

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

УДК 574.24: 574.58

ИЗМЕНЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА, ВЫЖИВАЕМОСТИ И МЕТАБОЛИЗМА В ДВУХ ПОКОЛЕНИЯХ *Daphnia magna* В СРЕДЕ С ПИПЕРОНИЛ БУТОКСИДОМ

Н.И. Колесникова¹,
А.О. Морозова¹, Д.В. Ускалова¹,
Е.И. Саранульцева^{1,2}

¹Обнинский институт атомной
энергетики – филиал ФГАО ВПО
НИЯУ МИФИ, 249040, г. Обнинск,
Калужская обл., Российская
Федерация

²ФГАО ВПО Национальный
исследовательский ядерный
университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ),
115409, г. Москва, Российская
Федерация

В работе проанализированы изменения выживаемости, плодовитости и метаболической активности в двух поколениях ракообразных *Daphnia magna* в среде с пиперонил бутоксидом (ПБО) в концентрациях от 50 до 800 мкг/мл в 21-суточном эксперименте в каждом поколении. Нарушение метаболизма оценено МТТ-тестом, традиционно применяемым *in vitro* для анализа цитотоксичности лекарственных препаратов. МТТ-тест интегрально отражает количество активных форм кислорода, инактивацию митохондриальных оксидаз, соотношение живых и мертвых клеток и работу системы антиоксидантных ферментов. Выявлено, что в первом поколении полулетальной для плодовитости дафний является концентрация ПБО 353 мкг/л, для выживаемости – 650 мкг/л. Во втором поколении токсическая концентрация снижается почти в два раза и составляет 194 мкг/л для плодовитости и 200 мкг/л для выживаемости. Обнаружен цитотоксический эффект действия ПБО на дафний.

Ключевые слова: *Daphnia magna*, пиперонил бутоксид, цитотоксичность, выживаемость, плодовитость.

Введение. Пиперонил бутоксид (ПБО) – вещество-синергист пиретроидов инсектицидного действия. Входит в состав более полутора тысяч препаратов, применяемых в сельском хозяйстве, в быту и на производстве. Его используют для уничтожения плодовой мухи и вредителей, а также при хранении зерна. Основным механизмом токсического действия препарата является усиление влияния синтетических пиретроидов на нервную систему насекомых, блокада защитных ферментов насекомых [1]. Водный раствор ПБО быстро разлагается под действием ультра-

фиолетовых лучей, поэтому опасность представляет только острое инсектицидное действие вещества. Лимитирующим критерием вредности соединения для теплокровных животных является его гепатотоксическое действие. Симптомы интоксикации развиваются спустя 20 мин после воздействия препаратом. Интоксикация проявляется в виде нарушения двигательной активности, прострации, появления выделений из глаз. Летальная медиальная доза (ЛД₅₀) при введении в желудочный тракт крыс составляет 4570 мг/кг, для мышей – 2650 мг/кг. Менее чувствительны

Колесникова Наталья Игоревна (Kolesnikova Nataliya Igorevna), студентка 3 курса кафедры биологии Обнинского института атомной энергетики – филиала ФГАО ВПО НИЯУ МИФИ, 249040, г. Обнинск, Калужская обл., Natasha442707245@mail.ru

Морозова Александра Олеговна (Morozova Alexandra Olegovna), студентка 3 курса кафедры биологии Обнинского института атомной энергетики – филиала ФГАО ВПО НИЯУ МИФИ, 249040, г. Обнинск, Калужская обл., Sashkaa95@yandex.ru

Ускалова Дарья Вадимовна (Uskalova Daria Vadimovna), аспирантка 2 года обучения кафедры биологии Обнинского института атомной энергетики – филиала ФГАО ВПО НИЯУ МИФИ, 249040, г. Обнинск, Калужская обл., uskalovad@mail.ru

Саранульцева Елена Игоревна (Saranultseva Elena Igorevna), доктор биологических наук, доцент Обнинского института атомной энергетики – филиала ФГАО ВПО НИЯУ МИФИ, 249040, г. Обнинск, Калужская обл., helen-bio@yandex.ru

к препарату собаки и коты (LD_{50} больше 7900 мг/кг). Коэффициент видовой чувствительности составляет 2,98. Однократно принятая доза 50 мг (0,71 мг/кг) является безопасной для человека [2].

