

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК

Toxicological Review



Научно-практический журнал

Издается с июля 1993 года, выходит 1 раз в 2 месяца

№ 4 (163), 2020

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

- Х.Х. Хамидулина**
СЛОВО ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА..... 2
- С.В. Клинова, И.А. Минигалиева, Л.И. Привалова, М.П. Сутункова, В.Б. Гурвич, Ю.В. Рябова, С.Н. Соловьева, В.Г. Панов, И.Е. Валамина, И.Н. Чернышов, Б.А. Кацнельсон**
СУБХРОНИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ИНТОКСИКАЦИЯ КРЫС СВИНЦОМ И КАДМИЕМ КАК ФАКТОР ПОВРЕЖДЕНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ..... 3
- Д.А. Белинская, Ю.В. Челуснова, В.В. Абзианидзе, Н.В. Гончаров**
ОСОБЕННОСТИ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ЧЕРЕЗ СТРЕПТАВИДИН-БИОТИНОВУЮ СИСТЕМУ ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО СЕЛЕКЦИИ АПТАМЕРОВ..... 12
- Г.А. Протасова, Л.В. Шабашева, В.Б. Попов**
КОРРЕКЦИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ 21
- С.В. Чепур, С.Е. Галан, М.С. Вахвиянен, Р.Н. Хромов, А.Н. Семёнов**
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИКОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АГОНИСТОВ КАППА-ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ 27
- К.И. Стосман, Л.В. Луковникова, Г.И. Сидорин, Л.И. Дьякова, Э.П. Зацепин, Г.В. Шестова, Б.С. Литвинцев**
О ВОЗМОЖНОСТИ РАЗВИТИЯ ТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПРИ КОНТАКТЕ С ПРОИЗВОДНЫМ N-НИТРОЗОАЛКИЛМОЧЕВИНЫ – ЛИЗОМУСТИНОМ 34
- Д.В. Мальцев, А.А. Спасов, В.А. Косолапов, К.Т. Султанова, М.В. Мирошников, С.К. Котовская, И.М. Сапожникова, В.Л. Русинов**
НЕЙРОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ АВ-19 ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА 39
- **Конкурс научных работ молодых ученых и специалистов**
Е.А. Белинская, С.Е. Мазина, Е.К. Пичугина, Г.В. Зыкова
ВЛИЯНИЕ СТОЙКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ И БЕНЗ[А]ПИРЕНА НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН ЯЧМЕНЯ ОБЫКНОВЕННОГО (*HORDÉUM VULGÁRE L.*)..... 44
- **Экологическая токсикология**
Н.П. Подосиновикова, К.А. Краснов, А.А. Бондаренко, М.Л. Александрова, М.А. Зайцева, В.В. Халаман
ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ЛИПОФИЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ БЕЛОМОРСКИХ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ – ФУКУСА ПУЗЫРЧАТОГО И ЛАМИНАРИИ САХАРИСТОЙ НА МОДЕЛИ *DAPHNIA MAGNA STRAUS*..... 49
- **Новые сведения о токсичности и опасности химических и биологических веществ**
М.В. Бидевкина, М.И. Голубева, А.В. Лиманцев, И.Н. Разумная, Т.Н. Потапова, Э.А. Федорова
ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ НАТРИЯ ЛАУРИЛСУЛЬФАТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПУТЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ..... 56
- **Юбилейные даты**
ПЕТРОВ АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ
(к 80-летию со дня рождения)..... 60
- Kh.Kh. Khamidulina**
FROM THE EDITOR-IN-CHIEF..... 2
- S.V. Klinova, I.A. Minigalieva, L.I. Privalova, M.P. Sutunkova, V.B. Gurvich, Ju.V. Ryabova, S.N. Solovjeva, V.G. Panov, I.E. Valamina, I.N. Chernishov, B.A. Katsnelson**
LEAD AND CADMIUM SUBCHRONIC INTOXICATION IN RATS AS A FACTOR OF DAMAGE TO THE CARDIOVASCULAR SYSTEM..... 3
- D.A. Belinskaya, Yu.V. Chelusnova, V.V. Abzianidze, N.V. Goncharov**
FEATURES OF ORGANOPHOSPHATES IMMOBILIZATION VIA STREPTAVIDIN-BIOTIN SYSTEM FOR EXPERIMENTS ON SELECTION OF APTAMERS... 12
- G.A. Protasova, L.V. Shabasheva, V.B. Popov**
STEM CELL CORRECTION OF TOXIC LIVER LESIONS 21
- S.V. Chepur, S.E. Galan, M.S. Vakhviyanen, R.N. Khromov, A.N. Semenov**
EXPERIMENTAL EVALUATION OF TOXICOMETRIC INDICATORS AND ANALGESIC ACTIVITY OF KAPPA-OPIOID RECEPTOR AGONISTS..... 27
- K.I. Stosman, L.V. Lukovnikova, G.I. Sidorin, L.I. Dyakova, E.P. Zatsepin, G.V. Shestova, B.S. Litvintsev**
ABOUT THE POSSIBILITY OF TOXIC EFFECTS DEVELOPING IN CONTACT WITH N-NITROSOALKYLUREA DERIVATIVE - LYSOMUSTINE 34
- D.V. Maltsev, A.A. Spasov, V.A. Kosolapov, K.T. Sultanova, M.V. Miroshnikov, S.K. Kotovskaya, I.M. Sapozhnikova, V.L. Rusinov**
NEUROTOXICOLOGICAL PROPERTIES OF THE COMPOUND AV-19 FOR PROPHYLAXIS AND TREATMENT OF COMPLICATIONS OF DIABETES MELLITUS 39
- **Competition of scientific works of young scientists and specialists**
E.A. Belinskaya, S.E. Mazina, E.K. Pichugina, G.V. Zykova
IMPACT OF PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS AND BENZ[A]PYRENE ON GERMINATION OF COMMON BARLEY SEEDS (*HORDÉUM VULGÁRE L.*)..... 44
- **Ecotoxicology**
N.P. Podosinikovova, K.A. Krasnov, A.A. Bondarenko, M.L. Alexandrova, M.A. Zaytseva, V.V. Khalaman
STUDY OF TOXICITY AND SAFETY OF LIPOPHILIC EXTRACTS OF THE WHITE SEA BROWN ALGAE – FUCUS VESICULOSUS AND LAMINARIA SACCHARINA ON THE *DAPHNIA MAGNA STRAUS* MODEL 49
- **News on toxicity and hazard of chemical and biological substances**
M.V. Bidevkina, M.I. Golubeva, A.V. Limantsev, I.N. Razumnaya, T.N. Potapova, E.A. Fedorova
ASSESSMENT OF THE TOXICITY AND HAZARD OF SODIUM LAURYL SULFATE AT DIFFERENT EXPOSURE ROUTES..... 56
- **Anniversary**
PETROV ALEXANDR NIKOLAEVICH
(to the 80th birthday) 60

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ
И АВТОРЫ ЖУРНАЛА!

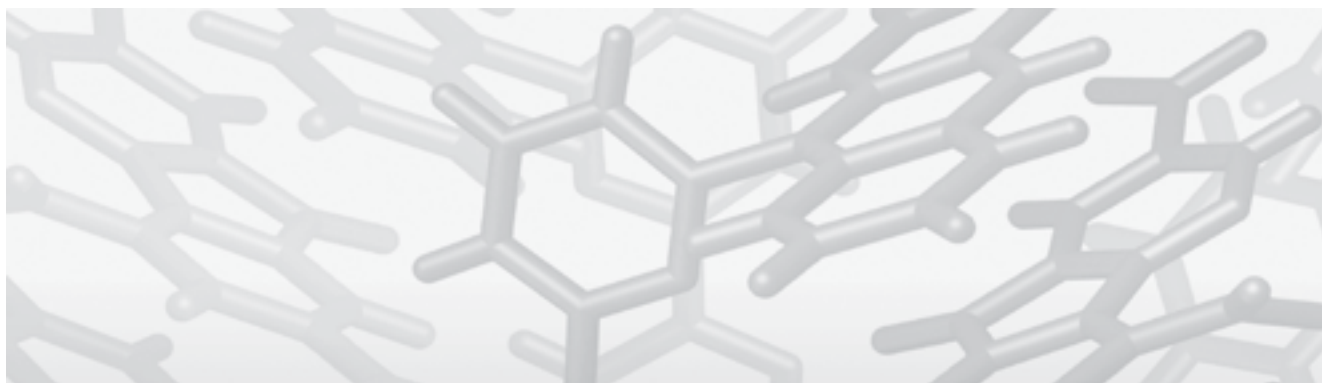
Доводим до Вашего сведения информацию
о том, что у журнала сменился научный редактор.

Редколлегия сердечно благодарит
член-корреспондента РАН, профессора Т.А. Гуськову
за многолетнюю скрупулезную и творческую работу
в качестве научного редактора.

Научным редактором стал А.С. Радилов,
доктор медицинских наук, профессор,
и.о. директора Научно-исследовательского института
гигиены, профпатологии
и экологии человека Федерального
медико-биологического агентства
(ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России).

Редколлегия надеется
на долгое плодотворное сотрудничество!

Главный редактор Х.Х. Хамидулина



СУБХРОНИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ИНТОКСИКАЦИЯ КРЫС СВИНЦОМ И КАДМИЕМ КАК ФАКТОР ПОВРЕЖДЕНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

С.В. Клинова¹, И.А. Минигалиева¹,
Л.И. Привалова¹, М.П. Сутункова¹,
В.Б. Гурвич¹, Ю.В. Рябова¹,
С.Н. Соловьева¹, В.Г. Панов²,
И.Е. Валамина³, И.Н. Чернышов¹,
Б.А. Кацнельсон¹

¹ФБУН «Екатеринбургский медицинский – научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, 620014, г. Екатеринбург, Российская Федерация
²ФБУН «Институт промышленной экологии» УрО РАН, 620990, г. Екатеринбург, Российская Федерация
³Центральная научно-исследовательская лаборатория Уральского государственного медицинского университета, 620109, г. Екатеринбург, Российская Федерация

Свинцово-кадмиевая интоксикация является фактором риска для здоровья рабочих металлургической промышленности и людей, проживающих на территориях, загрязняемых её эмиссиями. Субхроническая интоксикация моделировалась путем повторных внутривенных инъекций ацетата свинца и хлорида кадмия как изолированно, так и в комбинации, 3 раза в неделю в течение 6 недель. Найдено снижение частоты сердечных сокращений и показателей артериального давления при кадмиевой интоксикации, а также снижение скорости кровотока и повышение показателей артериального давления при свинцовой. На электрокардиограмме обнаружены увеличение длительности комплекса QRS при кадмиевой интоксикации, увеличение интервала QT и снижение изоэлектрической линии при комбинированном токсическом действии свинца и кадмия. Показаны уменьшение толщины кардиомиоцитов под влиянием кадмиевой интоксикации и увеличение – под влиянием свинцовой, а также уменьшение толщины внутренней оболочки стенки аорты при всех исследованных типах интоксикации. Любая токсическая экспозиция приводила к снижению числа ядер на единицу площади гистологического препарата миокарда.

Ключевые слова: свинец, кадмий, субхроническая интоксикация, ЭКГ, артериальное давление, кардиомиоцит.

Цит: С.В. Клинова, И.А. Минигалиева, Л.И. Привалова, М.П. Сутункова, В.Б. Гурвич, Ю.В. Рябова, С.Н. Соловьева, В.Г. Панов, И.Е. Валамина, И.Н. Чернышов, Б.А. Кацнельсон. Субхроническая экспериментальная интоксикация крыс свинцом и кадмием как фактор повреждения сердечно-сосудистой системы. Токсикологический вестник. 2020; 4: 3-11

Клинова Светлана Владиславовна (Klinova Svetlana Vladislavovna), научный сотрудник лаборатории промышленной токсикологии ФБУН «ЕМНЦ ПОЗРПП» Роспотребнадзора, klinova.svetlana@gmail.com;

Минигалиева Ильзира Амировна (Minigalieva Ilzira Amirovna), кандидат биологических наук, зав. лабораторией промышленной токсикологии ФБУН «ЕМНЦ ПОЗРПП» Роспотребнадзора, ilzira-minigalieva@yandex.ru;

Сутункова Марина Петровна (Sutunkova Marina Petrovna), кандидат медицинских наук, врио директора ФБУН «ЕМНЦ ПОЗРПП» Роспотребнадзора, marinasutunkova@yandex.ru;

Привалова Лариса Ивановна (Privalova Larisa Ivanovna), доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, зав. лабораторией научных основ биопрофилактики ФБУН «ЕМНЦ ПОЗРПП» Роспотребнадзора, privalovalii@yahoo.com;

Гурвич Владимир Борисович (Gurvich Vladimir Borisovich), доктор медицинских наук, научный руководитель центра ФБУН «ЕМНЦ ПОЗРПП» Роспотребнадзора, gurvich@ymrc.ru;

Рябова Юлия Владимировна (Ryabova Juliya Vladimirovna), м.н.с. лаборатории научных основ биопрофилактики ФБУН «Екатеринбургский медицинский – научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, ryabova@ymrc.ru;

Соловьева Светлана Николаевна (Solovjeva Svetlana Nikolaevna), н.с. лаборатории токсикологии среды обитания ФБУН «ЕМНЦ ПОЗРПП» Роспотребнадзора, solovyevasn@ymrc.ru;

Панов Владимир Григорьевич (Panov Vladimir Grigorievich), кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории математического моделирования в экологии и медицине, ИПЭ УрО РАН, 620990, г. Екатеринбург, Россия, vpanov@esko.uran.ru;

Валамина Ирина Евгеньевна (Valamina Irina Evgenievna), кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, заведующий ЦНИЛ ГБОУ ВПО УГМУ, ivalamina@mail.ru;

Чернышов Иван Николаевич (Chernishov Ivan Nikolaevich), младший научный сотрудник лаборатории промышленной токсикологии ФБУН «ЕМНЦ ПОЗРПП» Роспотребнадзора, chernishov@ymrc.ru;

Кацнельсон Борис Александрович (Katsnelson Boris Aleksandrovich), доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий отделом токсикологии и биопрофилактики ФБУН «ЕМНЦ ПОЗРПП» Роспотребнадзора, bkaznelson@etel.ru

Введение. Экспозиция к свинцу и кадмию является одним из наиболее важных факторов риска для здоровья работающих при плавке и рафинировании меди. Население (в том числе детское), проживающее на территориях под неблагоприятным воздействием этих предприятий, тоже подвергается риску.

В проведенных за последние годы эпидемиологических исследованиях, как правило, указывается на наличие связи между свинцовой экспозицией и распространенностью гипертонии [1-3]. Однако даже в относительно недавнем обзоре [4] указывается на неоднозначность данных о влиянии на артериальное давление воздействия свинца в профессиональных условиях. Проведенные в последние годы эксперименты на животных были направлены в основном на выяснение возможных механизмов развития как свинцовой гипертонии [5-8], так и нарушений сократительной активности миокарда [9-13].

Кардиоваскулярным эффектам кадмиевой нагрузки организма за последнее десятилетие было также посвящено немало число как эпидемиологических [14-17], так и экспериментальных [18-20] исследований. Особое внимание уделено связи повышенных показателей давления крови у человека или клинической гипертонии с повышенной концентрацией кадмия в крови и моче человека. Такая связь нередко выявлялась и раньше, так что уже в 2010 году Gallagher и Meliker [21] могли сравнить результаты, полученные в 8 эпидемиологических исследованиях, а на основе 5 из них провести мета-анализ данных, выводы из которого они нашли неоднозначными. Последующие публикации по проблеме кардио-вазотоксичности кадмия также не позволяют считать её окончательно решённой, хотя утверждение о наличии рассматриваемой связи всё же преобладает. Подтверждающие её экспериментальные результаты немногочисленны и столь же неоднозначны, однако уже давно было отмечено повышение кровяного давления у крыс после однократного или 5-кратного внутривенного введения ацетата кадмия [22], а Almenara с соавт. [18] при 4-недельной затравке хлоридом кадмия с питьевой водой наблюдали нарастающее со временем экспозиции повышение систолического артериального давления (диастолическое не регистрировалось). К тому же, некоторые экспериментальные исследования указывают на возможность прямого кадмиевого повреждения кардиомиоцита или действия на регуляторные механизмы его сократительной активности [19, 20, 23].

Целью данной работы являлось изучение состояния сердечно-сосудистой системы при субхронической экспозиции к свинцу и/или кадмию.

Материалы и методы исследования. Эксперимент проведен на белых аутбредных крысах-сам-

цах собственного разведения с исходной массой тела около 220-225 г. Содержание животных и все манипуляции с ними проводились в соответствии с требованиями «Правил надлежащей лабораторной практики» (Приказ Минздрава России от 01.04.2016 г. №199н) и «Международных руководящих принципов биомедицинских исследований на животных» (the Council for International Organizations of Medical Sciences, 1985.) и были одобрены локальным этическим комитетом ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора.

Субхроническая интоксикация моделировалась путем повторных внутрибрюшинных инъекций растворов 3-водного ацетата свинца и 2,5-водного хлорида кадмия 3 раза в неделю (всего 18 введений) при однократной дозе 6,01 мг по Pb и 0,377 мг по Cd на кг массы тела. Контрольные животные получали инъекции физиологического раствора. Животные были поделены на 4 группы по 12 особей в каждой: контроль, получавшие Cd, получавшие Pb, получавшие Cd и Pb.

Эвтаназия проводилась путем цервикальной дислокации через сутки после последнего введения. На 35 и 37 сутки после начала экспозиции (между 15, 16 и 17 введениями) однократно у крыс проводилась неинвазивная регистрация электрокардиограммы (всего 10 животных из группы) с помощью системы ecgTUNNEL (emka TECHNOLOGIES, Париж, Франция) и показателей артериального давления (всего 8 животных из группы) с помощью системы CODA-HT8 (Kent Scientific, Торрингтон, США). Для микроскопического гистологического исследования срезы тканей печени, почек, селезенки, головного мозга и сердца окрашивали гематоксилином и эозином (у 4 животных из группы). Для морфометрической характеристики тканей использовали окулярную сетку Автандилова и систему распознавания изображений CellSens (Olympus, Гамбург, Германия).

Статистическая значимость межгрупповых различий между средними значениями всех полученных показателей оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента. Данные приведены в статье как (среднее ± ошибка среднего). Математическое моделирование бинарного комбинированного действия по всем его измеренным эффектам было проведено с помощью методологии построения поверхности отклика - Response Surface Method (RSM) с построением на её основе изобол Лёве [24].

Результаты и обсуждение. По окончании эксперимента наблюдали заметные отклонения от контрольных величин большого числа биохимических, гематологических, морфометрических и некоторых других показателей состояния организма крыс после любой токсической экспозиции, которые детально описываются в другой публикации [25]. В целом, полученные нами экс-

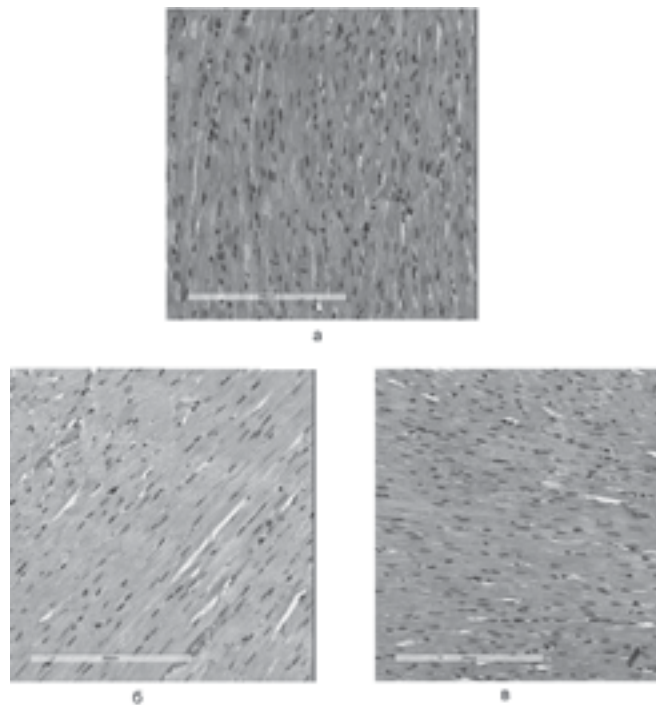


Рис. 1. Миокард левого желудочка у крыс (а) контрольной группы; (б) при кадмиевой интоксикации; (в) при свинцовой интоксикации. Окраска гематоксилином и эозином; увеличение $\times 200$.

периментальные модели изолированных и комбинированной субхронических интоксикаций свинцом и кадмием могут быть охарактеризованы как умеренно выраженные, но свидетельствующие о заметно более высокой токсичности кадмия по большинству показателей, кроме специфических для действия свинца нарушений порфиринового обмена и признаков анемии [25].

Вместе с тем, статистически значимые корреляции между сдвигами ряда показателей состояния организма при интоксикации, вызванной свинцом или кадмием, и концентрацией соответствующего металла в крови свидетельствовали не только о таком специфическом для свинца действии, но и о вероятной связи с токсическим воздействием этих металлов ряда интегральных и неспецифических сдвигов. Что касается их комбинированной токсичности, то при RSM-анализе была обнаружена (как и во многих других экспериментах нашей исследовательской группы (см. обзор [26])) неоднозначность её типа в зависимости от показателя, по которому он оценивается, от уровня эффекта и от соотношения доз [25].

В таблице 1 представлены некоторые гемодинамические показатели при изолированных и комбинированном воздействии. Видны отличия гемодинамических показателей у крыс при свинцовой интоксикации от контрольных. Эти отличия не всегда статистически значимы, но в целом функционально согласованы и ожидаемы, учитывая упомянутые выше данные о свинцовой экспозиции как факторе риска развития артери-

альной гипертонии [1-3, 5-8]. Можно предположить, что обнаруженная по величинам систолического, диастолического и среднего давления тенденция к артериальной гипертонии в свинцовой группе связана с системным повышением сопротивления кровотоку. Поэтому становится понятным снижение как его скорости (статистически значимое), так и кровенаполнения хвоста. В кадмиевой группе наблюдали снижение всех гемодинамических показателей, статистически значимое только для ЧСС.

Хорошо согласуется с предполагаемым системным повышением сопротивления артериальному кровотоку и развитие гипертрофии кардиомиоцитов левого желудочка (рис. 1), средняя толщина которых была статистически значимо выше, чем в контрольной группе (табл. 2). Вместе с тем, мы не находим объяснения статистически значимому утончению средней оболочки стенки аорты в группе крыс при свинцовой экспозиции (табл. 2), в то время как в литературе имеются данные (например, [27]) о том, что у крыс при экспериментальной артериальной гипертонии почечного генеза стенка аорты наоборот утолщается, в основном, за счёт гиперплазии гладких мышц средней оболочки. Между тем, она была статистически значимо повышена и в нашем эксперименте при комбинированном воздействии свинца и кадмия, хотя оно сопровождалось повышением артериального давления лишь до практически того же уровня, что и при изолированном воздействии свинца. Это обстоятельство делает парадоксаль-

Таблица 1

Некоторые гемодинамические показатели при изолированном и комбинированном субхроническом действии свинца и кадмия ($\bar{x} \pm s.e.$)

| Группы | Контроль | Cd | Pb | Pb + Cd |
|---|---------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Систолическое артериальное давление, мм рт.ст. | 142,66 ± 4,92 | 130,14 ± 5,70 | 152,76 ± 4,98 [#] | 150,29 ± 4,42 [#] |
| Диастолическое артериальное давление, мм рт.ст. | 103,55 ± 4,47 | 91,76 ± 4,96 | 108,92 ± 5,05 [#] | 111,61 ± 4,55 [#] |
| Среднее артериальное давление, мм рт.ст. | 116,26 ± 4,57 | 104,23 ± 5,19 | 123,20 ± 4,96 [#] | 124,14 ± 4,45 [#] |
| Частота сердечных сокращений, уд. /мин. | 332,65 ± 7,42 | 304,51 ± 9,23 ^c | 330,88 ± 12,43 | 314,20 ± 5,78 |
| Скорость кровотока в хвосте, мкл/мин | 30,85 ± 2,12 | 27,20 ± 2,96 | 22,94 ± 1,37 ^c | 30,09 ± 2,48 [*] |
| Объем крови в хвосте, мкл | 120,32 ± 9,46 | 99,58 ± 8,32 | 102,47 ± 4,21 | 124,93 ± 12,64 |

Примечание: индексами обозначено статистически значимое отличие ^c - от контрольной группы, ^{*} - от группы «Pb», [#] - от группы «Cd» ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

Таблица 2

Некоторые морфометрические показатели состояния миокарда и аорты при изолированном и комбинированном субхроническом действии свинца и кадмия ($\bar{x} \pm s.e.$)

| Группы | Контроль | Cd | Pb | Cd + Pb |
|---|--------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Толщина кардиомиоцита, нм | 6,29 ± 0,15 | 5,289 ± 0,082 ^c | 6,71 ± 0,14 ^{c#} | 4,00 ± 0,10 ^{c#*} |
| Число ядер кардиомиоцитов на квадрат 6000 нм ² | 27,05 ± 1,24 | 16,33 ± 0,40 ^c | 15,62 ± 0,29 ^c | 16,44 ± 0,35 ^c |
| Толщина средней оболочки стенки аорты, нм | 23,53 ± 1,34 | 23,36 ± 0,56 | 19,93 ± 0,35 ^{c#} | 29,75 ± 0,84 ^c |
| Толщина внутренней оболочки стенки аорты, нм | 6,54 ± 0,43 | 4,73 ± 0,20 ^c | 4,73 ± 0,31 ^c | 5,41 ± 0,21 ^c |

Примечание: индексами обозначено статистически значимое отличие ^c - от контрольной группы, ^{*} - от группы «Pb», [#] - от группы «Cd» ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

ное уточнение средней оболочки аорты при изолированной свинцовой интоксикации ещё труднее объяснимым.

Отметим также, что оба токсичных металла статистически значимо снизили толщину внутренней оболочки стенки аорты. Этот эффект заслуживает особого внимания, поскольку хорошо известна роль эндотелия, образующего этот слой сосудистой стенки, в поддержании гомеостаза артериального давления путем регуляции процессов вазодилатации и вазоконстрикции.

В свете тех литературных данных [14, 15, 17, 18, 22], согласно которым фактором риска развития гипертонии может являться не только свинцовая, но и кадмиевая (в частности, профессионально обусловленная) экспозиция, неожиданным может

показаться обнаружение в группе крыс, подвергавшейся изолированному воздействию кадмия, всех трёх показателей артериального давления сниженными по сравнению как с контролем (статистически не значимо), так и с группой, получавшей свинец (статистически значимо), а также статистически значимое снижение ЧСС. При этом скорость кровотока в хвосте мало отличалась от контрольной, а кровенаполнение хвоста – от соответствующего показателя свинцовой группы.

Однако, если снижение давления крови при кадмиевой интоксикации мы наблюдаем, кажется, впервые, то и повышение давления при этой интоксикации, судя по литературным данным, обнаруживалось далеко не всегда. Так, по данным Walker и Moses [28] у крыс при добавлении

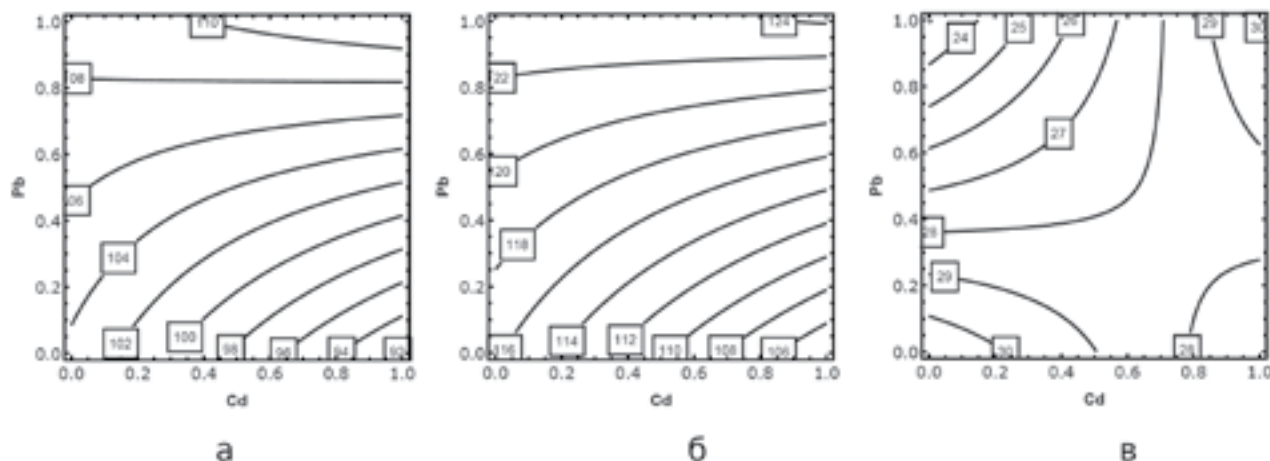


Рис. 2. Примеры изоболограмм, иллюстрирующие неоднозначность типа комбинированно действия кадмия (Cd) и свинца (Pb) на различные показатели гемодинамики: (а) на диастолическое артериальное давление (противонаправленность действия); (б) на среднее артериальное давление (то же самое); (в) на скорость кровотока в хвосте (разные типы одно- и противонаправленного действия при разных соотношениях доз). На осях – дозы металлов в долях соответствующей полной дозы; на изоболах – величина соответствующего эффекта.

кадмия в воду в концентрации 1 мг% артериальная гипертензия развивалась только к 36-й неделе хронической экспозиции, а Boscolo и Carmignani [29] вообще не нашли её на протяжении 9-месячной экспозиции кроликов, потреблявших воду с содержанием кадмия в концентрации 20 мкг/мл (то есть в 2 раза более высокой, чем в указанном эксперименте на крысах).

При описываемой нами комбинированной свинцово-кадмиевой интоксикации толщина внутренней оболочки аорты была статистически значимо увеличена по сравнению с контрольным показателем. Вместе с тем, средняя толщина кардиомиоцита левого желудочка была статистически значимо ниже, чем в свинцовой, кадмиевой и в контрольной группе. Такая неоднозначность различий по морфометрическим показателям состояния миокарда и аорты, возможно, свидетельствует о том, что они зависят не только от повышения артериального давления. Токсическое повреждение кардиомиоцита (вероятнее всего, по типу апоптоза), является вполне вероятной причиной ослабления насосной функции сердца. Это ослабление и могло быть основной причиной пониженного давления крови, которая при кадмиевой интоксикации, по-видимому, превалирует над изменениями сосудистого русла, а при свинцовой – наоборот. То, что при комбинированной свинцово-кадмиевой интоксикации толщина кардиомиоцита также статистически значимо снижена по сравнению с контролем, позволяет предположить, что вредный эффект кадмия преобладает и в комбинации со свинцом.

Показатели гемодинамики хвоста при действии комбинации свинца и кадмия почти совпадали с контрольными, но показатели артериального давления были не значимо выше контрольных и статистически значимо выше, чем при изоли-

рованном действии кадмия, что вновь позволяет допустить гипертензивное влияние именно свинца (табл. 1). При этом ЧСС была несколько ниже контрольного значения, но выше, чем в «кадмиевой» группе (в обоих случаях статистически недостаточно значимо).

RSM-анализ подтверждает превалирующее противонаправленное действие свинца и кадмия на артериальное давление при комбинированной экспозиции (рис. 2а и 2б). В то же время, аналогичный математический анализ их комбинированного действия на скорость кровотока (рис. 2в) и кровенаполнение хвоста позволяет прогнозировать, что при каких-то соотношениях доз действие этих двух металлов на гемодинамику в целом могло бы быть не противонаправленным и при этом даже супераддитивным. Поэтому допустимо предположить, что и обнаруженное нами гипотензивное действие кадмия является лишь фазовым, присущим полученной нами кадмиевой интоксикации конкретной тяжести и продолжительности. В качестве подтверждения возможной фазовости реакции кровяного давления на кадмиевую интоксикацию можно привести упомянутое ранее исследование, в котором развитие гипертензии у крыс при однократном внутривенном введении ацетата кадмия наблюдалось после временного снижения артериального давления [30].

В таблицах 3 и 4 приведены результаты анализа электрокардиограмм (ЭКГ), записанных во втором отведении. Оба металла вызвали небольшое удлинение всех межзубцовых интервалов (статистически значимое только для влияния кадмия на длительность комплекса QRS, табл. 3). Это замедление развития сердечного цикла соответствует снижению ЧСС ($394,17 \pm 13,35$ уд/мин в группе «Cd» и $404,23 \pm$

10,72 уд/мин в группе «Pb» против $421,14 \pm 8,71$ уд/мин в контрольной группе). В то же время, при комбинированной экспозиции был удлинён и при том статистически значимо только интервал QT, в том числе, и при любой его коррекции по ЧСС (табл. 3). Несмотря на это, суммарная длительность цикла, оцениваемая по интервалу RR, была при комбинированной интоксикации укорочена, что также согласуется с некоторым учащением сердечных сокращений ($433,04 \pm 9,04$ уд/мин).

Из всех изменений ЭКГ животных после всех трех токсических экспозиций к наиболее весомым можно отнести снижение изоэлектрической линии (значимое при комбинированном воздействии, табл. 4). Это может свидетельствовать о каком-то повреждении миокарда или хотя бы о метаболических нарушениях в нём.

