

*Л.М. Шафран**,
*Г.А. Хомич***,
*Е.В. Третьякова**,
*Н.А. Самохина**,
*Ю.В. Нехорошкова**,
*А.М. Третьяков**,
*Е.С. Шитко**

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ПИЩЕВОГО КОНЦЕНТРАТА ПОЛИФЕНОЛОВ ЧЕРНИКИ ПРИ ЭКСПОЗИЦИИ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

*Украинский НИИ медицины транспорта МЗ Украины**

г. Одесса

*ВУЗ Укоопсоюз "Полтавский университет экономики и торговли"****

г. Полтава

Ключевые слова: свинец, кадмий, пищевой концентрат полифенолов черники, профилактическое действие

Key words: lead, cadmium, food concentrate of blueberry polyphenols, preventive action

Резюме. На моделі свинцевої та кадмієвої інтоксикації в субхронічному експерименті встановлений позитивний ефект застосування харчового концентрату поліфенолів чорниці, що сприяє посиленню елімінації важких металів з організму, відновленню балансу про- та антиоксидантних систем, активації окисно-відновлювальних процесів, стабілізації активності протеолітичних ферментів, а також підвищенню адаптаційних можливостей організму за показниками стану симпато-адреналової системи.

Summary. On the model of lead and cadmium intoxication in subchronic experiment the positive effect of dietary concentrate of blueberry polyphenols is found, the preparation has enhanced elimination of heavy metals from the animals organism, restored the balance of pro- and antioxidant systems, activated the processes of oxidation-reduction, stabilized activity of proteolysis enzymes and increased the sympathoadrenal system potential.

Экологическая ситуация в Украине за последние годы характеризуется высоким уровнем загрязнения окружающей среды различными токсикантами, ведущее место среди которых занимают соединения тяжелых металлов (ТМ) [4,16,19]. Этому способствуют выбросы от предприятий по добыче и переработке полезных ископаемых, а также коксохимические, машиностроительные, энергетические предприятия, автомобильный транспорт и др.

По данным ВОЗ и других международных организаций, такие тяжелые металлы, как кадмий и свинец, относятся к глобальным антропогенным загрязнителям окружающей среды [7,21]. Для них характерна высокая токсичность, способность к биокумуляции и медленное выведение из организма. Воздействие ТМ вызывает поражения нервной, сердечно-сосудистой, гепато-ренальной, эндокринной, репродуктивной и других систем. Работы ряда авторов показывают, что хроническая экспозиция тяжелыми металлами приводит к росту уровня свободных радикалов и истощению резервных возможностей системы антиоксидантной защиты, снижению содержания эндогенных витаминов-антиоксидантов в организме [8,10,17]. В связи с этим проблема влияния данных ксенобиотиков на здоровье населения и дальнейшая разработка

новых пищевых добавок для использования в системе профилактических и лечебных мероприятий остается актуальной.

Традиционно для профилактики и лечения металлотоксикозов успешно применяют различные антиоксиданты. Широкое использование в клинической практике получили биологически активные добавки растительного происхождения, в состав которых входят микроэлементы, аминокислоты, витамины, поддерживающие баланс про- и антиоксидантных систем [3,13]. Однако полифенольные комплексы на основе черники (распространенного в нашей стране и доступного для питания населения растения) в системе профилактики и лечения металлопатий до настоящего времени не применялись. Известно [2], что черника способствует повышению уровня глутатиона в организме, который является наиболее важным антиоксидантом, а также содержит большое количество макро- и микроэлементов.

Поэтому целью данного экспериментального исследования явилось изучение биопротекторных свойств черники на фоне моделирования металлотоксикозов, вызванных субхронической экспозицией соединениями свинца и кадмия на организм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные исследования проведены на крысах-самцах массой 250-300 г с учетом национальных требований биоэтики, изложенных в «Загальних етичних принципах експериментів на тваринах» [9], которые согласуются с положениями Европейской конвенции [20]. Животных содержали в условиях вивария на стандартном рационе со свободным доступом к воде и еде согласно существующим требованиям [11].

