

Профилактическая токсикология и гигиеническое нормирование

© ГРЫНЧАК В.А., СЫЧИК С.И., 2018

УДК 613.632:66.063.72:615.9

Грынчак В.А., Сычик С.И.

ОСОБЕННОСТИ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПЛАСТИФИКАТОРА ДИИЗОНОНИЛФТАЛАТА НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены», Минздрава Республики Беларусь, 220012, Минск, Республика Беларусь

Введение. Целью исследования явилось определение особенностей биологического действия диизонилфталата, нового пластификатора для полимерных изделий.

Материал и методы. Токсические свойства соединения изучены при различных путях поступления в организм лабораторных животных, установлены местное раздражающее, кумулятивное и кожно-резорбтивное действия, выявлена потенциальная способность соединения к индукции отдаленных эффектов на экспериментальных моделях *in vivo/in vitro*.

Результаты и обсуждение. Полученные данные свидетельствуют, что диизонилфталат не представляет опасности острых отравлений при внутрижелудочном, внутрибрюшинном, эпилитанном и ингаляционном путях воздействия, не способен к индукции признаков раздражения кожных покровов и слизистых оболочек, не является алергоопасным. При субхроническом внутрижелудочном введении диизонилфталата в дозах от 10 000 до 100 мг/кг выявлена дозовая зависимость токсического действия и его способность вызывать хронические отравления политропного действия в виде нарушения картины периферической крови, обмена кальция и фосфора и изменений функционального состояния внутренних органов. При исследовании репродуктивной токсичности на фоне введения препарата в дозе 10 000 мг/кг установлено увеличение общей постимплантационной, эмбриональной и постнатальной смертности. Внутрижелудочное введение диизонилфталата в указанной дозе самкам экспериментальных животных в период беременности инициировало формирование множественных (сочетанных) внешних и внутренних пороков развития эмбрионов, которые носили единичный характер при снижении вводимой дозы до 100 мг/кг. Изменений состояния генеративной функции самцов не установлено. При изучении мутагенной токсичности в тесте Эймса установлено, что воздействие соединения не приводит к увеличению числа колоний ревертантов, что указывает на отсутствие способности диизонилфталата индуцировать точечные мутации.

Заключение. Результаты исследований показали, что необходимо дальнейшее изучение токсического действия диизонилфталата при хроническом воздействии и тестах *in vitro*.

Ключевые слова: диизонилфталат; однократное воздействие; субхроническая токсичность; репродуктивная токсичность; мутагенность.

Для цитирования: Грынчак В.А., Сычик С.И. Особенности токсического действия пластификатора диизонилфталата на экспериментальных моделях. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(5): 474-477. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-5-474-477>

Для корреспонденции: Грынчак Виталий Александрович, аспирант, мл. науч. сотр. лаб. профилактической и экологической токсикологии Республиканского унитарного предприятия «НПЦГ», 220012, Минск, Республика Беларусь. E-mail: grinchakva@gmail.com

Grynchak V.A., Sychik S.I.

PECULIARITIES OF THE TOXIC EFFECT OF DIISONONYL PHTHALATE PLASTICIZER PHTHALATE ON EXPERIMENTAL MODELS

Scientific-Practical Center of Hygiene, Minsk, 220012, Belarus

Introduction. The purpose of the study was to determine the characteristics of the biological effect of diisononyl phthalate, a new plasticizer for polymer products.

Material and methods. Toxic properties of the compound have been studied in various ways of its entering in the organism of laboratory animals, local irritating, cumulative and skin-resorptive actions have been established, the potential ability of the compound to induce remote effects in experimental models *in vivo/in vitro* has been revealed.

Results and discussion. The obtained data show diisononyl phthalate do not pose a risk of the acute poisoning under intragastric, intraperitoneal, epicutaneous and inhalation modes of exposure, being incapable of inducing signs of the irritation of the skin and mucous membranes, is not allergic. With subchronic intragastric administration of diisononyl phthalate in doses from 10,000 to 100 mg/kg, the dose dependence of toxic effect and its ability to cause chronic polytropic poisoning of the action in the form of disturbance of the pattern of peripheral blood, calcium and phosphorus metabolism and changes in the functional state of internal organs are revealed. In the study of the reproductive toxicity against the background of the administration of the drug at a dose of 10,000 mg/kg, an increase in total postimplantation, embryonic and the postnatal mortality rate was established. Intragastric administration of diisononyl phthalate at the mentioned dose to female animals during pregnancy triggered the formation of multiple (combined), external and internal malformations of embryos that were single in response to a reduced dose of up to 100 mg/kg. Changes in the state of the reproductive function of males have not been established. In the study of

mutagenic toxicity in the Ames test, the effect of the compound has not been established to lead to an increase in the number of revertant colonies, which indicates the lack of ability of diisononyl phthalate to induce point mutations.