Можно предположить, что диффузные метаболические (ионообменные и/или энергетические) нарушения являются не только и даже не столько прямым следствием кардиотоксичности ме-

Таблица 3

Интервальные показатели электрокардиограммы во 2-м отведении у крыс при комбинированном субхроническом действии свинца и кадмия ($\bar{x} \pm s.e.$)

| Группы | Контроль | Cd | Pb | Pb + Cd |
|---|-------------------|--------------------------|-------------------|-----------------------------|
| RR, мс | $143,35 \pm 3,08$ | $154,67 \pm 5,57$ | $149,55 \pm 4,18$ | $139,34 \pm 2,85^{\#}$ |
| Длительность P, мс | $14,84 \pm 0,17$ | $15,22 \pm 0,13$ | $14,85 \pm 0,43$ | $14,95 \pm 0,26$ |
| PQ, мс | $42,80 \pm 1,23$ | $43,95 \pm 1,31$ | $45,58 \pm 1,28$ | $44,21 \pm 0,63$ |
| QRS, мс | $23,03 \pm 0,64$ | $25,06 \pm 0,42^{\circ}$ | $23,43 \pm 1,25$ | $24,22 \pm 0,77$ |
| QT, мс | $65,56 \pm 1,13$ | $68,19 \pm 1,13$ | $67,25 \pm 0,53$ | $70,28 \pm 1,44^{\circ}$ |
| Корректированный QT (формула Базетта) | $173,50 \pm 3,04$ | $177,70 \pm 2,54$ | $172,08 \pm 3,61$ | $191,19 \pm 2,91^{\circ\#}$ |
| Корректированный QT (формула Фридерики) | $125,41 \pm 2,10$ | $129,99 \pm 2,18$ | $125,21 \pm 2,28$ | $135,67 \pm 2,61^{\circ}$ |

Примечание: индексами обозначено статистически значимое отличие $^{\circ}$ – от контрольной группы, $^{\#}$ – от группы «Pb», $^{\#}$ – от группы «Cd» ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

Таблица 4

Вольтажные показатели электрокардиограммы во 2-м отведении у крыс при комбинированном субхроническом действии свинца и кадмия ($\bar{x} \pm s.e.$)

| Группы | Контроль | Cd | Pb | Pb + Cd |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------------|
| Изоэлектрическая линия, мВ | $-0,0623 \pm 0,0029$ | $-0,0698 \pm 0,0038$ | $-0,0703 \pm 0,0043$ | $-0,0797 \pm 0,0036^{\circ}$ |
| P, мВ | $0,0973 \pm 0,0060$ | $0,0885 \pm 0,0023$ | $0,1036 \pm 0,0095$ | $0,1018 \pm 0,0041^{\#}$ |
| Q, мВ | $-0,000299 \pm 0,000075$ | $-0,000139 \pm 0,000059$ | $-0,00160 \pm 0,00073$ | $-0,00185 \pm 0,0010$ |
| R, мВ | $0,418 \pm 0,023$ | $0,427 \pm 0,025$ | $0,431 \pm 0,036$ | $0,454 \pm 0,049$ |
| S, мВ | $0,0016 \pm 0,0132$ | $-0,0091 \pm 0,0122$ | $-0,022 \pm 0,018$ | $-0,0179 \pm 0,0075$ |
| QRS, мВ | $0,388 \pm 0,034$ | $0,418 \pm 0,030$ | $0,408 \pm 0,026$ | $0,420 \pm 0,025$ |
| T, мВ | $0,1476 \pm 0,0097$ | $0,1506 \pm 0,0084$ | $0,157 \pm 0,018$ | $0,174 \pm 0,010$ |

Примечание: индексами обозначено статистически значимое отличие $^{\circ}$ – от контрольной группы, $^{\#}$ – от группы «Cd» ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

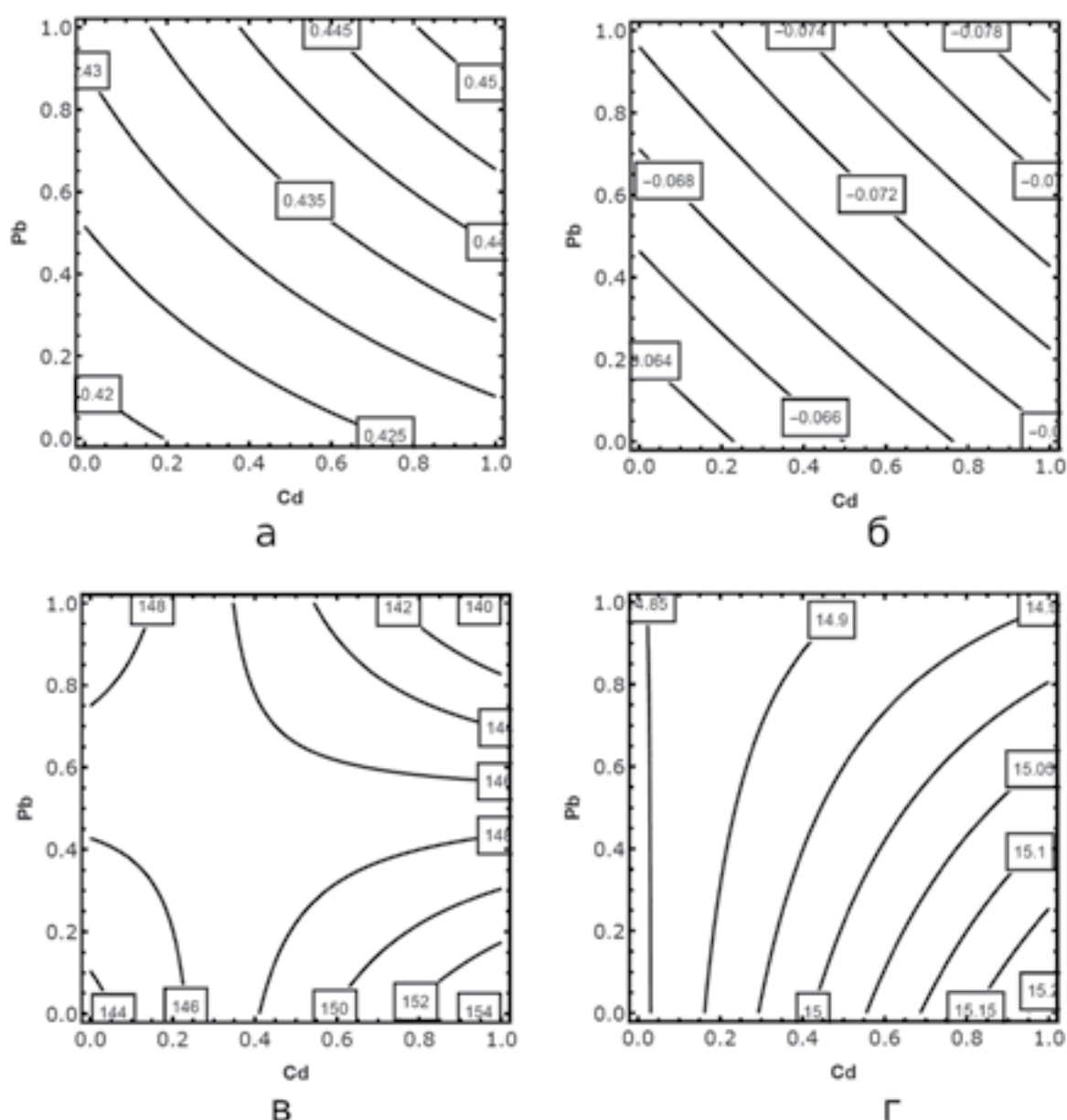


Рис. 3. Примеры изоболограмм, иллюстрирующие неоднозначность типа комбинированно действия кадмия (Cd) и свинца (Pb) на различные показатели ЭКГ: (а) на амплитуду зубца R (аддитивность однонаправленного действия); (б) на положение изоэлектрической линии (то же самое); (в) на интервал RR (разные типы одно- и противоположного действия при разных соотношениях доз); (г) длительность зубца P (противонаправленное действие при сочетании доз среднего и высокого уровня). На осях – дозы металлов в долях соответствующей полной дозы; на изоболах – величина соответствующего эффекта.

таллов, сколько – в случае свинца – вторичным результатом показанной выше гипертрофии кардиомиоцитов. Наряду с этим, нельзя исключить и связь рассматриваемого ЭКГ-феномена с токсическим повреждением (например, с частичным апоптозом) кардиомиоцитов, косвенным морфометрическим показателем которого может служить выраженное и при свинцовой, и при

кадмиевой, и особенно при комбинированной интоксикации уменьшение числа ядер на определённую площадь гистологического препарата (табл. 2).

Вместе с тем, амплитуды всех зубцов не отличались от контрольных значений статистически значимо, а имеющиеся различия не были однонаправленными.

Тип комбинированного действия свинца и кадмия на ЭКГ по большинству показателей может быть расценен как аддитивность (примеры даны на рис. 3а и 3б), но и здесь встречаются показатели, на которые действие металлов изменяется в зависимости от сочетания доз токсикантов (рис. 3в). По амплитуде и длительности зубца Р их действие может быть расценено как противонаправленность (рис. 3г).

Ради сокращения объёма статьи мы не приводим данные анализа ЭКГ в 1-м отведении, поскольку основанные на нём суждения в принципе те же.

Заключение. При оценке гемодинамических показателей, обнаружены снижение частоты сердечных сокращений и показателей артериального давления при кадмиевой интоксикации, но снижение скорости кровотока и повышение показателей артериального давления при свинцовой. Повышение показателей артериального давления наблюдали и при комбинированной экспозиции. На электрокардиограмме обнаружены увеличение длительности комплекса QRS при кадмиевой интоксикации, увеличение интервала QT и снижение изоэлектрической линии

при комбинированном токсическом действии свинца и кадмия. Показаны уменьшение толщины кардиомиоцитов под влиянием кадмиевой и комбинированной интоксикации, а под влиянием свинцовой – увеличение их толщины. Обнаружено уменьшение толщины внутренней оболочки стенки аорты при всех исследованных типах интоксикации, толщина средней оболочки снижалась при действии свинца и увеличивалась при комбинированном действии металлов. Любая токсическая экспозиция приводила к снижению числа ядер на единицу площади гистологического препарата миокарда.

Оценка кардиоваскулярной токсичности при изолированной или комбинированной экспозиции к свинцу и кадмию является далеко не однозначной ни в сравнительном аспекте, ни в отношении разных гемодинамических и электрокардиографических эффектов. Несмотря на то, что эта важнейшая проблема изучается уже довольно давно, относящиеся к ней суждения разных авторов довольно противоречивы, а наш эксперимент дополнительно свидетельствует о том, что эта противоречивость объективно обусловлена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES:

1. Fiorini J., Ribeiro R.F., Silveira E.A., Padilha A.S., Vescovi M.V., de Jesus H.C. et al. Low-level lead exposure increases systolic arterial pressure and endothelium-derived vasodilator factors in rat aortas. *PLoS One*. 2011; 6(2): e17117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017117>.
2. Glenn B.S., Bandede-Roche K., Lee B.K., Weaver V.M., Todd A.C., Schwartz B.S. Changes in systolic blood pressure associated with lead in blood and bone. *Epidemiol.* 2006; 17: 538–544. <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000231284.19078.4b>.
3. Navas-Acien A., Guallar E., Silbergeld E.K., Rothenberg S.J. Lead exposure and cardiovascular disease—a systematic review. *Environ. Health Perspect.* 2007; 115: 472–482. <https://dx.doi.org/10.1289/ehp.9785>.
4. Gidlow D.A. Lead toxicity. *Occup. Med.* 2015; 65(5): 348–356. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqv018>.
5. Carmignani M., Volpe A.R., Boscolo P., Qiao N., Di Gioacchino M., Grilli A. et al. Catcholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sci.* 2000; 68: 401–415. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00954-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00954-1).
6. Silveira E.A., Siman F.D., de Oliveira F.T., Vescovi M.V., Furieri L.B., Lizardo J.H. et al. Low-dose chronic lead exposure increases systolic arterial pressure and vascular reactivity of rat aortas. *Free Radic. Biol. Med.* 2014; 67: 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.021>.
7. Simões M.R., Ribeiro Júnior R.F., Vescovi M.V., de Jesus H.C., Padilha A.S., Stefanon I. et al. Acute lead exposure increases arterial pressure: role of the renin-angiotensin system. *PLoS One*. 2011; 6: e18730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018730>.
8. Vaziri N.D., Norris K. Lipid disorders and their relevance to outcomes in chronic kidney disease. *Blood Purif.* 2011; 31(1-3): 189–196. <http://dx.doi.org/10.1159/000321845>.
9. Fiorese M., Furieri L.B., Simões M.R., Ribeiro R.F.Jr., Meira E.F., Fernandes A.A. et al. Acute exposure to lead increases myocardial contractility independent of hypertension development. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2013; 46: 178–185. <https://dx.doi.org/10.1590%2F1414-431X20122190>.
10. Fiorese M., Simões M.R., Furieri L.B., Broseghini-Filho G.B., Vescovi M.V., Stefanon I. et al. Chronic lead exposure increases blood pressure and myocardial contractility in rats. *PLoS One*. 2014; 9(5): e96900. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096900>.
11. Protsenko Y.L., Katsnelson B.A., Klinova S.V., Lookin O.N., Balakin A.A., Nikitina L.V. et al. Effects of subchronic lead intoxication of rats on the myocardium contractility. *Food Chem. Toxicol.* 2018; 120: 378–389. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.034>.
12. Protsenko Y.L., Katsnelson B.A., Klinova S.V., Lookin O.N., Balakin A.A., Nikitina L.V. et al. Further analysis of rat myocardium contractility changes associated with a subchronic lead intoxication. *Food Chem. Toxicol.* 2019; 125(2019): 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.054>.
13. Silva M.A., de Oliveira T.F., Almenara C.C., Broseghini-Filho G.B., Vassallo D.V., Padilha A.S. et al. Exposure to a Low Lead Concentration Impairs Contractile Machinery in Rat Cardiac Muscle. *Biol. Trace Elem. Res.* 2015; 167: 280–287. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0300-0>.
14. Borné Y., Barregard L., Persson M., Hedblad B., Fagerberg B., Engström G. Cadmium exposure and incidence of heart failure and atrial fibrillation: a population-based prospective cohort study. *BMJ Open*. 2015; 5: e007366. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2014-007366>.
15. Navas-Acien A., Fry R.C., Balakrishnan P., Navas-Acien A., Oliver-Williams C., Howard A.G. et al. Cadmium body burden and increased blood pressure in middle-aged American Indians: The Strong Heart Study. *J. Hum. Hypertens.* 2017; (3): 225–230. <https://doi.org/10.1038/jhh.2016.67>.
16. Larsson S.C., Wolk A. Urinary cadmium and mortality from all causes, cancer and cardiovascular disease in the general population: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Int. J. Epidemiol.* 2016; 45(3): 782–791. <https://doi.org/10.1093/ije/dyv086>.
17. Myong J.P., Kim H.R., Jang T.W., Lee H.E., Koo J.W. Association between blood cadmium levels and 10-year coronary heart disease risk in the general Korean population: the Korean National Health and Nutrition Examination Survey 2008–2010. *PLoS One*. 2014; 9(11): e111909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111909>.
18. Almenara C.C., Broseghini-Filho G.B., Vescovi M.V., Angeli J.K., Faria T. de O., Stefanon I. et al. Chronic cadmium treatment promotes oxidative stress and endothelial damage in isolated rat aorta. *PLoS One*. 2013; 8(7): e68418. <https://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0068418>.
19. Chen C., Zhang S., Liu Z., Tian Y., Sun Q. Cadmium toxicity induces ER stress and apoptosis via impairing energy homeostasis in cardiomyocytes. *Bioscience Rep.* 2015; 35(3): e00214. <https://dx.doi.org/10.1042%2FBRS20140170>.
20. Turdi S., Sun W., Tan Y., Yang X., Cai L., Ren J. Inhibition of DNA methylation attenuates low-dose cadmium-induced cardiac contractile and intracellular Ca(2+) anomalies. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2013; 40(10): 706–712. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12158>.
21. Gallagher C.M., Meliker J.R. Blood and urine cadmium, blood pressure, and hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.* 2010; 118(12): 1676–1684.
22. Puri V.N. Cadmium induced hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* 1999; 21(1-2): 79–84.
23. Ferramola M.L., Pérez Díaz M.F.F., Honoré S.M., Sánchez S.S., Antón R.I., Anzulovich A.C. et al. Cadmium-induced oxidative stress and histological damage in the myocardium. Effects of a soy-based diet. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012; 265(2012): 380–389. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.09.009>.
24. Panov V.G., Varaksin A.N., Minigaliev I.A., Katsnelson B.A. The Response Surface Methodology as an approach of choice to modeling and analyzing combined toxicity: theoretical premises, the most important inferences, experimental justification. *Biom. Biostat. J.* 2017; 1(1): 112–124.
25. Klinova S.V., Minigaliev I.A., Privalova L.I., Valamina I.E., Makeyev O.H., Shuman E.A. et al. Further verification of some postulates of the combined toxicity theory: new animal experimental data on separate and joint adverse effects of lead and cadmium. *Food Chem. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110971> (in press).
26. Minigaliev I.A., Katsnelson B.A., Panov V.G., Varaksin A.N., Gurvich V.B., Privalova L.I. et al. Experimental study and mathematical modeling of toxic metals combined action as a scientific foundation for occupational and environmental health risk assessment (a synthesis of results obtained by the Ekaterinburg

research team, Russia). *Toxicol. Rep.* 2017; 4C: 194-201. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.toxrep.2017.04.002>.
27. Amann K., Wolf B., Nichols C., Törnig J., Schwarz U., Zeier M. et al. Aortic changes

in experimental renal failure: hyperplasia or hypertrophy of smooth muscle cells? *Hyperten.* 1997; 29(3): 770-775.
28. Walker H.L., Moses H.A. Cadmium: hypertension induction and lead

mobilization. *J. Natl. Med. Assoc.* 1979; 71(12): 1187-1189.

29. Boscolo P., Carmignani M. Mechanisms of cardiovascular regulation in male rabbits chronically exposed to cadmium. *Br. J. Ind.*

Med. 1986; 43(9): 605-610. <https://dx.doi.org/10.1136%2Fbmj.43.9.605>.

30. Puri V.N. Cadmium induced hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* 1999; 21(1-2): 79-84.

S.V. Klinova¹, I.A. Minigalieva¹, L.I. Privalova¹, M.P. Sutunkova¹, V.B. Gurvich¹, Ju.V. Ryabova¹, S.N. Solovjeva¹, V.G. Panov², I.E. Valamina³, I.N. Chernishov¹, B.A. Katsnelson¹

LEAD AND CADMIUM SUBCHRONIC INTOXICATION IN RATS AS A FACTOR OF DAMAGE TO THE CARDIOVASCULAR SYSTEM

¹Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers of Rospotrebnadzor, 620014, Yekaterinburg, Russian Federation

²Institute of Industrial Ecology, Urals Branch of the Russian Academy of Sciences, 620990, Yekaterinburg, Russian Federation

³Central Research Laboratory, Ural State Medical University, 620109, Yekaterinburg, Russian Federation

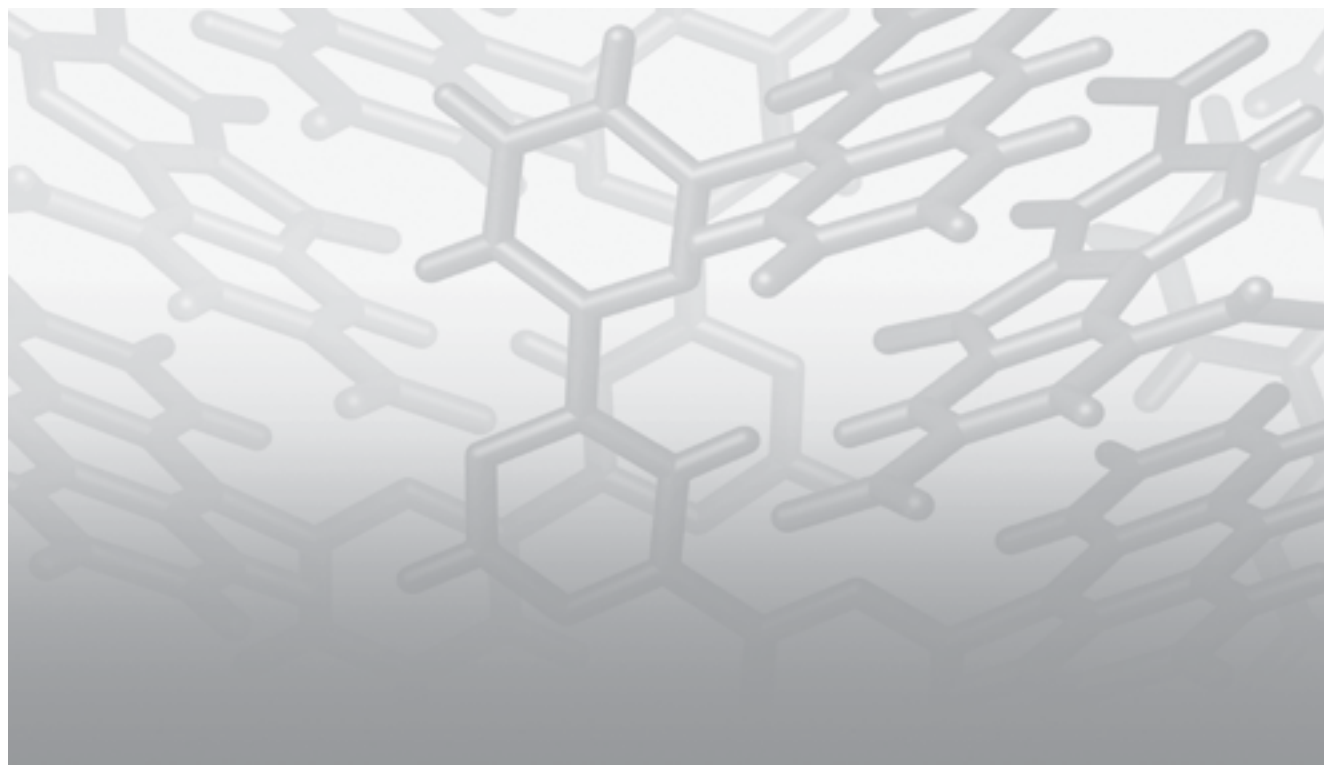
Lead-cadmium intoxication is an occupational risk factor for copper-smelting industry workers. People inhabiting the areas near the copper plants are also at risk. Subchronic intoxication was modeled by repeated intraperitoneal injections of lead acetate and cadmium chloride both in isolation and in combination, 3 times a week for 6 weeks.

A heart rate decrease in animals with Cd intoxication and a blood flow velocity decrease in those with Pb intoxication have been found. The impact of Pb and Cd on blood pressure proved to be contra-directional. ECG analysis revealed a prolonged duration of QRS in Cd intoxication, a prolonged QT interval and a baseline lowering in Pb+Cd intoxication. A variety of changes has been found with respect to the diameter of cardiomyocytes and the thickness of aortic wall layers in Pb and/or Cd intoxication. Any toxic exposure resulted in the decrease in number of nuclei per unit area of myocardium histological preparation.

Keywords: lead, cadmium, subchronic intoxication, ECG, blood pressure, cardiomyocyte.

Quote: S.V. Klinova, I.A. Minigalieva, L.I. Privalova, M.P. Sutunkova, V.B. Gurvich, Ju.V. Ryabova, S.N. Solovjeva, V.G. Panov, I.E. Valamina, I.N. Chernishov, B.A. Katsnelson. Lead and cadmium subchronic intoxication in rats as a factor of damage to the cardiovascular system. *Toxicological Review.* 2020; 4: 3-11

Переработанный материал поступил в редакцию 23.12.2019 г.



ОСОБЕННОСТИ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ЧЕРЕЗ СТРЕПТАВИДИН- БИОТИНОВУЮ СИСТЕМУ ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО СЕЛЕКЦИИ АПТАМЕРОВ

Д.А. Белинская¹, Ю.В. Челуснова²,
В.В. Абзианидзе², Н.В. Гончаров^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

²Федеральное государственное унитарное предприятие «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства, 188663, г.п. Кузьмолловский, Ленинградская область, Российская Федерация

Отравления фосфорорганическими соединениями (ФОС) занимают в общем числе экзотоксикозов одно из ведущих мест. Детоксикацию ФОС на первом этапе попадания в организм можно обеспечить с помощью ДНК- или РНК-аптамеров, связывающих яд в кровеносном русле. В настоящее время основным способом поиска аптамеров является экспериментальный метод систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX). В процессе селекции аптамеров необходима иммобилизация молекулы-мишени через стрептавидин-биотинный комплекс. Поскольку молекула отравляющего вещества имеет небольшие размеры, для увеличения ее доступности для связывания с аптамером необходимо использование спейсера между ФОС и биотином. Цель данной работы – на примере параоксона оптимизировать процедуру селекции аптамеров к ФОС путем увеличения доступности иммобилизованной через стрептавидин-биотинный комплекс молекулы отравляющего вещества. Для этого методами молекулярного моделирования были протестированы три спейсера между ФОС и биотином: три звена полиэтиленгликоля (3-ПЭГ), четыре звена полиэтиленгликоля (4-ПЭГ) и аминоксепсил. Конформация комплекса биотинилированного параоксона со стрептавидином и процесс взаимодействия параоксона со связывающим фрагментом аптамера были смоделированы методами молекулярного докинга и молекулярной динамики. Оценка возможности биотинилированного параоксона связаться с аптамером была проведена путем анализа площади поверхности параоксона, доступной растворителю, а также с помощью расчета свободных энергий связывания. Было показано, что только в случае использования аминоксепсила иммобилизованный параоксон может связаться с аптамером. На заключительном этапе был проведен синтез параоксона, связанного с биотином через аминоксепсил.

Ключевые слова: фосфорорганические соединения, селекция аптамеров, иммобилизация, молекулярное моделирование, синтез.

Цит: Д.А. Белинская, Ю.В. Челуснова, В.В. Абзианидзе, Н.В. Гончаров. Особенности иммобилизации фосфорорганических соединений через стрептавидин-биотинную систему для экспериментов по селекции аптамеров. Токсикологический вестник. 2020; 4:

Белинская Дарья Александровна (Belinskaya Daria Alexandrovna), кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории сравнительной физиологии сенсорных систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, d_belinskaya@mail.ru;

Челуснова Юлия Викторовна (Chelusnova Yulia Viktorovna), научный сотрудник лаборатории химического моделирования ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, chelusnovayulia@mail.ru;

Абзианидзе Виктория Вадимовна (Abzianidze Victoria Vadimovna), кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химического моделирования ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России

Гончаров Николай Васильевич (Goncharov Nikolay Vasil'evich), доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России; заведующий лабораторией сравнительной биохимии ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, ngoncharov@gmail.com

Введение. Отравления фосфорорганическими соединениями (ФОС) занимают в общем числе экзотоксикозов одно из ведущих мест [1]. Эффективность антидотной, симптоматической и профилактической терапии можно существенно повысить за счет усиления детоксикации ФОС на первом этапе поступления яда в организм – в кровеносном русле, что позволит уменьшить токсическое действие ФОС на ацетилхолинэстеразу нервно-мышечных и нейрональных синапсов. Высокоаффинное связывание ФОС в кровеносном русле можно обеспечить с помощью ДНК- или РНК-аптамеров, представляющих собой короткие нити олигонуклеотидов [2].

Основным способом поиска аптамеров в настоящее время является метод систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением – SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Процесс основан на поэтапной селекции и амплификации олигонуклеотидных последовательностей, обладающих максимальным сродством к молекуле-мишени [3]. При селекции аптамеров к высокомолекулярным соединениям для этапа инкубации молекула-мишень иммобилизуется через стрептавидин-биотиновый комплекс, затем к иммобилизованным мишеням добавляют олигонуклеотиды [4]. В случае ФОС применение этого подхода затруднительно, поскольку молекула отравляющего вещества имеет небольшие размеры и ее доступность на поверхности стрептавидин-биотинового комплекса ограничена. Для увеличения ее доступности для связывания с аптамером необходимо использование полимерного спейсера между ФОС и биотином. Цель представленного исследования – с помощью компьютерного моделирования на примере параоксона протестировать возможность применения следующих спейсеров: трех звеньев полиэтиленгликоля (3-ПЭГ), четырех звеньев полиэтиленгликоля (4-ПЭГ) и аминокексила, а затем синтезировать наиболее подходящий из них. Химические формулы параоксона, связанного с биотином с помощью спейсеров, представлены на рисунке 1.

Материалы и методы исследования. Молекулярный докинг биотинилированного параоксона в сайт связывания стрептавидина проводили с помощью программного пакета Autodock4.0 [5]. Трехмерные модели лигандов конструировали с помощью программного пакета HyperChem [6]. В качестве трехмерной модели стрептавидина использовали данные рентгеноструктурного анализа молекулы стрептавидина со связанной молекулой биотина из базы данных белковых структур [7], код структуры 3gu2 [8]. В исследуемом центре связывания белка строили решетку аппроксимации размером 60 узлов в x -, y -, и z -направлении и с шагом 0.0375 нм. Для поиска оп-

тимальных конформаций использовали ламарковский генетический алгоритм [5] с числом запусков равным 50. Конформацию с минимальным значением константы диссоциации K_d отбирали как итоговую и использовали в качестве стартовой структуры для дальнейшей симуляции методом молекулярной динамики.

Конформационные изменения во времени комплексов биотинилированного параоксона со стрептавидином рассчитывали методом молекулярной динамики с помощью программного пакета Gromacs 5.0.4 [9] с использованием силового поля CHARMM [10]. Комплекс, полученный методом молекулярного докинга, виртуально помещали в периодическую кубическую решетку, заполненную молекулами воды. Для нейтрализации заряда в систему добавляли ионы натрия. Для описания молекул воды использовали модельный потенциал, описанный в работе в [11]. Для поддержания в расчетном эксперименте постоянной температуры 300 К и постоянного давления 1 бар применяли термостат с масштабируемыми скоростями «V-rescale» [12] и баростат Берендсена [13] с временными константами 0,1 пс и 1 пс, соответственно. Дальние электростатические взаимодействия рассчитывали методом Эвальда [14]. Взаимодействия Леннард-Джонса не учитывали при межатомном расстоянии больше 1 нм. Длины связей поддерживали постоянными с помощью алгоритма LINCS [15]. Расчету конформационных изменений методом молекулярной динамики предшествовала релаксация системы длиной 100 пс. Для исследования конформационных изменений параоксона, иммобилизованного через стрептавидин-биотиновую систему, время симуляции составило 5 нс с шагом интегрирования 0,002 пс.

Оценку энергий связывания проводили методом, сочетающим использование молекулярной механики и решение уравнения Пуассона-Больцмана (molecular mechanics – Poisson Boltzmann surface area, MM-PBSA) [16] с помощью модуля `g_mmpbsa` [17], встроенного в программный пакет Gromacs. Метод MM-PBSA позволяет оценить энергию образования комплекса рецептор-лиганд из траекторий молекулярной динамики. В этом подходе свободная энергия связывания ΔG_{bind} рассчитывается по формуле (1):

$$\Delta G_{\text{bind}} = G_{\text{RL}} - (G_{\text{R}} + G_{\text{L}}) \quad (1),$$

где G – свободная энергия системы, индекс R ссылается на рецептор, L – лиганд, RL – комплекс рецептор-лиганд. Свободная энергия каждой молекулы или комплекса рассчитывается по формуле (2):

$$G_{\text{X}} = E_{\text{MM}} + G_{\text{sol}} - TS_{\text{MM}} \quad (2),$$

где индекс X ссылается на рецептор, лиганд или их комплекс, E_{MM} – потенциальная энергия молекулы или комплекса, рассчитанная методом мо-

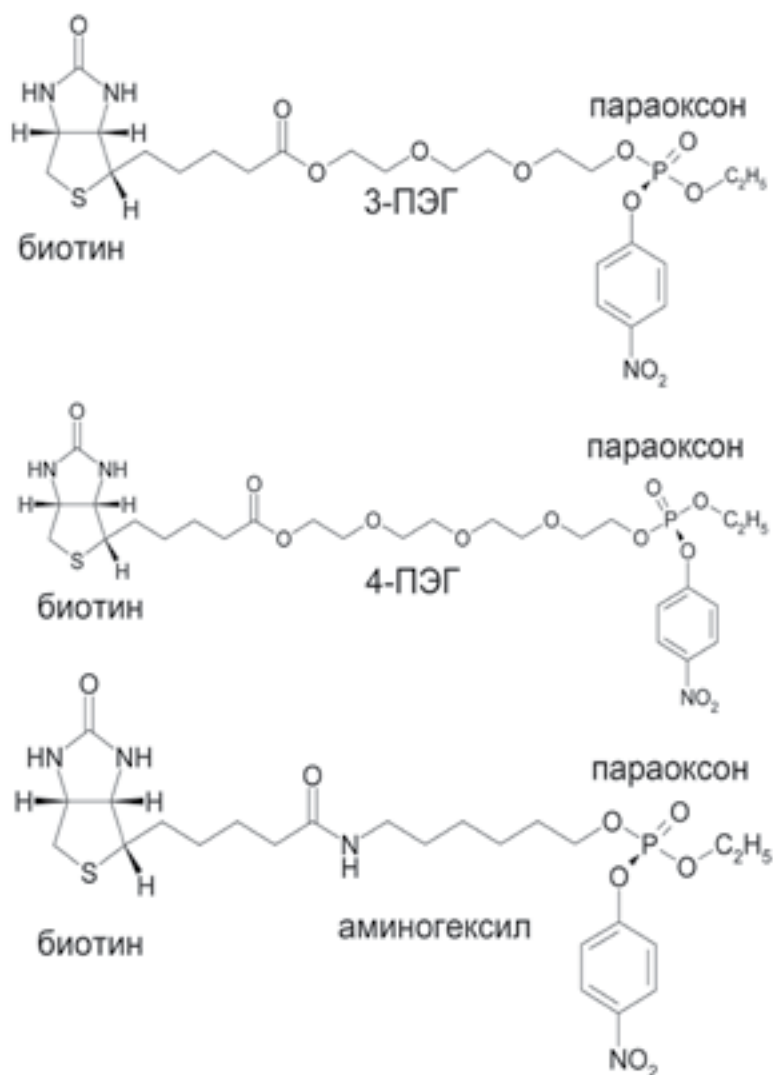


Рис. 1. Параоксон, биотинилированный с помощью трех звеньев полиэтиленгликоля (3-ПЭГ), четырех звеньев полиэтиленгликоля (4-ПЭГ) и аминогексила в качестве спейсеров.

лекулярной механики в вакууме, G_{solv} – свободная энергия сольватации, TS – энтропийная составляющая свободной энергии системы в вакууме, T и S – температура и энтропия соответственно.

Свободная энергия сольватации рассчитывается по формуле (3):

$$G_{\text{solv}} = G_{\text{polar}} + G_{\text{non-polar}} \quad (3),$$

где G_{polar} и $G_{\text{non-polar}}$ – вклад полярных и неполярных взаимодействий соответственно в свободную энергию сольватации.

E_{MM} рассчитывается как сумма ковалентных, ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий.