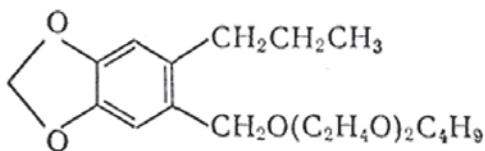
Для безопасного применения любого химиката в окружающей среде используют расчеты его предельно-допустимой концентрации по выживаемости и плодовитости принятых в экотоксикологии тест-организмов. Согласно современным методическим подходам к оценке канцерогенного риска, вещества с негенотоксическим механизмом канцерогенного действия нормируются по принципам общей токсикометрии [3]. Одним из широко используемых в экотоксикологии для нормирования вредных веществ является ветвистоусый рачок *Daphnia magna*. Дафниевый тест входит в международный экотоксикологический стандарт [4].

Целью данной работы был анализ общего токсического действия ПБО, вызывающего изменение выживаемости и плодовитости ракообразных *Daphnia magna* в двух поколениях в модельном эксперименте, а также анализ цитотоксического действия препарата по изменению метаболической активности рачков.

Материалы и методы исследования.

Характеристика вещества

Пиперонил бутоксид – маслянистая жидкость желтого цвета, со слабым специфическим запахом. Химическое название 5-2-(2-бутоксипропилокси)-6-пропил-1,3-бензодиазоксол. Эмпирическая формула $C_{19}H_{30}O_5$, cas 51-03-6



Относительная молекулярная масса 338,43; растворяется в воде 14,3 мг/л (25°C); хорошо растворяется в органических растворителях; Ткип 180°C, давление пара $1 \cdot 10^{-7}$ мм. рт. ст. (25°C), константа Генри $2,3 \cdot 10^{-6}$ Р м³ моль⁻¹ (25°C), удельная плотность 1,060 (20°C); Ко/в $4,51 \cdot 10^4$; водный раствор быстро разлагается на свету [2].

Культивирование *Daphnia magna* и схема эксперимента

Культура *Daphnia magna* Straus успешно культивируется несколько лет в нашей лаборатории по международному протоколу [4]. «Культивирование рачков проводили на водопроводной отстаиванной дважды фильтрованной воде, имеющей следующие характеристики: рН 7,5 – 8,2, O_2 ~10,0 мг/л; жесткость ~ 6,8 мг/л, соотношение Са:Мг 4:1, железа – менее 0,3 мг/л, Мн 0,1 мг/л, хлоридов – до 12 мг/мл, фосфатов – менее 0,05 мг/мл, сульфатов

около 44 – 50 мг/мл, взвешенных веществ – менее 3 мг/мл.»

Для получения синхронизированной культуры половозрелых самок по 5 особей культивировали в лабораторных стаканах со 100 мл воды при режиме освещенности 700 люкс 12 ч/ 12 ч свет/тьма при 20°C (Климатоста, модель R2 Спецкомплектресурс, Россия) и обновления воды дважды в неделю. Рачков кормили ежедневно суспензией зеленых водорослей (*Chlorella vulgaris*) в концентрации 1,87 мг С/л (плотность $4 \cdot 10^5$ кл./мл). Удаляли молодь первых пометов.

В эксперимент было отобрано по 10 новорожденных дафний третьего помета (поколение F₁). Односуточных рачков рассаживали индивидуально в лабораторные стаканы с 50 мл воды, в которой создавали разные концентрации растительного в 96%-ом этиловом спирте ПБО – 0 (контроль), 50, 100, 200, 400 и 800 мкг/л. Исходные концентрации вещества были приготовлены таким образом, чтобы аликвота составила 25 мкл раствора на 1 л воды. В контрольные образцы добавляли спирт в той же аликвоте. Дафний культивировали в режиме освещения 12 ч/ 12 ч свет/тьма при 20°C в климатостате 21 сут. Кормили рачков ежедневно. Воду с веществом меняли через сут, погибших дафний учитывали и удаляли. Новорожденную молодь учитывали и использовали для анализа на цитотоксичность.

