул. Не удивительно, что добавление большого числа инородных молекул к цитоплазменной системе вызывает нарушения не одной, а возможно многих ферментных систем и это приводит к нарушению большинства биологических процессов. В естественных условиях функционирование фермента часто регулируется благодаря аллостерическому эффекту. У ферментов, катализирующих начальные реакции в цепи метаболических превращений, имеется рецептор, который расположен на некотором расстоянии от рецептора для нормального субстрата - способного реагировать с природным ингибитором. В результате взаимодействия этого рецептора с ингибитором молекула фермента претерпевает конформационные изменения и его активный центр становится недоступным для нормального субстрата (Monod J. et al. , 1968). Существует мнение, что аллостерический эффект по крайней мере в некоторых случаях обусловлен явлением олигомерии, т.е. хорошо известной тенденцией молекул фермента к образованию ассоциатов из идентичных молекул. В основе механизма действия многих биологически активных соединений лежит их способность ингибировать определенный фермент. Однако, чтобы иметь право утверждать наличие указанного механизма, необходимо убедиться, что изолированный фермент ингибируется так же эффективно, как фермент в интактной клетке (Hunter F. Lowry O. , 1956).

Для проверки предположения о способности изучаемых гербицидов ингибировать ферменты была выбрана ферментативная реакция фосфорилирования глюкозы. Достоинством этой модели является наличие возможности произвести предварительную инкубацию отдельных ингредиентов реакции в растворах гербицидов.

В реакции фосфорилирования глюкозы содержится АТФ, количество которой в ходе реакции уменьшается. Добавление суспензии из светляка дает возможность проследить указанный процесс. Это подтверждается также разностью интенсивности высвечивания системы люциферин-люцифераза. Основным моментом, позволяющим судить о влиянии гербицидов на гексакиназу, является обнаружение факта тушения свечения системы интактной гексакиназой, т.е. она конкурирует с АТФ.

Инактивированная гексокиназа не влияет на интенсивность высвечивания, даже несколько его усиливает. При инактивировании гексакиназы гербицидами мы наблюдали неполное снижение интенсивности свечения до уровня, который заранее определен добавлением гербицидов к компонентам реакции фосфорилирования глюкозы. Поскольку во всех случаях инкубированная с гербицидами гексокиназа тушила свечение полностью, следует считать, что монурон, диурон и 2,4Д Na не проявляют сродства к активному центру фермента гексокиназы и потому в их присутствии аллостерический эффект не наблюдается. При обсуждении вопроса о том, как строение молекул гербицидов может отражаться на их токсичности, необходимо остановиться на некоторых уже имеющихся в этом направлении представлениях.

Вследствие электрофильной природы атома хлора кажется очевидным, что сдвиг электронной плотности в рассматриваемой серии веществ должен оказывать сильное влияние на адсорбционные взаимоотношения между молекулами токсиканта и окружающим субстратом. Удаление одной метильной группы снижает токсичность соединения в почве примерно вдвое, но не влияет на токсичность его в питательном растворе. Из этого можно заключить, что роль метильных заместителей в определенной токсичности вещества сводится к влиянию на степень адсорбции, тогда как фенильный и хлорфенильный радикалы имеют прямое отношение к взаимодействию соединения с клеточными структурами. Усложняющим фактором в этом случае является различная степень растворимости (Крафтс А., 1963).

Максимум токсичности гербицидов связан с наличием двух атомов хлора в ароматическом кольце и двух метильных групп у другого атома азота. Замещение одной метильной группы атомом водорода или бутильной группой снижает их фитотоксичность. При постоянных алкильных заместителях включение одного атома хлора в ароматическое кольцо повышает фитотоксичность в еще большей степени. Фрид (Freed V., 1953) показал, что пара-замещение более эффективно, чем мета и тем более орто-замещение.

Оба упомянутые автора придают первостепенное значение в определении токсичности гербицидов наличию хлорфенильного радикала в их молекулах. Роль же фенильных заместителей по их мнению ограничивается снижением степени адсорбции препарата.

По нашим данным токсичность диурона и 2,4Д Na для карпов различна (оба гербицида содержат хлорфенильный радикал с двумя атомами хлора, но отличаются строением боковой цепи). Диурон оказался намного токсичнее 2,4Д Na. Наблюдаемая разница проявлялась на гемолитических показателях интенсивности биолюминесценции. Монурон, отличающийся от диурона строением хлорфенильного радикала, и от 2,4Д Na строением боковой цепи, занимал промежуточное положение. Следовательно, токсичность гербицидов определяют как фенильные радикалы, так и боковые цепи в молекуле. Токсичность зависит от определенных изменений в химической структуре гербицида.

В заключении хочется привести физико-химическую гипотезу Фергюсона (Ferguson J., 1949, 1950), которая связывает растворимость веществ (зависящую от строения молекул) с их токсичностью.

Он считает, что термодинамический потенциал депрессанта в состоянии равновесия будет одинаковым во всех фазах (средах). Это справедливо также для непосредственно связанной с ним термодинамической активности. Иначе говоря, если термодинамическая активность измеряется в одной из фаз (во внешней среде), то можно быть уверенным, что и в биофазе она должна быть такой же.

"Биофазой" называют ту область, в которой реализуется биологическое действие — она может находиться вне клетки или представлять собой одну из органелл клетки.

Если термодинамическую активность чистого вещества принять за единицу, то термодинамическая активность паров этого вещества в воздухе при любой концентрации равна относительной насыщенности его паров. Отсюда

$$\text{Активность} = \frac{P_t}{P_s}$$

P_t - парциальное давление паров вещества в воздухе,

P_s - давление насыщенных паров этого вещества.

Таким образом, для характеристики депрессантов важнейшим показателем является степень насыщенности этими веществами среды, в которой они действуют, а вовсе не истинные их концентрации. Очевидно, что любые изменения структуры, вызывающие снижение растворимости вещества в воде по сравнению с исходным веществом, будут способствовать повышению его активности в качестве депрессанта. Это означает, что новое вещество окажется активным в более низких концентрациях, чем исходное. Принцип Фергюсона уже использован для объяснения действия инсектицидов.

При сравнении токсичности для карпа монурона и диурона наблюдается полное соответствие принципу Фергюсона. Действительно диурон, имеющий растворимость 0,042 г/л, оказался гораздо токсичнее монурона, растворимость которого 0,23 г/л. При этом строение названных гербицидов мало отличается. Действие структурно неспецифичных веществ состоит по-видимому в том, что они накапливаются в некоторых жизненно важных частях клетки, нарушая таким образом нормальное течение процессов метаболизма.

Иначе говоря, они действуют просто как чужеродные вещества. Само собой разумеется, что способность накапливаться в клетках обусловлена наличием соответствующих физических свойств, которые в свою очередь определяются химической структурой этих соединений. Отсюда следует, что нет особых оснований выделять эти вещества как действующие по физическому механизму и противопоставлять их структурно специфичным агентам. Физические свойства, определяющие биологическую активность, зависят исключительно от относительного числа гидрофильных и гидрофобных группировок (Э.Альберт, 1971).

Таким образом, действие гербицидов обнаруживается на всех взаимосвязанных уровнях и самые первичные связи с биосубстратом обусловлены их физико-химическими свойствами.

ВЫВОДЫ

1. Показана принципиальная возможность использования биофизических методов - моделирование и сбора интегральной информации об изменениях уровня энергетических процессов в организме для выяснения закономерностей биологического действия токсических веществ.

2. Монулон, диурон и 2,4D-Na соль являются биологически активными веществами, изменяющими осмотическую устойчивость эритроцитов. Эритроциты карпов повреждаются монулоном и диуроном, к которым эритроциты человека резистентны. 2,4D-Na гемолизует взвесь интактных эритроцитов без добавления HCl.