Предыдущие исследования выявили, что в течение симуляции молекулярной динамикой происходят очень большие колебания энтропии. Было показано, что расчет только энтальпийного компонента лучше коррелирует с эксперимен-

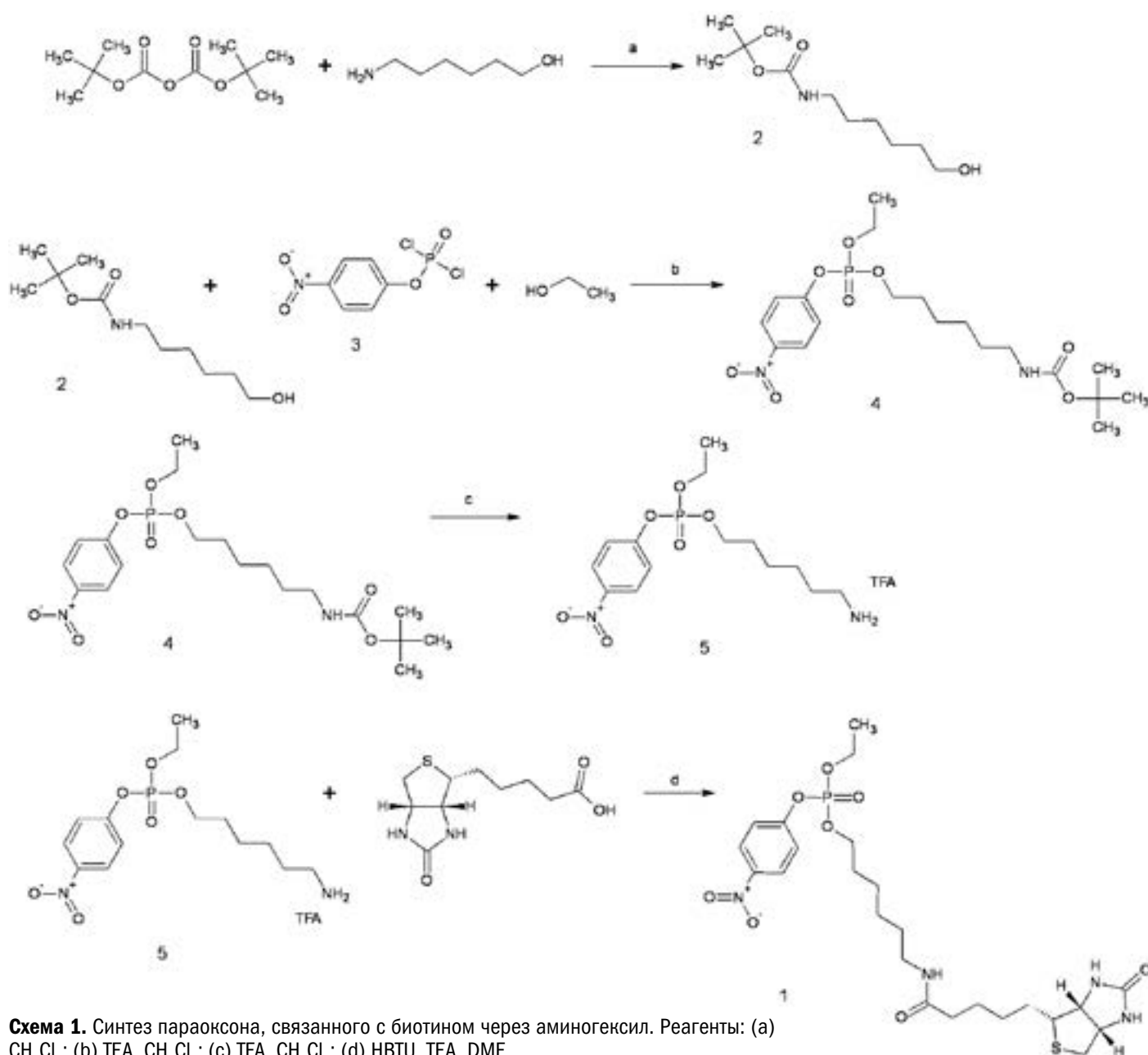
тальными данными, чем расчет полной свободной энергии [17]. Поэтому в нашей работе мы рассчитывали только энтальпийную составляющую свободной энергии образования комплекса.

В данной работе значение свободной энергии образования комплекса рассчитывали каждые 10 пс в течение симуляции. Таким образом, результатом запуска модуля g_mmpbsa для одной траектории молекулярной динамики было 500 значений свободной энергии. Итоговое значение рассчитывали из полученных 500 значений как среднее \pm стандартное среднее отклонение.

Материалы для синтеза биотинилированного параоксона (схема 1) были получены с помощью следующих процедур:

трет-Бутил (6-гидроксигексил) карбамат (соединение 2). К раствору 1 г (8,53 ммоль) аминогексанола в 10 мл хлористого метилена медленно прикапали 2,05 г (9,39 ммоль) бок-ангидрида. По окончании прикапывания раствор перемешивали еще 2 часа, затем упарили досуха в вакууме. Получили 1,85 г (100 %), который использовали в следующей стадии без дополнительной обработки. HPLC-MS $[M+H]^+$ m/z вычислено $C_6H_{15}NO$ (- бок): 118.17, получено: 118.12.

(6-[(трет-Бутоксикарбонил)амино]гексил этил 4-нитрофенилфосфат (соединение 4). К раствору 0,3 г (1,38 ммоль) соединения 2 в 5 мл безводного хлористого метилена прибавили 0,353 г (1,38 ммоль) паранитрофенилдихлорфосфата (соединение 3). Затем прибавили 0,279 г (2,76 ммоль) сухого триэтиламина и оставили на ночь при перемешивании под аргоном. Затем прибавили 0,095 г (2,07 ммоль) безводного этилового спирта и 0,140 г (1,38 ммоль) сухого триэтиламина. Реакционную массу перемешивали 2 часа под аргоном. Контроль реакции вели по HPLC-MS. Образовавшийся осадок триэтиламина гидрохлорида отфильтровали, фильтрат упарили досуха в вакууме. Продукт выделяли на хроматографической колонке (элюент DCM : MeOH – 20:1, $R_f=0,45$ для соотношения 10:1), получили 120 мг (20 %) соединения 4 в виде желтоватого масла и 230 мг (37 %) (6-[(трет-бутоксикарбонил)амино]гексил 4-нитрофенил гидрофосфата в виде



желтоватого масла в качестве основного побочного продукта. HPLC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z вычислено $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$ (- бок): 347.19, получено: 347.05.

6-Аминогексил этил 4-нитрофенилфосфата трифторацетат (соединение 5). 0,120 г (0,269 ммоль) соединения 4 растворили в 3 мл хлористого метилена, прибавили 0,3 г трифторуксусной кислоты. Реакционную массу оставили на ночь при интенсивном перемешивании. Затем прибавили еще 0,3 г трифторуксусной кислоты и перемешивали дополнительно 5 часов. Контроль за прохождением реакции осуществляли по тонкослойной хроматографии (DCM: MeOH – 10 : 1, $R_f=0,55$) до полного исчезновения пятна исходного соединения. Растворитель отгоняли в вакууме,

дополнительно переупаривали с 5 мл хлористого метилена, получили 0,131 г соединения 5 в виде масла коричневатого цвета. Продукт использовали в следующей стадии без дополнительной обработки. HPLC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$: 347.19, получено: 346.98.

*6-((5-[(3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-оксогексагидро-1*H*-тиено[3,4-*d*]имидазол-4-ил)пентаноил)амино)гексил этил 4-нитрофенил фосфат* (соединение 1). В колбу загрузили 0,124 г (0,269 ммоль) соединения 5, 4 мл безводного диметилформамида и 0,24 мл сухого триэтиламина до $\text{pH}=8$. Смесь перемешивали 15 минут под аргоном. Затем прибавили 0,053 г (0,215 ммоль) биотина и 0,102 г (0,269 ммоль) HBTU. Оставили на ночь при пере-

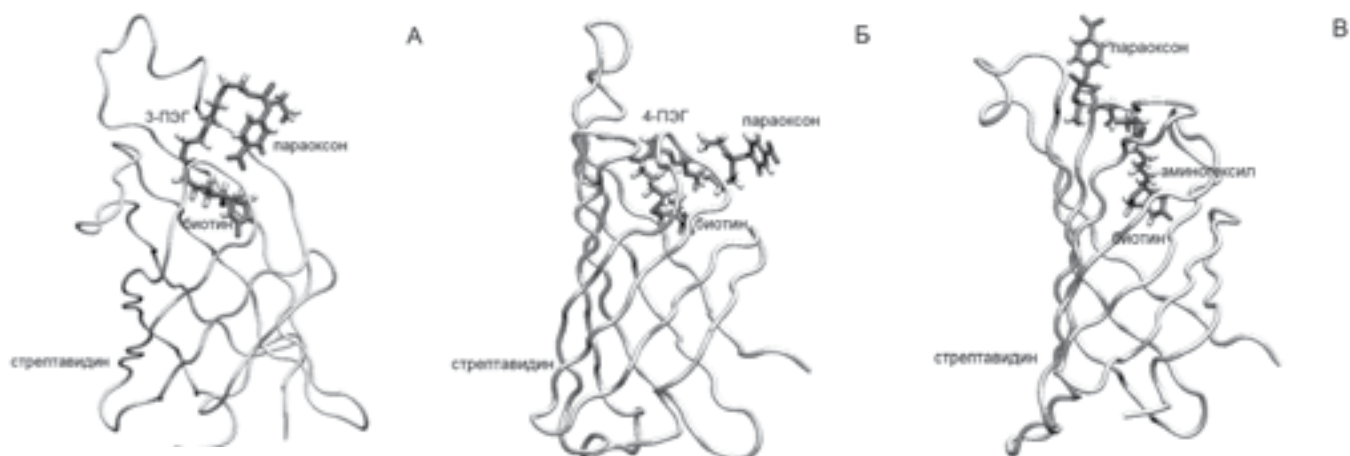


Рис. 2. Конформация параоксона, иммобилизованного через стрептавидин-биотиновый комплекс с использованием в качестве линкеров трех звеньев полиэтиленгликоля (3-ПЭГ, А), четырех звеньев полиэтиленгликоля (4-ПЭГ, Б), аминоксисила (В), по данным молекулярной динамики.

мешивании под аргоном. Растворитель отогнали в вакууме досуха. Полученное масло очищали на хроматографической колонке (DCM : MeOH – 100 : 1 → 20 : 1, $R_f = 0,5$ при соотношении 9 : 1), получили 63 мг грязного продукта, далее очищали на препаративном хроматографе, получили 12 мг (10 %) соединения 1. HPLC-MS $[M+H]^+ m/z$ вычислено $C_{24}H_{37}N_4O_8PS$: 573.21, получено: 573.13.

Результаты и обсуждение. На первом этапе был проведен молекулярный докинг параоксона, биотинилированного через три изучаемых спейсера, в сайт связывания стрептавидина. Полученные конформации мы сравнили со структурой биотин-стрептавидин, полученной методом рентгеноструктурного анализа [8]. Для всех трех спейсеров в конформации с минимальным значением константы диссоциации K_d положение биотинового фрагмента лиганда совпадает с положением биотина в центре связывания стрептавидина. Эта конформации стали стартовыми для расчета конформационных изменений методом молекулярной динамики. Длина траектории составила 5 нс.

По полученным траекториям были рассчитаны зависимости от времени величин среднеквадратичных отклонений (root mean square deviation – RMSD) атомов $C\alpha$ молекулы стрептавидина от их начального положения. Анализ полученной зависимости показал, что через 1-2 нс для всех трех исследуемых комплексов значение RMSD выходит на плато, что говорит о стабилизации системы. Конечные конформации комплексов представлены на рисунке 2.

По полученным траекториям была построена временная зависимость площади поверхности параоксона, доступной растворителю (solvent accessible surface area, SASA, рис. 3).

В случае использования спейсера 3-ПЭГ бензольное кольцо и нитрогруппа параоксона «спрятаны» в углублении на поверхности стрептавидина (рис. 2А). Анализ этого комплекса показал, что атомы кислорода нитрогруппы параоксона находятся в близком контакте с NH-группами остова остатков Gly48 и Asn49, по всей видимости, между кислородами параоксона и водородами этих NH-групп образуются водородные связи, удерживающие параоксон внутри глобулы белка. Значение параметра SASA параоксона оставалось самым низким на протяжении всей симуляции (рис. 3). Полученные данные указывают на то, что 3-ПЭГ слишком короткий и не может быть использован в качестве спейсера для иммобилизации параоксона на биотине.

В случае использования спейсеров 4-ПЭГ и аминоксисила, спейсер достаточно длинный, доступность параоксона для взаимодействия с олигонуклеотидами на протяжении симуляции выше, чем в случае использования 3-ПЭГ (рис. 3). Более того, согласно значениям SASA, 4-ПЭГ более предпочтителен, чем аминоксисил. Однако за счет разной химической структуры спейсеров (четыре отрицательно заряженных атома кислорода у 4-ПЭГ и алифатическая углеводородная цепочка у аминоксисила), положение параоксона относительно поверхности стрептавидина различно (рис. 4Б, В). Скажется ли такое различие на эффективности взаимодействия параоксона с олигонуклеотидами, мы проверили на следующем этапе исследования.

Ранее нами методами молекулярного моделирования были найден ДНК-аптамер, максимально эффективно связывающих параоксон:

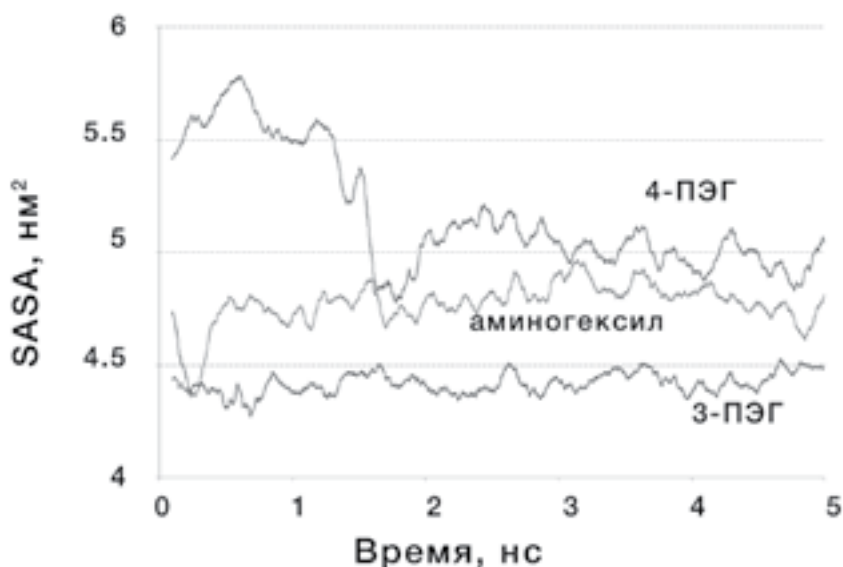


Рис. 3. Зависимость от времени площади поверхности, доступной растворителю (SASA), параоксона, иммобилизованного через стрептавидин-биотиновый комплекс с использованием в качестве спейсеров трех звеньев полиэтиленгликоля (3-ПЭГ), четырех звеньев полиэтиленгликоля (4-ПЭГ) и аминогексила.

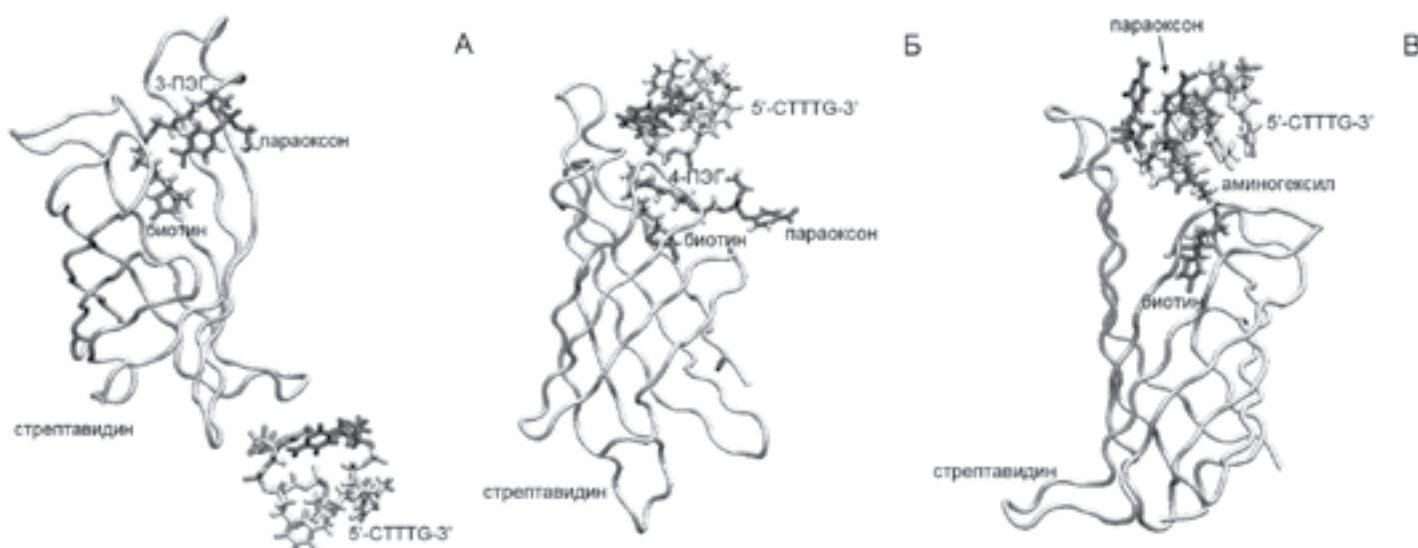


Рис. 4. Комплекс связывающего фрагмента аптамера к параоксону 5'-СТТТГ-3' с параоксоном, иммобилизованного через стрептавидин-биотиновый комплекс с использованием в качестве линкеров трех звеньев полиэтиленгликоля (3-ПЭГ, А), четырех звеньев полиэтиленгликоля (4-ПЭГ, Б), аминогексила (В), по данным молекулярной динамики.

5'-AGCTTGCTGC¹⁰AGCGATCTTT²⁰GATCGC CACA³⁰GAGCT-3',

в котором нуклеотиды С17, Т18, Т19, Т20, а также частично G21 непосредственно взаимодействуют с молекулой параоксона. Согласно нашим расчетам, значение свободной энергии связывания этого аптамера с параоксоном составило -124.4 ± 13.6 кДж/моль.

Мы проверили способность иммобилизованного параоксона связываться с этим нуклеотидным фрагментом. К комплексам стрептавидина с биотинилированным параоксоном, полученным ме-

тодом молекулярного докинга, был добавлен пентануклеотид 5'-СТТТГ-3', который виртуально был помещен в непосредственной близости от параоксона. Дальнейшие конформационные изменения этих трех систем были рассчитаны методом молекулярной динамики, свободные энергии связывания пентануклеотида с параоксоном были оценены методом ММ-РBSA. Полученные в результате расчета структуры представлены на рисунке 4. Рассчитанные значения свободных энергий связывания пентануклеотида с параоксоном представлены в таблице.

Энергетические характеристики связывания пентануклеотида 5'-СТТГ-3' с параоксоном, иммобилизованным через стрептавидин-биотиновый комплекс с использованием в качестве линкеров трех звеньев полиэтиленгликоля (3-ПЭГ), четырех звеньев полиэтиленгликоля (4-ПЭГ) и аминоксисла

| Энергия, кДж/моль | 3-ПЭГ | 4-ПЭГ | аминоксисл |
|------------------------|--------|--------|------------|
| E_{vdw} | -28±17 | -53±30 | -152±12 |
| E_{el} | -28±16 | -25±13 | -125±26 |
| E_{MM} | -56±27 | -78±40 | -276±21 |
| ΔG_{polar} | 58±35 | 86±30 | 218±30 |
| $\Delta G_{non-polar}$ | -3±2 | -6±3 | -14±1 |
| ΔG | -1±22 | 2±30 | -72±23 |

E_{vdw} – энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий пентануклеотида и параоксона, E_{el} – энергия электростатических взаимодействий пентануклеотида и параоксона, E_{MM} – потенциальная энергия взаимодействия пентануклеотида и параоксона, $E_{MM} = E_{vdw} + E_{el} \cdot G_{polar}$ и $G_{non-polar}$ – вклад полярных и неполярных взаимодействий в свободную энергию сольватации, ΔG – итоговое значение свободной энергии образования комплекса (подробнее см. раздел Материалы и методы исследования).

В случае использования спейсера 3-ПЭГ, пентануклеотид не смог связаться с параоксоном, и более того, полностью оторвался от комплекса стрептавидин-параоксон (рис. 4А). В случае использования спейсера 4-ПЭГ фрагмент аптамера также не смог связаться с параоксоном. Отрицательно заряженный пентануклеотид связался с областью поверхности белка, ограниченной с двух сторон положительно заряженными Arg84 и Lys121 (рис. 4Б). Более того, и в случае 3-ПЭГ, и в случае 4-ПЭГ, средняя по траектории свободная энергия связывания фрагмента аптамера с параоксоном близка к нулю (табл.), что говорит о нулевой аффинности пентануклеотида к параоксону.

Лишь в случае использования аминоксисла в качестве спейсера фрагмент аптамера оставался связанным с параоксоном в течение всех 5 нс расчетного времени. Расчет свободной энергии связывания фрагмента аптамера с параоксоном показал максимальную среди трех спейсеров аффинность пентануклеотида к отравляющему агенту (табл.).

Анализируя вклад различных взаимодействий в суммарную свободную энергию (табл.), можно заметить, что для всех трех спейсеров E_{vdw} примерно в равной степени компенсируется энергией сольватации, то есть чем сильнее стерическое взаимодействие между атомами нуклеотида и параоксона, тем больше требуется энергии на вытеснение молекул воды. Поэтому можно сделать вывод, что возможность связывания биотинили-

рованного параоксона с пентануклеотидом зависит преимущественно от электростатических взаимодействий в системе.

Таким образом, согласно полученным нами данным, в экспериментах по селекции аптамеров к ФОС для иммобилизации отравляющих агентов через стрептавидин-биотиновый комплекс лучшим спейсером является аминоксисл.

На заключительном этапе был проведен синтез параоксона, связанного с биотином через аминоксисл. Процесс синтеза представлен на схеме 1. Бокирование 6-аминоксисанола проводили по стандартной методике, к раствору 6-аминоксисанола в хлористом метиле прикапывали бок-ангидрид. Реакция проходит при комнатной температуре в течение 2 часов, с последующей отгонкой растворителя. Соединение 2 использовали в следующей стадии без дополнительной очистки.

Замещение атомов хлора паранитрофенил-дихлорфосфата (соединение 3) проводили по методике, описанной в [18]. Реакцию проводили в безводном хлористом метиле в присутствии триэтиламина в качестве акцептора хлористого водорода при комнатной температуре, с последующей очисткой на хроматографической колонке (элюент DCM : MeOH – 20 : 1, Rf = 0.45) получали продукт с 20 % выходом. В качестве основного побочного продукта образуется (6-[(трет-бутоксикарбонил)амино]гексил 4-нитрофенил гидрофосфат с выходом 37 %.

Бок-защиту соединения 4 снимали в хлористом метиле в присутствии трифторуксусной кислоты, с образованием соответствующей трифтороацетатной соли 7. Контроль прохождения реакции вели по HPLC-MS. Растворитель отгоняли в вакууме досуха и использовали полученный продукт в следующей стадии без дополнительной очистки.

Образование амидной связи проводили по известной методике с использованием HBTU в качестве активатора карбоксильной группы. Реакцию проводили в безводном N,N-диметилформамиде в присутствии триэтиламина при комнатной температуре. Контролировали ход реакции по HPLC-MS. По данным жидкостной хроматографии в смеси присутствует исходное соединение, дальнейшая выдержка не приводит к увеличению продукта. Реакция идет с большим количеством побочных соединений, продукт чистили на хроматографической колонке (элюент DCM : MeOH – 100 : 1 → 20 : 1, Rf = 0.5 при соотношении DCM : MeOH – 9 : 1) и препаративном хроматографе с выходом 10 %.

Важность правильного выбора спейсера для биотехнологических экспериментов обсуждается во многих исследованиях. Например, еще в 1994 году авторы работы [19] показали существенное влияние длины спейсера на ферментативную активность папаина, иммобилизованного на пористых хитозановых бусах. В работе [20] антимикробный пептид цекропин P1 иммобилизовывали на самособирающемся монослое с применением полиэтиленгликолевых спейсеров разной длины. Оказалось, что длина ПЭГ влияет на конформацию CP1 и, как следствие, на его антибактериальную эффективность. В нашем исследовании мы впервые продемонстрировали, что при подборе спейсера для экспериментов SELEX важно учитывать не только его длину, но и электростатические характеристики.

Мы не ставили перед собой задачу проводить подробный анализ межмолекулярных взаимодействий в системе стрептавидин-биотин-спейсер-параоксон-аптамер. Но нельзя не обратить внимание на тот факт, что иммобилизованный на стрептавидине (даже на лучшем спейсере) параоксон, согласно данным *in silico*, слабее взаимодействует с олигонуклеотидной последовательностью, чем в свободном состоянии. А в случае использования спейсера 4-ПЭГ, олигонуклеотид и вовсе закорился на молекуле стрептавидина и стал недоступным для параоксона. Это наблюдение наводит на мысль, что в условиях *in vivo* в кровеносном русле аптамер будет работать совсем не так, как в условиях идеального раствора *in vitro*. Тем не менее, проводится очень мало исследований, изучающих возможность взаимодействия полученных *in vitro* аптамеров с другими

компонентами «живой» среды, в первую очередь белками плазмы крови. В случае стрептавидина, олигонуклеотид закорился на положительно заряженные Arg84 и Lys121. На поверхности альбумина, мажорного белка плазмы крови, также присутствуют положительно заряженные аминокислоты [21], которые могут перетянуть на себя аптамер. Эти догадки подтверждаются и экспериментально. В работе [22] экспериментальным методом MALDI-MS и методами молекулярного моделирования было исследовано взаимодействие трех аптамеров к различным мишеням с сывороточным альбумином и было показано, что все они могут связываться с этим белком и частично терять биологическую доступность в плазме крови, а, значит, и терапевтическую эффективность. Связывающая и эстеразная активность альбумина является объектом пристального внимания в последние годы, происходит переоценка роли этого белка в транспорте и возможной детоксикации ФОС [23]. Авторы работы [24] методом плазмонного резонанса исследовали взаимодействие трёх известных аптамеров к тромбину с альбумином и другими релевантными компонентами плазмы крови – протромбином и ингибиторами тромбина. На основании полученных данных они предсказали, что один из трёх аптамеров, работающий *in vitro*, не будет достаточно эффективно работать *in vivo*. Таким образом, получение аптамеров к ФОС с помощью методов SELEX и молекулярного моделирования не является конечным этапом перед их тестированием. Требуется анализ взаимодействия полученных олигонуклеотидов с компонентами плазмы крови, чтобы предсказать, будет ли аптамер работать *in vivo*, и если нет, из-за каких именно компонентов среды.

Заключение. В представленной работе впервые было показано, что в экспериментах по селекции аптамеров к ФОС для иммобилизации отравляющих агентов через стрептавидин-биотиновый комплекс лучшим спейсером является аминоксисил. Впервые был проведен химический синтез параоксона, биотинилированного через аминоксисил в качестве спейсера. Впервые продемонстрировано, что при подборе спейсера для экспериментов SELEX важно учитывать не только его длину, но и электростатические характеристики. Полученная информация об эффективной иммобилизации отравляющих веществ может быть использована в других областях экспериментальной токсикологии и медицины.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-015-00304) и в рамках госзадания АААА-А18-118012290142-9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- King A.M., Aaron C.K. Organophosphate and carbamate poisoning. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 2015; 33: 133-51.
- Ku T.H., Zhang T., Luo H., Yen T.M., Chen P.W., Han Y. et al. Nucleic acid aptamers: an emerging tool for biotechnology and biomedical sensing. *Sensors (Basel)* 2015; 15: 16281-313.
- Darmostuk M., Rimpelova S., Gbelcova H., Ruml T. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol. Adv.* 2015; 33: 1141-61.
- Bing T., Yang X., Mei H., Cao Z., Shanguan D. Conservative secondary structure motif of streptavidin-binding aptamers generated by different laboratories. *Bioorg. Med. Chem.* 2010; 18(5): 1798-805.
- Morris G.M., Goodsell D.S., Halliday R.S., Huey R., Hart W.E., Belew R.K. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 1998; 19: 1639-62.
- Froimowitz M. HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling. *Biotechniques* 1993; 14: 1010-13.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H. et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28: 235-42.
- Le Trong I., Wang Z., Hyre D.E., Lybrand T.P., Stayton P.S., Stenkamp R.E. Streptavidin and its biotin complex at atomic resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2011; 67: 813-21.
- Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX.* 2015; 1-2: 19-25.
- Zhu X., Lopes P.E., Mackerell A.D. Jr. Recent developments and applications of the CHARMM force fields. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2012; 2: 167-85.
- Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., Hermans J. Interaction models for water in relation to protein hydration. In: Pullman B., ed. *Intermolecular forces*. Dordrecht: Reidel D. Publishing Company; 1981: 331-42.
- Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 2007; 126: 014101.
- Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., di Nola A., van Gunsteren W.F., Haak J.R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 1984; 81: 3684-90.
- Darden T., York D., Pedersen L. Particle mesh Ewald: An N log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 1993; 3: 10089-92.
- Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem.* 1997; 8: 1463-73.
- Genheden S., Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* 2015; 10: 449-61.
- Kumari R., Kumar R. *Open Source Drug Discovery Consortium*, Lynn A. g_mmpbsa – a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J. Chem. Inf. Model.* 2014; 54: 1951-62.
- Shizuka M., Schrader T.O., Snapper M.L. Synthesis of isoprostanyl phosphatidylcholine and isoprostanyl phosphatidylethanolamine. *J. Org. Chem.* 2006; 71(4): 1330-4
- Itoyama K., Tanibe H., Hayashi T., Ikada Y. Spacer effects on enzymatic activity of papain immobilized onto porous chitosan beads. *Biomaterials* 1994; 15(2): 107-12.
- Han X., Liu Y., Wu F.-G., Jansensky J., Kim T., Wang Z. et al. Different interfacial behaviors of peptides chemically immobilized on surfaces with different linker lengths and via different termini. *J. Phys. Chem. B* 2014; 118: 2904-12.
- Panman W., Japrun D., Pongprayoon P. Exploring the interactions of a DNA aptamer with human serum albumins: simulation studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2017; 35(11): 2328-36.
- Silva D., Missailidis S. Analyzing interactions of aptamers to proteins. *AIP Conf. Proc.* 2014; 1618: 594-7.
- Goncharov N.V., Belinskaia D.A., Shmurak V.I., Terpilowski M.A., Jenkins R.O., Avdonin P.V. Serum albumin binding and esterase activity: mechanistic interactions with organophosphates. *Molecules* 2017; 22: E1201.
- Trapaidze A., Herault J.P., Herbert J.M., Bancaud A., Gue A.M. Investigation of the selectivity of thrombin-binding aptamers for thrombin titration in murine plasma. *Biosensors and Bioelectronics* 2016; 78: 58-66.

D.A. Belinskaya¹, Yu.V. Chelusnova², V.V. Abzianidze², N.V. Goncharov^{1,2}

FEATURES OF ORGANOPHOSPHATES IMMOBILIZATION VIA STREPTAVIDIN-BIOTIN SYSTEM FOR EXPERIMENTS ON SELECTION OF APTAMERS

¹I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 194223, Saint Petersburg, Russian Federation

²Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical Biological Agency, 188663, p.o. Kuz'molovskiy, Leningrad Region, Russian Federation

Poisoning with organophosphorus compounds occupy one of the leading places in exotoxicosis. At the first stage, the detoxification of organophosphates can be provided with the help of DNA or RNA aptamers that bind the poison in the bloodstream. Currently, the main method of searching for aptamers is the experimental method of systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). In the process of aptamer selection, the target molecule must be immobilized via the streptavidin-biotin complex. Since the poison molecule is small in size, to increase its availability for binding to aptamer, it is necessary to use a spacer between organophosphorus compounds and biotin. The aim of this work was to optimize the selection of aptamers for organophosphorus compounds by increasing the availability of a poison molecule immobilized via the streptavidin-biotin complex on the example of paraoxon. For this purpose, three spacers between organophosphorus compounds and biotin were tested using molecular modeling methods: three links of polyethylene glycol (3-PEG), four links of polyethylene glycol (4-PEG) and aminohexyl. The conformation of the biotinylated paraoxon complex with streptavidin and the interaction of paraoxon with the binding fragment of the aptamer were modeled using molecular docking and molecular dynamics methods. The ability of biotinylated paraoxon to bind to the aptamer has been evaluated by analyzing the surface area of the paraoxon available to the solvent, as well as by calculating the free binding energies. It has been shown that only in the case of aminohexyl immobilized paraoxon can contact the aptamer. At the final stage, the synthesis of paraoxon bound to biotin via aminohexyl was carried out.

Keywords: organophosphorus compounds, selection of aptamers, immobilization, molecular modeling, synthesis.

Quote: D.A. Belinskaya, Yu.V. Chelusnova, V.V. Abzianidze, N.V. Goncharov. Features of organophosphates immobilization via streptavidin-biotin system for experiments on selection of aptamers. *Toxicological Review.* 2020; 4: 12-20

Материал поступил в редакцию 20.09.2019 г.

КОРРЕКЦИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Г.А. Протасова, Л.В. Шабашева,
В.Б. Попов

ФГУП НИИ гигиены профпатологии
и экологии человека ФМБА России,
188663, Ленинградская обл.,
Всеволожский р-н, г. п. Кузьмоловский,
Российская Федерация

Проведена оценка эффективности использования клеток фетальной печени (КФП) для коррекции острого токсического гепатита, индуцированного CCl_4 . Воздействие CCl_4 в дозе 3000 мг/кг приводило к выраженным центрлобулярным некрозам, гидропической, белковой, углеводной и жировой дистрофиям, сосудистым расстройствам. Изучена динамика морфологических изменений в печени с оценкой роли собственного регенераторного потенциала (с использованием патоморфологических, гистохимических и иммунофлуоресцентных методов исследования). Проведено фенотипирование клеточного материала, выявлена экспрессия энтодермальных и мезодермальных маркеров, характерных для печеночного эпителия, гемопоэтических стволовых клеток и клеток мезенхимы. Через 3 сут. после трансплантации КФП отмечали снижение интенсивности некротических и дистрофических процессов в паренхиме печени, у некоторых животных происходило восстановление трабекулярного строения центральных зон печени, а к 5-7 сут. введение фетальных клеток устраняло у части животных сосудистые нарушения. Полученные результаты могут служить обоснованием для использования клеток фетальной печени при лечении острых токсических гепатитов.

Ключевые слова: острый гепатит, коррекция, фетальные клетки.

Цит: Г.А. Протасова, Л.В. Шабашева, В.Б. Попов. Коррекция токсического поражения печени стволовыми клетками. Токсикологический вестник. 2020; 4: 21-26

Введение. Промышленные токсиканты, природные токсины, лекарственные средства, алкоголь, вирусы и т. п. вызывают разнообразные по механизмам действия и клиническим проявлениям патологические изменения в печени [1, 2]. В мире насчитывается более 2 млрд. человек с различной гепатобилиарной патологией, что в 100 раз превышает распространенность ВИЧ-инфекции. Проблема заболеваний печени токсического генеза приобретает все большую актуальность в связи с высокими темпами развития химической и фармацевтической промышленности, внедрением их продукции во все сферы жизни человека. Среди этиологических факторов риска развития токсических поражений печени особая роль принадлежит нерациональной фармакотерапии. Согласно статистическим данным только от побочных эффектов применения медикаментозных средств в мире ежегодно страдает до 1 млн. человек, причем в 180 тысячах случаев именно негативное побочное действие лекарств является непосредственной причиной летально-

го исхода [3]. Проблема лечения патологии печени до настоящего времени остается до конца нерешенной, т.к. число пациентов с диффузными поражениями печени и исходом в тяжелую печеночную недостаточность увеличивается, и колеблется в пределах от 50 до 70 % [4]. Единственно эффективным методом лечения таких патологий является трансплантация печени [5]. Однако существующий дефицит донорских органов, высокая стоимость трансплантации и быстрое течение патологических процессов при острой печеночной недостаточности не позволяют больным с печеночной патологией получить своевременно необходимую для них помощь. Альтернативой трансплантации печени могут стать новые разрабатываемые перспективные методы лечения, основанные на стимуляции собственных стволовых клеток и применении клеточной терапии, в том числе фетальных стволовых клеток. Эффективность коррекции пораженной печени и ее функционирование главным образом зависят от используемого клеточного материала [6, 7,

Протасова Галина Аркадьевна (Protasova Galina Arkad'evna), кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник ФГУП НИИ гигиены профпатологии и экологии человека ФМБА России, GalaSR@mail.ru;
Шабашева Лилия Владимировна (Shabashева Liliya Vladimirovna), старший научный сотрудник ФГУП НИИ гигиены профпатологии и экологии человека ФМБА России, shabash69@gmail.com;
Попов Вадим Борисович (Popov Vadim Borisovich), доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГУП НИИ гигиены профпатологии и экологии человека ФМБА России, vrorovlr@mail.ru

8]. Основными источниками клеток для терапии заболеваний печени являются: дифференцированные гепатоциты, стволовые клетки, полученные из фетальных органов и органов взрослого организма [9, 10], в том числе из костного мозга – мезенхимальные клетки [11, 12]. Наиболее перспективным источником получения гепатоцитов человека являются эмбриональные стволовые клетки и клетки с индуцированной плюрипотентностью [13, 14]. Однако применение клеточной терапии при патологиях печени является сложным многостадийным процессом, требующим детального понимания особенностей дифференцировки и регенерации гепатоцитов.