При планировании и проведении эксперимента животные были разделены на шесть групп: 1-я - контрольная, 2-я - ацетат свинца ($Pb(CH_3COO)_2$), 3-я - хлорид кадмия ($CdCl_2$), 4-я - пищевой концентрат полифенолов черники (ПКПЧ), 5-я - ацетат свинца + ПКПЧ, 6-я - хлорид кадмия + ПКПЧ. Пищевой концентрат полифенолов черники животные получали ежедневно внутрижелудочно с питьевой водой на протяжении 1 месяца, водные растворы солей металлов вводили натошак внутрижелудочно через зонд один раз в неделю (4 раза в месяц) в дозе 1/20 от DL_{50} (по соли).

Содержание ТМ (Pb, Cd) в органах лабораторных животных (печень, почки, головной мозг, двенадцати перстная кишка) определяли атомно-эмиссионным методом с дуговой атомизацией на АЭС Эмас-200 ДСС [5].

По окончании эксперимента проводили исследование общего анализа крови, в сыворотке крови и моче определяли креатинин и белок. В тканях исследованных физиологических систем изучали маркерные показатели энергетического обмена - активность лактатдегидрогеназы (К.Ф.1.1.27-ЛДГ), сукцинатдегидрогеназы (К.Ф.1.3.99.1-СДГ), ферментов антиоксидантной защиты - глутатионредуктазы (К.Ф.1.6.4.2-ГР), глутатионпероксидазы (К.Ф.1.11.1.7-ГП), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (К.Ф.1.1.1.49-Г-6-ФДГ), уровень перекисного окисления липидов (по показателю малонового альдегида (МДА)) [15]. В содержимом 12-перстной кишки (химусе) определяли протеолитическую активность (ПА) трипсина (К.Ф.3.4.4.4. - ТС) модифицированным методом Ансона [14]. Активность ферментов в тканях пересчитывали на количество белка в гомогенате по методу Лоури-Фолина [15].

В тканях надпочечников спектрофлуориметрическим методом измеряли содержание адреналина (А), норадреналина (НА), ДОФА, дофамина (ДА) [12]. Статистическую обработку выполняли методами корреляционного и вариационного анализа с использованием критерия Стьюдента (t) [1]. Изменения считали достоверными при $p < 0,05$. Для расчетов использо-

вали стандартный пакет программного приложения Microsoft® Office Excel 2003 (лицензионный № 74017-640-0000106-57490).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ксенобиотиков на живой организм вызывает нарушения относительной стабильности гомеостаза путем дестабилизации биохимических и физиологических процессов. Ответом на такое воздействие является формирование защитных реакций организма, в основе которых лежат активация и мобилизация многих взаимосвязанных функциональных систем.

Тяжелые металлы, накапливаясь в тканях паренхиматозных органов, могут приводить к изменениям их основных функций, в первую очередь - на клеточном уровне. Поэтому мониторинг содержания ТМ в органах подопытных животных, который был проведен после окончания субхронической экспозиции солями свинца и кадмия (табл.1), оказался важным прогностическим показателем, характеризующим развитие процессов накопления и элиминации ТМ из организма. Исследования показали, что при экспозиции животных ацетатом свинца наибольшее его количество накапливалось в почках и головном мозге: содержание Pb в почках возросло практически в 10 раз, а в головном мозге - более чем в 3 раза по отношению к контролю. Полученные данные подтверждают известное положение о том, что основными органами-мишенями данного металла являются почки и нервная система.

У животных, экспонированных ацетатом свинца и получавших на протяжении эксперимента пищевой концентрат полифенолов черники, содержание Pb в печени было достоверно снижено на 17,1, в почках - на 17,3, в головном мозге - на 65,7% по отношению к группе животных, которым вводили только свинец.

Содержание кадмия (Cd) в группе, экспонированной данным металлом, возросло в печени в 34,6 раза, в почках - более чем в 8 раз, в головном мозге - в 1,2 раза по отношению к контролю. В группе, экспонированной хлоридом кадмия и получавшей ПКПЧ, наблюдалось достоверное снижение содержания кадмия во всех органах по отношению к группе, экспонированной хлоридом кадмия - в печени на 49,2, в почках на 19,3, в головном мозге на 66,7%.

Следует отметить такой факт, что в группе, получавшей только пищевой концентрат полифенолов черники, наблюдалось достоверное снижение содержания кадмия в почках по отношению к контролю на 59,0%. В головном мозге

животных, экспонированных хлоридом кадмия и одновременно получавшей добавку ПКПЧ, также

отмечено снижение Cd на 60,0% по отношению к контрольной группе.