Для получения второго поколения (F₂) по 10 односуточных дафний из третьего помета поколения F₁ от трех разных самок рассаживали в лабораторные стаканы с 50 мл воды и создавали концентрации ПБО – 0 (контроль), 50, 100, 200, 400 и 800 мкг/л ПБО как в поколении F₁. Рачков культивировали в климатостате при оптимальных условиях до 21-суточного возраста. Анализировали выживаемость и плодовитость. Новорожденную молодь учитывали и использовали для анализа на цитотоксичность.

МТТ-тест для оценки цитотоксического действия вещества

Для анализа цитотоксичности использовали водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) [5]. МТТ-метод интегрально отражает количество активных форм кислорода, в том числе, короткоживущих супероксид анион-радикалов, инактивацию сукцинатдегидрогеназ и других митохондриальных оксидаз, соотношение живых и мертвых клеток и работу системы антиоксидантных ферментов. Метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ восстанавливать проникающий в клетки бесцветный МТТ с образованием нерастворимого окрашенного формазана. Последующий фотометрический анализ позволяет сопоставить изменение оптической плотности раствора по от-

ношению к контролю с изменением количества жизнеспособных клеток и оценить эффективность цитотоксического действия анализируемого соединения.

МТТ-тест применен в разработанной авторами модификации для анализа цитотоксического эффекта у *D. magna* в опытах *in vivo* [6]. Для проведения анализа 4-суточную новорожденную молодь по 50 особей из каждой опытной и контрольной групп поколения F1 и F2 пересаживали в микропробирки типа «Эппендорф» и проводили МТТ-тест на цитотоксичность. Для этого из микропробирок удаляли воду, добавляли по 100 мкл раствора МТТ и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. По окончании инкубации супернатант осторожно удаляли, добавляли по 200 мкл ДМСО («ЦАМАКС», Россия). Через 10 мин содержимое микропробирок гомогенизировали с помощью пестика. Для получения фоновых проб 50 четырехсуточных дафний из контрольных групп гомогенизировали в 200 мкл ДМСО. МТТ не добавляли. По 200 мкл надосадочной жидкости из фоновых проб помещали в лунки В2.....В6 96-ти луночного планшета. Крайние ряды (А1.....А6 и В1, С1, Е1...) не заполняли во избежание искажения результатов. После растворения гранул формазана супернатант из каждой опытной пробы переносили по 200 мкл в лунки С2.....С6, D2.....D6, Е2.....Е6. Оптическую плотность определяли при длине волны 492 (рабочая) и 630 нм (шумовая). Измерения оптической плотности окрашенных образцов проводили на планшетном иммуноферментном анализаторе «StatFax» 2100 («Awareness Technology», США, VIS-модель).

Статистическая обработка данных

Значимость отличия с контролем количественных признаков оценена тестом Манна-Уитни, качественных признаков – χ^2 -тестом. Расчеты проведены в программе Statistica 12. Коэффициенты корреляции рассчитаны между показателями метаболической активности новорожденного потомства дафний поколений F1 и F2 и показателями изменения плодовитости и выживаемости ракообразных в этих поколениях.

Результаты и их обсуждение. На рисунке 1 А представлены данные по выживаемости дафний к 21-м сут эксперимента в процентах относительно соответствующих контролей для каждого поколения. Видно, что выживаемость дафний, культивируемых при разных кон-

центрациях ПБО, снижается, начиная с 100 мкг/л вещества в каждом поколении. Поскольку дафнии, культивируемые при концентрации ПБО 800 мкг/л, не приносили потомства, во втором поколении эта группа отсутствовала. С применением критерия χ^2 рассчитали, что значимое снижение выживаемости тест-объекта в F1 происходит при концентрации ПБО 800 мкг/л, в поколении F2 – при 400 мкг/л.