Conclusion. *The results of the studies showed that further study of the toxic effect of diisononylphthalate in chronic exposure and in vitro tests is necessary.*

Key words: *diisononyl phthalate; single exposure; subchronic toxicity; reproductive toxicity; mutagenicity.*

For citation: Grynchak V.A., Sychik S.I. Peculiarities of the toxic effect of diisononyl phthalate plasticizer phthalate on experimental models. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2018; 97(5): 474-477. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-5-474-477>

For correspondence: Vitaly A. Grynchak, MD, postgraduate student of the Scientific Practical Center of Hygiene, Minsk, 220012, Belarus, E-mail: grinchakva@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received: 06 December 2017

Accepted: 24 April 2018

Введение

При получении полимерной продукции различного назначения (бытовая техника, изделия медицинского назначения, игрушки для детей, упаковка для пищевых продуктов и т. д.) производителями широко используются пластификаторы на основе сложных эфиров фталевой кислоты – фталаты. Известно, что фталаты оказывают негативное воздействие на эндокринную и нервную системы, обладают способностью индуцировать ряд отдаленных эффектов, включая репродуктивные и канцерогенные.

Наиболее перспективным пластификатором признано новое соединение – диизононилфталат (ДИНФ), химические свойства которого позволяют отказаться от применяемых дибутилфталата и диоктилфталата. Для безопасного обращения продукции медицинского назначения, изготовленной с применением нового пластификатора, необходимо проведение токсиколого-гигиенической оценки ДИНФ с обоснованием гигиенического норматива допустимого количества его миграции [1, 2].

Целью данного исследования является определение параметров острой токсичности изучаемого фталата при различных путях поступления в организм лабораторных животных, установление местного раздражающего, кумулятивного и кожно-резорбтивного действия, а также выявление потенциальной способности соединения к индукции отдаленных токсических эффектов на экспериментальных моделях *in vivo/in vitro*.

Материал и методы

Экспериментальные исследования проведены на 110 нелинейных белых мышах (18–20 г), 232 рандомбредных белых крысах (180–200 г) и 5 белых кроликах породы Шиншилла (4,2–4,5 кг), руководствуясь методическими документами [3, 4].

Объектом послужил диизононилфталат – сложный эфир фталевой кислоты, представляющий собой прозрачную бесцветную маслянистую жидкость без запаха, практически нерастворимую в воде, регистрационный № CAS: 28553-12-0, эмпирическая формула $C_{26}H_{42}O_4$, молекулярный вес 418,62 г/моль, плотность 0,97 г/см³.

Острое отравление моделировали при однократном внутрижелудочном, эпикутанном, ингаляционном и внутрибрюшинном путях поступления ДИНФ в организм самцов и самок белых мышей и крыс [4]. Ингаляционную токсичность фталата изучали методом статической заправки.

Способность соединения к кумуляции устанавливали при внутрижелудочном введении самцам белых крыс ДИНФ в дозах 100, 1000 и 10 000 мг/кг 5 дней в неделю в течение 2-месячного опыта. По окончании субхронического эксперимента у крыс изучали состояние нервной системы по показателям ориентировочно-исследовательской активности в установке «Открытое поле» (ООО

«НПК Открытая Наука», Россия) и величине суммационно-порогового показателя (СПП) по методу С.В. Сперанского [5]. После одномоментной декапитации крыс при аутопсии определены относительные коэффициенты массы (ОКМ) внутренних органов. Для характеристики функционального состояния организма подопытных животных изучали морфофункциональный состав периферической крови (гематологический анализатор Mythic18, Швейцария), определяли биохимические показатели сыворотки крови и мочи (автоматический биохимический анализатор Accent 200, Польша).

Сенсибилизирующую активность фталата изучали в тесте опухания лапы на белых мышах на модели воспроизведения гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Исследование раздражающего действия ДИНФ на слизистые оболочки глаза кроликов и неповрежденные кожные покровы белых крыс проводили в соответствии с Инструкцией № 1.1.11–12–35–2004 [4].