Таблица 1

Содержание тяжелых металлов в паренхиматозных органах подопытных животных после окончания эксперимента, мг/кг ткани (M±m)

Группы животных	Печень		Почки		Головной мозг	
	Pb	Cd	Pb	Cd	Pb	Cd
1. Контроль	0,036± 0,001	0,029± 0,001	0,037± 0,001	0,100± 0,001	0,047± 0,001	0,025± 0,001
2. Ацетат свинца	0,059± 0,002*	0,031± 0,001	0,365± 0,001*	0,026± 0,001*	0,143± 0,001*	0,025± 0,001
3. Хлорид кадмия	0,033± 0,001	1,002± 0,020*	0,039± 0,001	0,810± 0,016*	0,026± 0,001*	0,030± 0,001*
4. ПКПЧ	0,035± 0,001	0,027± 0,001	0,037± 0,001	0,041± 0,001*	0,041± 0,001	0,021± 0,001
5. Ацетат свинца+ПКПЧ	0,049± 0,001**	0,027± 0,001	0,302± 0,006**	0,038± 0,001	0,049± 0,001**	0,012± 0,001
6. Хлорид кадмия+ПКПЧ	0,039± 0,001	0,509± 0,007***	0,034± 0,001	0,655± 0,014***	0,043± 0,001	0,010± 0,001***

Примечания: */ изменения достоверны по отношению к контролю, (p<0,05); **/ изменения достоверны по отношению к группе № 2, (p<0,05); ***/ изменения достоверны по отношению к группе № 3, (p<0,05)

Общий анализ крови у экспериментальных животных показал достоверное повышение гемоглобина в группе животных, экспонированных свинцом и получавших пищевой концентрат полифенолов черники – на 13,2%, а также достоверное снижение количества нейтрофильных сегментоядерных гранулоцитов по сравнению с группой, экспонированной только ацетатом свинца на 46,2%.

Маркерным показателем развития патологии почек является содержание креатинина в сыворотке крови и моче. В группах, экспонированных отдельно ацетатом свинца и хлоридом кадмия, после 4-недельной экспозиции, содержание креатинина в моче было достоверно ниже фоновых значений и результатов в контрольной группе. В крови животных, экспонированных хлоридом кадмия, данный показатель был выше контрольных значений в 2 раза, а при одновременном введении пищевого концентрата полифенолов черники уровень креатинина имел только тенденцию к повышению.

Действие ТМ на организм приводит к развитию стресса, в патогенезе которого закономерно изменяется соотношение аэробного и анаэробного звеньев энергетического обмена. Прежде

де всего, следует отметить активацию процессов анаэробного гликолиза, что подтверждается повышением активности ЛДГ во всех группах, экспонированных данными металлами, особенно в почках – более чем на 60,0 %. Синфазно в почках наблюдается достоверное снижение активности ключевого фермента цикла трикарбонных кислот СДГ – на 9,1-14,0 % по сравнению с контролем. В других органах наблюдалась такая же направленность изменения соотношений анаэробное/аэробное звено углеводного обмена, но выраженность данных процессов была менее значимая.

При профилактическом введении пищевой добавки полифенольного комплекса черники наблюдается стабилизация окислительно-восстановительного потенциала тканей - достоверное снижение активности ЛДГ на 21,8% в почках, экспонированных хлоридом кадмия и получавших концентрат черники, по отношению к группе животных, экспонированных только Cd. Также отмечались изменения показателей аэробного обмена – повышение активности СДГ более чем на 20,0% у крыс, получавших на фоне введения свинца и пищевой концентрат полифенолов черники.