3. Гербициды ингибируют окисление модельных систем - хемилюминесценцию люминола и биолуминесценцию люциферин-люцифераза. Неферментативное окисление подавляется преимущественно диуроном, а ферментативное - всеми изученными гербицидами в равной степени.

4. Действие гербицидов на рыб протекает по общебиологической схеме адаптивного синдрома. Резистентность рыб изменяется во времени. Наиболее токсичен для них диурон, активно блокирующий энергетический источник организма - окислительные реакции.

5. Исследованные гербициды угнетают обмен веществ через клеточные мембраны. Они не действуют на отдельные ингредиенты биохимических реакций, но влияют на ход физико-химических процессов в целом.

6. Монурон, диурон и 2,4 D - Na не проявляют сродства к структурным компонентам фермента гексокиназы, поэтому в их присутствии аллостерический эффект не наблюдается.

7. Токсичность гербицидов определяют как фенольные радикалы, так и боковые цепи в молекуле. Она зависит от незначительных изменений в химической структуре гербицида. Монурон отличается от диурона всего одним атомом хлора. Диурон от 2,4 D - Na соли - строением боковой цепи.

В заключении приношу глубокую благодарность руководителю данной работы Михаилу Михайловичу Телитченко за постоянное внимание, помощь и заботу, за ценные консультации и указания в проведении и написании настоящей работы.

Благодарю коллектив и сотрудников лаборатории гидробиологии АН Латвийской ССР, а также коллегу М.К.Кундзиньша за сотрудничество в проведении отдельных экспериментов.

1. Агавердиев Н.Ш. Доскач Я.Е. Тарусов Б.Н. 1968. Об авто-регуляции стационарного равновесия при понижении температуры у растений. Тр. МОИП отд. биол., 28, 100-105.
2. Аллабутаев К.А., Васильев Р.Ф., Вичутинский А.А., Ручина И.Ф. 1965. Механизм хемилюминесценции окислительных реакций в растворах. Сборник Биолоуминесценция. Тр. МОИП, изд. "Наука", 21, 8.
3. Альберт Э. 1971. Избирательная токсичность. Издательство "Мир", Москва.
4. Аркадьева Г.Е. 1965. Изменение резистентности клеток к бактериальным токсинам в присутствии анатоксинов. Тр. Ленинградского химико-фармацевтического института, 18, 150-153.
5. Балтбарздис Э.Я., Слава Э.Э., Сауса В. 1968. Изучение действия некоторых гербицидов как структуроразрушающих факторов. Материалы XIY конференции по изучению внутренних водоемов Прибалтики, 2, 11-17.
6. Берсонова К.А. 1968. Передвижение монурона в воде, почве и корневищах тростника. Химия в сельском хозяйстве, 11, 38-40.
7. Богданова Т.И. 1965. Физиолого-биохимические основы действия альгицидных производных мочевины на синезелёные водоросли. Автореферат кандидатской диссертации, Киев.
8. Брагинский Л.П. 1972. Пестициды и жизнь водоемов. Изд. Наукова думка, Киев.

9. Брагинский Л.П. 1968. Пестициды - новый токсический фактор водной среды. Гидробиологический журнал, I. 85-94.
10. Брагинский Л.П., Гринь В.Г., Коненко А.Д., Топачевский А.В. 1968. Комплексное изучение альгицидной активности монурона и его влияние на режим и жизнь водоема. Сборник "Цветение воды", Изд. Наукова думка, Киев, I, 225-285.
11. Брагинский Л.П., Гринь В.Г., Костенко С.В., Лахин В.В., Суркова Л.В. 1963. Монурон и симазин как альгициды против нитратных водорослей. Природа биологических помех в водоснабжении. Тр. ВГБО, I4, Наука, Москва, 52-65.
12. Брагинский Л.П. 1965. Химические средства регулирования вегетации пресноводных водорослей. «Вопросы гидробиологии, I съезд ВГБО, тезисы доклада, Наука, 43.
13. Брагинский Л.П., Попова Г.В., Пушкарь И.Г., Комаровский Ф.Я. 1972. Влияние диурона на рыб и водных беспозвоночных в условиях хронического опыта в водоеме. Сборник "Влияние пестицидов на диких животных," 5-II.
14. Брагинский Л.П., Вуртная И.Л. 1969. Диурон, атразин и монурон как водные гербициды и их влияние на кислородный режим и фауну замкнутых водоемов. Материалы III Всесоюзной конференции по разработке и применению гербицидов в сельском хозяйстве, секция У, Москва.
15. Бреслер С.Е. Введение в молекулярную биологию, 1966, "Наука", Москва.

16. Бриллиант М.Д., Воробьев А.И. 1967. Роль липидов в распределении эритроцитов на кислотной эритрограмме. Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов. Наука, Москва, 123-131.
17. Бурлакова Е.В. 1967. О возможной роли свободнорадикального механизма в регуляции размножения клеток. Биофизика, 12, вып.1, 82-89.
18. Буря В.Ф. 1967. Влияние карбамида и бикарбамида аммония на газообмен плотвы и ряпушки. Сборник: Научная конференция института биологии Петрозаводского университета, 83.
19. Васильев Р.Ф., Карпужин О.Н., Шляпинтох В.Я. 1961. Установка для измерения слабых световых потоков. Журнал физ.химии, вып.2, 461.
20. Васильев Р.Ф., Русина И.Ф. 1964. Механизм хемилюминесценции при окислении органических веществ в растворах, ДАН СССР, 156, 6, 1402-6.
21. Васильев Р.Ф. 1964. Химическое свечение, Природа, 12, 22-30.
22. Васильев Р.Ф., Вичутинский А.А. 1963. Исследование хемилюминесценции в реакциях жидкофазного окисления. Известия АН СССР, сер. физ., 27, 6, 729-734.

23. Васильев Р.Ф. 1963. Люминесценция при химических реакциях в растворах. Автореферат докторской диссертации, Москва.
24. Васильев Р.Ф., Вичутинский А.А. 1962. О природе связи хемилюминесценции и окисления молекулярным кислородом, ДАН СССР, 142, 3, 615-618.
25. Веселов Е.А. 1967. Изменение газообмена рыб под влиянием токсических загрязнений воды. Сборник материалов IV медико-биологической конференции института биологии Петрозаводского Государственного университета, 164. 77.
26. Владимирова М.Г., Семененко В.Е. 1962. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. АН СССР, Москва.
27. Владимиров Ю.А. 1966. Сверхслабые свечения при биохимических реакциях. Издательство "Наука", Москва.
28. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. 1972. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. Издательство "Наука", Москва.
29. Владимиров Ю.А., Львова О.Ф. 1964. Сверхслабое свечение и окислительное фосфорилирование в митохондриях. Биофизика, 9, 4, 506.
30. Владимиров Ю.А., Литвин Ф.Ф. 1959. Исследование сверхслабых свечений в биологических системах. Биофизика, 4, 5, 601.