Влияние ДИНФ на репродуктивную функцию белых крыс изучали по методу А.А. Динерман [6]. Наличие аномалий развития внутренних органов эмбрионов определяли с помощью метода сагиттальных срезов, предложенного W. Wilson в модификации [7]. Морфофункциональное состояние гонад самцов подопытных крыс определяли по показателю ОКМ семенников и придатков, функциональные показатели сперматозоидов регистрировали при помощи спермоанализатора БИОЛА АФС-500-2, Россия.

Для оценки мутагенной активности ДИНФ использовали тест Эймса на штаммах *S. typhimurium* TA 97, 98, 100, 102, 1535 в условиях с метаболической активацией и без неё [8].

Результаты исследований обрабатывали общепринятыми методами. Различия между контрольными и опытными группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Обращение с животными соответствовало международным требованиям [9].

Результаты и обсуждение

В острых опытах при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении ДИНФ в максимально возможных дозах самцам и самкам белых мышей и крыс на первые сутки отмечены обильные выделения салыных желез. Животные полностью восстанавливались в течение 14-дневного наблюдения, при этом смертельные эффекты не зарегистрированы. Отсутствие летальных исходов не позволило рассчитать среднесмертельную дозу (LD_{50}). Следовательно, ДИНФ при внутрижелудочном введении подопытным животным относится к малоопасным соединениям ($LD_{50} > 5000$ мг/кг, 4-й класс опасности) в соответствии с ГОСТ 12.1.007–76 [10]. В условиях внутрибрюшинного введения препарат (согласно классификации К.К. Сидорова, 1973 [11]) является относительно безвредным ($LD_{50} > 3000$ мг/кг, 6 класс токсичности). Видовая и половая чувствительность не выявлены.

При изучении токсических свойств при однократном эпикутанном нанесении ДИНФ в дозе 5 000 мг/кг самцам белых крыс на выстриженные участки кожи спины площадью 20 см² проявлений интоксикации и гибели животных в опытных группах не зарегистрировано, что позволяет отнести изучаемое соединение к малоопасным соединениям (4 класс опасности согласно ГОСТ 12.1.007-76 [10]).

Во время проведения статической ингаляционной заправки и в последующие 14 суток наблюдения после воздействия фталата гибель животных и признаки интоксикации не выявлены, что указывает на отсутствие опасности острых отравлений.

При изучении местно-раздражающего действия фталата признаки гиперемии и визуально значимые изменения статуса кожных покровов подопытных животных не выявлены. Суммарная количественная оценка степени индукции эритемы и отёка для контроля и опыта при воздействии ДИНФ составляет по 0 баллов. Следовательно, в условиях, принятых для оценки кожно-раздражающего действия при тестировании на лабораторных животных [4], ДИНФ не способен к индукции выраженных местно-раздражающих свойств.

После введения фталата в нижний конъюнктивальный свод правого глаза кроликов симптомы раздражающего действия на слизистые оболочки глаз не зарегистрированы.

При проведении исследований ДИНФ на модели воспроизведения гиперчувствительности замедленного типа установлено, что величина среднegrupпового показателя ТОЛМ в абсолютных единицах $\times 10^{-2}$ у опытных животных составила 3,0 (1,0–5,0) мм и статистически значимо не отличалась от контроля – 2,3 (0,6–5,0) мм, что указывает на отсутствие сенсibilизирующей способности препарата.

На протяжении субхронического опыта при внутрижелудочном введении ДИНФ белым крысам в дозах 100, 1 000 и 10 000 мг/кг внешние проявления интоксикации и гибель животных не зарегистрированы, что позволяет отнести изучаемое соединение к веществам со слабой кумулятивной активностью [12]. Однако о наличии функциональной кумуляции препарата указывают изменения ряда клинико-биохимических показателей. Так, воздействие ДИНФ в дозах 100 и 1000 мг/кг приводило к изменению двигательной активности подопытных животных в виде достоверного увеличения показателя «проход по секторам» в 1,8 и 2,0 раза, соответственно, при этом максимальная испытанная доза 10 000 мг/кг приводила к обратному эффекту – снижению двигательной активности в 2,9 раза ($p < 0,05$). Величины остальных учитываемых показателей поведения – «норковый рефлекс», «вертикальная стойка», «груминг» и СПП не отличались от контрольных значений.