Целью настоящего исследования являлась оценка эффективности применения суспензии КФП для коррекции острого токсического поражения печени животных.

Материалы и методы исследования. Работа проведена на половозрелых аутбредных СПФ самках крыс, полученных из питомника «Пушино» (г. Пушкино, Московская область). Содержание и кормление лабораторных животных производилось в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики» (Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199н.)

Сформировано четыре группы животных (по 6 животных в группе):

- группа контроля (интактные животные);
- группа позитивного контроля – ПК (животным в/ж вводили CCl_4 в дозе 3000 мг/кг);
- группа животных с введением кондиционированной культуральной среды, (однократное в/ж введение CCl_4 + ежедневное внутрибрюшинное введение культуральной среды (2-3 пассажи мезенхимальных стволовых клеток – МезСК) в объеме 1 мл;
- группа животных с инъекцией КФП (однократное в/ж введение CCl_4 в дозе 3000 мг/кг + однократное в/в введение суспензии КФП в количестве 5 миллионов, в объеме 100 мкл).

Для моделирования острого токсического повреждения печени крысам однократно внутрибрюшинно вводили CCl_4 в масляном растворе, в дозе 3000 мг/кг. Животных через 1, 3, 5, 7, 16 сут. после воздействия подвергали эвтаназии с помощью эфира. В качестве контроля использовали интактных животных. Для патоморфологического анализа у животных иссекали печень, которую фиксировали в 10 % формалине, проводку осуществляли в гистологическом процессоре замкнутого цикла Tissue-Tek VIP (Sakura Япония), заливку в парафин проводили на станции парафиновой заливки Tissue – Tek TEC (Sakura Япония), срезы толщиной 4 мкм изготавливали на ротационном микротоме Accu – Cut SRM 200 (Sakura Япония). Гистологические срезы окрашивали азур – эозином, на коллаген по Ван-Гизо-

ну. Для обнаружения жировых включений срезы печени толщиной 8 мкм окрашивали суданом 3 [15].

Получение кондиционированной среды от мезенхимных клеток. Культивирование МезСК проводили в среде ДМЕМ F12 с добавлением 15 % нокаутной сыворотки, 0,1 мМβ-меркаптоэтанола (GIBCO, США, 1 % незаменимых аминокислот, 2 мМ L-глутамина, антибиотики (пенициллин 100 ед/мл, стрептомицин 10 мг/мл), во флаконах покрытых 0,1 % желатиной. Собирали суточную среду с субконфлюента клеток. Среду центрифугировали при 1000 об/мин, отбирали надосадочную жидкость и пропускали через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Кондиционированная среда получена после культивирования МезСК в течение 24 ч, среду вводили внутрибрюшинно в объеме 1мл с добавлением фактора роста Vegf в концентрации 100 нг/мл.

Выделение КФП. Клеточную суспензию печени получали из эмбрионов крысы линии Вистар. Ткани печени были выделены из 19-суточных эмбрионов крысы согласно стандартным протоколам [16,17] с модификациями. Для визуализации трансплантированных клеток использовался прижизненный краситель РКН26 (Sigma, США), окрашивающий липиды клеточных мембран.

Иммунофлуоресцентное окрашивание суспензии КФП крыс 19ДР, криосрезов и иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов печени крыс.

Препараты приготавливали из диссоциированных КФП, окраска парафиновых срезов и криосрезов печени проводилась в соответствии с протоколом [18]. В качестве первичных антител использовали: мышинные моноклональные антитела, к овальным клеткам (Oval Cell Marker, OV-6 mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, INC), антитела кролика к α-фетопротейну, (*Anti-α-1-Fetoprotein antibody produced in rabbit*, АФП), моноклональные кроличьи антитела к Цитоцератину 19 (Rabbit monoclonal AB to Abcam Inc.), мышинные моноклональные антитела к CD 45 (Mouse monoclonal antibody – CD 45, EMD Millipore Corporation) и моноклональные антитела к виментин (purified mouse anti-vimentin, BD Pharmingen, США). В качестве вторичных антител использовали поликлональные козы антитела против мыши, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 568 («goat anti-mouse IgG1(γ1)», StemCell Technologies), козы антитела против мыши, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor -488 и против кролика конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 568 («goat anti-rabbit IgG (H+L)», StemCell Technologies). Полученные препараты анализировали с помощью флуоресцентного полуавтоматического микроскопа «Olympus BX61» (Olympus, Япония) осна-

щенного программой CytoVision (Genetix, Великобритания).

Результаты и обсуждение. Для отработки модели острого токсического повреждения печени проведено несколько серий опытов с различными веществами, обладающими выраженным гепатотропным действием, такими как циклофосфамид, несимметричный диметилгидразин и CCl_4 в различных дозах. В результате проведенных экспериментов был выбран четыреххлористый углерод в дозе 3000 мг/кг, вызывающий выраженные стойкие изменения в паренхиме и строме печени, что позволило применить данную модель для разработки экспериментальных подходов к коррекции острого токсического гепатита.

Первую попытку коррекции токсического гепатита проводили с использованием кондиционированной культуральной среды, полученной при культивировании МезСК мыши. При введении кондиционированной среды гибели подопытных животных не наблюдалось, как и в контрольной группе. В группе позитивного контроля отмечалась гибель 3-х из шести подопытных животных в течение первых суток. По результатам патоморфологических исследований ежедневное введение кондиционированной культуральной среды подопытным животным не повлияло на выраженность и течение патологических процессов в печени во все изученные сроки. В связи с этим в дальнейших экспериментах использовали КФП для коррекции токсического гепатита.

Фенотипическая характеристика суспензии КФП плода крысы 19ДР.

В пренатальном периоде в печени млекопитающих происходят два основных гистогенетических процесса – гепатогенез и гемопоэз, которые оказывают взаимное влияние друг на друга. Основную роль в регуляции этих процессов играет строма фетальной печени, организующая микроокружение для дифференцирующихся печеночных и кроветворных стволовых клеток

[19]. Печеночные стволовые клетки пролиферируют и дифференцируются в гепатоциты и холангиоциты и при трансплантации их крысам с острым токсическим гепатитом способны оказывать непосредственное влияние на процессы регенерации.

Проведен иммунофлуоресцентный анализ (ИФА) мазков клеток фетальной печени, в результате чего была выявлена экспрессия основных маркеров печеночных стволовых клеток – OV6 – поверхностного маркера овальных клеток, альфа-фетопротеина (АФП) – маркера, синтезируемого висцеральной энтодермой желточного мешка и клетками эмбриональной печени, цитокератина 19 – специфического поверхностного маркера билиарных и стволовых печеночных клеток (СК 19), виментина – маркера для идентификации мезенхимы и основного маркера гемопоэтических стволовых клеток – CD 45, рис. 1 А, В, С.

Таким образом, в КФП выявили экспрессию энтодермальных и мезодермальных маркеров, характерных для печеночного эпителия (альфа-фетопротеин, маркера овальных клеток, цитокератина 19), гемопоэтических стволовых клеток (CD 45) и клеток мезенхимы (виментина). Полученный клеточный материал в дальнейшем был использован для коррекции острого токсического поражения печени.

На втором этапе исследования проведены эксперименты по оценке эффективности трансплантации КФП с изучением их роли в обеспечении регенераторных процессов.

Анализ гистологических препаратов печени, через 1 сут. после воздействия CCl_4 выявил выраженные центролобулярные некрозы паренхимы с нарушением трабекулярного строения центральных зон, гидропическую, белковую, углеводную и жировую дистрофии, периваскулярные отеки. Внутривенное введение КФП через 6 ч. после воздействия CCl_4 не повлияло на интенсивность перечисленных патологиче-

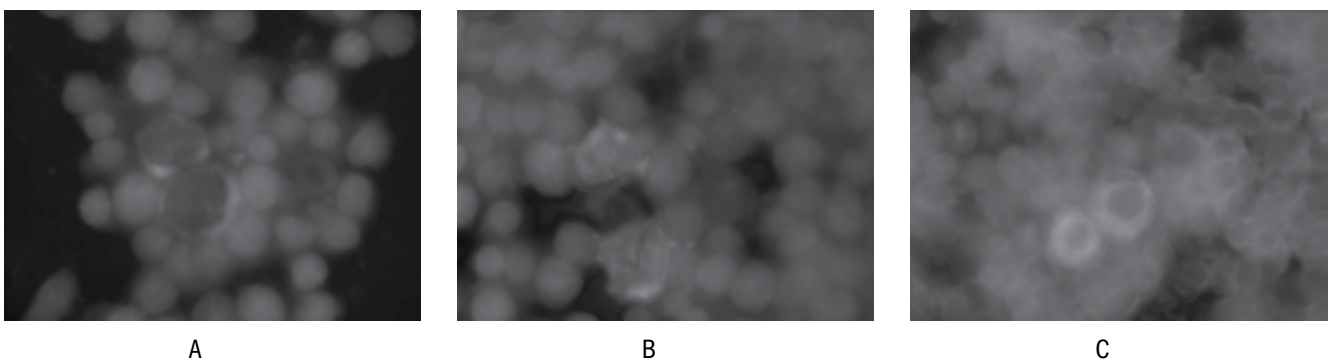


Рис. 1. Иммунофлуоресцентный анализ суспензии клеток фетальной печени. Окраска антителами А – на OV6, В – АФП, С – CD 45. Контраст ядер DAPI, ув x1000.

ских процессов в паренхиме и строме печени.

Структурные изменения через 3 сут. после воздействия CCl_4 в группе позитивного контроля проявлялись участками кровоизлияний в зонах некроза, нарушением трабекулярного строения центральных зон печени, клеточной инфильтрацией, атипичными митозами гепатоцитов, дистрофические изменения паренхимы сохранялись на прежнем уровне. Введение КФП способствовало снижению интенсивности некротических и дистрофических процессов в паренхиме к 3 сут., у некоторых животных после трансплантации КФП происходило восстановление трабекулярного строения центральных зон печени. К 3–5 сут. в центральных зонах печени наблюдалось скопление овальных клеток, что подтверждено ИФА свежемороженых срезов печени, окрашенных на маркер овальных клеток OV6.

При обширных поражениях печени часть овальных клеток способна дифференцироваться в гепатоциты, другая часть развивается по холангиоцитарной линии дифференцировки формируя систему разветвленных протоков, организованных по типу желчного эпителия [20], которые участвуют в образовании холангиол *de novo*, способствуя восстановлению функции печени, что и наблюдалось на 5 сут. после трансплантации КФП (рис. 2 С) и подтверждалось экспрессией специфического поверхностного маркера билиарных клеток – цитокератина 19, рис. 2 В.

Через 5–7 сут. деструктивные изменения паренхимы после воздействия CCl_4 в группе позитивного контроля уменьшались: снижалась интенсивность дистрофических процессов, происходило восстановление трабекулярного строения центральных зон, отмечалось усиление макрофагальной реакции в зонах поражения, однако на этот срок наблюдались выраженные сосудистые повреждения в виде панваскулитов. Трансплантации КФП устраняла у части животных сосудистые нарушения, в паренхиме наблюдались оста-

точные явления жировой дистрофии, но менее выраженные, чем в группе ПК. Число овальных клеток в период с 5 по 7 сут. было максимальным за весь период исследования, что не наблюдалось в группе ПК, это являлось свидетельством их активной пролиферации и участия в процессах регенерации. Дополнительным свидетельством непосредственного участия КФП в регенераторных процессах является присутствие OV6 позитивных клеток в срезах печени, секретирующих АФП (эмбриональный белок), рис 2 А.

К 16 суткам после воздействия CCl_4 в паренхиме печени отмечались явления жировой дистрофии, после коррекции КФП у части подопытных животных отмечалось полное восстановление строения паренхимы и стромы печени. Использование фетальных клеток для коррекции острых токсических гепатитов обусловлено их способностью к репарации, как стромы, так и паренхимы печени за счет непосредственного влияния стволовых клеток, имеющих энтодермальный и мезодермальный фенотипы, а также стромы, являющейся нишей для стволовых клеток. Трансплантированные КФП мигрируют в зоны некрозов и пролиферируют, что подтверждалось присутствием OV6 позитивных клеток на срезах печени, секретирующих эмбриональный белок, и оказывают непосредственное влияние на процессы регенерации. Также нельзя исключить неспецифическое стимулирующее действие КФП на регенераторные процессы в печени за счет пептидов, ростовых факторов, тканевых гормонов, выделяемых прогениторными клетками [21].

Заключение. Настоящее исследование направлено на оценку эффективности применения суспензии КФП для коррекции острого токсического поражения печени взрослых животных с определением роли трансплантированных клеток в обеспечении регенераторных процессов. На первом этапе исследования проведена оценка клеточного фенотипа фетальных клеток.

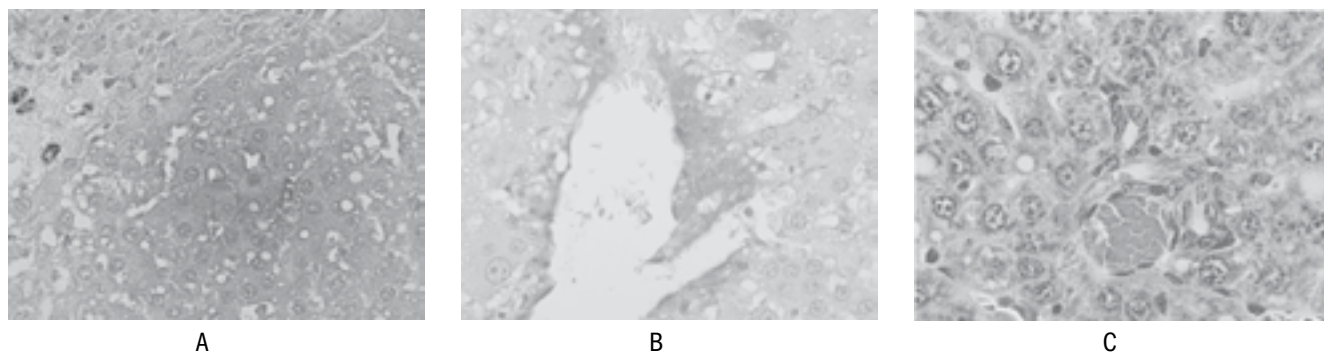


Рис. 2. Иммуногистохимическое окрашивание печени, введение клеток фетальной печени, сроки 5 - 7 сут., зоны гепатоцитов, экспрессирующих: А - АФП, ув х 650. В - СК 19, Контраст DAPI, ув х 400, С - холангиолы *de novo*, окр азур-эозин. ув 1000.

ИФА мазков суспензии КФП выявили экспрессию энтодермальных и мезодермальных маркеров, характерных для печеночного эпителия (альфа-фетопротеин, маркера овальных клеток, цитокератина 19), гемопоэтических стволовых клеток (CD 45) и клеток мезенхимы (виментина). В результате проведенных экспериментов, по отработке модели острого токсического повреждения печени, был выбран четыреххлористый углерод в дозе 3000 мг/кг, вызывающий выраженные стойкие изменения в паренхиме и строме печени. Для коррекции острого токсического гепатита использовали кондиционированную среду, полученную при культивировании МезСК мыши. Ежедневное введение кондиционированной среды подопытным животным устраняло гибель животных, однако по результатам патоморфо-

логических исследований кондиционированная среда не повлияла на выраженность и течение патологических процессов в печени во все изученные сроки. Использование КФП приводило к коррекции острого токсического гепатита, так к 3 суткам трансплантация КФП способствовала снижению интенсивности некротических и дистрофических процессов в паренхиме, у некоторых животных происходило восстановление трабекулярного строения центральных зон печени, а к 5-7 суткам внутривенное введение фетальных клеток устраняло у части животных сосудистые нарушения. Полученные результаты могут служить экспериментальным обоснованием возможности использования клеток фетальной печени при лечении острых токсических гепатитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кинзирская Ю.А., Богуш Т.А., Остапчук Н.В., Фисенко В.П. Гепатотоксическое действие лекарственных препаратов некоторых фармакологических групп. Клиническая медицина. 2003; 10: 11-16.
2. Browning J.D. et al. Prevalence of Hepatic Steatosis in an Urban Population in the United States: Impact of Ethnicity. *Hepatology*. 2004; 40 (6): 1387-1395.
3. Чернова В.М. Токсические поражения печени: современные взгляды и подходы к терапии. Острые и неотложные состояния в практике врача. 2011; 2: 26-30.
4. Reuben A., Koch D.G., Lee W.M. Drug-Induced Acute Liver Failure: Results of a U.S. Multicenter, Prospective Study. *Hepatology*. 2010; 52 (6): 2065-2076.
5. Готье С.В., Мойсюк Я.Г., Хомяков С.М. Донорство и трансплантация органов в российской федерации в 2014 году. VII сообщение регистра Российского трансплантологического общества. 2015; 17 (2): 7-22.
6. Урываева И.В. Стволовые клетки в регенерации печени. В кн.: Пальцев М.А., ред. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. т. 2. М.: Медицина; 2009: 211-252.
7. Репин В.С., Сухих Г.Т. Медицинская клеточная биология. М.: Российская академия медицинских наук: БЭБ и М.; 1998.
8. Сухих Г.Т. Трансплантация фетальных клеток в медицине: настоящее и будущее. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1998; 126 (1): 3-13.
9. Weiss T.S., Lichtenauer M., Kirchner S., Stock P., Aurich H., Christ B. et al. Hepatic progenitor cells from adult human livers for cell transplantation. *Hepatology*. 2008; 57: 1129-1138.
10. Zhang H., Liu Z., Li R., Wang D., Liu W., Li J. et al. Transplantation of embryonic small hepatocytes induces regeneration of injured liver in adult rat. *Transplantation Proceedings*. 2009; 41 (9): 3887-3892.
11. Люндуп А.В. Применение мезенхимальных стромальных клеток костного мозга для коррекции фиброзирующего

- повреждения печени: Автореф. дис. канд. мед. наук. М.; 2011.
12. Lee M.J., Jung J., Na K.H. et al. Anti-fibrotic effect of chorionic plate-derived mesenchymal stem cells isolated from human placenta in a rat model of CCl4-injured liver: potential application to the treatment of hepatic diseases. *Cell Biochemistry*. 2010; 111 (6): 1453-1463.
 13. Rambhatla L., Chiu C.P., Kundu P., Peng Y., Carpenter M.K. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplantation*. 2003; 12 (1): 1-11.
 14. Basma H., Soto-Gutiérrez A., Yannam G.R., Liu L., Ito R., Yamamoto T. et al. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology*. 2009; 136: 990-999.
 15. Меркулов Г.А. Курс патологической гистологии. М.: Медицина; 1969.
 16. Freshney R.I. Culture of Animal Cells. In: Freshney R.I. A manual of Basic Techniques. New York: 1995; 39: 184-185.
 17. McGrath K., Koninski A., Malik J. et al. Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood*. 2003; 101: 1669-1672.
 18. Kumar G.L., Rudberk L., ред., Франка Г.А., Малькова П.Г. ред. пер. с англ. Иммуногистохимические методы: Руководство. М.; 2011.
 19. Паюшина О.В., Домарацкая Е.И., Старостин В.И. Клеточный состав и регуляторные функции стромы зародышевой печени. *Цитология*. 2012; 54 (5): 369-380.
 20. Фактор В.М., Энгельгардт Н.В., Язова А.К. и др. Общие антигены овальных клеток и холангиоцитов мыши: выявление с помощью моноклональных антител. *Онтогенез*. 1990; 21: 625-632.
 21. Петракова О.С., Чернигло Е.С., Терских В.В., Калистратова Е.Н., Васильев А.В. Использование клеточных технологий в лечении патологий печени. *Acta naturae*. 2012; 3 (14): 18-33.

REFERENCES:

1. Kinzirskaya Yu.A., Bogush T.A., Ostapchuk N.V., Fisenko V.P. Hepatotoxic action of drugs of some pharmacological groups. *Clinical medicine*. 2003; 10: 11-16 (in Russian).
2. Browning J.D. et al. Prevalence of Hepatic Steatosis in an Urban Population in the United States: Impact of Ethnicity. *Hepatology*. 2004; 40 (6): 1387-1395.
3. Chernova V.M. Toxic liver lesions: modern views and approaches to therapy. Acute and emergency conditions in doctor's practice. 2011; 2: 26-30 (in Russian).
4. Reuben A., Koch D.G., Lee W.M. Drug-Induced Acute Liver Failure: Results of a U.S. Multicenter, Prospective Study. *Hepatology*. 2010; 52 (6): 2065-2076.
5. Got's S.V., Moysyuk Ya.G., Khomyakov S.M. Donorship and organ transplantation in the Russian Federation in 2014. VII Statement of the Register of the Russian Transplant Society. *Bulletin of transplant and artificial organs*. 2015; 17 (2): 7-22 (in Russian).
6. Uryvaeva I.V. Stem cells in liver regeneration. In: Pal'tsev M.A., ed. *Biology of stem cell and cell technologies*. vol. 2. Moscow: Meditsina; 2009 (in Russian).
7. Repin V.S., Sukhikh G.T. Medical cell biology. Moscow: Russian Academy of Medical Sciences: BEB & M.; 1998 (in Russian).
8. Sukhikh G.T. Transplantation of fetal cells in medicine: present and future. *Byull. Eksp. Biol. Med.* 1998; 126 (1): 3-13 (in Russian).
9. Weiss T.S., Lichtenauer M., Kirchner S., Stock P., Aurich H., Christ B. et al. Hepatic progenitor cells from adult human livers for cell transplantation. *Hepatology*. 2008; 57: 1129-1138.
10. Zhang H., Liu Z., Li R., Wang D., Liu W., Li J. et al. Transplantation of embryonic small hepatocytes induces regeneration of injured liver in adult rat. *Transplantation Proceedings*. 2009; 41 (9): 3887-3892.
11. Lyundup A.V. Application of mesenchymal stromal marrow bone cells for correction of fibrosing liver damage. *Cand. med. sci. diss.* Moscow; 2011 (in

- Russian).
12. Lee M.J., Jung J., Na K.H. et al. Anti-fibrotic effect of chorionic plate-derived mesenchymal stem cells isolated from human placenta in a rat model of CCl4-injured liver: potential application to the treatment of hepatic diseases. *Cell Biochemistry*. 2010; 111 (6): 1453-1463.
 13. Rambhatla L., Chiu C.P., Kundu P., Peng Y., Carpenter M.K. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplantation*. 2003; 12 (1): 1-11.
 14. Basma H., Soto-Gutiérrez A., Yannam G.R., Liu L., Ito R., Yamamoto T. et al. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology*. 2009; 136: 990-999.
 15. Merkulov G.A. Textbook on pathological and histological techniques. Moscow; Medicine; 1969 (in Russian).
 16. Freshney R.I. Culture of Animal Cells. In: A manual of Basic Techniques. New York: 1995; 39: 184-185.
 17. McGrath K., Koninski A., Malik J. et al. Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood*. 2003; 101: 1669-1672.
 18. Kumar G.L., Rudberk L. (ed. Frank G.A. and Malkov P.G.). *Immunohistochemical methods*. Moscow; 2011 (in Russian).
 19. Payushina O.V., Domaratskaya E.I., Starostin V.I. Cellular composition and regulatory functions of the stroma of the germinal liver. *Cytology*. 2012; 54 (5): 369-380 (in Russian).
 20. Faktor V.M., Engel'gardt N.V., Yazova A.K. et al. Common antigens of mouse oval cells and cholangiocytes: detection with monoclonal antibodies. *Ontogenies*. 1990; 21: 625-632 (in Russian).
 21. Petrakova O.S., Cherniogl E.S., Terskikh V.V., Kalistratova E.N., Vasil'ev A.V. The use of cellular technologies in the treatment of liver pathologies. *Acta naturae*. 2012; 3 (14): 18-33 (in Russian).

G.A. Protasova, L.V. Shabasheva, V.B. Popov

STEM CELL CORRECTION OF TOXIC LIVER LESIONS

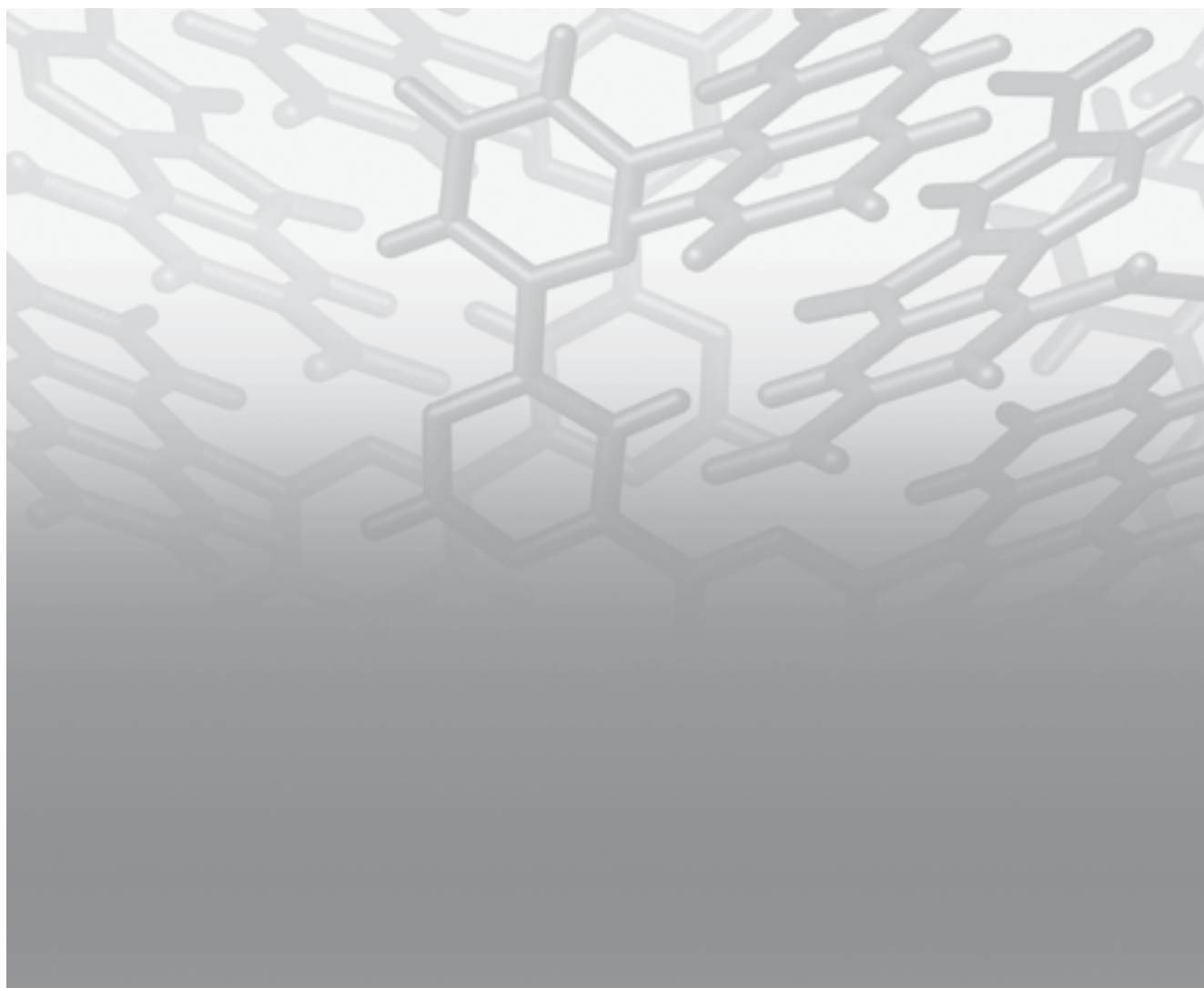
Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical Biological Agency, 188663, p.o. Kuz'molovsky, Vsevolozhsky District, Leningrad Region, Russian Federation

Assessment of the feasibility of fetal liver cells (FLC) for correction of a CCl_4 -induced acute toxic hepatitis was performed. Exposure to CCl_4 in a dose of 3000 mg/kg caused well-defined centrilobular necrosis, hydropic, protein, carbohydrate, and adipose degeneration, as well as vascular disorders. The dynamics of morphological changes in the liver was studied, and the role of their intrinsic regenerative potential was assessed using pathomorphological, histochemical, and immunofluorescence methods. Phenotyping the cellular material was carried out to reveal expression of endodermal and mesodermal markers characteristic for the hepatic epithelium, hematopoietic stem cells, and mesenchymal cells. Three days after FLC transplantation, slowing down of necrotic and dystrophic processes in the liver parenchyma was observed. In some animals, the trabecular structure of the central hepatic zones was restored and, by 5th to 7th day of post-implantation, vascular disorders were eliminated. The resulting data can be considered as evidence for the use of fetal liver cells in the treatment of acute toxic hepatitis.

Keywords: acute hepatitis, correction, fetal cells.

Quote: G.A. Protasova, L.V. Shabasheva, V.B. Popov. Stem cell correction of toxic liver lesions. Toxicological Review. 2020; 4: 21-26

Переработанный материал поступил в редакцию 03.03.2020 г.



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИКОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АГОНИСТОВ КАППА-ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

С.В. Чепур, С.Е. Галан,
М.С. Вахвияйнен,
Р.Н. Хромов, А.Н. Семёнов

Федеральное Государственное
Бюджетное Учреждение
Государственный Научно-
Исследовательский
Испытательный Институт военной
медицины Министерства обороны
Российской Федерации, 195043,
г. Санкт-Петербург, Российская
Федерация

В работе представлены данные о биологической активности агонистов каппа-опиоидных рецепторов среди производных трёх групп соединений: 1,2-циклогексиламина, 1,2,3,4-пиперидина, 1,2,4-пиперазина. На примере производных 1,2-циклогексиламинов и 1,2,4-пиперазинов прослежено снижение анальгетической активности и токсичности соединений при сокращении длины углеродной цепочки в фенилалкильном заместителе при атоме азота. Замена атомов хлора в 3,4-положениях фенильного кольца на атомы фтора, которые являются более электроотрицательными и приводит к усилению анальгетического эффекта и снижению токсичности соединений.

Ключевые слова: агонисты каппа-опиоидных рецепторов, функциональные заместители, анальгетический и седативный эффект, токсичность, безопасность.

Цит: С.В. Чепур, С.Е. Галан, М.С. Вахвияйнен, Р.Н. Хромов, А.Н. Семёнов. Экспериментальная оценка токсикометрических показателей и анальгетической активности агонистов каппа-опиоидных рецепторов. Токсикологический вестник. 2020; 4:27-33

Введение. Разработка новых обезболивающих препаратов, сочетающих в себе высокую эффективность опиоидных анальгетиков с более благоприятным профилем респираторной и наркологической безопасности, является важным направлением развития современной медицины и фармакологии [1-3].

К числу таких препаратов можно отнести селективные каппа-опиоидные агонисты (КОА). К КОА относят соединения различных классов: пептиды (динорфины), морфинаны (буторфанол, налфурафин), бензоморфаны (кетоциклозацин, пентазоцин), изохинолиноны, бензодиазепины (тифлуадом), ариацетамиды (энадолин, U50,488, U69,593, BRL-52537 и GR-89,696), бензимидазолы (РУ-1205) и др. Для данной группы соединений установлено отсутствие негативного влияния на функцию внешнего дыхания и моторику желудочно-кишечного тракта [4, 5]. Эффекты различных представителей КОА напрямую связаны со сродством к рецеп-

тору и с особенностями их фармакокинетики (распределение в организме, инициируемые сигнальные и клеточные события, белковые рецепторные системы).

К настоящему времени получены соединения, которые по избирательности к каппа-рецептору в сотни раз превосходят «классические» агонисты опиоидных рецепторов, такие как кетоциклозацин, пентазоцин и его аналоги, и могут быть использованы в качестве эффективных обезболивающих средств.

Ранее проведена наработка [6] некоторых производных КОА и сформирован методический подход к оценке их анальгетической активности [7]. Несмотря на выявление соединений с высокой селективностью к каппа-опиоидному рецептору и отсутствие негативного влияния на дыхательный центр, ни одно из них пока не нашло применения в клинической практике в качестве обезболивающего средства.

В этой связи, актуальным является исследо-

Чепур Сергей Викторович (Chepur Sergei Viktorovich), доктор медицинских наук, профессор, начальник ФГБУ ГНИИИ ВМ МО РФ, gniiivm_15@mail.ru;
Галан Сергей Евгеньевич (Galan Sergei Evgenievich), кандидат химических наук, научный сотрудник ФГБУ ГНИИИ ВМ МО РФ, gniiivm_15@mail.ru;
Вахвияйнен Мария Сергеевна (Vakhviayanen Maria Sergeevna), младший научный сотрудник ФГБУ ГНИИИ ВМ МО РФ, gniiivm_15@mail.ru;
Хромов Роман Николаевич (Kromov Roman Nikolaevich), младший научный сотрудник ФГБУ ГНИИИ ВМ МО РФ, gniiivm_15@mail.ru;
Семёнов Александр Николаевич (Semenov Alexander Nikolaevich), младший научный сотрудник ФГБУ ГНИИИ ВМ МО РФ, г. Санкт-Петербург, gniiivm_15@mail.ru.

вание показателей биологической активности КОА, относящихся к различным химическим классам, с целью выявления возможных зависимостей в изменении их анальгетических и токсических свойств.

Материалы и методы исследования.

Синтез и аналитический контроль. Синтез КОА проводили по разработанной ранее методике [6], структуры синтезированных образцов и их частоту подтверждали методами физико-химического анализа. Использовали в качестве оборудования для метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) «ThermoScientific» США, метода газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС) «AgilentTechnologies», США, метода ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) BrukerSystemAVHD600-10111437, США. Структура синтезированных образцов КОА представлена на рисунке 1.

Оценка биологической активности. Биологическую активность синтезированных образцов исследовали в опытах на белых беспородных крысах-самцах массой 200-250 г, полученных из филиала «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России и прошедших 14дневный карантин. Содержание и обращение с животными в эксперименте соответствовали российским и международным нормам. Животных содержали по 6 особей в клетках 1500U EurostandardType IV S (Tecniplast, Италия) при температуре воздуха 20-22 °С, относительной влажности 40-60 %, световом режиме 12:12 на корме ПК120 (ООО «Лабораторкорм», Россия) со свободным доступом к воде и пище.

Образцы синтезированных КОА вводили в водных растворах внутривенно из расчёта 1 мл на 1 кг массы тела животных в диапазоне доз от 0,001 до 100,0 мг/кг. Экспериментальные группы формировали из восьми животных, случайным образом выбирая по одной особи из разных клеток. Контрольным животным вводили растворитель – дистиллированную воду.

Расчёт показателей безопасности. Для каждого образца определяли средние летальные дозы (ЛД₅₀), при введении которых происходила гибель половины животных в группе в течение 14 сут. Расчет средних летальных доз проводили пробит-анализом по методу Финни, реализованном в программном пакете Statistica 2005 [10].