31. Владимирюв Ю.А., Львова О.Ф. 1965. Изучение сверхслабых свечений гомогенатов и кашиц печени. Сборник "Биофизика клетки", изд. "Наука", 74-83.
32. Владимирюв Ю.А., Львова О.Ф., Черемисина З.П. 1967. Механизм сверхслабых свечений, сопровождающих процессы окисления в митохондриях. Биоэнергетика и биологическая спектроскометрия, изд. "Наука", Москва, 29-34.
33. Владимирюв Ю.А., Карчагина М.В., Оленева В.И. 1971. Хемилюминесценция сопряженная с образованием липидных перекисей в биологических мембранах. Биофизика, ХУІ, 5, 452-454.
34. Вознесенский В.А. 1969. Первичная обработка экспериментальных данных, изд. "Наука", Ленинград.
35. Володин В.М., Лукьяненко В.И., Флеров Б.А. 1965. Динамика изменений устойчивости рыб к фенолу на ранних этапах онтогенеза. Вопросы гидробиологии, изд. "Наука", Москва.
36. Воронков М.Г., Федотова Л.А., Переферювич А.Н. 1967. Пестициды защитники растений, изд. "Зинатне", Рига.
37. Врочинский К.К. 1966, Некоторые вопросы гигиенического нормирования пестицидов в связи с их миграцией. Гигиена и токсикология пестицидов, 4, Киев, 288-291.
38. Врочинский К.К., Кононова Н.Э. 1970. К вопросу о влиянии пестицидов на жизнь водоемов. Сборник "Вопросы водной токсико-

логии, изд. "Наука", Москва, 88-95.

39. Гительзон И.И., Фиш А.М., Чумакова Р.И. 1967. О связи между люминесценцией и напряжением кислорода в суспензии светящихся бактерий. Биоэнергетика и биологическая спектрофотометрия, изд. "Наука", Москва, 70-75.

40. Гительзон И.И., Чумакова Р.И., Фиш А.М. 1965. К вопросу об энергетических соотношениях между биолюминесценцией и дыханием светящихся бактерий. Биофизика, 10, 1, 100.

41. Гительзон И.И., Чумакова Р.И. 1968. Люминесценция *Nostocula miliaris* как пример авторегулируемой реакции в клетке. Труды МОИП отдела биологии, 28, 207-212.

42. Гительзон И.И., Терсков И.А. 1959. Эритрограммы как метод клинического исследования крови. Изд. СО АН СССР, Красноярск.

43. Гофман Э. 1971. Динамическая биохимия, изд-во "Медицина", Москва.

44. Гурвич А.Т., Гурвич Л.Д. 1934. Метод генетического излучения. Изд-во ВИ-ЭМ, Ленинград.

45. Данюков Ю.Т., Мильман Л.С. 1966. Упрощенный фото-электронный прибор для энзиматического определения АТФ при помощи системы люциферин-люцифераза. Вопросы медицинской химии, 12, 5, 548.

46. Дмитренко Ю.С. 1963. Предварительные результаты выращивания сегалеток карпа в озере обработанном ЦХП. Сборник "X научная конференция по внутренним водоемам Прибалтики, Петрозаводске
47. Жарков В.В. 1967. Колебательные спектры алкил- -фенилуретов и аналитическое применение ИК-спектроскопии при исследовании структуры полиуретановых эластомеров. Кандидатская диссертация Университета, Горький.
48. Журавлев Е.З., Доморацкая Н.С., Серухина С.Я., Константинов И.И. 1969. Растворимость монурона и диурона в воде. Агрохимия, I, 141-143.
49. Журавлев А.И. 1968. Биоантиокислители и их роль в регуляции окислительных процессов. Сборник "Физико-химические основы авторегуляции в клетках, изд-во "Наука", Москва, 7-13.
50. Журавлев А.И., Филиппов Ю.Н., Симонов В.В. 1964. Хемилюминесценция и антиокислительные свойства липидов человека. Биофизика, 9, 86, 671.
51. Журавлев А.И. 1965. Проблемы биолюминесценции. Сборник "Биолюминесценция", труды МОИП, изд. "Наука", Москва, 21, 19.
52. Журавлев А.И. 1970. Сверхслабое свечение и ферменты. Успехи современной биологии, 69, 3, 398-408.

53. Журавлев А.И., Веселовский В.А., Кощеенко Н.Н. 1965. Биолуминесценция, труды МОИП, XXI, Изд. "Наука", Москва, 19-50.
54. Заева Г.Н. 1960. К вопросу о связи между характером токсического действия веществ (производных анизола) и химическим строением. Сб. "Промышленная токсикология" изд. АМН СССР, Москва.
55. Звиргзде Ю.К., Лаце Э.М., Грундуле М.В., Зуйка А.А. 1971. Влияние 2,4Д-На на окислительное фосфорилирование, механико-химические изменения и аденозин-трифосфатазная активность митохондрий печени карпа. Экспериментальная водная токсикология, 2, "Зинатне", Рига, 12-25.
56. Звиргзде Ю.К., Андрушайтис Г.П. 1970. Физиологический и биохимический подходы к решению проблемы водной токсикологии. Экспериментальная водная токсикология, Изд-во "Зинатне", Рига, 8-12.
57. Исламов И. 1969. Влияние диурона на дыхание и активность окислительно-восстановительных ферментов прорастающих семян хлопчатника и щирцы. Узбекский биологический журнал, 1, 22-24.
58. Казначеев В.П., Набиулин М.С., Черновский Е.Ф. 1967. Феномен люминесценции в биофизическом механизме действия родоновых вод курорта "Белокуриха". Сборник "Биоэнергетика и биологическая спектрофотометрия", изд. "Наука", Москва, 85-91.

59. Калиниченко В.Н. 1967. Определение квантового выхода некоторых хемилюминесцентных реакций окисления люминала. Украинский химический журнал, 33, 7, 749.
60. Калинин Ф.Л., Мережинский Ю.Г. 1965. Регуляторы роста растений. Киев.
61. Кауров Б.С. 1972. Изучение связи абсорбционных изменений в сине-зеленой области спектра с первичными реакциями фотосинтеза высших растений. Автореферат диссертации кандидата биол. наук, Москва.
62. Козлов Ю.П. 1968. Роль свободных радикалов в нормальных и патологических процессах, Автореферат докторской диссертации, изд. МГУ.
63. Корде Б.А., Звиргзде Ю.К. 1971. Влияние 2,4Д-Na на выживаемость икры и темп раннего эмбрионального развития вьюна. Экспериментальная водная токсикология, "Зинатне", Рига, 2, 31-43.
64. Крылов О.Н. 1968. О некоторых чувствительных показателях и изменениях в системе организма рыб при отравлениях. Тезисы доклада на Всесоюзной научной конференции по вопросам водной токсикологии, изд-во "Наука", Москва, 56-57.
65. Клипсон Н.А., Мамедов Т.Г. 1963. Биологическое действие свободных радикалов, полученных при анодном окислении тирозина. Радиобиология, 3, 1, 146.

66. Комаровский Ф.Я. 1970. Влияние диурона на фракционный состав белков сыворотки крови рыб. Экспериментальная водная токсикология, изд. "Зинатне", Рига, 30-31.
67. Комаровский Ф.Я., Попович Н.А. 1971. Исследование токсического действия производных мочевины на рыб в условиях хронического эксперимента. Экспериментальная водная токсикология, изд. "Зинатне", Рига, 2, 77-91.
68. Комаровский Ф.Я., Попова Г.В. 1969. Изменение картины крови рыб под влиянием диурона. Симпозиум по водной токсикологии, тезисы доклада, Ленинград, 68.
69. Комаровский Ф.Я. 1969. Гематологические методы в оценке токсичности пестицидов для рыб. Симпозиум по водной токсикологии, тезисы доклада, Ленинград, 67.
70. Комаровский Ф.Я., Попова Г.В. 1972. Изменения показателей крови рыб под влиянием диурона в хроническом опыте. Сборник "Влияние пестицидов на диких животных", Москва, 19-23.
71. Конев С.В. 1965. К вопросу о природе и биологическом значении сверхслабых свечений клетки. Сб. "Биолюминесценция", Тр. МОИП, изд. "Наука", Москва, 21, 181.
72. Кригер Ю.А. 1968. Механизмы регуляции клеточной проницаемости. Сб. "Физико-химические основы авторегуляции в клетках", Труды МОИП, XXУШ, изд. "Наука", Москва, 115-117.