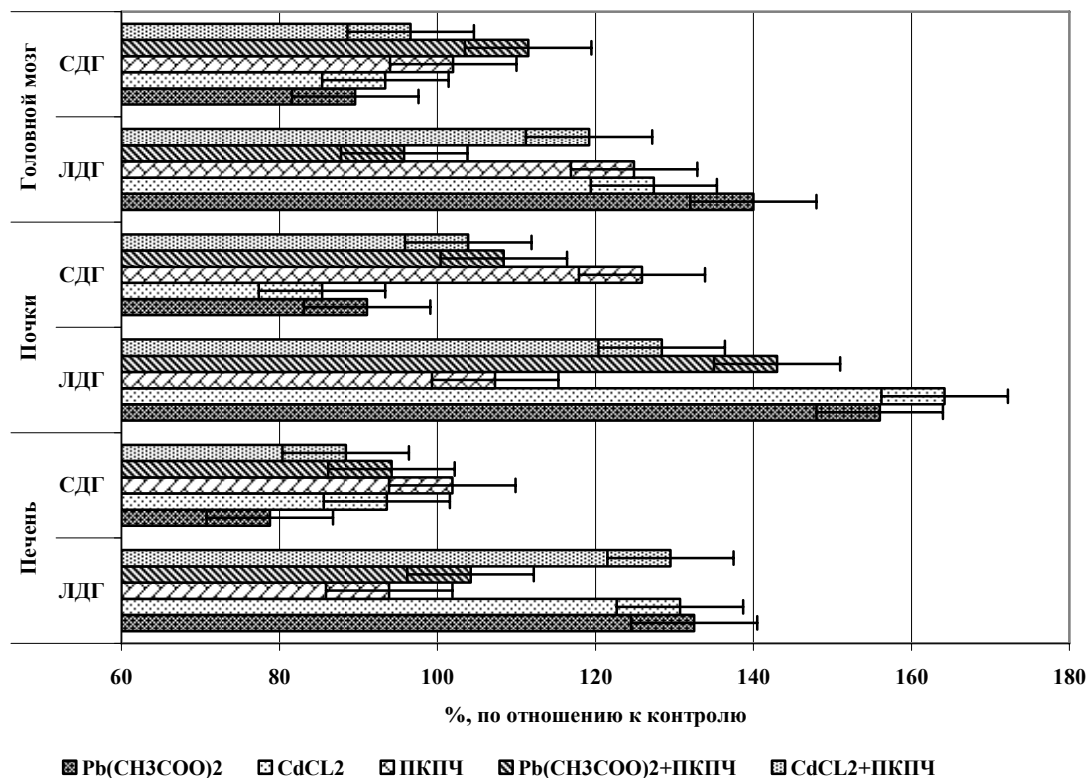


Рис. 1. Изменение активности ферментов энергетического обмена ЛДГ и СДГ в органах подопытных животных при воздействии ТМ и профилактическом применении ПКПЧ (в % по отношению к контролю)

В патогенезе металлопатий важная роль на клеточном уровне принадлежит развитию оксидативного стресса (ОС), который характеризуется тремя основными признаками: генерированием активных форм кислорода, активацией перекисного окисления липидов и подавлением (или истощением) систем антиоксидантной защиты. Среди последних ключевую роль играют ферменты глутатионантиоксидантной системы (ГАОС) – ГП, ГР, Г-6-ФДГ, активность которых отражает состояние адаптационных резервов данной системы. Выявление сдвигов в соотношении интенсивности ПОЛ и активности ферментов ГАОС может иметь важное диагностическое и прогностическое значение, а также служить чувствительными биомаркерами эффективности применения профилактических и корригирующих средств.

Как показали результаты проведенных исследований, в печени животных (рис.2), экспонированных ацетатом свинца, хлоридом кадмия и получавших на протяжении эксперимента пищевой концентрат полифенолов черники, выявлены достоверные отличия в стабилизации показателей ПОЛ и активации ферментов ГАОС – снижение количества МДА на 16,7 - 5,7 %, повышение активности ГП на 50,9 – 40,0 %, ГР на

34,1 – 25,0 % и Г-6-ФДГ на 87,3 - 39,4 % соответственно по сравнению с группой животных, экспонированных только свинцом и кадмием.

В почках животных, на фоне экспозиции ТМ и профилактического введения полифенольного комплекса черники, также выявлены положительные сдвиги, проявившиеся в снижении количества МДА на 19,6%, повышении активности ГП на 22,4, ГР – на 24,3 и Г-6-ФДГ на 27,8% по сравнению с группой, экспонированной кадмием. В группе, экспонированной ацетатом свинца и получавшей ПКПЧ, выраженность изменений носила ту же положительную направленность.

Наиболее значимые достоверные изменения в головном мозге выявлены у животных при экспозиции ацетатом свинца – увеличение количества МДА на 26,3% по отношению к контролю. У крыс, получавших на протяжении эксперимента на фоне введения соли свинца пищевой концентрат полифенолов черники, отмечена стабилизация показателей ПОЛ и достоверная активация ферментов антиоксидантной защиты – снижение количества МДА на 20,9%, повышение активности ГП, ГР и Г-6-ФДГ на 27,7, 43,9, 50,6%, соответственно, по сравнению с группой животных, экспонированных только свинцом.