На рисунке 1 Б представлены значения оптической плотности, характеризующие изменение метаболической активности в образцах новорожденных дафний от самок из поколений F1 (F1')

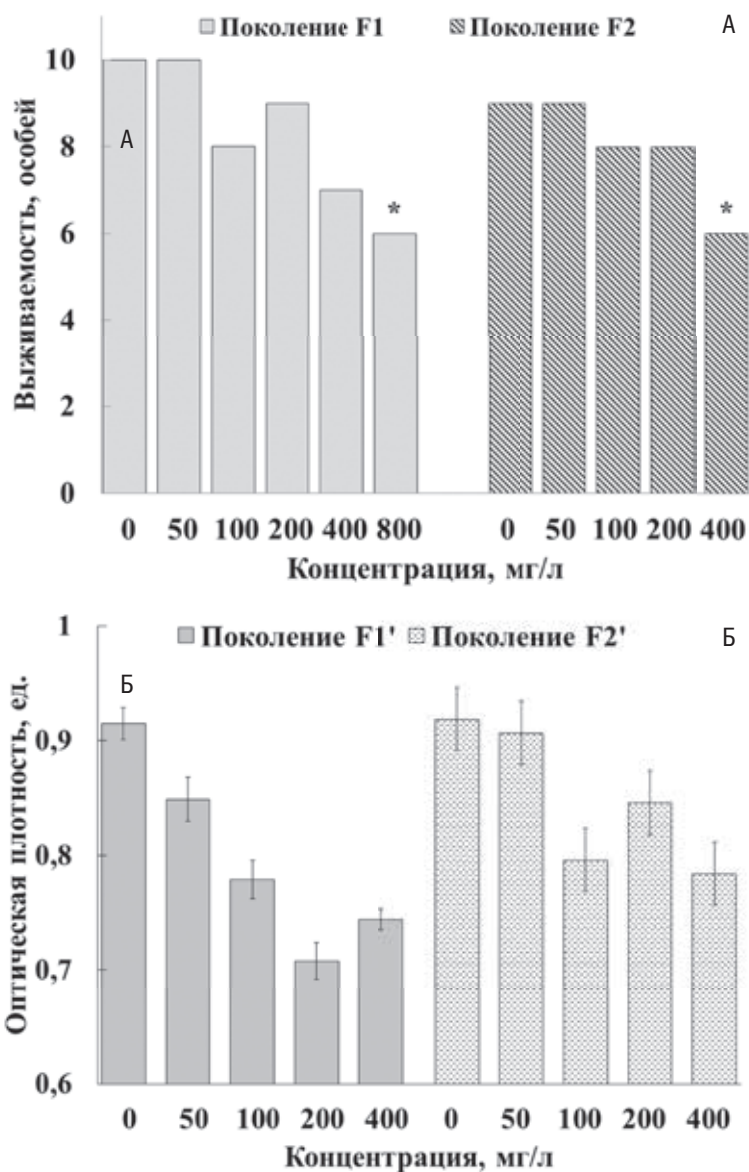


Рис. 1. Изменение (А) выживаемости и (Б) метаболической активности *D. magna* при культивировании в среде с пиперонил бутоксид в двух поколениях к 21-м сут эксперимента.

Таблица 1

Изменение плодовитости *Daphnia magna* в F1 и F2, культивируемых с разной концентрацией пиперонил бутоксида

Концентрация пиперонил бутоксида, мг/л	Новорожденных на дафнию, особей	Пометов на дафнию, штук	Новорожденных на помет, особей
	M ± SEM (p†)		
Поколение F1, N = 10			
0	70,10±1,30 (-)	3,80±0,85 (-)	18,60±0,97 (-)
50	71,70±2,70 (0,2137)	3,90±0,31 (0,7055)	18,38±1,42 (0,9397)
100	69,88±1,55 (0,1907)	3,75±0,57 (0,8589)	18,84±1,89 (0,8242)
200	63,44±1,33 (0,0702)	3,44±0,21 (0,5676)	17,84±1,72 (0,7751)
400	49,43±1,98 (0,0270)	3,57±0,11 (0,6256)	13,70±1,17 (0,0006)
Поколение F2: N=10			
0	70,44±1,33 (-)	3,78±0,31 (-)	18,48±0,32 (-)
50	70,11±1,70 (0,5202)	3,89±0,11 (0,6272)	18,30±1,67 (0,7239)
100	41,62±2,12 (0,0541)	3,00±0,16 (0,0094)	14,03±1,11 (0,0386)
200	37,88±1,35 (0,0012)	2,88±0,52 (0,0021)	13,15±2,07 (0,0141)
400	13,16±1,16 (0,0002)	1,50±0,11 (0,0026)	5,67±0,42 (0,0043)

Примечание. † Вероятность отличия от контроля. Жирным шрифтом – значимые отличия от контроля

и F2 (F2'). С применением теста Манна-Уитни был выявлен значимый токсический эффект у потомства дафний, культивируемых в среде с ПБО в концентрациях 100, 200 и 400 мкг/л. Анализ показал высокий коэффициент корреляции между показателями выживаемости дафний и метаболической активностью ($r = 0,67$ и $0,92$ соответственно для поколений F1 и F2), что указывало на то, что снижение выживаемости может быть связано с цитотоксическим действием вещества на тест-организм.