В качестве целевого эффекта образцов рассматривали анальгезию, в качестве токсического – седацию. Для этого через 10, 30, 60 минут, 2 и 24 часа после введения оценивали влияние введённых образцов на общее состояние и отмечали особенности поведения животных. Особое внимание уделяли следующим проявлениям

картины интоксикации: нарушению координации движений, стереотипному поведению (обнюхивание, жевание, качание головой, чесание тела), ритмичности дыхательных движений, показателю эмоциональной реактивности (эпизоды вздрагивания при хлопке), уровню спонтанного двигательного возбуждения (седацию и ажитацию), уровню агрессии и эмоциональной реактивности (испуг) при прикосновении к животному рукой, изменению абдоминального мышечного тонуса животных при сдавлении стенки живота с боков [8].

Анальгетическую активность КОА оценивали в тесте «Горячая пластина» [9]. В процессе исследования каждое животное помещали на пластину, нагретую до 55°С, регистрировали латентное время появления болевой реакции облизывание задних лап или подпрыгивание. В случае отсутствия болевой реакции у животного в течение 30 с тестирование останавливали и фиксировали полную анальгезию.

Седативное воздействие образцов на животных опытных групп определяли визуально, проводя сравнение с контрольными животными, фиксируя степень выраженности седации в баллах (0-отсутствие седации; 1- слабая седация, животные чуть заторможены, медленнее передвигаются по тестовой камере; 2 – средняя степень седации, животные почти не передвигаются, 3 – сильная седация, распластывание животных в камере).

Расчет средних доз осуществляли пробит-анализом по методу Финни, реализованном в программном пакете Statistica 2005 [10]. Значимость отличий полученных средних летальных и эффективных доз разных образцов устанавливали путём сравнения соответствующих 95% доверительных интервалов, вычисленных на основании их стандартных ошибок. Если их соотношение превышало 1, отличия считали значимыми [11].

На основании полученных средних летальных (ЛД), эффективных (ЕД) и токсических (ТД) доз рассчитывали терапевтический индекс (ТИ=ЛД₅₀/ЕД₅₀) и показатель переносимости (ПП=ТД₅₀/ЕД₅₀) синтезированных КОА.

Результаты и обсуждение. В работе исследовали три класса соединений, относящихся к КОА: производные 1,2-циклогексилamina (образец 1, образец 2, образец 3), производные 1,2,3,4-пиперидина (образец 4, образец 5), производные 1,2,4-пиперазина (образец 6, образец 7, образец 8, образец 9, образец 10). Исследуемые образцы представляли собой рацемические смеси соединений в виде фумаровокислых солей.

В качестве препарата сравнения применяли фармакопейный препарат пентазоцин, обладающий κ, μ-опиоидной активностью и агонистическим действием в отношении интра-

Таблица

Значения средних доз и показателей безопасности синтезированных агонистов каппа-опиоидных рецепторов

| Название образца | Доза, мг/кг | | | Терапевтический индекс | Показатель переносимости |
|------------------|---------------------|---------------------|-------------------|------------------------|--------------------------|
| | Средняя эффективная | Средняя токсическая | Средняя летальная | | |
| Пентазоцин | 5,7±1,6 | 7,4±3,8 | 29,4±8,19 | 5,2 | 1,3 |
| Образец 1 | 11,6±6,8 | 10,3±8,5 | 35,9±4,6 | 3,1 | 0,8 |
| Образец 2 | 2,7±0,8* | 0,29±0,11* | 54,8±12,2* | 20,3 | 0,1 |
| Образец 3 | 12,6±4,5 | 15,6±4,6* | 76,4±12,8* | 6,0 | 1,2 |
| Образец 4 | - | 0,301±0,112* | 10,0±3,3* | - | - |
| Образец 5 | 20,4±8,5 | 9,4±1,4 | 28,4±5,3 | 1,4 | 0,4 |
| Образец 6 | 0,43±0,21* | 0,0052±0,0021* | 29,8±11,3 | 69,3 | 0,01 |
| Образец 7 | 0,1±0,08* | 0,07±0,02* | 10,7±1,7* | 107,0 | 0,7 |
| Образец 8 | 9,1±5,7 | 0,5±0,2* | >30,0 | 3,2 | 0,05 |
| Образец 9 | 13,0±6,4 | 14,4±11,9 | >80,0* | 6,15 | 1,1 |
| Образец 10 | 0,3±0,25* | 0,06±0,05* | 49,7±7,5 | 165,6 | 0,2 |

Примечания:

1. *- различия достоверны от группы препарата сравнения (пентазоцин) при $p < 0,05$;
2. прочерк - эффект обезболивания не установлен, индексы не рассчитаны

целлюлярных S-рецепторов. Расчётные средние эффективные и токсические дозы исследованных образцов и индексы, характеризующие безопасность их применения, представлены в таблице.

При оценке показаний биологической активности наработанных образцов проводили сравнение с пентазоцином, обладающим каппа-опиоидной активностью. В отношении этого препарата были уточнены средние дозы, при введении которых у крыс отмечали обезболивание, седацию и летальность. Терапевтический индекс и показатель переносимости составили 5,2 и 1,3, соответственно.

С увеличением дозы пентазоцина более 5 мг/кг у животных в течение 1-2 часов фиксировали нарушение дыхания, которое характеризовалось чередующимися эпизодами апноэ и учащением дыхания. Наряду с угнетением дыхательной функции отмечали замедление двигательной активности, при увеличении дозы соединения до 10 мг/кг атаксия сменялась глубоким подавлением локомоторной функции.

У отдельных особей регистрировали поднятие хвоста, сходное с реакцией «Штраубе». При увеличении дозировки пентазоцина до 20 мг/кг и более у животных развивался судорожный синдром с преобладанием тонического компонента. В этих группах отмечали удлинение периодов апноэ до 1-3 мин и урежение частоты вдохов до 4-6. Вероятно, на фоне дыхательной недостаточности стремительно развивалась гибель.

При введении образца 1 в дозе 10 мг/кг седацию через 10-30 мин отмечали у 30 % животных, восстановление состояния животных регистрировали через 1 час после инъекции. Введение соединения в дозе 20 мг/кг провоцировало развитие седации и атаксии через 10-60 мин у 50 % животных, картина интоксикации была сопряжена с наблюдаемыми признаками нарушения координации движений и дыхания. При введении КОА в дозе 30 мг/кг в течение 10 мин у животных отмечали судороги в распластанном положении, грубые нарушения дыхательного ритма и характерное поднятие хвоста – «реакцию Штраубе». У крыс выявляли выраженную седа-

цию, сужение зрачка, отсутствие стартл-ответа и исследовательской активности, потерю роговичного рефлекса и способности к восстановлению ортостатического положения при перевороте. Через 30 мин после введения образца 1 животные восстанавливали способность к самостоятельному передвижению и ортостатическому положению, состояние животных полностью нормализовалось по прошествии 1 суток, гибель составила 75%. При введении образца 1 в дозе 40 мг/кг и более развитие судорог и гибели на фоне асфиксии носило стремительный характер у 100% животных в группе. Введение крысам образца 1 вызывало дозозависимая картина интоксикации, характерная для препарата сравнения. Анальгетический эффект отмечен при введении образца 1 в дозе $11,6 \pm 6,8$ мг/кг при исследовании в тесте «горячая пластина».

Образец 2 и образец 3 проявляли схожие биологические эффекты. При сравнении эффективных доз (ЕД) образцов с пентазоцином отмечены более высокие показатели для образца 3 ($12,6 \pm 4,5$ мг/кг). ЕД₅₀ образца 2 была в два раза ниже, чем у препарата сравнения.

Образец 4 в дозе 20 мг/кг и более также вызывал стремительное развитие судорог и гибель животных. При применении соединения в дозе 10 мг/кг гибели не отмечали, однако в течение 10 мин у животных развивались судороги и

распластанном положении и нарушения дыхательного ритма. У крыс регистрировали выраженную седацию, отсутствие стартл-ответа, потерю способности принимать ортостатическое положение и отсутствие роговичного рефлекса. Через 30-50 мин после введения животные восстанавливали способность возвращаться в ортостатическое положение и начинали самостоятельно передвигаться. Введение образца 4 в дозе 0,5 мг/кг через 10 мин вызывало слабый седативный эффект, который проходил через 30 мин. С уменьшением дозы до 0,1 мг/кг состояние животных после его введения визуально не изменялось. Образец 4 не проявлял анальгетического эффекта при исследовании в тесте «горячая пластина».

Образец 5 в дозе 30 мг/кг и более вызывал стремительное развитие непродолжительных (в течение 1-2 мин) судорог и гибель животных. После введения образца 5 в дозе 10 мг/кг при обследовании через 10, 30 и 60 мин у животных выявляли седацию, нарушение дыхания и координации движений, снижение абдоминального мышечного тонуса. Сходные значения латентного периода развития и длительности эффектов картины интоксикации образца 5 отмечали при введении в дозах 0,5 и 1 мг/кг, но продолжительность седативного эффекта составляла менее 30 мин. По этим показателям образец был

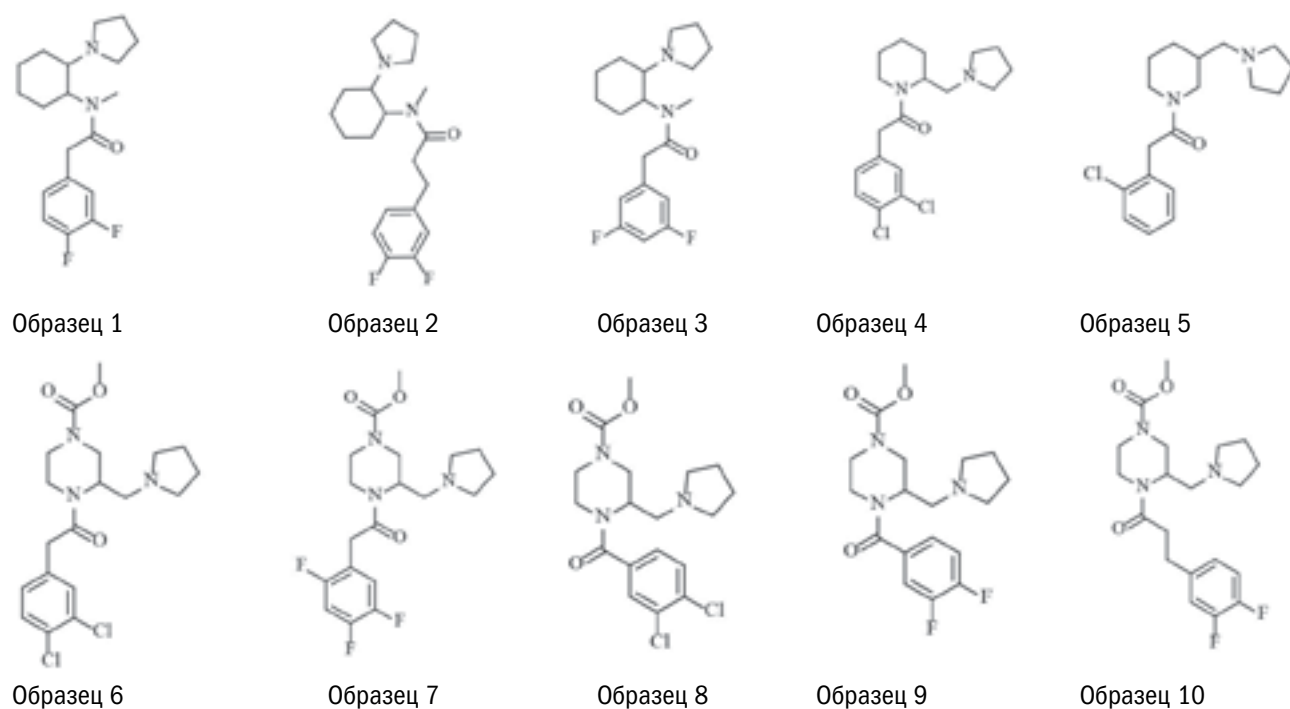


Рис. 1. Структура синтезированных образцов агонистов каппа-опиоидных рецепторов

сопоставим с пентазоцином. В диапазоне доз 0,01-0,1 мг/кг образец 5 практически не вызывал побочных эффектов.

Для большинства остальных образцов (6-10), в отличие от пентазоцина, обезболивающее действие проявлялось при введении в дозах, превышающих токсические.

Введение образца 6 в дозах 0,0001-0,001 мг/кг не провоцировало у животных развитие токсических эффектов, локомоторная функция соответствовала статусу контрольных животных. Образец 6 в дозах 0,1 мг/кг спровоцировал у крыс потерю роговичного рефлекса, нарушение функции внешнего дыхания, снижение исследовательской активности и отклонения стартл-ответа, признаки интоксикации регрессировали через 60 мин наблюдения, а степень седации и выраженность отклонений физиологических функций были ниже, чем при введении в более высоких дозах. Нарушение дыхания и координации движений, снижение исследовательской активности, стартл-ответа, абдоминального мышечного тонуса, потерю роговичного рефлекса наблюдали у животных через 10-60 мин после введения образца 6 в диапазоне доз от 0,2 до 5 мг/кг. Образец 6 проявлял анальгетический эффект в тесте «горячая пластина» при внутривенном введении в дозе 0,5 мг/кг. Соединение в дозе 30 мг/кг способствовало развитию мгновенной 100 %-ной летальности в экспериментальной группе.

Образец 7 при введении в дозах 10 и 20 мг/кг в течение 10 мин провоцировал гибель всех животных на пике клонико-тонических судорог, сопровождавшихся нарушениями дыхания. Введение образца в диапазоне доз 0,01-5 мг/кг вызывало дозозависимые токсические эффекты. Нарушения дыхания и координации движений, снижение исследовательской активности, стартл-ответа, абдоминального мышечного тонуса и потерю роговичного рефлекса наблюдали у животных через 10-60 мин после введения образца в дозах от 0,25 до 5 мг/кг. Введение образца в дозе 0,1 мг/кг не вызывало у крыс потерю роговичного рефлекса, показатели исследовательской активности и стартл-ответ соответствовали контрольным значениям через 60 мин наблюдения, степень седации и уровни отклонений функционального состояния животных были ниже, чем при введении КОА в более высоких дозах. Отклонений характеристик состояния животных от контроля при введении образца 7 в диапазоне доз 0,001-0,01 мг/кг не выявляли.

Седацию и снижение абдоминального мышечного тонуса отмечали через 10 мин после введения образца 8 в дозе 0,1 мг/кг. При снижении дозы токсических эффектов не отмечали. Ток-

сические эффекты, развивающиеся при введении образца 8, были сходны с картиной интоксикации образца 7 и сохранялись более 60 мин. В дозе 30 мг/кг соединение не вызывало гибели экспериментальных животных.

Внутривенное введение образца 9 в дозе 80 мг/кг не приводило к гибели животных. Токсические эффекты (снижение исследовательской активности и стартл-ответа, седация), которые прослеживали на протяжении более 1 ч, фиксировали у животных при введении в дозах 1 мг/кг и выше.

Образец 10 в дозах 0,2-25 мг/кг через 10 мин провоцировал у животных развитие атаксии, седации, снижение тонуса мышц и исследовательской активности, нарушение дыхания. В дозе 1 мг/кг продолжительность токсических эффектов превышала 1 ч. Введение соединения в дозах 50 и 100 мг/кг вызывало судороги и гибель всех животных в течение первых 2-5 мин.

Анализ полученных данных позволил заключить, что производные 1,2-циклогексиламинов проявляют анальгетические свойства в дозах, близких к седативным, что также отмечено для фармакологического препарата – пентазоцина. Увеличение длины углеродной цепочки в фенилалкильном заместителе при атоме аминного азота приводит к снижению как анальгетических, так и седативных доз, при этом повышается безопасность соединений. Однако однонаправленное изменение эффективных и токсических доз образцов ставит под сомнение возможность создания обезболивающих препаратов, лишенных седативной активности, из числа соединений данной группы.

Среди производных 1,2,3,4-пиперидинов образец 4 не проявлял анальгетических свойств. При этом изменение положения метилпирольного заместителя со 2-го на 3-е в пиридиновом ядре (образец 5) обеспечивало приобретение анальгетических свойств, однако эффективная доза соединения соизмерима слетальной. Указанное изменение фармакологической активности в ряду производных 1,2,3,4-пиперидинов позволяет предполагать, что анальгетическая и седативная активность соединений связана с различным положением объемного заместителя пиридинового ядра, что может служить основанием для поиска препаратов с направленным спектром активности среди соединений этой группы.

Среди производных 1,2,4-пиперазина образцы 6, 7 и 10 проявляли выраженный седативный эффект, что существенно отличает проявления их фармакологической активности от препарата сравнения. Следует отметить, что образец 10 имеет максимальный терапевтический индекс среди всех рассмотренных соединений, кото-

рый составил 165,6. На примере соединений этой группы прослежена закономерность, ранее выявленная для 1,2-циклогексиламинов. В частности, сокращение длины углеродной цепочки в заместителе при атоме азота с фенилпропионового до фенилуксусного заместителя приводит к повышению средних эффективных и токсических доз соединений (образец 8 и образец 9). Кроме этого, можно отметить, что замена двух атомов хлора в 3,4-положениях фенильного кольца на атомы фтора, который является более электроотрицательным, приводит к усилению анальгетического эффекта и увеличению среднесмертельной дозы. Включение в фенилуксусный фрагмент молекулы третьего атома фтора снижает анальгетическую дозу и повышает порог проявления эффекта седации.

Анализируя полученные данные можно заключить, что среди агонистов КОР выявлены вещества, обладающие как высокой анальгетической активностью, так и седативным эффектом. Такая тенденция наблюдается для широкого круга исследуемых соединений обзор которых приводится в работах [1, 2, 3], где указывается, что у исследуемого класса веществ, несмотря на отсутствие способности угнетать дыхание и вызывать лекарственную зависимость, в большинстве случаев сохраняются побочные реакции, вызывающие дисфорию и седацию.

Таким образом, синтетические КОА могут представлять собой перспективный класс физиологически активных веществ для отбора лекарственных средств с направленной активностью, применение которых с соответствующей

дыхательной поддержкой может обеспечивать проведение обезболивания, позволяя достичь как анальгезии, так и седации. Изменяя структуру молекул этих соединений путём замены функциональных заместителей, можно выявить вещества обладающие комплексом показателей биологической активности среди которых имеются соединения с терапевтическим индексом более, чем на порядок превышающий таковой для пентазоцина.

Полученные данные позволяют предположить, что среди изученных соединений класса агонистов КОР могут быть найдены более эффективные и безопасные вещества по сравнению с изученными.

В ходе проведенных исследований по изучению анальгетической активности и токсических свойств трёх групп агонистов капса-опиоидных рецепторов: 1,2-циклогексиламина, 1,2,3,4-пиперидина, 1,2,4-пиперазина установлено:

1. В ряду производных 1,2-циклогексиламинов и 1,2,4-пиперазинов прослежено снижение анальгетической активности и токсичности соединений при сокращении длины углеродной цепочки в фенилалкильном заместителе при атоме азота.

2. В ряду производных 1,2,4-пиперазинов замена атомов хлора в 3,4-положениях фенильного кольца на атомы фтора, который является более электроотрицательным заместителем, приводит к усилению анальгетического эффекта и снижению токсичности соединений в сравнении с пентазоцином.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Литвинов Р.А. Фармакотоксикологические свойства нового капса-опиоидного агониста – производного бензимидазола: Дисс. канд. мед. наук, Волгоград; 2016, 26 с.
2. Ращенко А.И. Фармакологические свойства нового обезболивающего средства производного бензимидазола: Дисс. канд. фарм. наук, Волгоград; 2014.
3. Соснов А.В., Садовников С.В., Семченко Ф.М. и др. Сильнодействующие ненаркотические анальгетики как направление развития фармацевтики. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016;1 (14): 196-206.
4. Walsh S.L., Strain E.C., Abreu M.E., Bigelow G.E. Enadoline, aselectivekappa-opioidagonist: comparison with butorphanol and hydromorphone in humans. *Psychopharmacol. (Berl.)*. 2001. 157 (2): 151162.
5. Ranganathan M., Schnakenberg A., Skosnik P.D. et al. Dose-related behavioral, subjective, endocrine and psychophysiological effects of the k opioid agonist Salvinorin A in humans. *Biol. Psychiatry*. 2012. 72 (10): 871-879.
6. Kasatkin I.K., Nazarov G.V., Galan S.E. et al. Drug synthesis methods and manufacturing technology: new method for the synthesis of methyl-4-[(3,4-dichlorophenyl)acetyl]-3-[(1-pyrrolydinil) methyl]-1-[piperazinecarboxylate]. *Pharm. Chem. J.* 2009. 43 (2): 115117.
7. Быков В.Н., Анохин А.Г., Чепур С.В. и др. Исследование психолептических эффектов. *Токсикологический вестник*. 2011; 3 (108): 1316.
8. Roux S., Sable E., Porsolt R.D. Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agents and its effects on behavior and physiological function. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2004. 27 (1): 10.10.1.-10.10.23.
9. Mulla W.A., More S.D., Jamge S.B. et al. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract of roots *Adhatodavasica* Linn. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 2010. 2 (2): 13641368.
10. Finney D.J. Probit analysis, 3d ed. New York: Cambridge University Press; 1971.
11. Lei C., Sun X. Comparing lethal dose ratios probit regression with arbitrary slopes // *BMC Pharmacology and Toxicology*/ 2018/ 19:61. 10 p. <https://doi.org/10.1186/s40360-018-0250-1>.

REFERENCES:

1. Litvinov R.A. Pharmacotoxicological properties of a new kappa-opioid agonist - benzimidazole derivative: Diss. cand. med. sciences, Volgograd; 2016, 26 p. (in Russian).
2. Raschenko A.I. Pharmacological properties of a new analgesic benzimidazole derivative: Diss. cand. pharm. sciences, Volgograd; 2014 (in Russian).
3. Sosnov A.V., Sadovnikov S.V., Semchenko F.M. et al. Strong non-narcotic analgesics as a direction of pharmaceutical development. Development and registration of medicines. 2016;1 (14): Pp. 196-206 (in Russian).
4. Walsh S.L., Strain E.C., Abreu M.E., Bigelow G.E. Enadoline, aselectivekappa-opioidagonist: comparison with butorphanol and hydromorphone in humans. *Psychopharmacol. (Berl.)*. 2001. 157 (2): Pp. 151162.
5. Ranganathan M., Schnakenberg A., Skosnik P.D. et al. Dose-related behavioral, subjective, endocrine and psychophysiological effects of the k opioid agonist Salvinorin A in humans. *Biol. Psychiatry*. 2012. 72 (10): Pp.871-879.
6. Kasatkin I.K., Nazarov G.V., Galan S.E. et al. Drug synthesis methods and manufacturing technology: new method for the synthesis of methyl-4-[(3,4-dichlorophenyl)acetyl]-3-[(1-pyrrolydinil) methyl]-1-[piperazinecarboxylate]. *Pharm. Chem. J.* 2009. 43 (2): Pp. 115117.
7. Bykov V.N., Anokhin A.G., Chepur S.V. et al. Research of psycholeptic effects. *Toxicological Review*. 2011; 3 (108): Pp. 1316 (in Russian).
8. Roux S., Sable E., Porsolt R.D. Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agents and its effects on behavior and physiological function. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2004. 27 (1):10.10.1.-10.10.23.
9. Mulla W.A., More S.D., Jamge S.B. et al. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract of roots *Adhatodavasica* Linn. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 2010. 2 (2): Pp. 13641368.
10. Finney D.J. Probit analysis, 3d ed. New York: Cambridge University Press; 1971.
11. Lei C., Sun X. Comparing lethal dose ratios probit regression with arbitrary slopes // *BMC Pharmacology and Toxicology*/ 2018/ 19:61. 10 p. <https://doi.org/10.1186/s40360-018-0250-1>.

S.V. Chepur, S.E. Galan, M.S. Vakhviaynen, R.N. Khromov, A.N. Semenov

EXPERIMENTAL EVALUATION OF TOXICOMETRIC INDICATORS AND ANALGESIC ACTIVITY OF KAPPA-OPIOID RECEPTOR AGONISTS

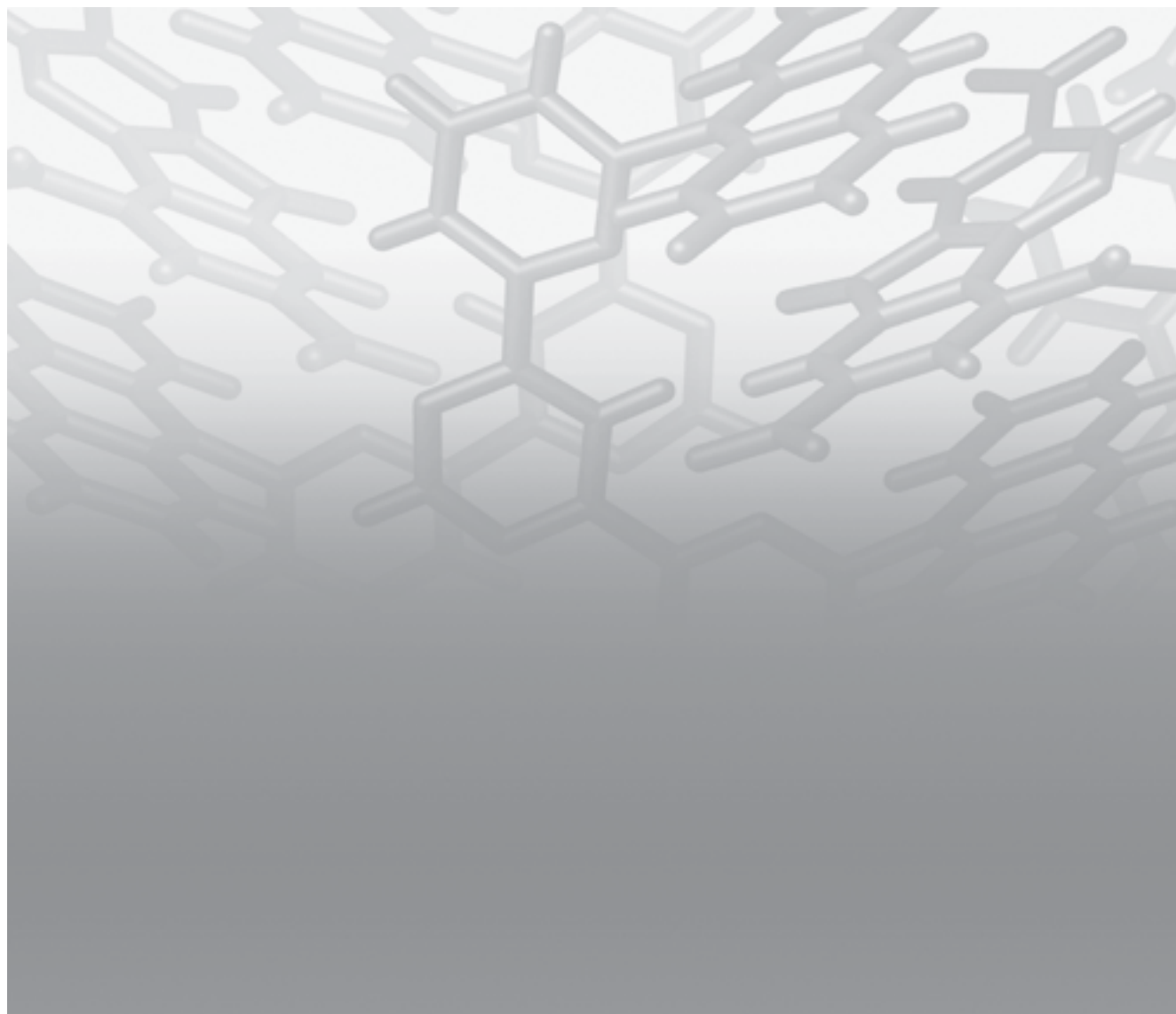
State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine, Ministry of Defence of the Russian Federation, 195043, Saint Petersburg, Russian Federation

Data on the biological activity of kappa-opioid receptor agonists - derivatives of three groups of compounds: 1,2-cyclohexylamine, 1,2,3,4-piperidine, 1,2,4-piperazine are presented. On the examples of 1,2-cyclohexylamine and 1,2,4-piperazine derivatives, it has been shown that a decrease in the length of the carbon chain in the phenylalkyl substituent at the nitrogen atom is accompanied by a decrease in the analgesic activity and toxicity of compounds. The replacement of chlorine atoms in the 3 and 4 positions of the phenyl ring with fluorine atoms, which are more electronegative, leads to an increase in the analgesic effect and a decrease in the toxicity of the compounds.

Keywords: *kappa-opioid receptor agonists, functional substituents, analgesic and sedative effect, toxicity, safety.*

Quote: S.V. Chepur, S.E. Galan, M.S. Vakhviaynen, R.N. Khromov, A.N. Semenov.
Experimental evaluation of toxicometric indicators and analgesic activity of kappa-opioid receptor agonists. Toxicological Review. 2020; 4:27-33.

Переработанный материал поступил в редакцию 02.07.2020 г.



О ВОЗМОЖНОСТИ РАЗВИТИЯ ТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПРИ КОНТАКТЕ С ПРОИЗВОДНЫМ N-НИТРОЗОАЛКИЛМОЧЕВИНЫ – ЛИЗОМУСТИНОМ

К.И. Стосман,
Л.В. Луковникова,
Г.И. Сидорин, Л.И. Дьякова,
Э.П. Зацепин, Г.В. Шестова,
Б.С. Литвинцев

ФГБУН «Институт токсикологии
Федерального медико-биологического
агентства», 192019, г. Санкт-
Петербург, Российская Федерация

В работе представлены результаты исследования возможности развития токсических эффектов при контакте с противоопухолевым препаратом лизомустин для оценки риска здоровью при изготовлении готовой лекарственной формы и при ее применении. Работа выполнена на 40 беспородных крысах, 40 морских свинках и 114 беспородных мышах. Проведенное экспериментальное исследование показало, что лизомустин не раздражает неповрежденную кожу, не является потенциальным аллергеном, не оказывает кожно-резорбтивного действия, не вызывает нарушений репродуктивной функции. У лекарственного средства выявлены мутагенные свойства, присущие многим цитостатикам, представителям класса нитрозоалкилмочевин. Результаты исследований позволяют сделать заключение о недопустимости наличия препарата в воздухе производственных помещений и на кожных покровах, работающих при его изготовлении и применении готовой лекарственной формы.

Ключевые слова: лизомустин, мутагенные свойства, репродуктивная функция, кожно-резорбтивное действие, аллергизирующие свойства.

Цит: К.И. Стосман, Л.В. Луковникова, Г.И. Сидорин, Л.И. Дьякова, Э.П. Зацепин, Г.В. Шестова, Б.С. Литвинцев.

О возможности развития токсических эффектов при контакте с производным n-нитрозоалкилмочевины – лизомустином. Токсикологический вестник. 2020; 3:4. 34-38

Введение. Вопросы охраны здоровья работающего населения в любом государстве являются одной из приоритетных проблем сохранения здоровья нации. Для профилактики профессиональных интоксикаций на предприятиях фармацевтической промышленности, а также у медицинского персонала клиник, проводится тщательное изучение токсического действия веществ, потенциальных лекарственных препаратов [1, 2].

Производные N-нитрозоалкилмочевины в настоящее время успешно применяются в составе схем комбинированной химиотерапии при ле-

чении различных видов и локализации злокачественных опухолей. Препараты этой группы обладают не только специфически направленным терапевтическим действием, но и широким спектром побочных токсических эффектов. Попадая в окружающую среду на разных этапах производства и использования, эти вещества в той или иной степени могут оказывать вредное воздействие на человека. Контакт с химиопрепаратами возможен при ингаляционном поступлении при синтезе и приготовлении лекарственных форм, при попадании на кожу, при соприкосновении с упаковочными поверхностями

Стосман Кира Иосифовна (Stosman Kira Iosiphovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, kira.stosman@influenza.spb.ru;

Луковникова Любовь Владимировна (Lukovnikova Lubov Vladimirovna), доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, lukovnikova.l.v@toxicology.ru;

Сидорин Геннадий Иванович (Sidorin Gennadij Ivanovich), доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, sidorin.g@mail.ru;

Дьякова Людмила Ивановна (Dyakova Lyudmila Ivanovna), кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»;

Зацепин Эдуард Павлович (Zatsepina Eduard Pavlovich), доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»;

Шестова Галина Владимировна (Shestova Galina Vladimirovna), доктор медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»;

Литвинцев Богдан Сергеевич (Litvintsev Bogdan Sergeevich), доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»

ми, загрязненными флаконами, при проведении инъекций и др. Не исключено и пероральное поступление в случае нарушений личной гигиены. Всем этим факторам могут быть подвергнуты работники фармацевтических компаний, имеющие непосредственный контакт с противоопухолевыми препаратами при их производстве, а также медицинский персонал.

Лекарственные средства группы N-нитрозоалкилмочевина обладают канцерогенными, мутагенными, тератогенными, эмбриотоксическими свойствами, могут оказывать аллергизирующее действие [3]. Эпидемиологические наблюдения за состоянием здоровья лиц, занятых в технологическом процессе производства противоопухолевых цитостатиков по разным причинам практически отсутствуют. В последние годы появилась информация о вредном воздействии противоопухолевых препаратов на медицинский персонал онкологических клиник [4, 5, 6]. По данным некоторых авторов, в моче у лиц, занятых приготовлением лекарственных форм цитостатиков, высока вероятность содержания мутагенных субстанций (в виде молекул препаратов или их метаболитов), что можно расценивать как биомаркеры экспозиции и показатели высокой степени риска здоровью [7].

Влияние на репродуктивную функцию – один из аспектов, которому уделяется существенное внимание применительно к характеристике вредных последствий профессионального контакта с химиопрепаратами. Репродуктивная система – наиболее уязвима при действии многих противоопухолевых средств. Проведенные в США исследования, показали, что у медицинского персонала, работающего с противоопухолевыми препаратами, отмечена высокая частота преждевременных родов и более низкий вес ребенка при рождении [8]. В ряде статей описано двукратное повышение риска выкидышей у медсестер, профессионально контактирующих с противоопухолевыми средствами в первом триместре беременности [9, 10]. Исследования с участием медицинского персонала, работающего с цитостатиками, позволяет предположить возможность проявления мутагенного и канцерогенного действия препаратов [11].

В связи с этим, для эффективного наблюдения за состоянием здоровья работающих на производстве, медперсонала онкологических клиник необходимы знания о характере проявлений всех сторон токсического действия противоопухолевых препаратов.

Лизомустин является оригинальным противоопухолевым лекарственным средством, относящимся к соединениям алкилирующего действия, который является бифункциональным хлорэтильным производным нитрозоалкилмо-

чевины, представляет собой смесь 2 изомеров (активного и малоактивного), ингибирует синтез ДНК, РНК и протеинов.