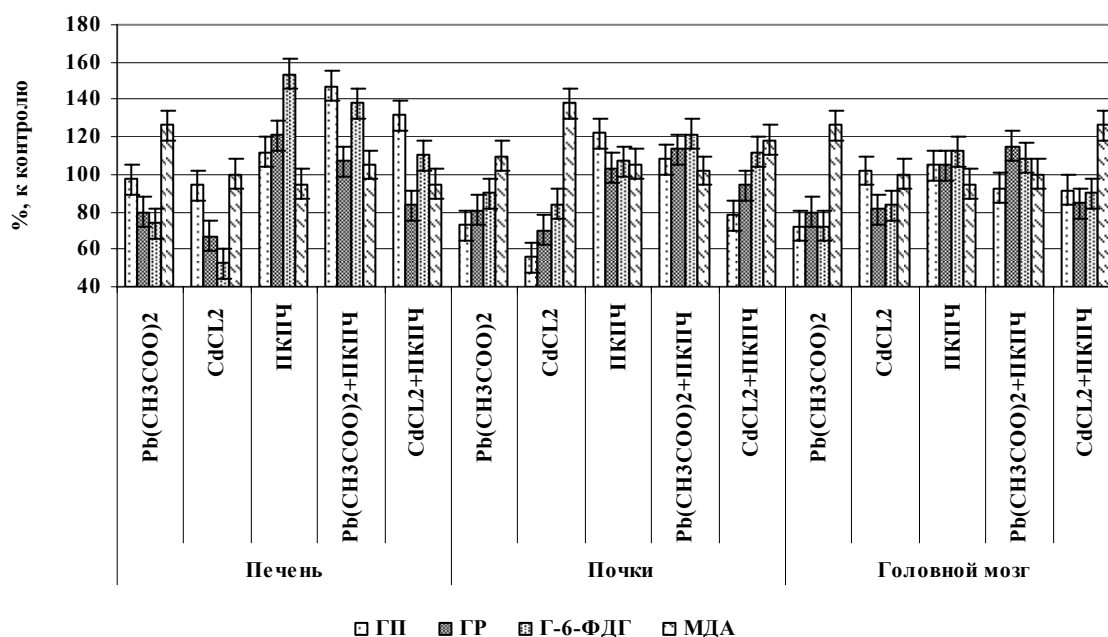


Рис. 2. Изменение активности ферментов ГАОС и содержания МДА в органах подопытных животных при воздействии ТМ и профилактическом применении ПКПЧ (в % по отношению к контролю)

В исследовании про- и антиоксидантной системы в тканях печени, почек, головного мозга при введении животным только пищевого концентрата полифенолов черники отмечена положительная тенденция к активации ГП, ГР и Г-6-ФДГ в тканях по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о позитивном стимулирующем воздействии данной добавки на защитные системы организма.

Реализация токсических эффектов действия тяжелых металлов может проходить и опосредованно, путем активации нейромедиаторных и гормональных систем, ответственных за реализацию стрессорных реакций. В тканях надпочечников у животных, экспонированных ацетатом свинца, выявлено повышение уровня адреналина на 54,9, НА – на 48,4, ДА – на 27,4 %, в группе, экспонированной хлоридом кадмия, данные показатели находились выше контрольных значений на 43,6, 62,1 и 27,4 %, соответственно. Содержание ДОФА в надпочечниках составило 84,5 и 76,7% в соответствующих группах по отношению к контролю. В группах животных, которые на фоне введения тяжелых металлов получали пищевую добавку полифенолов черники, большинство исследованных показателей находилось на уровне контрольных значений, что на фоне достаточного содержания ДОФА в этих группах свидетельствует о положительном эффекте применения данного препарата.

Потенциально любое токсическое вещество в окружающей среде, вероятность поступления которого через желудочно-кишечный тракт (алиментарным путем) очень высока, может негативно влиять на процессы пищеварения. Состояние данных процессов во многом зависит от нормального функционирования пищеварительных ферментов, так как желудочно-кишечный тракт представляет собой физический (защитный) барьер для распространения инородных веществ из просвета кишечника в кровеносную систему.