73. Кудряшов Ю.Б., Какушкина М.Л. 1959. Новая методика определения активности тканевых гемолизинов. Научные доклады высшей школы, 2, 93.

74. Кузьменко Н.М. 1966. Данные к токсикологической характеристике далапона. Гигиена и токсикология пестицидов и клиника отравлений, Здоровье, 4, Киев, 197-8

75. Лесников Л.А., 1970. О разделении пестицидов на группы с точки зрения регулирования их применения и производства. Экспериментальная водная токсикология, изд-во "Зинатне", Рига, 16-19.

76. Лубянов И.П. 1968. К вопросу о влиянии ДДТ и ГХЦГ на водные организмы. Тезисы докладов на Всесоюзной научной конференции по вопросам водной токсикологии, изд. "Наука", Москва, 95-96.

77. Лукьяненко В.И. 1967. Токсикология рыб. Изд-во "Пищевая промышленность", Москва.

78. Лукьяненко В.И., Флеров Б.А. 1963. Экспериментальные данные к возрастной токсикологии рыб. Фармакология и токсикология, Москва, 5, 625-629.

79. Лукьяненко В.И., Флеров Б.А. 1963. Зависимость динамики токсического процесса от концентрации при фенольном отравлении карасей. Сб. "Материалы по гидробиологии и биологии волжских водохранилищ, Изд. АН СССР, Москва-Ленинград.

Лукьяненко В.И., Флеров Б.А. 1964. Влияние сезонного фактора на токсикорезистентность рыб. Вопросы ихтиологии, 4, вып. I, 179-183.

81. Лукьяненко В.И., Петухова Л.А. 1966. Некоторые биохимические показатели крови и тканей рыб в норме и при рефлекторном возбуждении. Тезисы Всесоюзной конференции по экологической физиологии рыб, Москва.

82. Лукьяненко В.И. 1965. Экспериментальное изучение некоторых общих вопросов водной токсикологии на модели фенольной интоксикации рыб. Вопросы гидробиологии, изд. "Наука", Москва.

83. Лукьяненко В.И. 1967. Экспериментальное изучение некоторых общих вопросов водной токсикологии. Гидробиологический журнал, 6.

84. Мамедов Т.Г. 1968. Коррекция интенсивности слабой биолюминесценции с реакциями метаболизма клетки. Труды Московского общества испытателей природы отдела биологии, 28.

85. Майер-Бодэ Г. 1972. Гербициды и их остатки, изд. "Мир", Москва.

86. Мельников Н.Н. 1970. Новые пестициды, изд. "Мир", Москва.

87. Мельников Н.Н. 1968. Химия пестицидов, изд-во "Химия", Москва.

88. Мельников Н.Н., Баскаков Ю.А. 1962. Химия гербицидов и регуляторов роста растений. Государственное научно-техническое издательство химической литературы, Москва.

89. Мережко А.И., Богданова Г.Л. 1965. Физиолого-биохимические механизмы действия монурона на сине-зеленые водоросли. Вопросы гидробиологии, изд. "Наука", Москва.

90. Метелев В.В., Канаев А.Н., Дзасохова Н.Г. 1971. Водная токсикология, изд. "Колос", Москва.

91. Метелев В.В. 1971. Токсичность пестицидов для рыб, механизм действия и методы индикации. Экспериментальная водная токсикология, изд. "Зинатне", Рига, 104-122.

92. Михайлов Н.Е. 1966. Экспериментальные исследования к обоснованию допустимых концентраций монурона и диурона в воде водоемов. Сборник "Гигиена и токсикология пестицидов и клиника отравления", изд. "Здоровье", Киев, 291-294.

93. Найнштейн С.Я., Клебанова В.А., Томашевская Л.А., Лурье А.И. 1968. Материалы к пересмотру предельно допустимой концентрации ДДТ в воде открытых водоемов, Гигиена и санитария, 1, 42-46.

94. Никольская Н.С., Степанова Н.С. 1969. Влияние анаэробноз на дробление и содержание АТФ в яйца влвна, ДАН СССР, 185, 5, 1197-1200.

95. Панюшкин Ю.А., Тарусов Б.Н. О роли липидных антиоксидантов в адаптации рыб к различным осмотическим условиям, 1968, Вопросы ихтиологии, 8, 5, 949.

96. Пасынский А.Г. 1968. Биофизическая химия, изд. "Высшая школа", Москва.

97. Петяев М.М., Черепнева И.Е., Сюсина Т.Г., Дмитриев Ю.П., Петров И.А. 1967. Свободные радикалы эритроцитов при злокачественных новообразованиях. Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов, изд. "Наука", Москва, 258-262.

98. Пидгайко М.Л., Щербань Л.П. 1970. Развитие планктонных и донных животных в прудах, обработанных монуроном. Сборник "Вопросы водной токсикологии", изд. "Наука", Москва, 96-101.

99. Плохинский Н.А. 1970. Биометрия, изд. Московского университета.

100. Подрабинек П.А., Каменский И.И. 1966. О закономерности распределения эритроцитов по их химической резистентности. Биофизика, XI, 2, 281-287.

101. Поликарпов Г.Г., Иванов В.Н. 1961. О действии стронция-90-итрия-90 на развивающуюся икру хамсы. Вопросы ихтиологии, I, 3,

102. Попова Г.В. 1971. Особенности действия гербицида ялана на рыб. Экспериментальная водная токсикология, 2, изд. "Зинатне", Рига, 65-67.

103. Попова Г.В. 1972. Патоморфологические изменения эритроцитов у рыб при хроническом отравлении диуроном. Сборник "Влияние пестицидов на диких животных", Москва, 12-18.
104. Попова Г.В. 1970. Гематологические показатели при оценке токсичности пестицидов для рыб. Экспериментальная водная токсикология, 2, изд. "Зинатне", Рига, 19.
105. Попова Г.В., 1970. К вопросу о влиянии пестицидов на рыб. Экспериментальная водная токсикология, изд. "Зинатне", Рига, 13-15.
106. Рапопорт С.М. 1966. Медицинская биохимия, Медгиз, Москва.
107. Рид С. 1960. Возбужденные электронные состояния в химии и биологии, изд. "Иностр. лит.", Москва, 173.
108. Рубин Л.Б., Дубровин В.Н. 1968. Некоторые особенности действия ингибитора диурона и кислорода на первичные реакции фотосинтеза. Научные доклады Высшей школы, отд. Биолог., 2, 62-67.
109. Самылин А.Ф. 1970. Возникновение уродств при эмбриональном развитии рыб под влиянием гексахлорана. Сборник "Вопросы водной токсикологии", изд. "Наука", Москва, 106-111.
110. Самосват Л.С. 1968. Определение малых количеств монурона в воде, водорослях и почве методом хроматографии в тонком слое. Гидробиологический журнал, 4, 4.

III. Свешников Б.Л. 1938. О механизме хемилюминесценции 3-амино-фталевого гидразида. Журнал физической химии, II, 5, 720-732.

II2. Семенцева Э.М. 1966. Группоспецифические антигенные свойства протоплазмы эритроцитов человека в норме и при воздействии хлороформа. Гигиена и токсикология пестицидов и клиника отравления, 4, "Здоровье", Киев, 69-74.

II3. Селье Г. 1960. Очерки об адаптационном синдроме, Медгиз, Москва.