Целью данной работы было изучение токсических свойств противоопухолевого препарата лизомустин для оценки возможного риска здоровью персонала при синтезе готовой лекарственной формы и при ее применении.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 40 беспородных крысах с массой тела 160-190 г., 40 морских свинок с массой тела 250-300 г. и 114 мышах с массой тела 18-20 г., полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАН (Ленинградская область). Экспериментальное исследование проведено в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными [12]. Мутагенные, аллергизирующие свойства, оценку репродуктивной функции, раздражающего и кожно-резорбтивного действия осуществляли, используя современные методы исследования [13, 14]. Лизомустин вводили мышам и крысам в брюшную полость. Этот путь введения объясняется тем, что параметры токсичности при введении в брюшную полость близки к параметрам токсичности при поступлении через легкие [15]. Ингаляционный путь поступления лекарственного средства в организм человека наиболее вероятен при его синтезе на производстве и применении в медицинской практике. Раздражающее и кожно-резорбтивное действие исследовали путем однократной аппликации 25% мази лизомустина на вазелиновой основе на 2/3 хвоста мышей с экспозицией 2 часа. Действие препарата на кожу оценивали визуально сразу после воздействия и далее ежедневно в течение 14 дней. Оценка раздражающего действия на слизистые оболочки проводилась при однократном внесении в конъюнктивальный мешок глаза крыс лизомустина в вазелиновом масле (1:3) с последующей регистрацией видимых и скрытых повреждений роговицы в течение 3 суток. Скрытые повреждения роговицы выявляли с помощью 1% раствора флюоресцеина в 2% растворе NaHCO_3 . Аллергизирующие свойства препарата изучали в реакции гиперчувствительности замедленного типа на мышах, а также методом накожных аппликаций и в тесте конъюнктивальная проба на морских свинок. Для накожных аппликаций лизомустин наносили в течение 28 дней по 5 раз в неделю на выстриженный участок кожи 2x2 см в виде 25% мази на вазелиновой основе. При проведении конъюнктивальной пробы морских свинок сенсibilizировали в течение 30 дней, препарат вводили в дозе 0,1 мг/кг. Для оценки мутагенного действия использовали микроядерный тест *in vivo*. Препарат вводили мышам

однократно в дозах 100 мг/кг и 200 мг/кг. Через 30 часов выделяли костный мозг из бедренной кости, центрифугировали. Из осадка готовили мазки клеток, высушивали и окрашивали по Романовскому–Гимзе–Май–Грюнвальду. Подсчитывали число полихроматофильных (ПХЭ) и нормохромных (НХЭ) эритроцитов с микроядрами. Репродуктивную функцию исследовали на беспородных крысах-самках. Препарат вводили в дозе 0,026 мг/на животное (эквивалентной ингалируемой концентрации 1,0 мг/м³, расчетной величине ОБУВ - ориентировочный безопасный уровень воздействия) в течение 30 дней до спаривания. На 20-й день беременности проводили эвтаназию животных. После вскрытия определяли количество желтых тел беременности, плацент и плодов, рассчитывали до-, постимплантационную и общую внутриутробную гибель, измеряли и взвешивали плоды и плаценты, рассчитывали индекс фертильности. В динамике эксперимента (на 7, 14 и 20 дни) оценивали массу тела беременных самок.

Статистическая обработка данных была выполнена с использованием пакета статистических программ «GraphPadPrism 6.0» (США). Отличия между выборками оценили с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни и считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В экспериментах на мышах и крысах было показано, что лизомустин не раздражает кожу и слизистые, не проникает через неповрежденные кожные покровы. Однократная аппликация 25% мази на кожу мышей не приводила к каким-либо изменениям. Внесение препарата в конъюнктивальный мешок глаза также не вызывало визуальных изменений слизистых и роговицы.

При изучении аллергизирующих свойств пре-

парата у мышей не было выявлено развития гиперчувствительности замедленного типа. Величина отека лапы и индекс реакции у животных из опытных и контрольной групп не различались. При проведении накожных аппликаций у морских свинок не были выявлены симптомы, свидетельствующие об аллергизации. Многократное нанесение препарата (20 аппликаций) не вызвало патологических изменений кожных покровов в виде отека, покраснения или некроза. Толщина кожной складки у морских свинок из опытных и контрольной групп не различалась на протяжении всего эксперимента. При проведении конъюнктивальной пробы у морских свинок на всех сроках наблюдения (через 15 минут и 24 часа) реакция на введение препарата отсутствовала. Покраснения слезного протока, склеры или конъюнктивы не наблюдалось. Суммируя вышеизложенное можно заключить, что препарат лизомустин не приводил к развитию гиперчувствительности как немедленного, так и замедленного типа.

Для оценки мутагенного действия препарата лизомустин применялся микроядерный тест *in vivo*, который позволяет выявить структурные изменения хромосом (кластогенный эффект). В микроядерном тесте кластогенный эффект оценивается непрямым путем: подсчетом в интерфазе мелких ядер, образовавшихся из ацентрических фрагментов хромосом или целых хромосом. О цитотоксическом действии вещества судили по определению доли полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) от суммы ПХЭ и нормохромных эритроцитов (НХЭ), отражающей состояние эритропоэза. У мышей из опытных групп обоего пола отмечалось существенное увеличение числа полихроматофильных эритроцитов с микроядрами (табл.). Причем на-

Таблица

Результаты исследования мутагенного действия лизомустина на мышах

| Экспериментальные группы животных | Доза препарата 100 мг/кг | | Доза препарата 200 мг/кг | |
|-----------------------------------|--------------------------|--|--------------------------|--|
| | ПХЭ/НХЭ | Содержание ПХЭ с микроядрами [ед./500 ПХЭ] | ПХЭ/НХЭ | Содержание ПХЭ с микроядрами [ед./500 ПХЭ] |
| Контроль, самцы | 0,93±0,08 | 0,7 | 1,00±0,06 | 0,9 |
| Лизомустин, самцы | 0,83±0,09 | 3,5* | 0,84±0,05 | 9,0* |
| Контроль, самки | 1,29±0,14 | 0,9 | 0,91±0,13 | 0,9 |
| Лизомустин, самки | 0,83±0,07* | 3,4* | 0,74±0,09 | 5,6* |

Примечание: * – статистически значимо по сравнению с контролем, $p < 0,05$

блюдалась дозовая зависимость. Так, при введении препарата в большей дозе отмечено почти 2-3-х кратное повышение образования микроядер в цитоплазме клеток.

Выявленные мутагенные свойства являются одним из важнейших механизмов токсического действия лизомустина и указывают на возможность канцерогенного риска, присущего многим цитостатикам представителям класса нитрозоалкилмочевин. Следует подчеркнуть, что отмечалось значимое увеличение процентного соотношения ПХЭ/НХЭ у самок, получавших лизомустин, по сравнению с контролем. Этот факт свидетельствует о том, что у женских особей наблюдался более выраженный генотоксический эффект, что требует дальнейшего исследования. Таким образом, лизомустин, как и большинство противоопухолевых препаратов из группы нитрозоалкилмочевин, обладает мутагенным эффектом. Данный факт дает возможность предположить, что при длительном контакте с препаратом даже в низких дозах риск развития отдаленных последствий, в том числе канцерогенного, вполне вероятен.

В условиях выполненного эксперимента при исследовании возможных токсических эффектов при введении лизомустина на репродуктивную функцию самок крыс показано отсутствие негативного влияния препарата на фертильность животных. Масса тела у особей, получавших лекарственное средство, была несколько снижена, но находилась в пределах физиологической нормы. К окончанию (к 20-му дню) беременности этот показатель у самок обеих экспериментальных групп не имел существен-

ных различий между собой. Результаты эксперимента показали, что поступление лизомустина на уровне расчетной величины ОБУВ_{р.з.} (1,0 мг/м³) не оказывало влияния на репродуктивную функцию. Выявленное отсутствие негативного эффекта у самок крыс позволяет предположить, что у женщин, имеющих контакт с данным противоопухолевым препаратом до наступления беременности, сохраняется возможность рождения ребенка. Однако необходимо учитывать, что у матери при профессиональной экспозиции цитостатиком повышен относительный риск врожденных пороков развития у детей [16, 17].

Заключение. Анализ полученных результатов позволяет заключить, что лизомустин является высокоактивным лекарственным средством с высокой потенциальной возможностью проявления не только мутагенного, но и канцерогенного эффектов (1-2А группы в соответствии с классификацией МАИР) [18]. По данным проведенного экспериментального исследования лизомустин не раздражает неповрежденную кожу, не оказывает алергизирующего действия. При моделировании условий близких к производственным, при введении дозы лизомустина (0,026 мг/на особь), адекватной поступлению препарата ингаляционным путем на уровне расчетного ОБУВ_{р.з.}, нарушений репродуктивной функции не установлено. С целью сохранения здоровья персонала при изготовлении и применении готовой лекарственной формы лизомустина в воздухе рабочей зоны и на кожных покровах работающих наличие препарата не допустимо.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горохова Л.Г., Мартынова Н.А., Кизиченко Н.В., Логунова Т.Д. Гигиенические аспекты состояния здоровья работающих в химико-фармацевтическом производстве. Медицина в Кузбассе. 2017; 16(3): 11-16
2. Имманкулова Б.Н., Джусупов К.О. Влияние химического фактора производственной среды на здоровье медицинского персонала в онкологической клинике. Вестник КГМА им. И.К.Ахунбаева. 2016; 5: 85 - 91.
3. Багирова В.Л., Рышкова Н.Е., Оборотова Н.А. Новая лекарственная форма противоопухолевого препарата Бис-хлорэтил-нитрозоомочевины (БХНМ). Ведомости НЦ ЭГКПС. 1999;1: 15-19.
4. Маргаева М.П., Карлова Е.В. Факторы, влияющие на состояние здоровья среди медицинских работников. Медсестра. 2015; 6: 48-58.
5. Ramphal R., Bains T., Goulet G., and Vaillancourt R. Occupational exposure to chemotherapy of pharmacy personnel at a single centre. CJHP. 2015; 68 (2): 104 - 112.
6. Connor T.H., DeBord D.G., Pretty J.R. et al. Evaluation of antineoplastic drug exposure of health care workers at three university-based US cancer centers. J. Occup. Environ Med. 2010;52:1019-1027.
7. Alavi N.M. Occupational Hazards in Nursing. Nurs Midwifery Stud. 2014; 3 (3): 223-257.
8. Тюляндин С.А., Самойленко И.В., Измерова Н.И., Кузьмина Л.П., Королева Е.П., Тихонова Г.И. Руководство для медицинского персонала по безопасному обращению с противоопухолевыми препаратами. Москва; 2012.
9. Walton A.M.L., Mason S., Busshart M., Spruill A.D. et al. Safe Handling: Implementing Hazardous Drug Precautions. Clin J Oncol Nurs. 2012; 16 (3): 251-254.
10. Janes A., Tanguay C., Caron J., Bussieres J-F. Environmental contamination with cyclophosphamide, ifosfamide, and methotrexate: a study of 51 canadian centres. Can J Hosp Pharm. 2015; 68 (4): 279-89.
11. Соленова Л.Г., Якубовская М.Г. Химиотерапия: возможные риски при обращении с противоопухолевыми препаратами. Успехи молекулярной онкологии. 2017; 4 (3): 10-20.
12. Директива 2010/63/EU европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб.; 2012.
13. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012.
14. Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы. Методические указания. МУ 1.1.578-96; 2014.
15. Саночкий И.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия). М.: Медицина; 1970.
16. Тихонова Г.И., Рубцова Н.Б., Яковлева Т.П. Условия труда родителей как фактор риска развития врожденных пороков у детей. Безопасность жизнедеятельности 2006;(2):52-7.
17. Shirangi A., Bower C., Holman C.D. et al. A study of handling cytotoxic drugs and risk of birth defects in offspring of female veterinarians. Int J Environ Res Public Health 2014;11(6):6216-30.
18. Agents classified by the IARC MONOGRAPHS, 1-117. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>

REFERENCES:

1. Gorohova L.G., Martynova N.A., Kizichenko N.V., Logunova T.D. Hygienic aspects of the health status of workers in the chemical and pharmaceutical industry. Medicine in Kuzbass. 2017; 16(3): 11-16 (in Russian).
2. Imankulova B.N., Dzhusupov K.O. The influence of the chemical factor of the working environment on the health of medical personnel in an oncology clinic. Bulletin of I.K. Akhunbaev Kyrgyz State Medical Academy. 2016; 5: 85 - 91 (in Russian).
3. Bagirova B.L., Ryshkova N.E., Oborotova N.A. A new dosage form of the antitumor drug bis-chloroethyl-nitrosourea.

Vedomosti NC EGKPS. 1999;1: 15-19 (in Russian).

4. *Margaeva M.P., Karpova E.V.* Factors affecting the health status of medical workers. Nurse. 2015; 6: 48-58 (in Russian).
5. *Ramphal R., Bains T., Goulet G., Vaillancourt R.* Occupational exposure to chemotherapy of pharmacy personnel at a single centre. CJHP. 2015; 68 (2): 104 - 112.
6. *Connor T.H., DeBord D.G., Pretty J.R.* et al. Evaluation of antineoplastic drug exposure of health care workers at three university-based US cancer centers. J. Occup. Environ Med. 2010; 52: 1019-1027.
7. *Alavi N.M.* Occupational Hazards in Nursing. Nurs Midwifery Stud. 2014; 3 (3): 223-257.
8. *Tyulyandin S.A., Samoilenko I.V., Izmerova N.I., Kuz'mina L.P., Koroleva E.P., Tihonova G.I.* Guidelines for medical personnel on the safe handling of anticancer drugs. Moscow; 2012 (in Russian).
9. *Walton A.M.L., Mason S., Busshart M., Spruill A.D.* et al. Safe Handling: Implementing Hazardous Drug Precautions. Clin J Oncol Nurs. 2012; 16 (3): 251-254.
10. *Janes A., Tanguay C., Caron J., Bussieres J-F.* Environmental contamination with cyclophosphamide, ifosfamide, and methotrexate: a study of 51 canadian centres. Can J Hosp Pharm. 2015; 68 (4): 279-89.
11. *Solenova L.G., Yakubovskaya M.G.* Chemotherapy: possible risks during handling anticancer drugs. Advances in molecular oncology. 2017; 4 (3): 10-20 (in Russian).
12. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union for the protection of animals used for scientific purposes. SPb.;2012.
13. Guidelines for preclinical studies of drugs. Part 1. M.: Grif & K; 2012 (in Russian).
14. Requirements for the formulation of experimental studies to substantiate the maximum permissible concentrations of industrial chemical allergens in the air of the working zone and atmosphere. Methodological guidelines. MU 1.1.578-96; 2014 (in Russian).
15. *Sanockij I.V.* Methods for determining the toxicity and hazard of chemicals (toxicometry). M.: Medicina; 1970 (in Russian).
16. *Tikhonova G.I., Rubtsova N.B., Yakovleva T.P.* Working conditions of parents as a risk factor for the development of congenital malformations in children. Life Safety. 2006;(2):52-7 (in Russian).
17. *Shirangi A., Bower C., Holman C.D.* et al. A study of handling cytotoxic drugs and risk of birth defects in offspring of female veterinarians. Int J Environ Res Public Health. 2014; 11(6): 6216-30.
18. Agents classified by the IARC MONOGRAPHS, 1-117. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification>.

K.I. Stosman, L.V. Lukovnikova, G.I. Sidorin, L.I. Dyakova, E.P. Zatsepin, G.V. Shestova, B.S. Litvintsev

ABOUT THE POSSIBILITY OF TOXIC EFFECTS DEVELOPING IN CONTACT WITH N-NITROSOALKYLUREA DERIVATIVE - LYSOMUSTINE

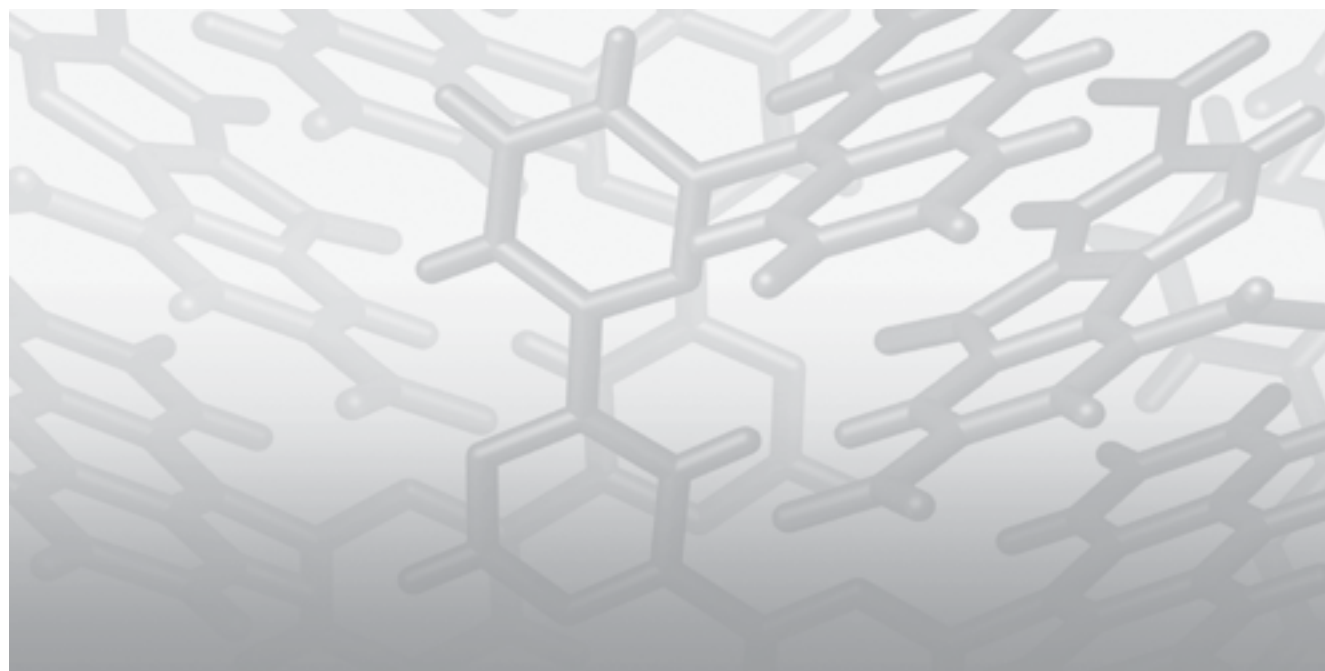
Institute of Toxicology of the Federal Medical Biological Agency, 192019, Saint Petersburg, Russian Federation

The paper presents the results of a study on the possibility of toxic effects developing in contact with the antitumor drug – lysomustine - to assess the health risk in the manufacture of the finished dosage form and its use. The work was performed on 40 outbred rats, 40 guinea pigs and 114 outbred mice. The experimental study has showed that lysomustine does not irritate intact skin, is not a potential allergen, has no skin-resorptive effect, does not cause reproductive disorders. The drug reveals mutagenic properties inherent in many cytostatics, representatives of the class of N-nitrosoalkylureas. The research results allow to conclude that the presence of the drug in the air of industrial premises and on the skin of workers in its manufacture and use of the finished dosage form is unacceptable.

Keywords: *lysomustine, mutagenic properties, reproductive function, skin-resorptive action, allergic properties.*

Quote: K.I. Stosman, L.V. Lukovnikova, G.I. Sidorin, L.I. Dyakova, E.P. Zatsepin, G.V. Shestova, B.S. Litvintsev. About the possibility of toxic effects developing in contact with N-nitrosoalkylurea derivative – lysomustine. Toxicological Review. 2020; 4:34-38

Материал поступил в редакцию 13.04.2020 г.



НЕЙРОТОКСИКО- ЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ АВ-19 ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Д.В. Мальцев^{1,2}, А.А. Спасов^{1,2},
В.А. Косолапов¹, К.Т. Султанова^{1,2},
М.В. Мирошников¹, С.К. Котовская³,
И.М. Сапожникова³, В.Л. Русинов³

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 400131, Россия, г. Волгоград, Российская Федерация

²Государственное бюджетное учреждение Волгоградский медицинский научный центр 400131, г. Волгоград, Российская Федерация

³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» 620002, г. Екатеринбург, Российская Федерация

В настоящем исследовании представлены результаты изучения нейротоксикологического профиля нового соединения АВ-19, действующего на конечные продукты гликирования коллагена (AGE) и рецепторы к ним (RAGE), для профилактики и лечения осложнений сахарного диабета. Использовалась методика многотестового наблюдения по «S.Irwin». Показатели тестов оценивали в параллельных группах, получавших вещество в дозах, начинающихся со средней эффективной (ЭД₅₀) и с кратным увеличением в 5, 10, 20 и 50 раз. Было установлено, что соединение АВ-19 в дозах 20, 100 и 200 мг/кг не оказывает влияния на функционально-поведенческий статус животных. Однако при увеличении дозировки до 400 мг/кг наблюдались типичные проявления интоксикации: снижение мышечного тонуса, гипотермия, седация, тахипноэ. В результате проведенного изучения выявлено, что для нейротоксикологических свойств соединения АВ-19 характерна дозозависимая активность. Также была обозначена минимальная токсическая доза 400 мг/кг ≤ ТД_{мин} ≤ 1000 мг/кг.

Ключевые слова: АВ-19, сахарный диабет, осложнения сахарного диабета, нейронпсихотропная активность, методика многотестового наблюдения по «S.Irwin».

Цит: Д.В. Мальцев, А.А. Спасов, В.А. Косолапов, К.Т. Султанова, М.В. Мирошников, С.К. Котовская, И.М. Сапожникова, В.Л. Русинов. Нейротоксикологические свойства соединения АВ-19 для профилактики и лечения осложнений сахарного диабета. Токсикологический вестник. 2020; 4:39-43

Введение. Терапия сахарного диабета представляется важной задачей, требующей решения [1,2]. Существующие препараты для лечения данного заболевания обладают рядом нежелательных эффектов, таких как головокружение,

головная боль, диспепсические явления, аллергические реакции, анемический синдром (метформин, репаглинид), так же на фоне приема некоторых препаратов может возникнуть прибавка в весе и гипогликемия (глибенкламид, глимеци-

Мальцев Дмитрий Васильевич (Maltsev Dmitriy Vasil'evich), кандидат биологических наук, доцент кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, maltsevdmityri@rambler.ru;

Спасов Александр Алексеевич (Spasov Aleksandr Alekseevich), доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, Академик РАН, Заслуженный деятель науки РФ, aspasov@mail.ru;

Султанова Кира Тимуровна (Sultanova Kira Timurovna), ассистент кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, sultanova.pharma@gmail.com;

Косолапов Вадим Анатольевич (Kosolapov Vadim Anatol'evich), доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, vad-ak@mail.ru;

Мирошников Михаил Владимирович (Miroshnikov Mikhail Vladimirovich), ассистент кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, mihailmiroshnikov@mail.ru;

Котовская Светлана Константиновна (Kotovskaya Svetlana Konstantinovna), кандидат химических наук, УрФУ, s.k.kotovskaya@urfu.ru;

Сапожникова Ирина Михайловна (Sapozhnikova Irina Mikhailovna), младший научный сотрудник УрФУ, i.m.sapozhnikova@urfu.ru.

Русинов Владимир Леонидович (Rusinov Vladimir Leonidovich), доктор химических наук, член-корреспондент РАН, УрФУ, v.l.rusinov@urfu.ru;

рид) [3], так же на фоне применения некоторых препаратов (аминогуанидин) возможно развитие аутоиммунных состояний, появление гриппозоподобного синдрома, волчаночно-подобного синдрома, анемии, васкулитов, ингибирования eNOS [15]. Сахарный диабет характеризуется прогрессирующим течением и развитием ряда острых и поздних осложнений, зачастую приводящих к временной потере трудоспособности, инвалидизации и ранней смерти [4,5]. В связи с этим поиск новых антидиабетических средств остается одним из перспективных направлений современной фармакологии. Поскольку сахарный диабет является хроническим заболеванием, требующим длительного применения сахароснижающих препаратов, лекарственная безопасность является приоритетным направлением при создании новых препаратов [6]. В ходе ранее проведенных исследований, было найдено соединение для лечения отдаленных последствий сахарного диабета под шифром АВ-19. Полученные результаты позволяют судить о достаточно высокой эффективности выявленного соединения и о необходимости дальнейшего углубленного изучения спектра его свойств, а также возможных токсических эффектов [10,11]. В связи с этим особый интерес представляет оценка возможных нейротропных эффектов соединения АВ-19 с использованием многотестового наблюдения по «S.Irwin».

Цель работы - изучить нейротоксикологические свойства соединения АВ-19 при пероральном введении половозрелым мышам-самцам с использованием многотестового наблюдения по «S.Irwin».

Материалы и методы исследования. Субстанция АВ-19 (натриевая соль диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты моногидрат) синтезирована в ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург (патент РФ № 2612300 от 02.11.2015).

Экспериментальная часть исследований проводилась на беспородных белых мышах-самцах массой 18-22 г. Животные содержались в стандартных условиях с 12 часовым режимом освещения при свободном доступе к еде и воде (ГОСТ Р 50258-92), с соблюдением Международных рекомендаций по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях и Национальных стандартов «Принципы надлежащей лабораторной практики» [7,8]. Исследование специфической токсичности регламентировано методическими рекомендациями по проведению доклинических исследований лекарственных средств [9]. Изучение нейротоксикологического профиля нового соединения под лабораторным шифром

АВ-19 проводилось по модифицированной методике S.Irwin [11-14]. В ходе исследования было сформировано 6 экспериментальных групп (n=6) – 1 контрольная и 5 опытных. Исследуемые вещества вводили внутривентрикулярно металлическим зондом. Изучение нейротропных свойств субстанции АВ-19 проводилось в нарастающих дозах, начиная со средней эффективной (20 мг/кг) и дозах, превышающих эффективную дозу в 5, 10, 20 и 50 раз. Животные контрольной группы получали дистиллированную воду из расчета 100 мкл на 10 г веса. Для изучения психосоматических реакций проводили оценку следующих параметров: поведенческие реакции (вокализация, настороженность, пассивность, стереотипия, агрессия, беспокойство, груминг, спонтанная двигательная реакция), нервно-мышечные эффекты (реакции на боль, прикосновение, реакция на стук, подергивания, судороги, тремор, тонус конечностей, расстройство походки) и вегетотропные эффекты (птоз/экзофтальм, размеры зрачка, уринация, дефекация, саливация, цвет кожи, частота дыхания и ректальная температура). Для оценки данных параметров использовалась 8-балльная шкала S.Irwin. Показатели состояния животных в норме приравнивались к 4 баллам. Однако для некоторых показателей, отсутствующих у животных (вокализация, стереотипия, беспокойство, агрессия, тремор, подергивание, судороги, расстройство походки и саливация), за норму принималось 0 баллов, а изменения фиксировались в диапазоне от 0 до 4 баллов. Изменение параметра на 25 % приравнивалось к 1 баллу. Возрастание изменений функционально-поведенческого статуса от 4 до 8 баллов указывает на увеличение эффекта, снижение от 4 до 0 баллов характеризуется уменьшением эффекта. Уровень изменений фиксируемых показателей оценивался через 60 и 120 мин после введения веществ. Также прогнозировали доклиническую степень безопасности соединения и определяли минимальную токсическую дозу (ТД_{мин}). Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи программы GraphPad Prism 5.0. с применением теста Краскела-Уоллиса с посттестом Даннетта.

Результаты и обсуждение. У животных, получавших в средней эффективной дозе АВ-19 (20 мг/кг) значимых изменений изучаемых показателей данного многопараметрового тестирования не наблюдалось (рис. 1). При исследовании АВ-19 в дозе, превышающей среднюю эффективную в 5 раз, регистрируемые параметры, характеризующие нервно-мышечную возбудимость и функциональное состояние вегетативной нервной системы, соответствовали установленной для данной тест-системы норме.

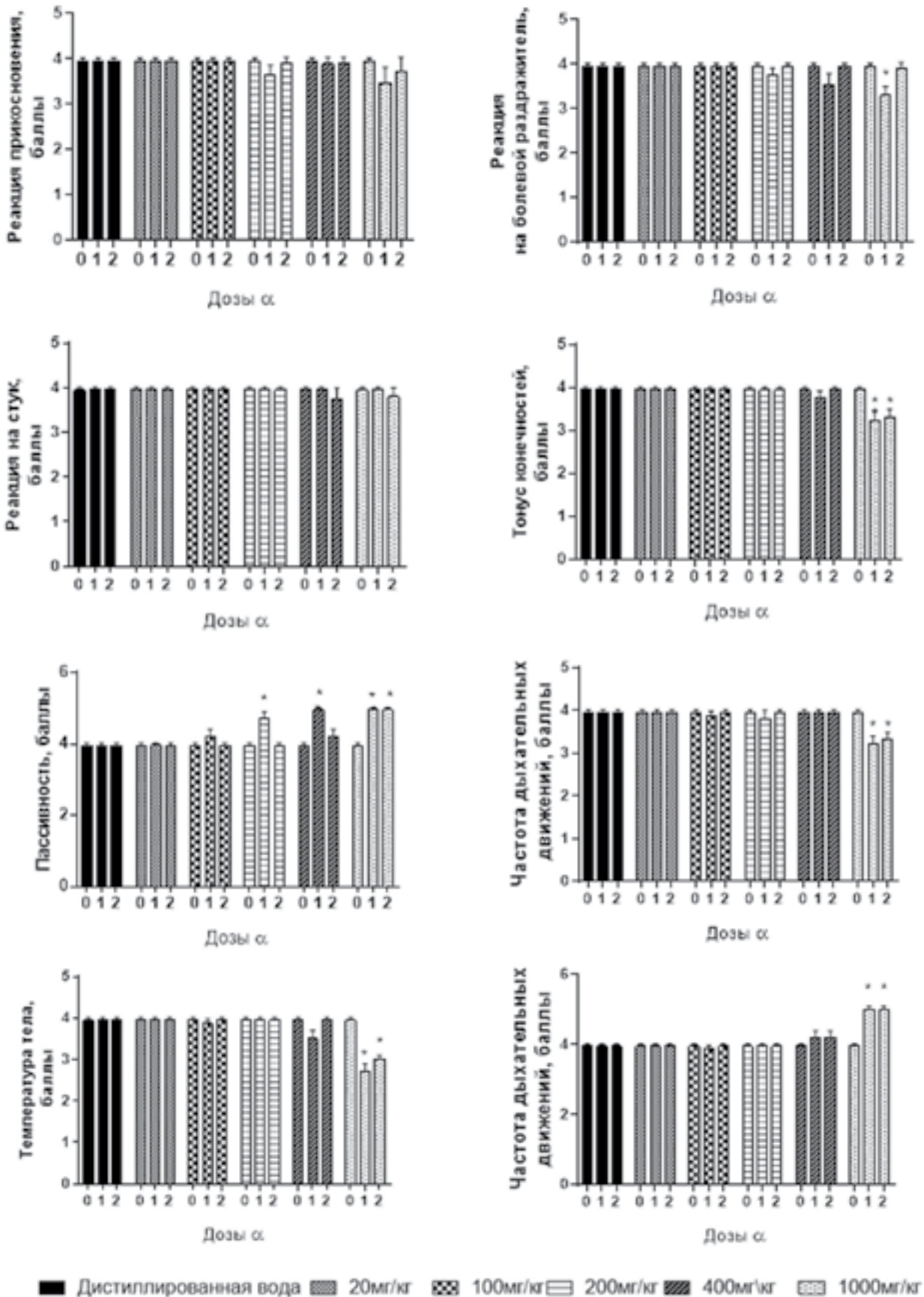


Рис. 1. Влияние соединения АВ-19 в исследуемых дозах на нейротоксические симптомы у мышей (в баллах, M±m).

Δ - Примечание: 0 - исходные данные, полученные до введения вещества; 1 - значения, полученные через 1 час после введения вещества; 2 - значения, полученные через 2 часа после введения вещества

Из показателей, описывающих поведенческие реакции, через 1 час после введения вещества у животных фиксировалось статистически незначимое снижение груминга и спонтанной двигательной активности, а также пассивность в поведении. Остальные параметры, в сравнении с группой контроля, не изменились. При 10-ти кратном увеличении средней эффективной дозы АВ-19 регистрировались изменения спонтанной двигательной активности и груминга, достоверно увеличивался показатель пассивности. Отмечались случаи снижения рефлекторных реакций на тактильное прикосновение и болевой раздражитель. Со стороны вегетативной нервной системы изменений зафиксировано не было. Для животных на 60 и 120 минутах после введения соединения в дозах 400 и 1000 мг/кг была характерна следующая картина интоксикации: снижался показатель двигательной активности животных (пассивность и спонтанная двигательная активность, в дозе 1000 мг/кг), уряжалась частота актов груминга; по сравнению с исходным значением и показателями контрольной группы угнетались рефлекторные реакции (на звук и на прикосновение в дозе 1000 мг/кг, а на боль в обоих дозах), нарушался тонус конечностей, в особенности задних лап; указанные симптомы дополнялись снижением частоты дыхательных движений и гипотермией. В целом большинство изучаемых эффектов АВ-19 были дозозависимы, в частности значительная часть эффектов в большинстве случаев развивалась к 1 часу наблюдения и в дозе 400 мг/кг статистически была не достоверна, в то время как в дозе превышающей эффективную в 50 раз, интоксикационные изменения статистически усиливались и наблюдались в течение всего периода наблюдения. Описанная картина изменений в настоящем многопараметровом тестировании за счет совокупности указанных признаков может свидетельствовать о развитии седации с выраженной вегетотропной симптоматикой у животных. Проведенное исследование свиде-

тельствует об отсутствии значимого нейротоксического влияния АВ-19 в средней эффективной дозе 20 мг/кг, а также дозе, превышающей эффективную в 5 раз. В основном, при увеличении дозы от 400 мг/кг и выше при введении АВ-19 у животных развивается выраженная седация, тахипноэ и гипотермия, а также отмечается снижение нервно-мышечной передачи.