Трипсин [18] является одним из важнейших ферментов для кишечного пищеварения, поскольку он не только участвует в расщеплении пищевых белков, но и активизирует все образующиеся в поджелудочной железе проферменты (химотрипсин, эластаза, карбоксипептидазы А и В, фосфолипаза). Только немногочисленные данные литературы свидетельствуют о том, что препараты черники используются для сорбции тяжелых металлов [6]. К тому же полифенолы, входящие в состав черники, способны защищать слизистую оболочку желудка и кишечника путем стимуляции выделения необходимой слизи.

Проведенный анализ содержания ТМ в стенках двенадцати перстной кишки показал (табл. 2), что при субхроническом внутрижелудочном введении солей свинца и кадмия уровень Pb в данной ткани был в 3,8 выше контроля, а Cd – выше в 12 раз. Одновременное поступление в

организм кадмия на фоне профилактического введения полифенольного комплекса черники уменьшает всасывание и, соответственно, накопления кадмия в желудочно-кишечном

тракте более чем в 20 раз. В группе, экспонированной свинцом и получавшей ПКПЧ, положительного эффекта не выявлено.

Таблица 2

Содержание Pb и Cd в двенадцати перстной кишке и изменение ПА трипсина в дуоденальном содержимом крыс после эксперимента (M±m)

Группа	Содержание Pb, мг/кг	Содержание Cd, мг/кг	ПА, ед/г (M±m)
1. Контроль	0,058±0,004	0,031±0,001	0,147±0,018
2. Ацетат свинца	0,220±0,018 *	0,023±0,001	0,090±0,005*
3. Хлорид кадмия	0,041±0,003	0,362±0,021*	0,259±0,023*
4. ПКПЧ	0,084±0,007	0,034±0,002	0,200±0,027
5. Ацетат свинца+ПКПЧ	0,119±0,009*	0,015±0,001*	0,115±0,009**
6. Хлорид кадмия+ПКПЧ	0,019±0,001*	0,017±0,001 */***	0,248±0,022*

Примечания: */ изменения достоверны по отношению к контролю, (p<0,05), **/ изменения достоверны по отношению к группе № 2, (p<0,05), ***/ изменения достоверны по отношению к группе № 3, (p<0,05)

Результаты исследования протеолитической активности трипсина, представленные также в табл. 2, показали, что поступление данных ксенобиотиков в организм через желудочно-кишечный тракт разнонаправлено моделируют его активность: ацетат свинца снижает активность данного фермента на 38,8%, а хлорид кадмия – повышает на 76,2%. При употреблении пищевого концентрата полифенолов черники в качестве пищевой добавки с питьевой водой наблюдалась стимуляция протеолитической активности трипсина. Вероятно, взаимосвязь между экспозицией хлорида кадмия и ПА трипсина является сложной, не носит причинно-следственный характер в принятых условиях эксперимента и требует дальнейших исследований.

При введении животным пищевого концентрата полифенолов черники на фоне воздействия ацетата свинца ПА трипсина была достоверно выше на 27,7% по сравнению со второй группой; а на фоне воздействия хлорида кадмия ПА трипсина достоверно не изменилась по отношению к группе, экспонированной кадмием.

Таким образом, полученные результаты экспериментальных исследований позволяют рекомендовать применение пищевого концентрата полифенолов черники в терапевтических дозах для профилактики развития оксидативного стресса, восстановлению баланса про- и антиоксидантных систем в организме, акти-

вации системы окислительно-восстановительных процессов, а также профилактики и лечения отравлений, вызванных поступлением в организм соединений тяжелых металлов.

ВЫВОДЫ

1. Введение животным пищевой добавки полифенолов черники не вызывало у экспериментальных животных негативных функционально-метаболических изменений, которые были бы обусловлены действием данной пищевой добавки.

2. Пищевой концентрат полифенолов черники способствует снижению содержания тяжелых металлов в тканях животных и стенках двенадцати перстной кишки при одновременном поступлении металлов и введении данной пищевой добавки.

3. Результаты проведенных экспериментальных исследований по изучению биопротекторных свойств пищевого концентрата полифенолов черники в терапевтических дозах на модели свинцовой и кадмиевой интоксикации показали позитивный эффект применения данного препарата, выражающийся в активации ферментов антиоксидантной защиты, окислительно-восстановительного метаболизма, выраженном защитном действии на функционирование протеолитических ферментов (трипсина), стимулировании показателей симпато-адреналовой системы.