При субхроническом внутрижелудочном введении ДИНФ в дозе 10 000 мг/кг выявлено увеличение ОКМ печени в 1,6 раза, почек – в 1,2 раза, селезенки – в 1,4 раза по отношению к контролю ($p < 0,05$). При снижении вводимой дозы изучаемого соединения до 1000 мг/кг установлено лишь увеличение ОКМ печени в 1,2 раза ($p < 0,05$). Уровень воздействия, равный 100 мг/кг, не вызывал сдвигов массовых коэффициентов внутренних органов.

При анализе гематологических показателей крови белых крыс, подвергнутых субхроническому воздействию ДИНФ в дозе 10 000 мг/кг, выявлено достоверное снижение общего количества эритроцитов на 11,4%, концентрации гемоглобина на 9,3%, гематокрита на 11,4%, среднего объёма эритроцита на 9,9%, среднего содержания гемоглобина на 6,5% и средней концентрации гемоглобина в эритроците на 3,5%, что указывает на развитие признаков анемии. При снижении вводимых доз соединения до 1000 и 100 мг/кг наблюдались признаки снижения синтеза гемоглобина в виде гипохромии – уменьшения среднего содер-

жания гемоглобина на 5,5–6,5% и средней концентрации его в эритроците на 2,3–2,8% ($p < 0,05$) соответственно. Указанные изменения сопровождались достоверным снижением содержания железа в сыворотке крови в 2,9 раза при 10 000 мг/кг и 2,4 раза при 1000 мг/кг. Лейкоцитарные показатели у подопытных крыс при воздействии всех изучаемых доз ДИНФ соответствовали таковым в контрольной группе. Обращает внимание, что при максимальной дозе общее количество тромбоцитов увеличилось в 1,3 раза, при этом средний их объём, который является качественной характеристикой, возрос на 5,9% ($p < 0,05$). Синхронное увеличение содержания тромбоцитов и их объёма, связанного с равным выходом зрелых и незрелых форм, указывает на токсическое действие препарата.

При изучении биохимических показателей сыворотки крови белых крыс вне зависимости от уровня воздействия (100, 1000 и 10 000 мг/кг) ДИНФ установлено достоверное увеличение активности гамма-глутамилтранспептидазы на 21,4, 14,3, 21,4%, соответственно, и мочевой кислоты в 1,4–1,5 раза. В дозе 10 000 мг/кг ДИНФ обнаружено достоверное увеличение в 1,4 раза активности α -амилазы – фермента, характеризующего функцию поджелудочной железы, которая сопровождалась снижением аспартатаминотрансферазы в 1,5 раза. На фоне воздействия фталата в изучаемых дозах целый ряд других биохимических показателей (лактатдегидрогеназа, аланинаминотрансфераза, альбумин, креатинин, магний, мочевины, глюкоза, общий белок, билирубин, компоненты комплемента С3 и С4, иммуноглобулины А, G и M, а также показатели липидного обмена) оставались без изменений.

Со стороны функциональных показателей состояния мочевыводящей системы у животных всех опытных групп отмечалось достоверное увеличение суточного диуреза в 1,9–3,9 раза ($p < 0,05$), при этом *pH*, клиренс креатинина, содержание железа в моче достоверно не отличались от контрольной группы. При оценке состояния азотистого обмена при всех уровнях воздействия в моче обнаружено снижение содержания мочевины в 1,5–2,1 раза ($p < 0,05$), мочевой кислоты в 2,4–4,2 раза и увеличение клиренса мочевины в 1,9 раза ($p < 0,05$), креатинина в 2,0 – 3,1 раза ($p < 0,05$). Статистическая обработка показателей минерального обмена подопытных крыс выявила разнонаправленные сдвиги уровней содержания кальция в моче: при массивном воздействии 10 000 мг/кг наблюдали уменьшение экскреции данного элемента в 2,9 раза ($p < 0,05$), а при воздействии в дозах 100 и 1000 мг/кг ДИНФ регистрировали повышенное его выведение из организма с мочой в 8,6 и 5,2 раза ($p < 0,05$) соответственно. Указанные изменения сочетались со снижением содержания фосфора, основного микроэлемента, в 9,1–2,3 раза.

В результате эмбриональной смертности, которая при дозе 10 000 мг/кг достигла 54,6% ($p < 0,05$), число живых эмбрионов и среднее число особей в помёте на одну самку достоверно снизилось в 1,8 и 1,4 раза соответственно по сравнению с контролем. Кроме того, наблюдалось увеличение постимплантационной смертности на 29% по сравнению с контролем ($p < 0,05$). В опытных группах при уровнях воздействия 10, 100 и 1000 мг/кг изучаемые показатели оставались в пределах контрольных значений.