Заключение. В результате исследования установлено, что для соединения АВ-19 в средней эффективной дозе и дозе, превышающей среднюю эффективную в 5 и 10 раз, не характерно влияние на функциональное состояние вегетативной нервной системы и нервно-мышечного возбуждения, а среди спектра исследуемых поведенческих эффектов отмечается снижение активности мышцей. Зарегистрированные случаи снижения рефлекторных реакций на тактильное прикосновение и болевой раздражитель в дозе 200 мг/кг не имели статистически достоверного различия с группой интактного контроля. Доза 400 мг/кг при внутрижелудочном введении у мышцей-самцов предварительно, условно, может быть обозначена как начальная, вызывающая выраженные токсические реакции, и может быть рекомендована для более детального исследования при изучении хронической токсичности ФС на следующем этапе доклинического исследования. Выявленные изменения нейрофункционального статуса у мышцей позволяют предварительно обозначить минимальную токсическую дозу ($TD_{мин}$) для АВ-19 при внутрижелудочном введении: $400 \text{ мг/кг} < TD_{мин} \leq 1000 \text{ мг/кг}$, а также охарактеризовать клиническую картину возможной передозировки АВ-19. Наиболее значимыми из симптомов являются: седация, снижение тонуса мышцей; со стороны вегетативной нервной системы – тахипноэ и гипотермия. По результату проведенного исследования можно сделать вывод о том, что для соединения АВ-19 характерно низкое токсическое действие в отношении поведения животных при многотестовом наблюдении по «S.Irwin», а также вещество перспективно для углубленного доклинического изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ионова Т.И. и др. Качество жизни и проблемы, связанные с гипогликемией, у больных сахарным диабетом 2-го типа на фоне пероральной сахароснижающей терапии // Клиническая медицина. – 2013. – Т. 91. – №. 9.
2. Глобальный доклад по диабету [Global report on diabetes]. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2018. Лицензия: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
3. Сергиенко А.В. Клиническая фармакология пероральных сахароснижающих лекарственных средств в обучении студентов фармацевтических вузов/ Сергиенко А.В., Ивашев М.Н., Лысенко Т.А., Арлыт А.В., Зацепина Е.Е. и др. // Международный журнал экспериментального образования №10. – 2012. – 17 – 20
4. Дедов И. И. и др. Сахарный диабет: диагностика, лечение, профилактика. – 2011.
5. Ramasamy R. et al. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation // Glycobiology. – 2005. – Т. 15. – №. 7. – С. 16R-28R.
6. Смирнова О.М., Кононенко И.В. Гипогликемическая терапия сахарного диабета 2 типа: проблемы долгосрочной безопасности // Эндокринология. – № 4-5. – 2016. – С. 32-43
7. Макарова М.Н. Методические подходы к оценке нейротоксичности веществ/М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, Е.В. Шенунова// Ведомости ЦЭСМП. – Том 7, № 2. – Апрель-июнь 2017
8. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes// European Treaty Series - No. 123
9. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 ноября 2014 г. № 1700-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33044-2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2015 г. Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Guide 1:1998 OECD Principles of good laboratory practice).
10. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под общей редакцией д.м.н. А.Н.Миронова –М: Гриф и К, 2012. – С. 80-93.
11. Irwin S. Drug screening and evaluation of new compounds in animals. In: Nodin JH, Siegler PE, eds. Animal and clinical techniques in drug evaluation. Chicago: Year Book Medical Publishers; 1964.P. 36-54.
12. Irwin S. Determination of variability in drug response / S. Irwin //

Psychosomatics. – 1964. – Vol.5. – P. 174-179.

13. Irwin, S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behABioral

and physiologic state of the mouse [Text] / S. Irwin // Psychopharmacologia. – 1968. – V. 13. – № 3. – P. 222-257.

14. Ковалев Д. Г., Бугаева Л. И., Озеров А. А. Нейротоксикологический профиль

новых производных аденина, обладающих противовирусной активностью // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2010. – Т. 6. – №. 2.

15. Кузнецова В. А. и др. Метод оценки

антигликирующей активности in vitro новых веществ // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2014. – №. 3 (43).

REFERENCES:

1. Ionova T.I. et al. Quality of life and problems associated with hypoglycemia in patients with type 2 diabetes mellitus on the background of oral hypoglycemic therapy. Clinical medicine. – 2013. – Vol. 91. – Iss. 9 (in Russian).
2. Global report on diabetes. Geneva: World Health Organization; 2018. License: CCBY-NC-SA3. OIGO (in Russian).
3. Sergienko A.V. Clinical pharmacology of oral hypoglycemic drugs in the training of students of pharmaceutical universities / Sergienko A.V., Ivashev M.N., Lysenko T.A., Arlt A.V., Zatshepina E.E. et al. / International Journal of Experimental Education. – 2012. – Iss. 10. – Pp. 17 – 20 (in Russian).
4. Dedov I.I. et al. Diabetes mellitus: diagnosis, treatment, prevention. – 2011 (in Russian).
5. Ramasamy R. et al. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. Glycobiology. – 2005. – Vol. 15. – Iss. 7. – Pp. 16R-28R.
6. Smirnova O.M., Kononenko I.V. Hypoglycemic therapy of type 2 diabetes: problems of long-term safety. Endocrinology. – 2016. – Vol. 4-5. – Pp. 32-43 (in Russian).
7. Makarova M.N. Methodological approaches to the assessment of neurotoxicity of substances / Makarova M.N., Makarov V.G., Shekunova E.V. / Journal of the Scientific Center for the Examination of Medical Devices. – 2017. – Vol. 7. – Iss. 2 (in Russian).
8. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes // European Treaty Series - No. 123.
9. National standard of the Russian Federation GOST R 33044-2014 "Principles of good laboratory practice" (approved by Order of the Federal Agency for Technical Regulation and Metrology, dated November 20, 2014, in Russian).
10. Guidelines for conducting preclinical research of medicines. Part one / ed. Mironov A.N. -M: Grif and K. – 2012. – Pp. 80-93 (in Russian).
11. Irwin S. Drug screening and evaluation of new compounds in animals. In: Nodin J.H., Siegler P.E., eds. Animal and clinical techniques in drug evaluation. Chicago: Year Book Medical Publishers; 1964. – Pp. 36-54.
12. Irwin S. Determination of variability in drug response / S. Irwin / Psychosomatics. – 1964. – Vol. 5. – Pp. 174-179.
13. Irwin, S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behABioral and physiologic state of the mouse [Text] / S. Irwin / Psychopharmacologia. – 1968. – Vol. 13. – Iss. 3. – Pp. 222-257.
14. Kovalev D.G., Bugaeva L.I., Ozerov A.A. Neurotoxicological profile of new adenine derivatives with antiviral activity. Saratov Scientific Medical Journal. – 2010. – Vol. 6. – Iss. 2 (in Russian).
15. Kuznetsova V.A. et al. Method for in vitro evaluation of the antihypoglycemic activity of new substances. Volgograd Scientific Medical Journal. – 2014. – Iss. 3 (in Russian).

D.V. Maltsev^{1,2}, A.A. Spasov^{1,2}, V.A. Kosolapov¹, K.T. Sultanova^{1,2}, M.V. Miroshnikov¹, S.K. Kotovskaya³, I.M. Sapozhnikova³, V.L. Rusinov³

NEUROTOXICOLOGICAL PROPERTIES OF THE COMPOUND AV-19 FOR PROPHYLAXIS AND TREATMENT OF COMPLICATIONS OF DIABETES MELLITUS

¹Volgograd State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 400131, Volgograd, Russian Federation

²Volgograd Medical Scientific Center, 400131, Volgograd, Russian Federation

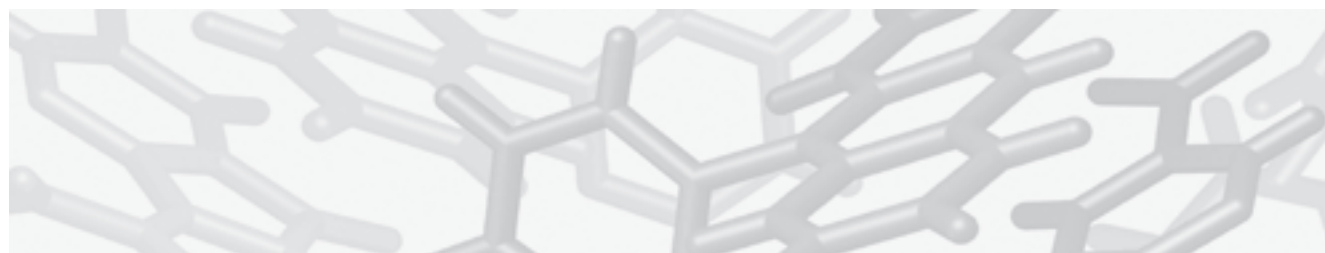
³Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, 620002, Yekaterinburg, Russian Federation

The article presents the results of a study of the neurotoxicological profile of the new compound AB-19, acting on collagen glycation end products (AGE) and their receptors (RAGE), for the prevention and treatment of diabetes complications. The multi-test method «S. Irwin» was used. The test results were evaluated in parallel groups receiving the substance in doses starting with the average effective dose (ED₅₀) and with a multiple increase by 5, 10, 20 and 50 times. It was found that the compound AB-19 in doses of 20, 100 and 200 mg / kg does not affect the functional and behavioral status of animals. However, with an increase to 400 mg / kg, typical manifestations of intoxication were observed: a decrease in muscle tone, hypothermia, sedation, tachypnea. As a result of the study, it was revealed that the neurotoxicological properties of the compound AB-19 are characterized by dose-dependent activity. A minimum toxic dose of 400 mg / kg $\leq Td_{min} \leq 1000$ mg / kg was also indicated.

Keywords: AV-19, diabetes mellitus, complications of diabetes mellitus, neuropsychotropic activity, method of multi-test observation "S. Irwin".

Quote: D.V. Maltsev, A.A. Spasov, V.A. Kosolapov, K.T. Sultanova, M.V. Miroshnikov, S.K. Kotovskaya, I.M. Sapozhnikova, V.L. Rusinov. Neurotoxicological properties of the compound AV-19 for prophylaxis and treatment of complications of diabetes mellitus. Toxicological Review. 2020; 4:39-43

Переработанный материал поступил в редакцию 15.01.2020 г.



КОНКУРС НАУЧНЫХ РАБОТ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ И СПЕЦИАЛИСТОВ

УДК 574.583:582.263:574.63

DOI: 10.36946/0869-7922-2020-4-44-48

ВЛИЯНИЕ СТОЙКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ И БЕНЗ[А]ПИРЕНА НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН ЯЧМЕНЯ ОБЫКНОВЕННОГО (*HORDÉUM VULGÁRE L.*)

Е.А. Белинская¹, С.Е. Мазина^{2,3},
Е.К. Пичугина³, Г.В. Зыкова¹

¹ФГУП Научно-технический центр радиационно-химической безопасности и гигиены ФМБА России, 126182, г. Москва, Российская Федерация

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, г. Москва, Российская Федерация

³Российский университет дружбы народов, Экологический факультет, 115093, г. Москва, Российская Федерация

В работе рассмотрено влияние на прорастание семян ячменя присутствия в среде культивирования полихлорированных дибензо-*n*-диоксинов, дибензофуранов, бифенилов и бенз[а]пирена, а также влияние загрязнителей на хранения семян. В результате проведенных опытов, было отмечено отрицательное действие полихлорированных бифенилов на прорастание семян при концентрации 100 мкг/кг, что может объясняться высоким накоплением семенами низкохлорированных загрязнителей. Зарегистрировано отрицательное влияние бенз[а]пирена на прорастание семян при концентрации 20, 100 мкг/кг.

Ключевые слова: стойкие органические загрязнители, бенз[а]пирен, прорастание, семена ячменя, всхожесть, загрязнение почвы.

Цит: Е.А. Белинская, С.Е. Мазина, Е.К. Пичугина, Г.В. Зыкова. Влияние стойких органических загрязнителей и бенз[а]пирена на прорастание семян ячменя обыкновенного (*Hordéum Vulgáre L.*). Токсикологический вестник. 2020; 4:44-48

Введение. При проведении оценки воздействия загрязнителей одним из важных объектов исследования является почва, где происходит накопление химических веществ и реализуется цепочка передачи их по трофической цепи с помощью растительности в организм человека. Наиболее чувствительны к воздействию молодые растения, и особенно их семена.

В литературе известны эксперименты по прорастанию семян под влиянием, в основном, таких загрязнителей, как нефть [1,2,3]. О влиянии стойких органических загрязнителей (СОЗ), являющихся предметом Стокгольмской кон-

венции (2001 год), и полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) на прорастание семян, а особенно о механизмах действия их низких концентраций, в литературе имеется недостаточно сведений.

В перечень СОЗ входит группа таких высокотоксичных соединений, как полихлорированные дибензо-*p*-диоксины и дибензофураны (ПХДД и ПХДФ) – группа гетероциклических полихлорированных соединений, основу которых составляют два ароматических кольца, связанных между собой кислородными мостиками, самым токсичным представителем ко-

Белинская Екатерина Александровна (*Belinskaya Ekaterina Alexandrovna*), старший научный сотрудник ФГУП НТЦ РХБГ ФМБА России, eabelinsk@yandex.ru;

Мазина Светлана Евгеньевна (*Mazina Svetlana Evgen'evna*), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры радиохимии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, доцент экологического факультета Российского университета дружбы народов, sopolphytum@mail.ru;

Пичугина Елизавета Константиновна (*Pichugina Elizaveta Konstantinovna*), магистр экологического факультета Российского университета дружбы народов, pichugina94@inbox.ru;

Зыкова Галина Васильевна (*Zykova Galina Vasil'evna*), кандидат химических наук, заведующий лабораторией физико-химических исследований ФГУП НТЦ РХБГ ФМБА России, gvzykova@yandex.ru.

торых является 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-п-диоксин (2,3,7,8-ТХДД) [4]. Они характеризуются высокой устойчивостью в окружающей среде и способностью к накоплению в трофических цепях [5].

В почву диоксины могут поступать при попадании в нее отходов и загрязненных продуктов различных производственных процессов, в результате осаждения из загрязненного атмосферного воздуха.

При попадании в почву диоксины сорбируются на частицах в поверхностном слое и практически не мигрируют во внутренние слои. Установлено, что период полураспада в почвах составляет около 9-15 лет в поверхностном слое и 25-100 лет на глубине [6].

Как правило, ПХДД и ПХДФ образуются как примеси в процессе разнообразных неуправляемых химических реакций с применением хлора. Они формируются при производстве некоторых хлорированных фенолов (пентахлорфенол, 2,4,5-трихлорфенол) и их производных, а также в процессе горения хлорорганических соединений. Диоксины могут находиться в потребительских товарах таких, как целлюлозно-бумажная продукция, хлорсодержащие гербициды и хлорированные фенолсодержащие продукты, обнаруживаются в низких концентрациях в табачном дыме и в автомобильных выхлопах дизельных двигателей. Кроме того, они поступают в атмосферу при неправильной эксплуатации термических установок для сжигания твердых бытовых, промышленных и медицинских отходов, при открытом сжигании мусора на свалках [7-11], при производстве стали, плавлении различных металлов (железо, магний, никель, свинец и алюминий) и при горении древесины.

В настоящее время в России действуют нормативы ориентировочных допустимых количеств (ОДК) диоксинов в почвах. На заседании комиссии по нормированию Роспотребнадзора в апреле 2015 года было утверждено, в том числе значение норматива ОДК диоксинов в почве селитебной территории, равное 50 нг/кг [12].

Помимо ПХДД/ПХДФ, к группе СОЗ относятся полихлорированные бифенилы (ПХБ), которые насчитывают 209 индивидуальных конгенов, представляющих собой хлорированные соединения двух ароматических колец. ПХБ принадлежат к веществам, не образующимся в природных условиях, а попадающих в окружающую среду в результате деятельности человека. Этот класс органических соединений был специально синтезирован в промышленных целях (фирма Монсанто, США) и получил широкое распространение как технический продукт [13], начиная с 1929 г. Вследствие высокотем-

пературного сжигания бытового мусора, эксплуатации конденсаторов и трансформаторов, содержащих промышленные смеси ПХБ с различной степенью хлорирования, они поступают в природные среды и негативно на них воздействуют.

Высокие концентрации ПХБ обнаружены на территориях, прилегающих к местам, где возможно использование или нахождение ПХБ-содержащих или загрязненных ими материалов: объекты хранения или захоронения, станции по ремонту электротехнического оборудования, свалки.

Значение ОДК в почве ПХБ (суммарно) – 0,06 мг/кг. Кроме того, отдельно нормируется ОДК для трихлорбифенилов – 0,03 мг/кг, тетрахлорбифенилов – 0,06 мг/кг и пентахлорбифенилов – 0,1 мг/кг [14].

Серьезную опасность здоровью населения несут ПАУ – группа органических соединений, содержащих два или более конденсированных бензольных кольца. ПАУ характеризуются высокой канцерогенной, мутагенной и тератогенной активностью. Наибольшей канцерогенной токсичностью среди них обладают бенз[а]пирен и дибенз[а,h]антрацен [15]. Международное агентство по изучению рака (МАИР) относит бенз[а]пирен к группе 1 (безусловно канцерогенные для человека).

Источниками образования и поступления в окружающую среду ПАУ являются природные высокотемпературные и микробиологические процессы, а также антропогенные факторы, связанные с производством энергии, выбросами промышленных предприятий и автомобильного транспорта [15]. Использование в металлургическом производстве металлолома приводит к выбросу ПАУ. В дымовых газах заводов по производству асфальтовых смесей для дорожного строительства содержится бенз[а]пирен и другие ПАУ. При термической обработке твердых бытовых и медицинских отходов ПАУ постоянно поступают в окружающую среду. Для снижения содержания ПАУ в выбросах таких заводов применяют системы очистки дымовых газов и пылеуловители. ПАУ, находящиеся в окружающей среде, сами по себе не проявляют канцерогенную активность. Только после проникновения в организм, они биотрансформируются в канцерогенные формы.

В России для оценки загрязненности почв установлен норматив предельно-допустимой концентрации (ПДК) для самого токсичного представителя группы ПАУ – бенз[а]пирена. Значение этого норматива составляет 20 мкг/кг [16]. Соответствующая величина европейского норматива в 5 раз выше и составляет 100 мкг/кг [17 – 19].

Цель работы – выявить влияние различных концентраций, в том числе низких, ПХДД/ПХДФ, ПХБ и бенз[а]пирена на прорастание семян ячменя обыкновенного (*Hordéum vulgáre* L.) в случае присутствия загрязнителей при хранении сухих семян или при прорастании семян в среде с загрязнителями.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлись семена ячменя обыкновенного (*Hordéum vulgáre* L.). Эксперимент проводили по методике [20]. В первой серии опытов проращивали семена ячменя в крахмальной среде. Наносили 5 см³ раствора с загрязнителем в этаноле на 10 г крахмала, высушивали на воздухе, крахмал заливали горячей (65-70°C) дистиллированной водой по 10 см³ и разливали полученный гель в чашки Петри по 15 см³.

Так как для отдельных конгенов ПХБ санитарно-гигиенические нормативы отсутствуют, а установленные величины ПДК касаются только промышленных смесей ПХБ, то в данном исследовании на крахмал наносили смесь Арохлор 1254 (табл. 1), которая принята в качестве стандартной для расчета ПДК [7].

Загрязнители вносили из расчета конечных концентраций: бенз[а]пирена – 200 мкг/кг, 100 мкг/кг и 20 мкг/кг; ПХДД – 50 нг/кг и 25 нг/кг; Арохлор 1254 – 100 мкг/кг и 50 мкг/кг; смеси 100 мкг/кг бенз[а]пирена, 50 нг/кг ПХДД и 100 мкг/кг Арохлора 1254; смеси 20 мкг/кг бенз[а]пирена, 25 нг/кг ПХДД и 50 мкг/кг Арохлора 1254. На густой крахмал в чашку Петри раскла-

дывали по 25 штук предварительно промытых водой семян ячменя, сходных по размеру.

Во второй серии опытов семена хранили в крахмале с добавками бенз[а]пирена и ПХДД/ПХДФ в течение 6 месяцев при комнатной температуре в темном месте, после чего извлекали из смеси, промывали и проращивали на среде из крахмала без добавок. В контрольном эксперименте семена хранили в чистом крахмале.

Семена проращивали при комнатной температуре (23°C), с закрытыми крышками чашек Петри, при ежедневном подсчете прорастающих семян в течение 7 дней. Эксперименты проведены дважды, каждый вариант опыта в четырехкратной повторности. Статистическая значимость полученных результатов оценивалась с использованием критерия Стьюдента, достоверными считались различия при $p \leq 0,05$. Результаты обработаны статистически с помощью пакета программ Microsoft Excel 2003.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований выявлено, что на всхожесть семян оказывало влияние наличие в среде прорастания бенз[а]пирена (с концентрацией 20 мкг/кг и 100 мкг/кг) и Арохлора 1254. Однако при концентрации бенз[а]пирена в 200 мкг/кг достоверного снижения всхожести семян не обнаружено, что может быть связано с нестабильностью бенз[а]пирена под действием различных внешних факторов [7]. Что касается других экспериментов, то не отмечено явного воздействия загрязнителей на количество проросших семян (табл.2). Сниже-

Таблица 1

Состав технической смеси Арохлор 1254 (в %) [13]

| Эмпирическая формула | Число атомов хлора в конгенере ПХБ | Арохлор 1254 |
|------------------------------------|------------------------------------|--------------|
| $C_{12}H_{10}$ | 0 | |
| $C_{12}H_9Cl$ | 1 | |
| $C_{12}H_8Cl_2$ | 2 | |
| $C_{12}H_7Cl_3$ | 3 | 1 |
| $C_{12}H_6Cl_4$ | 4 | 15 |
| $C_{12}H_5Cl_5$ | 5 | 53 |
| $C_{12}H_4Cl_6$ | 6 | 26 |
| $C_{12}H_3Cl_7$ | 7 | 4 |
| $C_{12}H_2Cl_8$ | 8 | |
| $C_{12}HCl_9$ | 9 | |
| Приблизительная молекулярная масса | | 328,4 |

Таблица 2

Влияние ПХДД/ПХДФ, ПХБ и бенз[а]пирена на прорастание семян, отмечены эксперименты, в которых $p \leq 0,05$

| Действующий агент | Процент всхожести семян | | | |
|--|-------------------------|------------------------|------------|------------------------|
| | Проращивание | | Хранение | |
| | Среднее, % | Стандартное отклонение | Среднее, % | Стандартное отклонение |
| Дистиллированная вода | 81,33 | 7,87 | 82,41 | 5,23 |
| Этиловый спирт (95 %) | 84,00 | 9,47 | - | - |
| Бенз[а]пирен – 200 мкг/кг | 86,00 | 6,57 | 8,33 | 2,34 |
| Бенз[а]пирен – 100 мкг/кг | 69,33 | 6,53 | 79,33 | 1,63 |
| Бенз[а]пирен – 20 мкг/кг | 68,67 | 4,68 | 80,83 | 3,82 |
| ПХДД/ПХДФ – 50 нг/кг | 79,33 | 4,68 | 79,67 | 1,51 |
| ПХДД/ПХДФ – 25 нг/кг | 71,33 | 11,15 | 79,51 | 2,17 |
| Арохлор 1254 – 100 мкг/кг | 59,33 | 5,32 | - | - |
| Арохлор 1254 – 50 мкг/кг | 69,33 | 4,84 | - | - |
| 100 мкг/кг бенз[а]пирена, 50 нг/кг ПХДД и 100 мкг/кг Арохлора 1254 | 73,67 | 3,67 | - | - |
| 20 мкг/кг бенз[а]пирена, 25 нг/кг ПХДД и 50 мкг/кг Арохлора 1254 | 74,00 | 7,04 | - | - |

ние всхожести семян при их проращивании в присутствии ПХДД/ПХДФ статистически незначимо. Возможно, что слабое влияние загрязнителей на всхожесть семян злаков связано с тем, что проросток на начальном этапе питается в основном запасами зерновки, получая из внешней среды воду и водорастворимые вещества. В этом случае поступление к проростку загрязнителей задерживается. Обнаруженное в исследовании снижение всхожести семян в присутствии Арохлора 1254, вероятно, объясняется избирательной биоаккумуляцией конгенеров с низким содержанием атомов хлора вследствие более высокой растворимости в воде. Поэтому они в первую очередь поглощаются растениями [21].

При хранении зерен в присутствии загрязнителей в сухих условиях воздействия на статистически достоверном уровне не выявлено (табл. 2).

Заключение. В результате проведенного эксперимента по оценке действия различных загрязнителей на зерновки овса выявлено, что хранение семян в течение 6 месяцев с загрязняющими агентами в сухом состоянии не влияет на их всхожесть. Наибольшее снижение прорастания оказывают ПХБ и бенз[а]пирен, причем в случае с последним веществом-загрязнителем, необходимо проводить дальнейшие исследования по выявлению концентраций, оказывающих наибольшее угнетающее действие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Донец Е.В. Влияние нефти на прорастание семян хвойных лесобразующих видов древесных растений подзоной южной тайги Омской области: Автореф. канд. дисс. Омск: Изд-во ОмГПУ; 2009: 19.
2. Полонский В.И., Полонская Д.Е., Бородулина Т.С. Воздействие нефтезагрязнения почвы на прорастание семян салат. Вестник КрасГАУ: Экология; 2013. № 2: 72 – 76.
3. Шарипова А.К., Донец Е.В. Влияние нефтяного загрязнения на прорастание семян ели сибирской (*Picea obovata* Lebed.). Вестник Омского ГАУ: Биологические науки. Омск; 2017. № 1 (25): 65 – 70.
4. Фёдоров, Л.А. Диоксины как экологическая опасность: ретроспектива и перспектива. М.: Наука; 1993: 266.
5. Поздняков С.П., Румак В.С., Софронов Г.А., Уманова Н.В. Диоксины и здоровье человека. С-Пб.: Наука; 2006: 273.
6. Puri R.K., Clevenger R.K., Kapila S.,

Yanders A.F., Malhotra A.F. Studies of parameters affecting translocation of tetrachlorodibenzo-p-dioxin in soil. *Chemosphere*; 1989. v.18: 1291-1296.

7. Майстренко В.Н., Ключев Н.А. Эколого-аналитический мониторинг органических загрязнителей. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2004: 323.

8. Цибильский В.А. Факторы эмиссии и выбросы ПХДД/ПХДФ при сжигании органического топлива. Экологическая химия. Т. 12. № 1; 2003: 13 – 22.

9. The Inventory of Sources of Dioxin in the United States, Review. EPA/600/P-98/002Aa. Washington, USA; 1998: 360.

10. Identification of relevant Industrial Sources of Dioxins and Furans in Europe. Materialien N 43. Germany; 1997: 312.

11. Ключев Н.А. Контроль суперэтоксикантов в окружающей среде и источники

их появления. ЖАХ; 1996. Т.51. №2: 163-172.

12. ГН 2.1.7.3298-15 Ориентировочные допустимые концентрации (ОДК) полихлорированных dibenzo-p-диоксинов и dibenzofуранов (в пересчете на 2,3,7,8-тетрахлордibenzo-p-диоксин и его аналоги) в почве населенных мест, сельскохозяйственных угодий и промышленной площадки. Утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 15 сентября 2015 года №49. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/420306463>

13. Полихлорированные бифенилы. Супертоксиканты XXI века. Информационный выпуск. № 5. М.: ВИНТИ; 2000: 189.

14. Приказ Госкомэкологии РФ от

13.04.99 № 165 О рекомендациях для целей инвентаризации на территории Российской Федерации производств, оборудования, материалов, использующих или содержащих ПХБ, а также ПХБ-содержащих отходов. Available at: <http://www.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc&base=EXP&n=278168#09188936640085503>

15. Ровинский Ф.Я., Теллицкая Т.А., Алексеева Т.А. Фоновый мониторинг полициклических ароматических углеводородов. Ленинград: Гидрометеоздат; 1988: 223.

16. ГН 2.1.7.2041-06 Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/901966754>

17. Guidelines on remediation of contaminated sites. Danish Environmental

Protection Agency. Denmark; 2002.

18. Canadian soil quality guidelines. Environment Canada. Canada; 2003.

19. Circular of target values and intervention values for soil remediation. Ministry of Housing, Spatial Planning and Environment. Netherlands; 2000.

20. Иванов В.Б., Плотников И.В., Живухина Е.А., Михалевская О.Б., Гуленкова М.А., Кириллова Г.А., Жиленкова О.Г. Практикум по физиологии растений. М.: Изд. Центр «Академия»; 2004: 144.

21. Демин Д.В., Севостьянов С.М., Деева Н.Ф., Ильина А.А. Распределение и биологическая активность полихлорбифенилов в системе «почва-растение» при высоких уровнях загрязнения. Теоретическая и прикладная экология. № 3; 2007: 31 – 35.

REFERENCES:

1. Donets E.V. Influence of oil on seed germination of coniferous forest-forming species of woody plants in the southern taiga subzone of the Omsk region. Abstract of the PhD thesis, 2019. – 19 p. (in Russian).

2. Polonsky V.I., Polonskaya D.E., Borodulina T.S. Impact of oil contamination of the soil on the germination of lettuce seeds. *Bulletin KrasSAU: Ecology*. - 2013. – Vol. 2: - Pp. 72 – 76 (in Russian).

3. Sharipova A.K., Donets E.V. Influence of oil pollution on seed germination of Siberian spruce (*Picea Obovata* Ledeb.). *Bulletin of Omsk State Agrarian University: Biological Sciences*. Omsk. - 2017. – Vol. 1 (25). – Pp. 65 – 70 (in Russian).

4. Fedorov L.A. Dioxins as an environmental hazard: a retrospective and perspective. М.: Наука. – 1993. – 266 p. (in Russian).

5. Pozdnyakov S.P., Rumak V.S., Sofronov G.A., Umanova N.V. Dioxins and human health. SPb.: Science. – 2006. – 273 p. (in Russian).

6. Puri R.K., Clevenger R.K., Kapila S., Yanders A.F., Malhotra A.F. Studies of parameters affecting translocation

of tetrachlorodibenzo-p-dioxin in soil. *Chemosphere*. - 1989. - Vol. 18. - Pp. 1291-1296.

7. Maistrenko V.N., Klyuev N.A. Ecological and analytical monitoring of organic pollutants. Moscow: BINOM. Laboratory of knowledge. – 2004. – 323 p. (in Russian).

8. Tsybul'sky V.A. Factors of emission and emissions of PCDD/PCDF from fossil fuels burning. *Environmental chemistry*. – 2003. – Vol. 12. – Iss. 1. – Pp. 13 – 22 (in Russian).

9. The Inventory of Sources of Dioxin in the United States, Review. EPA/600/P-98/002Aa. Washington, USA. – 1998. – 360 p.

10. Identification of relevant Industrial Sources of Dioxins and Furans in Europe. Materialien N 43. Germany. - 1997. - 312 p.

11. Klyuev N.A. Control of supercotoxics in the environment and sources of their appearance. *Journal of Analytical Chemistry*. - 1996. -Vol. 51. - Iss. 2. - Pp. 163-172 (in Russian).

12. GN 2.1.7.3298-15. Indicative permissible concentrations of

polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (in terms of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and its analogues) in the soil of populated areas, agricultural land and industrial sites. Approved by Resolution No. 49 of the Chief state sanitary doctor of the Russian Federation dated September 15, 2015. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/420306463>.

13. Polychlorinated biphenyls. Supertoxicants of the XXI century. Informational issue № 5. М.: ВИНТИ. – 2000. – 189 p. (in Russian).

14. Order No. 165 of the State Committee of Ecology of the Russian Federation of 13.04.99 «On recommendations for the purpose of inventory on the territory of the Russian Federation of productions, equipment, materials using or containing PCBs, as well as PCBs-containing waste». Available at: <http://www.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc&base=EXP&n=278168#09188936640085503>.

15. Rovinskiy F.Ya., Teplit'skaya T.A., Alekseeva T.A. Background monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons.

Leningrad: Hydrometeoizdat. – 1988. – 223 p. (in Russian).

16. GN 2.1.7.2041-06 Maximum permissible concentrations (MPC) of chemicals in the soil. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/901966754>.

17. Guidelines on remediation of contaminated sites. Danish Environmental Protection Agency. Denmark. - 2002.

18. Canadian soil quality guidelines. Environment Canada. Canada. - 2003.

19. Circular of target values and intervention values for soil remediation. Ministry of Housing, Spatial Planning and Environment. Netherlands. - 2000.

20. Ivanov V.B., Plotnikov I.V., Zhivukhina E.A., Mikhalevskaya O.B., Gulenkova M.A., Kirillova G.A., Zhilenkova O.G. Practicum on plant physiology. – М.: Academy, 2004. – 144 p. (in Russian).

21. Demin D.V., Sevost'yanov S.M., Dееva N.F., Il'ina A.A. Distribution and biological activity of polychlorobiphenyls in the "soil-plant" system at high levels of pollution. *Theoretical and Applied Ecology*. – 2007. – Iss. 3. – Pp. 31 – 35 (in Russian).

E.A. Belinskaya¹, S.E. Mazina^{2,3}, E.K. Pichugina³, G.V. Zykova¹

IMPACT OF PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS AND BENZ[A]PYRENE ON GERMINATION OF COMMON BARLEY SEEDS (*HORDÉUM VULGÁRE L.*)

¹Research and Technical Center of Radiation Chemical Safety and Hygiene of the Federal Medical Biological Agency, 126182, Moscow, Russian Federation

²M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119991, Moscow, Russian Federation

³Peoples' Friendship University of Russia, Faculty of Ecology, 115093, Moscow, Russian Federation

The paper considers the influence of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, biphenyls and benz[a]pyrene on the germination of barley seeds, as well as the influence of pollutants on seed storage. As a result of the experiments, the negative effect of polychlorinated biphenyls on seed germination at a concentration of 100 µg/kg has been found, which can be explained by the high accumulation of low-chlorinated pollutants by seeds. The negative effect of benz[a]pyrene on seed germination at concentrations of 20 and 100 µg/kg has been registered.

Keywords: persistent organic pollutants, benz[a]pyrene, germination, barley seeds, viability, soil contamination.

Quote: E.A. Belinskaya, S.E. Mazina, E.K. Pichugina, G.V. Zykova. Impact of persistent organic pollutants and benz[a]pyrene on germination of common barley seeds (*Hordéum Vulgáre L.*). *Toxicological Review*. 2020; 4:44-48

Материал поступил в редакцию 29.03.2019 г.

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

УДК 582.272 : 615.9

DOI: 10.36946/0869-7922-2020-4-49-55

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ЛИПОФИЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ БЕЛОМОРСКИХ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ – ФУКУСА ПУЗЫРЧАТОГО И ЛАМИНАРИИ САХАРИСТОЙ НА МОДЕЛИ DAPHNIA MAGNA STRAUS

Н.П. Подосиновичева¹,
К.А. Краснов¹,
А.А. Бондаренко¹,
М.Л. Александрова¹,
М.А. Зайцева¹, В.В. Халаман²

¹ФГБУН «Институт токсикологии
Федерального медико-биологического
агентства», 192019,
Санкт-Петербург,
Российская Федерация
²Зоологический институт РАН, 199034,
Санкт-Петербург, Российская
Федерация

В работе проведена оценка острой токсичности, безопасности и биологической активности экстрактов липофильных веществ бурых водорослей Белого моря – ламинарии сахаристой (*S. latissima*) и фукуса пузырчатого (*F. vesiculosus*) на модели зоогидробионтов *Daphnia magna Straus*.

Апробировано два способа получения сухого липидного концентрата ламинарии и фукуса. Показано, что острая токсичность липидного экстракта ламинарии не зависит от способа его получения и составляет порядка 200 мг/л. Острая токсичность экстракта фукуса зависит от метода получения. Она составляет около 100 мг/л при «холодном» способе экстрагирования и повышается на порядок при «горячем» методе получения экстракта. Для исследования биологической активности использовались образцы бурых водорослей, полученные методом «холодной экстракции».

В хронических экспериментах препараты бурых водорослей использовали в концентрации 8,0 мг/л, которая составляла менее 0,1 ЛК₅₀ величины острой токсичности фукуса и не вызывала токсических эффектов. На протяжении 24 суток препараты вносили в среду с дафниями дважды в неделю. В дальнейшем контрольные и опытные гидробионты содержались в одинаковых условиях до гибели последних особей. Показано, что препараты ламинарии и фукуса в предложенной концентрации на 20-30% увеличивали продолжительность жизни дафний в условиях нормального содержания и на 50-60% в экстремальных условиях, стимулируя при этом в 3-4 раза репродуктивную активность гидробионтов. Полученные результаты позволяют предполагать наличие у исследованных препаратов выраженных адаптогенных и цитопротекторных свойств.

Ключевые слова: бурые водоросли, *F. vesiculosus*, *S. latissima*, липиды, токсичность, продолжительность жизни, репродуктивная активность, *Daphnia magna Straus*.