По результатам анализа плодовитости было установлено, что дафнии, культивируемые в среде с ПБО в концентрации 800 мкг/л, не способны производить жизнеспособное потомство. Плодовитость дафний в поколении F1 значимо снижалась при концентрации ПБО 400 мкг/л, а в поколении F2 при концентрации 100 мкг/л (рис. 2).

Данные по плодовитости в каждом поколении имели высокий коэффициент корреляции с нарушением митохондриальной активности у их потомства, измеренной МТТ-тестом. Коэффициенты корреляции составили $r = 0,58$ и $0,92$ соответственно для первого и второго поколений ракообразных, подвергавшихся воздействию.

Более детальный анализ компонентов общей плодовитости – размера и числа пометов на даф-

нию к концу эксперимента, выявил, что количество пометов значимо не изменяется ни в одной экспериментальной группе из поколения F1, но снижается количество новорождённых на помет начиная с концентрации 400 мкг/л (табл. 1). Снижение плодовитости в поколении F2 было связано как со снижением числа пометов, так и новорожденных на помет, значимых при концентрации ПБО от 100 мкг/л (табл. 1).

Для расчета полулетальной концентрации ЛК₅₀, вызывающей нарушение выживаемости и репродуктивного потенциала дафний, был проведен пробит-анализ [7]. Согласно полученным данным ЛК₅₀ пиперонил бутоксида для плодовитости дафний в поколении F1 составил 353 мкг/л, в поколении F2 – 194 мкг/л, для выживаемости в F1 – 650 мкг/л, в F2 – 200 мкг/л.

Из литературы известно, что в условиях многократного воздействия (21 сут) пиперонил бутоксида в дозах 100, 300 и 1000 мг/кг на кожу кроликов признаков интоксикации и летальных исходов не отмечалось. Наряду с этим наблюдалось проявление местного действия в виде эритемы на кожных покровах при воздействии в дозе 1000 мг/кг. При пероральном поступлении пиперонил бутоксида в организм собак в течение 8 недель в дозах 2000 и 3000 мг/кг наблюда-

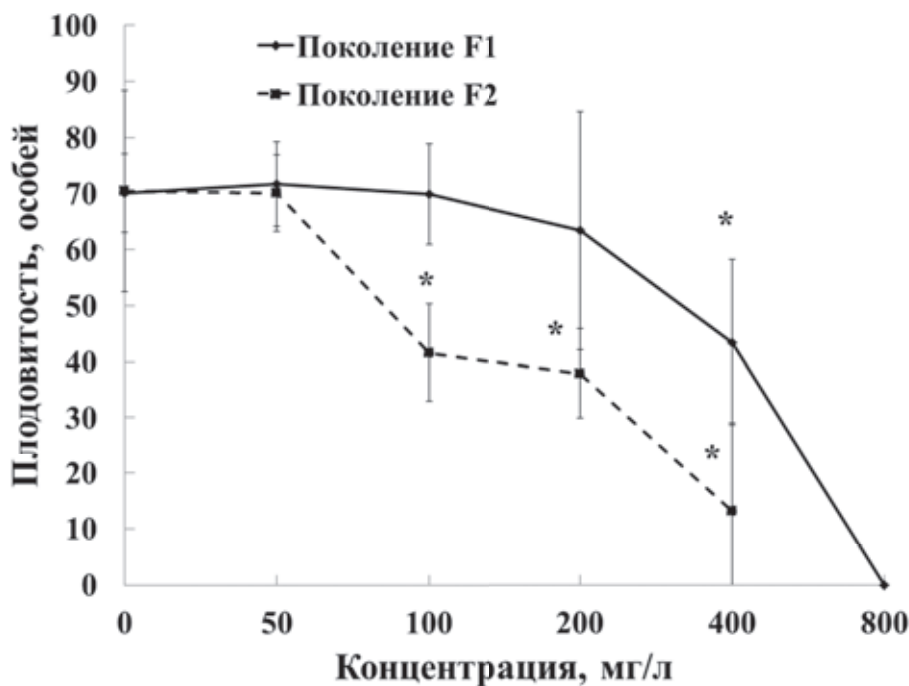


Рис. 2. Изменение плодовитости *D. magna* при культивировании в среде с пиперонил бутоксид в двух поколениях к 21-м сут эксперимента.