Обращает внимание наличие аномалий развития эмбрионов, которое носило дозозависимую зависимость от 49,2% при введении 10 000 мг/кг до отсутствия пороков при 10 мг/кг. Доза 10 000 мг/кг исследуемого соединения вызывала множественные (сочетанные) пороки развития, такие как: отсутствие межжелудочковой перегородки (20%), эвентрация кишечника и/или печени (15,4%), микрофтальмия (12,3%), анэнцефалия (9,2%), гидроцефалия (9,2%), акрония (6,2%), энцефалоцеле (6,2%), микрогнатия (4,6%)

и гипоплазия нижней доли легкого (3,1%). При меньших дозах наблюдалась лишь микрофтальмия, отсутствие межжелудочковой перегородки и эквентрация кишечника и/или печени. Полученные результаты свидетельствуют о проявлении тератогенного действия ДИНФ на плод.

Наблюдения за процессом постнатального развития крысят проводили, начиная с дня рождения крысят до их 60-дневного возраста. Установлено, что постнатальная смертность при уровне воздействия ДИНФ 10 000 мг/кг достоверно увеличилась на 22,7% по сравнению с контролем. По параметрам физического развития (масса и длина тела) крысят самок опытных групп, получавших фталат, не отличались от контрольных.

При изучении показателей состояния генеративной функции потомства (самцы крыс, получавших ДИНФ на протяжении беременности) не зарегистрировано достоверных отклонений ОКМ семенников и придатков, функциональных показателей сперматозоидов как и у самцов при 2-месячном воздействии ДИНФ в дозах 100, 1000 и 10 000 мг/кг.

При изучении генотоксических свойств с применением тест-штаммов *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 97 и TA 102 установлено, что исследуемое соединение в концентрациях 0,3, 0,6, 1,3, 2,5, 5,0 мг/мл не вызывает достоверного увеличения числа колоний ревертантов по сравнению с отрицательным контролем в тесте Эймса без метаболической активации и с полной метаболической активацией и не обладает бактериотоксическим и бактериостатическим действиями на микроорганизмы.

Заключение

ДИНФ, новый пластификатор для полимерных изделий, не представляет опасности острого отравления при различных способах поступления в организм, не обладает раздражающим действием при однократном контакте с неповрежденными кожными покровами и слизистыми оболочками глаз. В стандартных условиях моделирования и формирования сенсбилизации у белых мышей не вызывал формирование аллергических реакций.

В условиях 60-дневного внутрижелудочного введения ДИНФ в дозах 100, 1000 и 10 000 мг/кг отсутствие смертельных эффектов свидетельствует о низкой кумулятивной активности соединения. Однако выявлена дозовая зависимость токсического действия ДИНФ и его способность вызывать хронические отравления политропного характера действия. Установлены признаки железodefицитной анемии, тромбоцитоза с наличием молодых незрелых форм на фоне увеличения массы селезенки.

Возможно, что гипокальциемия при высоких дозах ДИНФ (10 000 и 1000 мг/кг) связана с гипофункцией паращитовидных желёз и снижением всасывания кальция в кишечнике. Нарушение обмена кальция сопровождается изменением фосфорного гомеостаза – увеличением содержания в крови и снижением его экскреции с мочой. Состояние мочевыделительной системы подопытных крыс, подвергшихся субхронической загрузке ДИНФ, в целом характеризуется снижением уровней метаболитов на фоне увеличения суточного диуреза и клиренса мочевины при уровне воздействия 10 000 мг/кг.

При исследовании репродуктивной токсичности ДИНФ установлена дозовая зависимость в виде увеличения общей постимплантационной, эмбриональной и постнатальной смертности в дозе 10 000 мг/кг, которые не наблюдались при снижении вводимых доз. Наличие множественных (сочетанных) пороков развития эмбрионов выявлено при максимальной дозе, единичные – при дозах 1000 и 100 мг/кг и отсутствие пороков развития при 10 мг/кг. Генеративной функции самцов при всех уровнях воздействия нарушений не установлено.