II4. Сидоров В.С., Лизенко Е.И., Болгова О.М., Нефедова Э.А. 1969. К вопросу о содержании липидов в различных органах ряпушки озер Южной Карелии. Тез. докладов на УШ сессии Ученого Совета по проблеме "Биологические ресурсы Белого моря и внутр. водоемов Европейского севера".

II5. Синельников В.Е. 1971. Люминесцентный анализ вод суши и моря, Обнинск.

II6. Синельников В.Е. 1968. К применению хемилюминесцентной реакции окисления люминола для характеристики качества воды в водоеме. Труды Института биологии внутренних вод АН СССР, 19, изд-во "Наука", Москва-Ленинград.

II7. Синельников В.Е. 1969. К выяснению роли перекисей в процессе окисления фенола в водоемах, Сборник "Материалы к совещанию по прогнозированию содержания биогенных элементов и органического вещества в водохранилищах, Выбинск, 118-126.

118. Синельников В.Е. 1965. О возможностях применения люминесцентного метода при исследовании загрязненных рек, Научные доклады по вопросам самоочищения водоемов и смешения сточных вод, Таллин.

119. Синельников В.Е. 1968. К использованию хемилюминесцентного метода в изучении веществ ингибирующих химическое окисление в водной среде, Тезисы четвертой конференции по химии моря, Москва.

120. Синельников В.Е. 1968. К применению хемилюминесцентной реакции окисления люминола для характеристики качества воды в водоемах, Сборник "Химизм внутренних водоемов и факторы их загрязнения и самоочищения, Изд-во "Наука", Москва-Ленинград.

121. Синельников В.Е. 1969. Установка для изучения превращений органических соединений в воде хемилюминесцентным методом, Материалы к совещанию по прогнозированию содержания биогенных элементов и органического вещества в водоохранилищах, Рыбинск, 163-171.

122. Смирнова О.И. 1966. Изменение гемолитической стойкости эритроцитов и пероксидазной активности крови при острой интоксикации некоторыми органическими перекислями, Фармакология и токсикология, XXIX, I, 96-98.

123. Столяров К.П., Григорьев Н.Н. 1967. Введение в люминесцентный анализ неорганических веществ, изд-во "Химия", Ленинградское отделение.

124. Строганов Н.С., Гусев А.Г. 1971. Критерий токсичности и принципы методик по водной токсикологии, Изд-во Московского Университета.

125. Строганов Н.С. 1970. Загрязнение вод и задачи водной токсикологии. Сборник "Вопросы водной токсикологии", изд-во "Наука", Москва, II-23.

126. Строганов Н.С. 1964. Химизация и вопросы водной токсикологии, Зоологический журнал 43, 12.

127. Строганов Н.С., Колосова Л.В. 1965. Влияние малых концентраций ГХБД на водные организмы. Бюллетень Московского общества испытателей природы, отдел биологии, 70, 2.

128. Строганов Н.С., Пахитков Н.Г. 1941. Экспериментальное исследование по установлению физиологических границ ядовитого вещества, ионсв меди и аммиака на рыб и некоторых беспозвоночных, Ученые записки МГУ, Биология, вып.60, изд-во МГУ, Москва, 27-86.

129. Тарусов Б.Н. 1968. Физико-химические основы авторегуляции в клетках, изд-во "Наука", Москва.

130. Тарусов Б.Н., Иванов И.Л., Петрусевиц Ю.М. 1967. Сверхслабые свечения биологических систем, изд-во Московского Университета, 24.

131. Тарусов Б.Н., Поливода А.И., Журавлев А.И. 1961. Изучение сверхслабой спонтанной люминесценции животных клеток. Биофизика, т.6, вып.4,
132. Тарусов Б.Н. 1954. Основы биологического действия радиоактивных излучений, Медгиз, Москва.
133. Тарусов Б.Н., Журавлев А.И. 1965. Биохемиллюминесценция липидов, Сборник "Биолюминесценция" Труды МОИП, изд-во "Наука", Москва, 21, 125.
134. Телитченко М.М., Говорова М.Ф. 1962. Использование метода кислотных эритрограмм с целью ранней диагностики токсикозов рыб. Бюлл. Моск. о-ва исп. природы, отд. биол., т.67, вып. 3, 157-158.
135. Телитченко М.М., Говорова М.Ф. 1962. Ранняя диагностика токсикозов рыб методом эритрограмм. Вопросы ихтиологии, т.2., вып. 3, 393-397.
136. Телитченко М.М., Кокин К.А. 1968. Санитарная гидробиология. Изд-во МГУ, 25-32.
137. Телитченко Л.А., Бойченко М.М. 1971. Влияние на эритропоэз рыб и крыс воды, регенерированной из мочи человека, Космическая биология и медицина, № 5, 89-90.
138. Телитченко М.М., Кокин К.А. 1968. Санитарная гидробиология, изд-во МГУ, 25-32.

139. Трингер К.С., Гинзбург Э.И. 1962. Кинетика ферментативного разрушения клеточной мембраны эритроцита, Биофизика, вып. 7, 2, 244-247.

140. Тамбиев А.Х., Телитченко М.М. 1968. Изучение токсических метаболитов некоторых гидробионтов современными методами, Санитарная гидробиология и водная токсикология, Материалы XIУ конференции по изучению внутренних водоемов Прибалтики, изд-во "Зинатне", Рига, 185-189.

141. Тарусов Б.Н. 1968. Сверхслабое свечение биологических систем и перспективы его использования, Сельскохозяйственная биология, вып.3, 336.

142. Терсков И.А., Гительзон И.И. 1960. Эритрограммы как метод клинического исследования крови, Красноярск, 1959.

143. Трошин А.С. 1964. Сорбционные свойства протоплазмы и их роль в явлениях клеточной проницаемости, Сборник "Физико-химические основы происхождения биопотенциалов", Труды МОИП, IX, изд-во "Наука", Москва, 7.

144. Тумерман Л.А., Федорович И.Б., 1967. Биолуминесцентный метод определения аденозинтрифосфата, Сборник "Биоэнергетика и биологическая спектрофотометрия", изд-во "Наука", Москва, 35-39.

145. Фреймане: Т.Х., Платпура В.П. 1971. Количественные сдвиги липидных фракций в скелетной и сердечной мускулатуре карпа под влиянием 2,4Д-На, Экспериментальная водная токсикология 2, изд.-во "Зинатне", Рига, 26-30.

146. Хаггис Дж., Михи Д., Мюир А., Роберте К., Иопер П. 1967. Введение в молекулярную биологию, изд-во "Мир", Москва.

147. Чернышева В.М. 1968. Влияние монурона на плодовитость и качество потомства рыб (на примере группы *Lebistes reticulatus* Peters), Цветение воды, изд-во "Наукова думка", I, 286-293.

148. Чернышева В.М. 1968. Определение наличия токсических концентраций производных мочевины в воде при помощи биологических индикаторов. "Цветение воды", изд. "Наукова думка", Киев, 365-370.

149. Чернышев В.И., Телитченко М.М. 1973. Физико-химические аспекты развития патологических процессов у *Cyprinus carpio* при резких перепадах температуры и содержания кислорода в воде и интоксикациях ядами разной природы. Вопросы ихтиологии, т.13, вып.1, 155-166.

150. Чернышев В.И., Телитченко М.М., Козлов Ю.П. 1968. Использование метода электрохемилюминесценции для оценки биологической активности токсических продуктов, Научные доклады высшей школы, Биологические науки, № 7, 57-62.

151. Шелков Л.С., Трагер И.А., Костин А.Г. 1965. Счетчики фотонов для точных измерений ультрафиолетового излучения. Приборы и техника, № 31, 349.