лось уменьшение потребления корма, снижение массы тела, повышение активности щелочной фосфатазы и увеличение массы печени [8 – 10]. Анализ литературы показал, что пиперонил бутоксид в дозах 300, 1000 и 5000 ppm (26,7; 89 и 445 мг/кг) действует на репродуктивную функцию крыс линии Sprague Dawley CD и снижает массу тела у животных в двух поколениях. Полулетальная доза для крыс по репродуктивной токсичности составила 1000 ppm (89 мг/кг) [11]. В другом исследовании использовали крыс Crj:Donryu. В корм животным в течение 28 сут добавляли ПБО в концентрациях 5000, 10000 или 20000 ppm (445, 890 и 1780 мг/кг). Концентрации 10000 и 20000 ppm (890 и 1780 мг/кг) вызвали увеличение печени и атрофические изменения в женских половых путях у крыс, что являлось результатом антиэстрогенной активности ПБО [12].

Известно, что механизм негативного действия пиперонил бутоксида основан на токсическом влиянии вещества на ферменты монооксигеназной системы. Оксигеназы – это ферменты, которые катализируют включение кислорода в молекулу субстрата. Они участвуют в синтезе и деградации многих типов метаболитов, входят в состав мультиферментных комплексов, встроенных в мембрану. Известно, что уровень активных форм кислорода может зависеть от функционирования изоформ цитохрома P450 и уровня экспрессии защитных ферментов: каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. Например, показано, что ПБО в концентрации 500 мкг/л

вызывает оксидативный стресс, воздействуя на цитохром P450 в головном мозге тилэпии *Oreochromis niloticus* [13]. В другой работе обнаружено, что ПБО при воздействии на комара *Aedes albopictus*, находящегося в личиночной стадии жизненного цикла, индуцирует экспрессию гена CYP6N28 и ингибирует CYP6P15 и CYP6Y7 [14]. Примененный в нашем эксперименте МТТ-анализ позволил интегрально оценить цитотоксический эффект ПБО, суммарно отразив количество образующихся активных форм кислорода, инактивации сукцинатдегидрогеназ и других митохондриальных оксигеназ, соотношение живых и мертвых клеток и работу системы антиоксидантных ферментов. Поскольку полученные нами данные по выживаемости и плодовитости ракообразных *D. magna* коррелируют с данными по нарушению метаболической активности, можно предположить, что снижение демографических показателей у рачков связано с цитотоксическим эффектом ПБО, нарушающим активность ферментов оксигеназной системы.

Выводы: 1. Пиперонил бутоксид вызывает цитотоксический эффект, что является одной из возможных причин снижения выживаемости и плодовитости ветвистоусого рачка *Daphnia magna*.