При изучении мутагенной токсичности в тесте Эймса установлено, что воздействие фталата не приводит к увеличению числа колоний ревертантов, следовательно, ДИНФ не обладает способностью индуцировать точечные мутации.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.
Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература (см. References пп. 7–9)

1. Грынчак В.А., Сычик С.И., Актуальные проблемы безопасного обращения диизононил фталата. *Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем.* 2016; 11 (2): 36–46.
2. Грынчак В.А., Актуальность токсикологической оценки диизононил фталата как химического вещества нарушающего работу эндокринной системы. *Сборник материалов школы молодых ученых «Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний».* М.; 2016; 1: 66–71.
3. Бабич П.Н., Чубенко А.В., Лапач С.Н., Жминько П.Г., Вычисление коэффициента кумуляции с использованием современных информационных технологий. *Современные проблемы токсикологии.* 2004; 2: 53–60.
4. Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ: инструкция № 1.1.11–12–35–2004; утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 14.12.2004. Минск, 2004: 43.
5. Галиева М.А., Нурпейсов Т.Т., Жумабекова Б.К., Курмангалиева Д.С., Жанасова М.М. Оценка эффективности специализированного питания на физиологические показатели при подостром воздействии аэрозолем резиנותехнического производства. *Вестник КазНМУ.* 2013; 5 (1): 72–4.
6. Белецкая Э.Н., Онул Н.М. Влияние цинка на репродуктивную функцию экспериментальных животных. *Микроэлементы в медицине.* 2014; 15 (2): 22–8.
10. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности: ГОСТ 12.1.007-76. Введ. 01.01.1977. Минск: БелГИСС, 2008: 8.
11. Березовская И.В., Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения. *Химико-фармацевтический журнал.* 2003; 37 (3): 32–4.
12. Аргунов М.Н., Ветеринарная токсикология с основами экологии. Лань: 2007: 160.

References

1. Grynchak V.A., Sychik S.I., Actual problems of safe handling of diisononyl phthalate. *Proceedings of the Belarusian State University. Series: Physiological, biochemical and molecular basis of functioning of biosystems.* 2016; 11 (2): 36–46. (in Russian)
2. Grynchak V.A., Actuality of toxicological and hygienic assessment of diisononyl phthalate as a chemical substance disrupting the endocrine system. *Collection of materials of the School of Young Scientists "Fundamentals of Healthy Nutrition and Ways to Prevent Alimentary-Dependent Diseases"*, М.; 2016; 1: 66–71. (in Russian)
3. Babich P.N., Chubenko A.V., Lapach S.N., Zhminko P.G., Calculation of the cumulation coefficient using modern information technologies. *Modern problems of toxicology.* 2004; 2: 53–60. (in Russian)
4. Requirements for the formulation of experimental studies for the primary toxicological assessment and hygienic regulation of substances: Instruction No. 1.1.11-12-35-2004; approved. Ministry of Health Respubl. Belarus on 14.12.2004. Minsk; 2004: 43. (in Russian)
5. Galieva M.A., Nurpeisov T.T., Zhumabekova B.K., Kurmangalieva D.S., Zhanasova M.M. Evaluation of the efficiency of specialized nutrition for physiological parameters in subacute aerosol exposure in rubber technical production. *Bulletin of KazNMU.* 2013; 5 (1): 72–4. (in Russian)
6. Beletskaya E.N., Onul N.M. Effect of zinc on the reproductive function of experimental animals. *Microelements in medicine.* 2014; 15 (2): 22–8. (in Russian)
7. Guseva S.I., Avdeeva O.I., Makarova M.N., Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Karachinskaya I.V., Dyachuk G.I. Preclinical study of embryophytotoxic properties and influence on the generative function of a new phytodrug. *Herald of the Mechnikov Saint-Petersburg State Medical Academy.* 2009; 3 (32): 143–9.
8. OECD guideline for testing of chemicals 471. Bacterial Reverse Mutation Test. (1997). Available at: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948418.pdf> (accessed 8 May 2014).
9. Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of laboratory research resources. National academy press. Washington, D.C. 1996; 1: 128.
10. Harmful substances. Classification and general requirements of safety: ГОСТ 12.1.007-76. - Enter. 01/01/1977. Минск: БелГИСС, 2008: 8. (in Russian)
11. Berезовская И.В., Classification of chemicals by acute toxicity parameters for parenteral administration. *Chemical and pharmaceutical magazine.* 2003; 37 (3): 32–4. (in Russian)
12. Argunov M.N. Veterinary toxicology with the basics of ecology. Lan: 2007; 160. (in Russian)