152. Шляпинток В.Я., Карпухин О.Н., Постников Л.М., Захаров И.В., Вигутинский А.А., Цепалов В.Ф. 1968. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов, Изд-во "Наука", Москва".

153. Щербань Э.И. Влияние монурона на потенциальную продуктивность некоторых планктонных cladocera, 1971. Экспериментальная водная токсикология, 2, Изд-во "Зинатне", Рига, 92-103.

154. Щетинская Л.И. 1969 О влиянии диурона бактериофлору экспериментальных прудов, Материалы III Всесоюзной конференции по разработке и применению гербицидов в сельском хозяйстве, секция У, Москва.

155. Якубов С.М., Чернышев В.И., Козлов Ю.П., Тарусов Б.Н. О некоторых физико-химических свойствах липидов органов карпа *Surginus carpio L* при воспалении плавательного пузыря, 1971, Вопросы ихтиологии, т. II, вып. 4, 68.

156. Яновский М.В., 1968. цит. по Телитченко М.М., Кокин К.И., Санитарная гидробиология, Москва, изд. МГУ.

157. Allaway W.G., Mansfield T.A. 1967. Stomatal responses to changes in carbon dioxide concentration in leaves treated with 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea, *New Phytol.*, 66 (1), 57-63.

158. Audubert R. 1939. Emission of ultraviolet rays by chemical reactions, *Trans. Faraday Soc.*, 35, pt.1, 197.

159. Bakerman S., Wasemiller G. 1967. Structural units of human Erythrocyte membrane I. Separation isolation and partial characterization, *Biochemistry* 6 (4), 400-413, Kansas City, England.

160. Ball I.R. 1968. The relative susceptibilities of some species of fresh-water fish to poisons, *Water Res.*, 1 (11/12) 767-775, England, *Water Pollut. Res. Lab., Sterenage.*

161. Baudt H.J. 1958. Phenolabwasser und Abwasserphenole, ihre Entstehung, Schädigung und abwassertechnische Behandlung eine monographische Studie, Akademie Verlag, Berlin.

162. Benesch R., Benesch R.E. 1968. Oxygenation and ion transport in red cells, *Science*, 160 (3823) 83, New-York.

163. Berger A.W., Driscoll I.N., Pirog I.A. 1965. A survey of chemiluminescence in base-catalysed autoxidation reaction, In *Symposium on chemiluminescence*, Durham, North Carolina, 31 March-April, 301.

164. Bertolini A.M., Quarto D., Palot M. 1962. Erythrocyte metabolism in the aged. *Giorn. Gerontol.* 10, 565-580.

165. Blake A., Leader D., Whittam R. 1967. Physical and chemical reactions of phosphates in red cell membranes in relation to active transport, *J. Physiol London*, 193, 467-479.

166. Boudier A.J., Chan-Tai Kwong A.J. 1969. Time course of red cell lysis in hypotonic electrolyte solutions, *f., Physical (London)*, 201, 437-452.

167. Böhme C., Ernst W. 1965. Über den stoffwechsel von Harustoff-Herbiciden in der Ratte. Mitteilung Diuron und Aresin, *Food and Cosmetics Toxicology*, N.3, 797-802.

168. Carlson A.D. Effect of drugs on luminescence in larval fireflies. 1968. *J. Exp. Biol.* 49 (1), 195-199.

169. Chapman D., Kamat V.B., de Jier J., Penkett S.A. 1968. Nuclear magnetic resonance studies of erythrocyte membranes, *Journal Molecular Biology*, 31 (1), 101-104.

170. Chapman D., Kamat V.B. 1968 *Regulatory functions of biological membranes*, J. Jarnefelt, Amsterdam, Elsevier, 99.

171. Chamiel J. 1960 Resistance of human red cells and their physical-chemical changes in hypertonic media. *Bull. soc. amis sci et lettres, Poznan, Ser. C.* 10, 113-125.

172. Cohen G. 1966. Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by acetylphenylhydrazine, *Biochem. Pharmacol*, 15 (11), 1775-1782.

173. Colli L., Facchini V., Cuidotti G., Duchani-Lonati R., Orsenigo M., Sonnarive O. 1955. Parther measurements on the bioluminescence of the seedlinge, *Experientia*, 11, 479.

174. Colli L. Facchini V. Rossil 1954. A Study of RCA 5819 and EMI 62-60 Photoamplifier as individual photon counters "Nuovo cimento", 11.

175. Cook Ed. 1961, *Biochemists Handbook*.

176. Cormier M.J. 1961. Biochemistry of Renilla Reniformis Luminescence, *Symposium on Light and Life* Ed by W. Mc Elroy B. Glass Baltimore, 274-299.

177. Cormier Milton J., Prichard Philip M. 1968. An investigation of the mechanism of the luminescent peroxidation of luminal by stopped fluo techniques, *Journal Bio. Chem.*, Nr. 98, 243, 4706-4714.

178. Cormier Milton J., Totter J.R., 1964, *Bioluminescence*, *Annial Rev. Biochemistry*, 33, 431.

179. Cornwell D.G., Heikkila R.E., Bar R.S., Biagi G.L. 1968. Red blood all lipids and plazma membrane, *Journal Amer. Oil Chemistry Society*, 45, 5, 297-304.

180. Crafts A.S. 1962. The chemistry and Mode of action of herbicides, Interscience Publishes, New-York-London.

181. Darrow R.A., Colowick S.P. 1963. Hexsokinase from Pakeis Yeast, Methods in Enzymology, vol I, 226-235.

182. Debye P., Edwards J.O.K. 1952. A note on the phosphorescence of proteins, Science, 115, 143.

183. Desforges J.F. 1965, Erythrocyte metabolism in he-lysis, New England Journal Medicine 273 (24), 1310-1321.

184. Douste-Blazy L., Soule O. Valdique P. 1962. Beha- viour of red cell lipids during in vitro hemolysis, Bioche- mistry Problem Lipids, Proc. Intern. lauf 7th, Birmingham, 396-403.

185. Edson E. 1958. The risks of pesticides for fish, World Crops. Nr.8.

186. Ernst W. Bohme C. 1965. Über den Stoffwechsel von Hanestoff-Herbiciden in der Ratte. Mitteilung Monuron und Aresin, Food Cosmer Toxicol, 3, 789-797.

187. Ezell G.H., Sulya L.L., Dodgen C.L. 1969, Osmotic fragility of some fish erythrocytes in hipotonic saline, Com- parative Biochemistry Physiology, 28 (1), 404-415.

188. Ferguson J., Hawkins S., Doxey D. 1950. C-Mitotic Action of some Simple bases, Nature, vol.165, Nr.4208, 1021-1022.

189. Fitzgerald G.P. 1957. The control of the growth of algae with CMC, Trans. Wisconsin Acad. Science, Arts and Letters, v. 6, 281-294.

190. Frank P.A. 1966. Persistence and distribution of monuron and neburon in an aquatic environment, weeds, 14, 219-222.

191. Forthneys S.R. Linn W.S. 1964. Role of ascorbate and cystein on swelling and lipid peroxidation in rat liver mitochondria, Arch. Biochem. and Biophys., 104, Nr.2, 241.

192. Funaki Hiroshi, Joshitsugu Imaizaki, Hanko Hattuda. 1967. Comparison of digestion of human RBC and intact red cells, Minami Osaka Byoin Igaku Zasshi, 15 (1), 57-58.

193. Funaki Hiroshi. 1957. Comparative investigations on the catalase reaction between erythrocyte suspension and hemolyzate, Japan J Physiol, 7, 147-152.

194. Funder I., Wieth I.O. 1967, Effect of some univalent anions of fluxes of sodium and potassium and on glucose metabolism of ouabain-treated human red cells, Acta Physiol Scand. 71 (23), 168-185.