2. Токсическая концентрация вещества во втором поколении снижалась более, чем в два раза по сравнению с первым, что может свидетельствовать о повышении чувствительности рачков во втором поколении».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рьльников В.А., Рьльников В.А., Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Яковлев А.А., Бабич Н.В., Слудский А.А., Тарасов М.А., Тошигин Ю.В., Кадиров А.Ф.А. Управление численностью проблемных биологических видов: Учебное пособие / Под ред. В.А. Рьльников. – М.: Институт пест-менеджмента, 2011. Т. 2 – 169с.
2. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS). Comprehensive guide to the RTECS. Doris V. Sweet Ed. U.S. Department of health and human services, 1997. Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health Cincinnati, Ohio 45226.
3. Онищенко Г.Г., Новиков С.М., Рахманин Ю.А., Авалиани С.Л., Буштуева К.А. Основы оценки риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду / Под ред. Г.Г. Онищенко и Ю.А. Рахманина. – М.: ГУ НИИ ЭЧигОС им. А.Н.Сысина РАМН, 2002 – 408 с.
4. Organisation for Economic Co-operation and Development, 2012. Test No. 211. *Daphnia magna* Reproduction Test. OECD Guideline for Testing of Chemicals, Paris, France. doi: 10.1787/20745761.
5. Cancer Cell Culture. Methods and Protocols. / Ed.I.A. Cree. Second ed. – Springer New York Dordrecht Heidelberg London: Human Press, 2011. P. 237–244.
6. Сарapultseva E.I. Прямые и отдаленные эффекты радиационного облучения простейших и ракообразных. Дис. д-ра биол. наук. – Обнинск: ИАТЭ НИЯУ МИФИ, 2015. – 218 с.
7. РД 64-085-89. МУ «Методические основы биотестирования и определения генетической опасности отходов, поступающих в окружающую среду». – М.: Мин-во медицинской промышленности, 1990.
8. Vardavas AI, Fragkiadaki P, Alegakis AK, Kouretas D, Goutzourelas N, Tsiaoussis J, Tsitsimpikou C, Stivaktakis PD, Carvalho F, Tsatsakis AM. Downgrading the systemic condition of rabbits after long term exposure to cypermethrin and piperonyl butoxide // *Life Sci.*, 2016. 145. P. 114-120. doi: 10.1016/j.lfs.2015.12.026.
9. Cox C. Piperonyl Butoxide // *Journal of pesticide reform*, 2002. V. 22, NO. 2. P. 12–20.
10. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification: 2009. IPCS. WHO Press, Geneva, 2010.
11. U.S. Dept. of Agriculture. Agricultural Marketing Service. Science and Technology Division. 2001. Pesticide data program: Annual summary calendar year 2000. Appendix E. p.39.
12. Hayashi S, Taketa Y, Inoue K, Takahashi M, Matsuo S, Irie K, Watanabe G, Yoshida M. Effects of piperonyl butoxide on the female reproductive tract in rats // *J Toxicol Sci.*, 2013. 38 (6). P. 891-902.
13. Üner N, Piner P, Temiz Ö. Piperonyl butoxide increases oxidative toxicity of fenthion in the brain of *Oreochromis niloticus* // *J Biochem Mol Toxicol.*, 2014. 28 (2). P. 84-90. doi: 10.1002/jbt.21539.
14. Chan HH, Wajidi MF, Zairi J. Molecular cloning and xenobiotic induction of seven novel cytochrome P450 monooxygenases in *Aedes albopictus* // *J Insect Sci.*, 2014. 14:163. doi: 10.1093/jisesa/ieu025.

REFERENCES:

1. Ryl'nikov V.A. Upravlenie chislennost'yu problemnykh vidov: uchebnoe posobie [Numerical management of problematic species: Tutorial] / V.A. Ryl'nicov, A.N. Matrosov, A.A. Kuznetsov, A.A. Yakovlev, N.B. Babich, A.A. Sludski, M.A. Tarasov, Ю.В. Toshigin, А.Ф.А. Kadirov. – Moskva: Institut pest-menedzmenta, 2012. V. 2. 169 p. (in Russian).
2. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS). Comprehensive guide to the RTECS. Doris V. Sweet Ed. U.S. Department of health and human services, 1997. Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health Cincinnati, Ohio 45226.
3. Onishenko G.G. Osnova ocenki riska dlya zdoroviya naseleniya pri vozdeystvii himicheskikh veshstv, zagryaznyayushnih sredu [Base on risk assessment to human health when exposed to environmental chemicals pollution] / G.G. Onishenko and U.A. Rakhmanin, ed. / G.G. Onishenko, S.M. Novikov, U.A. Rakhmanin, S.L. Avaliani, K.A. Bushtaev. – Moscow: Scientific-Research Institute of Human Ecology and Environmental Hygiene them. AN Sysina, 2002 – 408 p. (in Russian).
4. Organisation for Economic Co-operation and Development, 2012. Test No. 211. *Daphnia magna* Reproduction Test. OECD Guideline for Testing of Chemicals, Paris, France. doi: 10.1787/20745761.
5. Cancer Cell Culture. Methods and Protocols. / I.A. Cree, ed. – Springer New York Dordrecht Heidelberg London: Human Press, 2011. P. 237–244.
6. Sarapultseva E.I. Pryamye i otdalennyye efekty radiacionnogo oblucheniya prosteishih i rakoobraznyh. Dissertatsiya doktora biologicheskikh nauk [Direct and long-term effects of radiation exposure in protozoa and crustaceans. Dr. of Sciences dissertation]. – Obninsk: Institute of Nuclear Power Engineering NRNU MEPhI, 2015. – 218 p. (in Russian).
7. RD 64-085-89. MU "Metodicheskie osnovy biotestirovaniya i opredeleniya genicheskoy opasnosti othodov, postupayushih v okruzaushuyu sredu" [Methodical bases of biological testing and to determine the genetic dangers of waste going into the environment]. – Moscow: Ministry of Medical Industry, 1990. 56 p. (in Russian).
8. Vardavas AI, Fragkiadaki P, Alegakis AK, Kouretas D, Goutzourelas N, Tsiaoussis J, Tsitsimpikou C, Stivaktakis PD, Carvalho F, Tsatsakis AM. Downgrading the systemic condition of rabbits after long term exposure to cypermethrin and piperonyl butoxide // *Life Sci.*, 2016. 145. P. 114-120. doi: 10.1016/j.lfs.2015.12.026.
9. Cox C. Piperonyl Butoxide // *Journal of pesticide reform*, 2002. V. 22, NO. 2. P. 12–20.
10. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification: 2009. IPCS. WHO Press, Geneva, 2010.
11. U.S. Dept. of Agriculture. Agricultural Marketing Service. Science and Technology Division. 2001. Pesticide data program: Annual summary calendar year 2000. Appendix E. p. 39.
12. Hayashi S, Taketa Y, Inoue K, Takahashi M, Matsuo S, Irie K, Watanabe G, Yoshida M. Effects of piperonyl butoxide on the female reproductive tract in rats // *J Toxicol Sci.*, 2013. 38 (6). P. 891-902.
13. Üner N, Piner P, Temiz Ö. Piperonyl butoxide increases oxidative toxicity of fenthion in the brain of *Oreochromis niloticus* // *J Biochem Mol Toxicol.*, 2014. 28 (2). P. 84-90. doi: 10.1002/jbt.21539.
14. Chan HH, Wajidi MF, Zairi J. Molecular cloning and xenobiotic induction of seven novel cytochrome P450 monooxygenases in *Aedes albopictus* // *J Insect Sci.*, 2014. 14:163. doi: 10.1093/jisesa/ieu025.

N.I. Kolesnikova¹, A.O. Morozova¹, D.V. Uskalova¹, E.I. Sarapultseva^{1,2}

CHANGES IN REPRODUCTIVE POTENTIAL, SURVIVAL AND METABOLIC ACTIVITY IN TWO SUCCESSIVE GENERATIONS OF DAPHNIA MAGNA IN THE PIPERONYL BUTOXIDE MEDIUM

¹Obninsk Institute of Nuclear Power Engineering, 249040 Obninsk, Kaluga region, Russian Federation

² National Research Nuclear University, 115409 Moscow, Russian Federation

Changes in survival, fertility and metabolic activity in two generations of crustacean *Daphnia magna* in the piperonyl butoxide medium (PBO) were analyzed in concentrations of 50 to 800 ug/ml in a 21 day experiment in each generation. Metabolism disorders were evaluated using the MTT-assay traditionally applied in vitro to analyze cytotoxicity of medications. The MTT-assay shows in an integral way the amount of oxygen active forms, inactivation of mitochondrial oxidases, ratio of living and dead cells and function of antioxidant enzymes. It was found out that in the first generation, the PBO concentration of 353 ug/l is semi-lethal to *Daphnia* fertility and to the *Daphnia* survival it is 650 ug/l. In the second generation the toxic concentration is two-fold lower and amounts to 194 ug/l to fertility and to 200 ug/l to survival. It was revealed that PBO poses the cytotoxic effect on *Daphnia*.

Keywords: *Daphnia magna*, piperonyl butoxide, cytotoxicity, survival, fertility.

Переработанный материал поступил в редакцию 22.09.2016 г.