4. Пищевой концентрат полифенолов черники может быть рекомендован для использования как эффективное средство при интоксикации тяжелыми металлами, а также, вероятно, действия

других негативных факторов химической и физической природы, в патогенезе развития которых важная роль принадлежит оксидативному стрессу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антамонов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных / М.Ю. Антамонов. – К., 2006. – 558 с.
2. Барабой В.А. Биоантиоксиданты / В.А. Барабой. – К.: Книга плюс, 2006. – 462 с.
3. Биологическая профилактика комбинированного действия токсичных металлов и органических веществ / О.Ю. Береснева, Б.А. Кацнельсон, С.В. Брежгина [и др.] // Гигиена и санитария.-2010.-№3.-С.37-40.
4. Білецька Е.М. Гігієнічна характеристика вмісту мікроелементів у питній воді м. Дніпропетровська / Е.М. Білецька, Н.М. Зубик // Актуальні питання гігієни та екологічної безпеки України (другі Марзевські читання): зб. матеріалів. наук.-практ. конф. – К., 2006. – С. 30-31.
5. Большой Д.В. Модификация метода непламенного атомно-абсорбционного определения ртути / Д.В. Большой, Е.Г. Пыхтева // Качество и безопасность. Вопросы методологии и метрологии химического анализа: Материалы науч.-практ. конф. 16-19 ноября 2004 года, Одесса. – Одесса, 2004. – С. 56-58.
6. Влияние степени дисперсности пищевых добавок на совместную сорбцию свинца и кадмия / В.Ф.Урьяш, Е.А.Степанова, Н.В.Гришатова [и др.] // Вестник Нижегород. ун-та им. Н.И. Лобачевского/ – 2009. – № 5. – С. 113–117.
7. Гигиенические критерии состояния окружающей среды: Вып. 3. Свинец.–Женева: ВОЗ, 1980.–192с.
8. Дмитруха Н.Н. К вопросу нефротоксического действия кадмия / Н.Н. Дмитруха // Укр. журнал з проблем медицини праці. – 2010. – №2 (22). –С. 36-42.
9. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах (документ розроблений робочою групою Конгресу під керівництвом чл.-кор.НАН і АМН України О.Г.Резнікова) // Ендокринологія. – 2003.– Т.8, № 1. — С. 142–145.
10. Кузьмин О.Б. Хроническая болезнь почек и состояние сердечно-сосудистой системы / О.Б. Кузьмин // Нефрология. – 2007. –Т. 11, № 1. – С. 28-37.
11. Лабораторні тварини в медико-біологічних експериментах / В.П.Пішак, В.Г. Висоцька, В.М. Магалаєв [та ін.]. – Чернівці : Мед університет, 2006. – 350 с.
12. Меньшиков В.В. Методы клинической биохимии гормонов и медиаторов / В.В.Меньшиков. – М., 1969. – 134 с.
13. Нефротоксическое действие свинца, кадмия и его торможение комплексом биопротекторов / Е.П. Киреева, Б.А. Кацнельсон, Т.Д. Дегтярева [и др.] // Токсикол. вестник. – 2009. - № 3. – С.26-32
14. Польгалина Г.В. Определение активности ферментов: Справочник / Г.В.Польгалина, В.С.Чердиченко, Л.В.Римарева. – ДеЛипринт, 2003. – 376 с.
15. Справочник по лабораторным методам исследования / под ред. Л. А. Даниловой. – СПб. : Питер, 2003. – 736 с.
16. Трахтенберг І.М. Профілактична токсикологія та медична екологія / І. М. Трахтенберг. – К.: Авіцена, 2011. – 120 с.
17. Тяжелые металлы внешней среды и их влияние на репродуктивную функцию женщин: монография / М.А.Сердюк, Э.Н.Билецкая, Н.М.Таранько, Т.Т. Шматов. – Д.: АРТ-ПРЕСС, 2004. – 148 с.
18. Физиология человека / под ред. Покровского В.М., Коротько Т.Ф. Т.2. – М.: Медицина, 1997. – 368с.
19. Черниченко І.О. До питання оцінки стану забруднення атмосферного повітря і його безпеки для населення // І.О Черниченко, Я.В. Першегуба, О.М. Литвиненко // Довкілля та здоров'я. – 2009. – № 3(50). – С.19-23.
20. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe.–Strasbourg, 1986.–53p.
21. IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans and their Supplements. - Vol. 1-88. Webside at: <http://www.-dep.iarc.fr/>.