195. Gardos G. Hma Szasz, I Arny. 1956. Structure and function of erythrocytes. Relation between the energy metabolism and the maintenance of biconcave shape of human erythrocytes, Acta Biochem. Biophys., 1(3), 253-265.

196. Giebel O., Passou H. 1960. Permeability of the erythrocyte membrane to inorganic ions. The problem of diffusion through pores, Arch. ges. Physiol., 271, 378-388.

197. Gingras G., Lavorel J. 1965. Fluorescence properties of Scenedesmus adapted to hydrogen, Physiol. Vegetate, 3(2), 109-120.

198. Glaser M., Simpkins H., Singer S., Sheets M., Chans. 1970. On the Interactions of Lipids and Proteins in the Red Blood Cell Membrane. Proc. Nat. Aced. sci USA, 65, 721-728.

199. Good W., Rose S.M. 1968. Kinetics of hemolysis of human erythrocytes in hipotonic solutions of glucose, Biochem. Biophys. Acta 163 (4), 483-493.

200. Grabiec S.A., Gutowa Malzaha Michailow W. 1969. Investigations on the Oxidation - Reduction Activity in Embryos and trophozoites of Trichocephalus nodulosus (Pall) by the Chemiluminescence Method. Bulletin de l'Academie Polonaise Des Sciences, vol. XVII, Nr.10, 609-612.

201. Grizell R. 1966. Diuron as an aquatic herbicide, 19th Annual Conference South-east Association Game and Fish Commissioners Tulsa, Columbia.

202. Hambrig R.N. 1969 Testing diuron as an economical herbicide in recreation lakes, Proc. Society weed Conference, 22, 321-323.

203. Hance R.I. 1967. The speed of attainment of sorption Equilibria in some systems involving herbicides, Weed Res., 7(1), England, 29-36.

204. Harvey E.N. 1920. The nature of animal Light, Lippincott, Philadelphia.

205. Harvey E.N. 1952. Bioluminescence, Academic Press, New-York.

206. Harvey E.N. 1957. History of Luminescence, American Philosophical Society, Philadelphia.

207. Heard D.N., Seaman G.V.F. 1960. The influence of pH and ionic strength on the electrokinetic stability of the human erythrocyte membrane, J. Gen. Physiol., 43, 635-654.

208. Hiltibran R.C. 1967. Effect of some Herbicides on Fertilized Fish Eggs, Reprinted from Transactions of the American Fishery Society, vol. 96, Nr.4, October, 414-416.

209. Hochstein P., Cohen G. 1964. The Role of glutathione in the detoxication of hydrogen peroxide, Acta Biol. Med. Ger. Suppl., 3, 292.

210. Hodge H.C., Douns W.R., Panner B.S., Smith D.V., Maynard F.A. 1967. Oral toxicity and metabolism of diuron N-(3,4-dichlorophenyl)-N,N-dimethylurea) in rats and dogs, Food, Cosmet, toxicol, 5(4), 513-531, University of Rochester.

211. Hodgson E., Caside J.E. 1961. *Biochem. Pharmacol*, 8, 179.

212. Holden A. 1962. Contamination of fresh wates by persistent insecticides and their effects of fish, *Annual Application Biology*, vol.55, Nr.2.

213. Hughes J.S. 1962, The toxicity of fish firferent formulations of 2,4,5-T 2(2,4DP) and silvex, *Proc. So Weed Conf.*, 15, 265-266.

214. Hughes J.S., Davis J.T. 1963. Variations in toxicity to bluegill seefish of phenixy herbicides, *weeds II*, 50-53.

215. Inglot A.D., Wolna E. 1968. Reactions of konsteroidal antlinflammatory drugs with the erythrocyte membrane, *Biochem Pharmacol*, 17(2), 269-279, England.

216. Jansen L.F., Gentner W.A., Hilton I.L. 1958. A new method for evaluating potential algicides and determination of the algisidae properties of substituted-urca and S-triazine compaunds, *Weeds*, vol.6, Nr.4.

217. Jones J. 1957. In book: *Aspects of river pollution*, L.Klein, London.

218. Jonson F.H., Sie E.M-C. 1961, *The Luciferia-Luciferase Reaction*, Asymposium on Light and Life Edit. by Mc.Elroy and B.Glass Baltimore, The Johns Hopkins Pless, 206-215.

219. Jordan L.S., Mann I.D., Day B.E. 1965. Effects of ultraviolet light on herbicides, Weeds 13(1), 43-46.

220. Jortner I., Ottolengh L., Stein G., 1963. The formation of solvated electrons in the photochemistry of the phenolate ion in aqueous solutions, Journa, American Chemistry Society, vol.85.

221. Kavanau I.L. 1966. Membrane Structure and function, Federat, Proc., vol.25, Nr.3, part 1, 1096-1107.

222. Konopka K., Leyko V., Gondko R., Sidorezyk Z., Fabjanovska Z., Swedovska M. 1969. Studies on the compounds of ATP and iron, isolated from human erythrocytes, clin.Chim.Acta, 24(3), 399-366.

223. Kretschmar G., Günter G. 1970. Der Einfluss von 3-Amino-1,2,4-triazol (amitrol) auf die Atmung von Azotobacter. Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie 10, 7 487-500.

224. Kubal I. 1968. A Chemoluminescence Method for the Determination of hydrogen Peroxide in Aqueous Medium. Chemiske Listy 62, 12, 1478-1482.

225. Langebeck W., Ruge U. 1937, Einige Versuche mit Luminol. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft v 70, Nr.2, 367-369.

226. Laut A.F., Whittam R. 1968. The influence of ions of the labeling of adenosine Hiphosphate in red cell ghosts. I.Physiol (london), 457-484.
227. Lenar I., Singer S.J. 1968. Structure of membranes: reaction of red blood cell membranes with phospholipase C. Science 159 (3816), 738-739.
228. Lovelock I.E. 1955. The haemolysis of human red blood cells by tresing and thancing. J.Biochem. 60, 692.
229. Luedemann D., Kayser H. 1965. Toxicita of herbicides to aquatic life Gas and wasserfach 106(b), 220-223.
230. Maloney T.E. 1958. Control of algae with chloroꝑhe-nyldimethylurea. I.Amer. Water Works Assoc. 50, 417-422.
231. Mayneord W.V., Anderson W., Ivans H.D., Rosen D. 1955. Hydrogen peroxide yields in x-irradiated aqueous solutions. A sensitive method based on hydroxide chemiluminescence. Radiation Research, v.3, Nr.4, 379-392.
232. Mc.Carpa F. 1968. An application of the theory of electro-cyclic reactions to bioluminescence. Chem Commun. Bright. Engl. 3, 155-156.
233. McElroy W.D., Seliger H.H. 1961. Mechanisms of Bioluminescent Reactions In. A.Symposium on Light and Life. Ed Mc.Elroy W. B. lass Baltimore. The Johns Hopkins Press 219-257.

234. Mc Elroy W.D., Seliger H.H. 1962. Biological luminescence, *Scient Amer.* 207, Nr.6, 76.

235. Mircevova L. Simonova A., Michalec C., Kolman Z. 1968. The influence of hemolysins on the ATP ase activity and the composition of the erythrocyte membrane. *Euzymol Biol. Clin.* 9(1), 31-40.

236. Muirhead-Thomson R.C. 1971. Pesticides and Frechwater Fauna. In book: Acad. Press London and New-York.

237. Mullison W.R. 1970. Effects of Herbicides on Water and its Inhabitants. *Weed Science* 18, 6, 738-750.

238. Nash R.G. 1968. Plaut up take of diuron C14^X in modified soil. *Agronomical Journal (Beltsville Eng.)* 60 (2), 177-179.

239. Neururer H. Slanina K. Chemische Bekämpfung unerwünschter Teichpflanzen mit besonderer Berücksichtigung der Fischtoxicitat von Herbisiden. *Pflanzenschutz Berichte*, v.24, Nr.8,10.

240. Nungster W.J. Paradise L.J., Adair J.A. 1969. Loss of Cellular ATP as a Measure of Cytolytic Activity of Antiserum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* v.132, Nr.2, 582-587.

241. O'Brien J.S. 1967. Cell membranes: composition, structure, function. *Journal Theoret Biol.* 15, 307-324.

242. I. van Overbeck. 1959. Auxins. *The Botanical Review*, v.25, Nr.2, 269-350.

243. Olson E.J., Cazort R.I. 1969. Active calcium and strontium transport in human erythrocyte ghosts. *I.Gen.Physiol.* 53 (3), 311-322.

244. Palmer C.M. 1956. Evaluation of new algacides for water supply purposes. *I.American Water Works Assoc.*, v.48.

245. Paniker N.V., Iyer G., Yegna N. 1967. Protective factors in the detoxication of hydrogen peroxide in erythrocyte. *Can. I.Biochem.* 47, 4, 405-410.

246. Pierce P.C. 1966. Results of field testing newer aquatic herbicides with emphasis on spot treatment applications. *Proc. So. Weed Conf.* 10, 374-375.

247. Pierce M.F. 1969. The effect of a combined formulation of 2,4D and endothal upon a small pond. *Proc. No. East Contr. Conf.* 23, 376-379.

248. Ponder E. In book: *Haemolysis and related phenomena*. London. 1948.

249. Richardson T. Tappel A., Smith R. Houls C. 1962. Polyunsaturated fatty acids in mitochondria. *Journal Lipid Research*, v.3, Nr.3, p.344.

250. Rosenberg S.A., Guidotti G. 1968. The Protein of human erythrocyte membrane. I. Bio. Chem. 243 (8), 1985-92.

251. Rubin M., Changey I.P. 1966. On the Nature of Allosteric Transitions Implications of Non-exclusive Ligand Binding. I. mol. Biol. 21, 265-274.

252. Seeman P. 1966. Erythrocyte membrane stabilization by local anesthetic and tranquilizers. Biochem. Pharmacol 15 (11), 1753-66.

253. Seeman P., Weinstein I. 1966. Erythrocyte membrane stabilization by tranquilizers and antihistamines. Biochem. Pharmacol 15 (11), 1737-52.

254. Seeman P. 1966. A method for distinguishing specific from nonspecific hemolysins. Biochem. Pharmacol 15 (11), 1767-74.

255. Seliger H.H. 1961. Some Aspects of the Luminal Light Reaction. In. Symposium of Light and Life. Ed. Mc Elroy W.Glass B. Baltimore, Ione Hopkins Press, p. 200-205.

256. Selye H. 1950. The Stress Montreal-1952. The Story of adaptation Syndrome Montreal 1956. The Stress of Life New-York-Toronto-London.

257. Sheets T.S. 1964. Review of Disappearance of Substituted Urea Herbicides from soil. I. of Agricultural and Food. Chem. 12, 30-33.

258. Sjöstrand F.S. 1959. Fine structure of cytoplasm. The Organisation of Membranous Layers. Rev. Modern Phys. 31, 301-318.

259. Smith G.E., Isom B.C. 1967. Investigation of effects of large scale applications of 2,4D upon aquatic fauna and water quality. Pesticid Monitos J. 1, 16-21.

260. Stanley P., Williams E. 1969. Use of the Liquid Scintillation Spectrometer for Determining Adenosine Triphosphate by the Luciferase. Euryme. Analytical biochemistry 29, 381-392.

261. Strehler L.B. 1965. Adenosine 5'-triphosphate and Creatine Phosphate Determination with Luciferase. In. Methods of enzymatic analysis Acad. Press New-York-London, 559-566.

262. Soula G., Douste-Blazy L., Valdiguie P. 1964. Diffusion of fatty acids of erythrocytes during osmotic hemolysis. Bull. Soc. Chem. Biol. 46 (2/3), 329-38.

263. Stauff I., Schmidkuntz H. Hartmann G. 1963. Weak chemiluminescence of oxidation reactions. Nature 198 N 4877, 281.

264. Steen J.B. Puritzin S.N. 1968. Nature and Biological significance of the pH difference across red cell membranes. Resp. Physiol 5(2), 234-42.

255. Steigman A. 1942. Luminol as reagent for hydrogen peroxide cooper, iron and cyanide. Society of Chemical Industry, No 2, v.61, 465-467.

266. Strehler B.L. Arnold W.A. 1951. Light production by green plant. I Gen. Physiol 34, p.809.

267. Swanson C.R. Swanson H.R. 1968. Metabolic fate of monurone and diuron in isolated leaf disks. Weed Scie. 16 (2), 137-143.

268. Sweerser P.B., Todd C.W., Hersch R.T. 1961. Effect of inhibitors on Light Re-emission. Biochem. Biophys. Acta, 51 509,-518.

269. Treharne R.W., Brown T.E., Vernon L.P. 1963. Separation of Zur Light-induced electron-spin resonance signals in several algal species. Biochimica et Biophysica Acta, v.75, 3, 324-332.

270. Tsen C.C., Collier H.B. 1960. The relation between the glutathione content of rat erythrocytes and their hemolysis by various agents in vitro. Can. J. Biochem and Physiol, 38, 961-987.

271. Uhlenbruck G., Winzer G., Wersdoerfer R. 1967. Structure of cell membranes, specially red blood corpuscles. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 5(6), 261-287.

272. Van Deenen L.L. 1967. On the lipid composition of membrane, *Protoplasma* 63, 157-159.

273. Vasilev G., Iliev L., Dobrev K. 1967. Herbicidal activity of certain thiourea derivatives. *C.R.Acad Bulg Sci*, 20 (11), 1193-1195.

274. Vassilev R.F., Vichutinskij. 1962. Chemiluminescence and oxidation. *Nature*, 194, N 4835, 1276.

275. Veldstra H. 1956. Synergism and Potentiation with Special Reference to the Combination of Structural analogues. *Pharmacol. Reviews*, v. 3, 339-389.

276. Walker C.R. 1961. Herbicide toxicity and ecology in Missouri fish ponds with reference to aquatic weed control. *Proc. Nat. Conf. Weeds Contr. (NWCC)*.

277. Walker C.R. 1965. Dieron, Fenuron, Monuron, Neburon and TSA Mixtures as Aquatic Herbicides in fish Habitats, *Weeds*, v.13, 4, 297-301.

278. Walker C.R. 1963. Toxicological effects of herbicides on the environment. *Proc. 8-th Air and water Pollution conf.*

279. White E.H., Zafirion O., Matsuo K. 1965. Chemiluminescence in liquid solutions. In: "Symposium on Chemiluminescence" Durham North Carolina 31 March-2 April, p.315.

280. White E.H. 1961. The Chemiluminescence of Luminol
In. "A Symposium of Light and Life" Baltimore, 183-200.

281. Whitehouse M.W. 1964. Uncoupling of oxidative phosphorylation by some arylacetic acids. Nature, 201, 629.

282. Wubster D.E., Shapiro P.H. 1963. Investigation of the mechanism of urea-induced hemolysis. I.Pharm. Sci., 52, 33-38.

283. Zweig G., Hitt, J.E., Mc.Mahon R., 1968. Effect of certain quinones, diguac and diuron on chlorella pyrenoidosa. Weed, Sci. 16 (1), 69-73.