Цит: Н.П. Подосиновичева, К.А. Краснов, А.А. Бондаренко, М.Л. Александрова, М.А. Зайцева, В.В. Халаман. Изучение токсичности и безопасности липофильных экстрактов беломорских бурых водорослей – Фукуса пузырчатого и Ламинарии сахаристой на модели *Daphnia magna straus*. Токсикологический вестник. 2020; 4:49-55

Подосиновичева Нина Павловна (Podosinovichova Nina Pavlovna), кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории фармацевтической и токсикологической диагностики ФГБУН Институт токсикологии ФМБА России, institute@toxicology.ru;

Краснов Константин Андреевич (Krasnov Konstantin Andrejevich), кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН Институт токсикологии ФМБА России, krasnov_tox@mail.ru;

Бондаренко Анастасия Александровна (Bondarenko Anastasiya Aleksandrovna), bondarenko-nastua@yandex.ru;

Александрова Марина Леонидовна (Alexandrova Marina Leonidovna), кандидат химических наук, заведующая лабораторией фармацевтической и токсикологической диагностики ФГБУН Институт Токсикологии ФМБА России, analekt@mail.ru;

Зайцева Мария Анатольевна (Zaytseva Maria Anatolevna), кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией лекарственной токсикологии ФГБУН Институт токсикологии ФМБА России, alpha-2@mail.ru;

Халаман Вячеслав Вячеславович (Khalaman Vyacheslav Vyacheslavovich), vkhalaman@gmail.com

Введение. Морские бурые водоросли являются ценнейшим источником биологически активных веществ. Наибольшее промышленное значение имеют получаемые из них вещества гидрофильного ряда, такие как альгиновые кислоты, маннит, фукоидан, широко используемые в пищевой, фармацевтической и косметической отраслях [1]. Но особое внимание в современной медико-биологической литературе уделяется липидным компонентам бурых водорослей, которые рассматриваются в качестве перспективных фармакологических средств и БАДов [2, 3, 4].

К числу характерных липидов бурых водорослей относятся каротиноиды (фукоксантин и его аналоги), производные хлорофилла, полиненасыщенные жирные кислоты, стероиды и целый ряд других классов биологически активных веществ [1]. Наиболее важным из них считается фукоксантин, обладающий выраженным антиоксидантным и антимуtagenным действием [5], а также онкопротекторными, цитостатическими [6], антидиабетическими [7], гиполипидемическими [8] и многими другими биологическими свойствами. Производные хлорофилла известны как активные антиоксиданты и иммуномодуляторы [9], а полиненасыщенные жирные кислоты, (особенно ω -3), играют важную роль в регуляции липидного обмена и препятствуют развитию атеросклероза [10]. В связи с этим, липофильные концентраты бурых водорослей широко используются в диетологической практике в составе пищевых добавок и нутрицевтиков [4, 8].

На территории России большое промышленное значение имеют несколько видов бурых водорослей, в частности ламинария сахаристая (*S. latissima*) и фукус пузырчатый (*F. vesiculosus*), произрастающие в районах Белого и Баренцева морей. Комплексные исследования состава этих водорослей, проведенные в работах [1, 11, 12], подтверждают выводы о высокой биологической ценности содержащихся в них липидных веществ. Однако до настоящего времени токсикологические свойства этих липидных комплексов остаются далеко не полностью изученными, что препятствует фармацевтическим разработкам на их основе. Из липидов достаточно подробно исследован только фукоксантин, содержание которого в извлечениях не превышает нескольких процентов.

В связи с этим, в настоящей работе было проведено скрининговое исследование токсичности, безопасности и биологической активности суммы липофильных веществ беломорских водорослей *S. latissima* и *F. vesiculosus* на гидробионтах *Daphnia magna* Straus [14, 15]. Выбор дафний в качестве тест-системы связан с удобством и быстротой получения результатов на данной модели, что важно в условиях скрининга. Определение острой

токсичности образцов позволяет стандартизировать препараты по интегральному параметру. Кроме того, наблюдения за продолжительностью жизни и репродуктивной активностью дафний в хроническом эксперименте позволяют оценить интегральный биологический эффект тестируемой субстанции на живой организм.

Материалы и методы исследования. В работе использовали свежие водоросли *S. latissima* и *F. vesiculosus*, собранные в районе Чупинской губы (мыс Картеш) в период июля 2017 г. Качество собранного сырья контролировали по содержанию каротиноидов. Свежие водоросли промывали проточной водой и замораживали для хранения при -10°C .

Количественное содержания каротиноидов в свежих водорослях и экстрактах определяли методами ТСХ на пластинах Сорбфил в системе ацетон-хлороформ 1:5 (R_f фукоксантина 0.55) и ВЭЖХ на хроматографе Shimadzu с диодно-матричным детектором (колонка Chromolit Performace C18, 4/6x100 mm, элюент – ацетонитрил - водный раствор муравьиной кислоты 0.1 %, скорость потока 5 мл/мин, время удерживания фукоксантина 3.22 мин. В качестве стандарта использовали фукоксантин 95 % (Sigma).

Получение липидного концентрата *F. vesiculosus*. Метод 1. 1 кг замороженной водоросли *F. vesiculosus* промывали 3 л воды комнатной температуры, отжимали и заливали 2 л этанола 96%. Выдерживали 1 сутки при температуре 20-25° С. Спирто-водный экстракт сливали и упаривали на роторном испарителе при давлении 100-200 mbar и температуре водяной бани 60-70° С до конечного объема 250 мл. Полученный остаток замораживали, а затем размораживали и отстаивали, отбрасывали 70-150 мл верхнего прозрачного раствора, а целевую нижнюю фракцию с осадком липидных веществ замораживали и лиофилизировали. Полученный сухой липидный концентрат фукуса (Ф-1) растирали, продували аргоном и хранили при (-10°C).

Метод 2. К 1 кг замороженной водоросли *F. vesiculosus* приливали 3 л горячей (90°C) воды, выдерживали 15 мин и отделяли водный раствор. Процедуру промывки сырья горячей водой повторяли еще 2 раза. Затем к отжатому от воды сырью приливали 2 л этанола 96% и выдерживали 18 ч при температуре 20-25° С. Спиртоводный экстракт отделяли и упаривали на роторном испарителе при давлении 100-200 mbar и температуре водяной бани 60-70° С до конечного объема 150 мл. Полученный остаток замораживали и лиофилизировали. Сухой липидный концентрат фукуса (Ф-2) растирали, продували аргоном и хранили при (-10°C).

Аналогично, из замороженной водоросли *S. latissima* по Методу 1 получали сухой липидный

концентрат ламинарии Л-1, а по Методу 2 – сухой концентрат Л-2.

Выход сухих экстрактов и содержание суммы каротиноидов в их составе приведены в таблице 1.

Исследование биологической активности субстанций. Опыты были поставлены на гидробионтах *Daphnia magna Straus* в возрасте 7 суток, выращенных в лабораторных условиях.

При тестировании биологической активности использовали водные растворы исследуемых субстанций. Для этого сухие липидные концентраты бурых водорослей суспензировали в воде с помощью ультразвукового гомогенизатора, получая 0,1% взвеси исследуемых субстанций, которые далее вносили в заданных концентрациях в культивационную среду для гидробионтов.

Изучение острого токсического действия субстанций. Для проведения исследований дафний помещали в стеклянные емкости с 50,0 мл культивационной воды по 5 особей в каждый. Исследуемые субстанции вводили в культивационную среду в пяти возрастающих по логарифмической шкале концентрациях по три параллельных пробы на каждую концентрацию. В качестве контроля использовали три параллельных пробы с культивационной водой. Через 96 часов регистрировали количество погибших дафний [13] и рассчитывали среднюю летальную концентрацию препарата ($ЛК_{50}$) по формуле, приведенной в методике [14]. Каждый эксперимент повторяли трижды.

Изучение хронического действия субстанций. Хроническое воздействие субстанций исследовали на дафниях, содержащихся в стандартных условиях и в условиях стресса, оценивая продолжительность жизни и репродуктивную активность гидробионтов. В стандартных условиях дафнии содержались в емкостях с 50,0 мл культивационной среды, по 5 особей в каждой емкости. Дафний три раза в неделю кормили суспензией водорослей *Chlorella*. Один раз в две недели вместо *Chlorella* давали суспензию дрож-

жей. Каждая экспериментальная группа включала по 30 дафний, находящихся в 6 емкостях по 5 особей в каждой. Дважды в неделю гидробионтам проводили смену культивационной среды, которая, в случае опытных групп, содержала субстанции ламинарии или фукуса в выбранной концентрации. На протяжении 24 суток дважды в неделю вносили исследуемые субстанции, после чего все группы содержались в одинаковых условиях в чистой культивационной воде. В ходе эксперимента ежедневно учитывали и удаляли народившуюся молодежь и погибших дафний. Наблюдения продолжали до полной гибели всех особей во всех группах.

При изучении хронического воздействия субстанций на гидробионты в условиях стресса, объем культивационной среды уменьшали с 50,0 мл до 10,0 мл и исключали из рациона белково-витаминное питание дрожжами. В экспериментальные группы брали по 10 дафний, каждая из которых содержалась в отдельной емкости. Культивационную среду меняли гидробионтам 2 раза в неделю. На протяжении 24 суток дважды в неделю вносили исследуемые субстанции, после чего контрольная и опытные группы содержались в одинаковых условиях в чистой культивационной воде до полной гибели всех особей в группах.

Результаты и обсуждение. В таблице 2 представлены результаты определения острой токсичности образцов липидных концентратов ламинарии и фукуса для гидробионтов *Daphnia magna Straus* при экспозиции 96 часов.

Из данных, приведенных в таблице 2 следует, что липидные экстракты ламинарии менее токсичны, чем соответствующие экстракты фукуса. При этом летальные концентрации образцов Л-1 и Л-2 были примерно одинаковы, то есть в случае ламинарии токсичность не зависела от технологии выделения липидной фракции. Уровень токсичности субстанций Л-1 и Л-2 соответствует 3-му классу опасности [15]. Токсичность препаратов фукуса заметно различалась: если образец

Таблица 1

Липидные концентраты *S. latissima* и *F. vesiculosus*: выход и содержание суммы каротиноидов

| Сырье | Липидный концентрат | Сумма каротиноидов, % | Выход липидного концентрата в пересчете | |
|-----------|---------------------|-----------------------|---|-----------------|
| | | | на сырой вес, % | на сухой вес, % |
| Фукус | Ф-1 | 3,4 | 0,56 | 2,9 |
| | Ф-2 | 1,9 | 0,82 | 4,3 |
| Ламинария | Л-1 | 1,5 | 1,02 | 11,5 |
| | Л-2 | 4,2 | 0,31 | 3,5 |

Ф-1 по уровню ЛК₅₀ можно отнести к 3-му классу опасности, то образец Ф-2 на порядок более токсичен, соответствуя 2-му классу опасности [15]. Эти различия, очевидно, были связаны с технологическими особенностями получения данных субстанций. Вероятно, обработка сырья горячей водой, используемая при получении Ф-2, изменяла характер последующей экстракции, способствуя выделению в раствор токсичных веществ, присутствующих в составе фукуса.

Для дальнейшего исследования хронического действия были выбраны липидные экстракты ламинарии Л-1 и фукуса Ф-1 (наименее токсичные). Концентрация тестируемых субстанций в хронических экспериментах составила 8,0 мг/л, что не превышало 0,1 ЛК₅₀ выбранного образца Ф-1. С целью установления зависимости эффекта от концентрации, образец Ф-1 тестировали также в концентрации 4,0 мг/л. Во всех экспериментах внесение препаратов прекращалось после 24 суток экспозиции.

Влияние препаратов ламинарии и фукуса на продолжительность жизни *Daphnia magna* в стандартных условиях представлено в таблице 3.

Как видно из представленных данных, продолжительность жизни в группах №2 и №3 была выше, чем в контрольной группе (табл. 3). Под действием экстракта ламинарии средняя продолжительность жизни дафний увеличивалась на 30 %, а экстракта фукуса в группе №3 – на 22 % по сравнению с контролем. Хотя статистически различия не достоверны ($P > 0.05$), тем не менее, они близки к порогу, а на 90% доверительном уровне различия уже значимы. В случае воздействия низкой концентрации липидного экстракта фукуса (группа №4) продолжительность жизни дафний не отличалась от контроля.

В таблице 4 представлены результаты исследования продолжительности жизни дафний в экстремальных условиях содержания при хроническом воздействии экстрактов ламинарии и фукуса в концентрации 8 мг/л.

Как видно из представленных данных (табл. 4), под действием экстракта ламинарии средняя продолжительность жизни дафний увеличивалась на 66 %, а экстракта фукуса – на 50,2 % по сравнению с контролем. Наблюдаемые различия статистически достоверны с вероятностью не

Таблица 2

Летальные концентрации сухих экстрактов водорослей для *Daphnia magna* Straus

| Ламинария | | Фукус | |
|------------|-------------------------|------------|-------------------------|
| Образец, № | ЛК ₅₀ , мг/л | Образец, № | ЛК ₅₀ , мг/л |
| Л-1 | 200,0±52,9 | Ф-1 | 115,7±25,3 |
| Л-2 | 179,4±46,5 | Ф-2 | 15,8±4,0 |

Таблица 3

Влияние ламинарии и фукуса на продолжительность жизни дафний в условиях стандартного содержания

| Продолжительность жизни, сутки | Экспериментальная группа | | | |
|--------------------------------|--------------------------|-----------|--------------|--------------|
| | Контроль | Ламинария | Фукус 8 мг/л | Фукус 4 мг/л |
| | №1 | №2 | №3 | №4 |
| Средняя | 32,8 | 42,8 | 40,0 | 33,7 |
| Ошибка среднего | 3,0 | 3,5 | 3,9 | 3,1 |
| Станд. отклонение | 16,3 | 19,1 | 21,6 | 16,9 |
| Максимальная | 60 | 80 | 72 | 56 |
| Минимальная | 4 | 12 | 0 | 4 |

Таблица 4

Влияние ламинарии и фукуса на продолжительность жизни дафний в экстремальных условиях

| Продолжительность жизни, сутки | Контроль | Ламинария | Фукус |
|--------------------------------|----------|-----------|-------|
| Средняя | 20,0 | 33,2 | 30,4 |
| Ошибка среднего | 3,8 | 3,8 | 3,7 |
| Станд. отклонение | 12,0 | 12,1 | 11,8 |
| Максимальная | 36 | 48 | 44 |
| Минимальная | 4 | 8 | 8 |

Таблица 5

Влияние липидных концентратов на репродуктивную активность дафний в условиях стандартного содержания

| | Контроль | Ламинария 8 мг/л | Фукус 8 мг/л | Фукус 4 мг/л |
|------------------------------|----------|---------------------|-----------------|-----------------|
| Число рождений на одну особь | 35,7 | 111,5 | 167,7 | 99,0 |
| Коэффициент стимуляции | 1,0 | 3,1 | 4,7 | 2,8 |
| Ошибка среднего | 20,0 | 28,0 | 24,2 | 17,5 |
| Станд. отклонение | 48,9 | 68,7 | 59,3 | 42,8 |

менее 95%, что может свидетельствовать о наличии у исследуемых субстанций адаптогенного, а также геропротекторного действия. В этой связи интересно отметить, что в литературе описан геропротекторный эффект фукоксантина (компонента бурых водорослей), добавки которого увеличивали продолжительность жизни дрозофил и нематод [16].

Одновременно с регистрацией продолжительности жизни, проводился учет родившейся молодежи. Результаты воздействия субстанций в условиях стандартного содержания дафний отражены в таблице 5.

Статистический анализ данных, проведенный методом Манна-Уитни [17, 18], показал достоверное увеличение репродуктивной активности во всех трех группах, получавших липидные экстракты бурых водорослей. Наиболее выраженная стимуляция рождаемости дафний наблюдалась под действием фукуса в концентрации 8 мг/л, при уменьшении концентрации вещества эффект снижался. Стимулирующий эффект ламинарии в концентрации 8 мг/л был выражен слабее, чем у фукуса в той же концентрации.

Аналогичные результаты были получены и в

случае хронического воздействия исследуемых субстанций на гидробионты, содержащихся в экстремальных условиях (табл. 6).

Из представленных данных видно, что в неблагоприятных условиях препараты бурых водорослей также значительно стимулируют репродуктивную активность дафний, причем отличия от контроля в данном случае еще выше, чем в условиях стандартного содержания дафний. Как и в предыдущем эксперименте, стимуляция репродуктивной активности дафний у экстракта фукуса была выражена сильнее, чем у ламинарии.

Заключение. Таким образом, липидные экстракты ламинарии и фукуса, острая токсичность которых на *Daphnia magna Straus* составляет $200,0 \pm 52,9$ мг/л и $115,7 \pm 25,3$ мг/л соответственно, в хроническом эксперименте в выбранных концентрациях 8 мг/л и 4 мг/л не проявляют токсических эффектов, а напротив, увеличивают как продолжительность жизни, так и репродуктивную активность дафний. Как известно, у дафний в природных условиях стимуляция репродуктивной активности сопровождается снижением продолжительности жизни, подобный эффект может быть получен в лабораторных условиях

Влияние липидных экстрактов на репродуктивную активность дафний в экстремальных условиях содержания

| | Контроль | Ламинария 8 мг/л | Фукус 8 мг/л |
|------------------------------|----------|---------------------|-----------------|
| Число рождений на одну особь | 1,7 | 11,1 | 14,1 |
| Коэффициент стимуляции | 1,0 | 6,5 | 8,3 |
| Ошибка среднего | 1,5 | 4,6 | 5,8 |
| Станд. отклонение | 4,7 | 14,6 | 18,2 |

при повышении температуры содержания гидробионтов [13, 14]. В представленных экспериментах введение в среду препаратов ламинарии и фукуса достоверно увеличивало репродуктивную активность, как в оптимальных, так и в экстремальных условиях содержания. При этом продолжительность жизни гидробионтов по сравнению с контролем либо достоверно увеличивалась (в негативных условиях) либо имела тенденцию к увеличению (в нормальных условиях), что свидетельствует об адаптогенном и цитопротекторном действии препаратов бурых водорослей.

Следует отметить, что стимуляция репродуктивной активности под действием липидных кон-

центратов ламинарии и фукуса продолжалась достаточно долго после прекращения введения препаратов. Очевидно, полученный эффект не может быть связан только с улучшением кормовой базы гидробионтов. Полученные результаты дают основания предполагать, что липидные экстракты беломорских водорослей представляют потенциальный интерес для разработки адаптогенных и геропротекторных препаратов.

Результаты работы получены, в том числе в рамках государственной темы «Динамика структуры и функционирования экосистем Белого моря и сопредельных арктических морей». Регистрационный номер №АААА-А19-119022690122-5.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боголицин К.Г., Каплицын П.А., Ульяновский Н.В., Пронина О.А. Комплексное исследование химического состава бурых водорослей Белого моря // Химия растительного сырья. 2012. №4. С. 153-160.
2. Stengel D.B., Connan S., Popper Z.A. Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnol. Adv.* 2011. 29(5): 483-501.
3. Рябушко В.И., Мусатенко Л.И., Войтенко Л.В., Попова Е.В., Нехорошев М.В. Функциональная роль фукоксантина и фитогормонов из морских бурых водорослей. *Альгология*, 2014, 24(1): 20-33.
4. Vadalà M., Palmieri B. From algae to "functional foods". *Clin. Ter.* 2015;166(4): 281-300.
5. Gammone M.A., Riccioni G., D'Orazio N. Marine Carotenoids against Oxidative Stress: Effects on Human Health. // *Mar. Drugs*. 2015, 13(10): 6226-46.
6. Martin L.J. Fucoxanthin and Its Metabolite Fucoxanthinol in Cancer Prevention and Treatment. *Mar. Drugs*. 2015, 13(8): 4784-98.
7. Maeda H. Nutraceutical effects of fucoxanthin for obesity and diabetes therapy: a review // *J. Oleo Sci.* 2015, 64(2): 125-32.
8. Abidov M., et al. The effects of Xanthigen in the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic fatty liver disease and normal liver fat. // *Diabetes Obes Metab.* (2010)
9. Stengel D.B., Connan S., Popper Z.A. Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnol. Adv.* 2011,29(5): 483-501.
10. Delbrut A., Albina P., Lapierre T., et al. Fucoxanthin and Polyunsaturated Fatty Acids Co-Extraction by a Green Process // *Molecules*. 2018 Apr 11; 23(4)
11. Муравьева Е.А. Комплексная технология получения экстрактивных БАВ из бурых водорослей белого моря – Рыбпром. № 3, 2010, С. 54-57.
12. Podolskaya E.P., Gladchuk A.S., Keletsieva O.A., et al. The film chemical deposition technologies as a tool for fingerprinting of free fatty acids by MALDI-TOF-MS // *Analytical Chemistry*. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b05296. Publ. date (Web) 11 Dec. 2018.
13. ФП.1.39.2007.003222, «Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодотворности дафний». М. «АКВАРОС» 2007.
14. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06, 16.1:2:2:3:3.9-06. «Методика измерений количества *Daphnia magna* Straus для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, осадков сточных вод, отходов производства и потребления методом прямого счета». М. 2014.
15. Межгосударственный стандарт 12.1.007-76-2007. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. Москва: Стандартинформ, 2007.
16. Lashmanova E., Proshkina E., Zhikrivetskaya S., et al. Fucoxanthin increases lifespan of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacol Res.* 2015, 100, P. 228-41.
17. Mann H.B., Whitney D.R. On a test of whether one of two random variables are stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics*. 1947; № 18. P.50-60.
18. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях; Л. 1973.

REFERENCES:

1. Bogolitsyn K.G., Kaplitsyn P.A., Ulyanovskiy N.V., Pronina O.A. Comprehensive study of the chemical composition of the White Sea brown algae. *Chemistry of plant raw materials*. 2012. – Vol. 4. – Pp. 153-160 (in Russian).
2. Stengel D.B., Connan S., Popper Z.A. Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnol. Adv.* 2011.- Vol. 29(5). – Pp. 483-501.
3. Ryabushko V.I., Musatenko L.I., Voytenko L.V., Popova E.V., Nekorshchev M.V. Functional role of fucoxanthin and phytohormones from marine brown algae. *Algology*. 2014. – Vol. 24(1). – Pp. 20-33 (in Russian).
4. Vadalà M., Palmieri B. From algae to "functional foods". *Clin Ter.* 2015. – Vol. – 166(4). – Pp. 281-300.
5. Gammone M.A., Riccioni G., D'Orazio N. Marine Carotenoids against Oxidative Stress: Effects on Human Health. *Mar. Drugs*. 2015. – Vol. 13(10). – Pp. 6226-46.
6. Martin L.J. Fucoxanthin and Its Metabolite Fucoxanthinol in Cancer Prevention and Treatment. *Mar. Drugs*. 2015. – Vol. –13(8). – Pp. 4784-98.
7. Maeda H. Nutraceutical effects of fucoxanthin for obesity and diabetes therapy: a review. *J. Oleo Sci.* 2015. – Vol. 64(2). – Pp. 125-32.
8. Abidov M., et al. The effects of Xanthigen in the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic

- fatty liver disease and normal liver fat. *Diabetes Obes Metab.* 2010.
9. Stengel D.B., Connan S., Popper Z.A. Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnol. Adv.* 2011. - Vol. 29(5). - Pp. 483-501.
10. Delbrut A., Albina P., Lapierre T., et al. Fucoxanthin and Polyunsaturated Fatty Acids Co-Extraction by a Green Process. *Molecules.* 2018. - Vol. 23(4).
11. Murav'eva E.A. Complex technology for producing extractive BAS from white sea brown algae. *Rybprom.* - 2010. - Vol. 3. - Pp. 54-57 (in Russian).
12. Podolskaya E.P., Gladchuk A.S., Keltsieva O.A., et al. The film chemical deposition technoloques as a tool for fingerprinting of free fatty acids by MALDI-TOF-MS. *Analytical Chemistry.* DOI: 10.1021/acs.analchem.8b05296. Publ. date (Web) 11 Dec. 2018.
13. FR.1.39.2007.003222, "Methods for determining the toxicity of water and water extracts from the soil, sewage sludge, waste from mortality and changes in the fertility of *Daphnia*". M. «AKVAROS» 2007 (in Russian).
14. PND FT 14.1:2:3:4.12-06, 16.1:2:2.3:3.9-06. "Methods of measuring the quantity of *Daphnia magna* Straus to determine the toxicity of drinking, fresh natural and waste waters, water extracts from soils, sewage sludge, production and consumption wastes by direct counting method". M. 2014 (in Russian).
15. Interstate standard 12.1.007-76-2007. Occupational safety standards system. Noxious substances. Classification and general safety requirements. M: Standartinform, 2007 (in Russian).
16. Lashmanova E., Proshkina E., Zhikrivetskaya S., et al. Fucoxanthin increases lifespan of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacol Res.* 2015. - Vol. 100. - Pp. 228-41.
17. Mann H.B., Whitney D.R. On a test of whether one of two random variables are stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics.* 1947. - Vol. 18. - Pp. 50-60.
18. Gubler E.V., Genkin A.A. Application of non-parametric test for statistics in biomedical research; L. 1973 (in Russian).

N.P. Podosinovicova¹, K.A. Krasnov¹, A.A. Bondarenko¹, M.L. Alexandrova¹, M.A. Zaytseva¹, V.V. Khalaman²

STUDY OF TOXICITY AND SAFETY OF LIPOPHILIC EXTRACTS OF THE WHITE SEA BROWN ALGAE – *FUCUS VESICULOSUS* AND *LAMINARIA SACCHARINA* ON THE *DAPHNIA MAGNA STRAUS* MODEL

¹Institute of Toxicology of the Federal Medical Biological Agency, 192019, Saint Petersburg, Russian Federation

²White Sea Biological Station, Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, 199034, Saint Petersburg, Russian Federation

Assessment of the acute toxicity, safety and biological activity of lipophilic extracts of the White Sea brown algae – *S. latissima* and *F. vesiculosus* – on the model of zoohydrobionts *Daphnia magna* Straus has been performed.

Two methods of obtaining dry lipid concentrate of kelp and fucus were tested. It has been shown that the acute toxicity of the lipid extract of kelp does not depend on the method of its preparation and is about 200 mg/L. The acute toxicity of fucus extract depends on the method of preparation. It is about 100 mg/L in the «cold» method of extraction and increases by an order of magnitude in the «hot» method. To study the biological activity, samples of brown algae obtained by «cold» extraction were used.

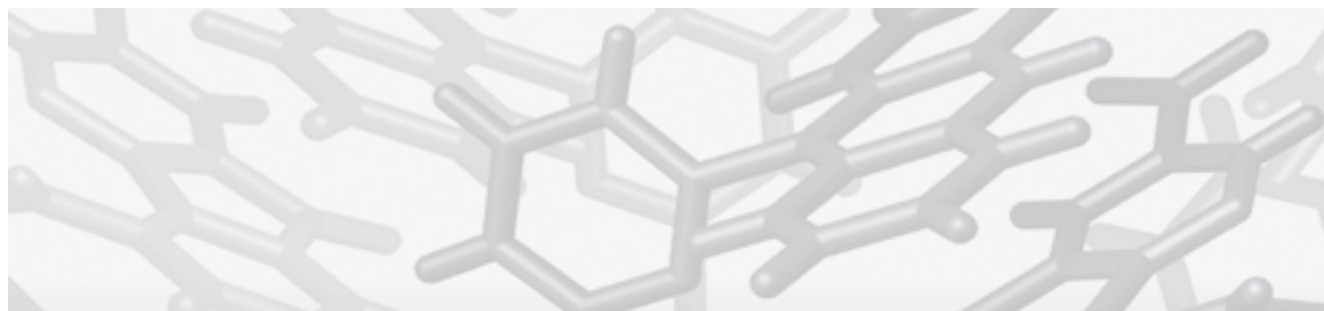
In chronic experiments, preparations of brown algae were used in a concentration of 8.0 mg/L, which was less than 0,1 LC₅₀ of the acute toxicity of fucus and did not cause toxic effects.

For 24 days, the preparations were introduced in contact with *Daphnia* twice a week. Subsequently, the control and experimental hydrobionts were kept under the same conditions until the death of the last individuals. It has been shown that the preparations of *S. latissima* and *F. vesiculosus* in the proposed concentration by 20-30% increased the lifespan of *Daphnia* in normal conditions and by 50-60% in extreme conditions, while stimulating the reproductive activity of aquatic organisms by 3-4 times. The results obtained suggest that the studied drugs have pronounced adaptogenic and cytoprotective effects.

Keyword: brown algae, *F. vesiculosus*, *S. latissima*, lipids, toxicity, lifespan, reproductive activity, *Daphnia magna* Straus.

Quote: N.P. Podosinovicova, K.A. Krasnov, A.A. Bondarenko, M.L. Alexandrova, M.A. Zaytseva, V.V. Khalaman. Study of toxicity and safety of lipophilic extracts of White Sea brown algae – *Fucus vesiculosus* and *Laminaria saccharina* on the *Daphnia magna* Straus model. *Toxicological Review.* 2020; 4:49-55.

Переработанный материал поступил в редакцию 20.12.2019 г.



НОВЫЕ СВЕДЕНИЯ О ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

УДК 615.9

DOI: 10.36946/0869-7922-2020-4-

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ НАТРИЯ ЛАУРИЛСУЛЬФАТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПУТЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ

М.В. Бидевкина¹, М.И. Голубева²,
А.В. Лиманцев¹, И.Н. Разумная²,
Т.Н. Потапова¹, Э.А. Федорова²

¹ФБУН «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора, 117246, г. Москва, Российская Федерация

²АО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ» (АО «ВНЦ БАВ»), 142450, Старая Купавна Московской области, Российская Федерация

Натрия лаурилсульфат – наиболее распространённое поверхностно активное вещество, используется при производстве большинства моющих средств, применяется в фармацевтической промышленности, в производстве хлоропренового каучука, пластиков, искусственных мехов. Натрия лаурилсульфат относится к умеренно опасным веществам при введении в желудок (DL_{50} для белых мышей и крыс находится в диапазоне 2086-2700 мг/кг), оказывает выраженное местное раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки глаз, обладает кожно-резорбтивным, сенсibiliзирующим и выраженным кумулятивным действием. Порог остро́го ингаляционного действия установлен на уровне 15,3 мг/м³ по изменению показателей функции нервной системы и раздражающему действию на слизистые оболочки верхних дыхательных путей (увеличение общего количества клеток в смывах из носоглотки). Рекомендован к утверждению ОБУВ натрия лаурилсульфата в воздухе рабочей зоны – 0,2⁺ мг/м³ (аэрозоль).

Ключевые слова: натрия лаурилсульфат, натрия додецилсульфат, токсичность, раздражающее действие, крысы, гигиеническое нормирование.

Цит: М.В. Бидевкина, М.И. Голубева, А.В. Лиманцев, И.Н. Разумная, Т.Н. Потапова, Э.А. Федорова. Изучение токсичности и опасности натрия лаурилсульфата при различных путях воздействия. Токсикологический вестник. 2020; 4: 56-59

Введение. Натрия лаурилсульфат (натрия додецилсульфат) относится к анионным поверхностно-активным веществам (ПАВ), является высокоэффективным эмульгатором, обладает детергентными и амфифильными свойствами. Характер токсического действия натрия лаурилсульфата хорошо изучен. Вещество относится к умеренно опасным соединениям при введении в желудок (DL_{50} для крыс 1288 мг/кг), оказывает выраженное раздражающее действие на кожные покровы и

слизистые оболочки глаз. При попадании натрия лаурилсульфата в дыхательные пути у рабочих наблюдали раздражение слизистых оболочек носоглотки, кашель, першение в горле, затрудненное дыхание; может вызывать аллергические реакции (дерматит, астма). Натрия лаурилсульфат не обладает мутагенным и канцерогенным действием; оказывает влияние на развитие плодов мышей и кроликов на уровне доз, токсичных для материнского организма [1]. Для группы анионных

Бидевкина Марина Васильевна (Bidevkina Marina Vasil'evna), доктор медицинских наук, заведующая лабораторией токсикологии дезинфекционных средств ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора, bidevkinamv@niid.ru;

Голубева Маргарита Ивановна (Golubeva Margarita Ivanovna), кандидат биологических наук, заведующая лабораторией профилактической токсикологии и гигиены АО «ВНЦ БАВ», golubevamargo@mail.ru;

Лиманцев Анатолий Владимирович (Limantsev Anatoly Vladimirovich), кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории токсикологии дезинфекционных средств ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора, av.lim@yandex.ru;

Разумная Ирина Николаевна (Razumnaya Irina Nikolaevna), старший научный сотрудник лаборатории профилактической токсикологии и гигиены АО «ВНЦ БАВ», irina.r.3@mail.ru;

Потапова Татьяна Николаевна (Potapova Tat'yana Nikolaevna), старший научный сотрудник лаборатории токсикологии дезинфекционных средств ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора, potapovatn@niid.ru;

Федорова Эмма Алексеевна (Fedorova Emma Alexeevna), старший научный сотрудник лаборатории профилактической токсикологии и гигиены АО «ВНЦ БАВ», emfed@mail.ru

ПАВ (алкилсульфаты натрия), в число которых входит натрия лаурилсульфат, установлена групповая максимальная разовая ПДК в атмосферном воздухе населенных мест – 0,01 мг/м³ (рефл. признак вредности, 4 класс опасности).

Натрия лаурилсульфат используют при производстве большинства моющих средств, шампуней, зубной пасты и других средств личной гигиены; применяют в медицине как искусственный раздражитель кожи, в фармацевтической промышленности – при изготовлении готовых лекарственных форм, а также в производстве хлоропренового каучука, пластиков, искусственных мехов. В связи с этим *задачей нашего исследования* было изучение характера биологического действия натрия лаурилсульфата на организм экспериментальных животных, с целью обоснования ОБУВ в воздухе рабочей зоны.

Материалы и методы исследования. Натрия лаурилсульфат – кристаллический порошок белого или светло-желтого цвета практически без запаха. CAS №: 151-21-3. Химическая формула: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{SO}_3\text{Na}^+$. Эмпирическая формула: $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{SNa}$. М.м.: 288,4. $T_{\text{пл.}}$: 205,5 °С. Плотность: 1,01 г/см³. Хорошо растворим в воде (не менее 130 г/л при 20 °С), хорошо растворим в масле; растворим в спиртах; не растворим в других органических растворителях. Коэффициент распределения масло/вода составляет 1,6. Биоразлагаемость превышает 90 %, токсичных продуктов при разложении не образуется.

Исследование токсичности и опасности натрия лаурилсульфата проводили в соответствии с действующими нормативно-методическими документами. Исследование проведено на 150 белых беспородных крысах самцах, 100 белых беспородных мышах, 6 кроликах породы «Советская шиншилла». Статистические группы животных состояли из 6-10 особей.

Средние смертельные дозы определяли при введении препарата в желудок виде взвеси в 2% крахмальном геле. Раздражающее действие на кожу изучали при эпикутанных аппликациях 500 мг препарата в виде мази на 4% крахмальном геле в соотношении 1:1. Кожно-резорбтивное действие препарата оценивали на мышах «пробирочным методом» («хвостовые пробы»); кумулятивные свойства изучали на мышах методом Лима и соавторов. Способность натрия лаурилсульфата оказывать сенсibilизирующее действие изучали путём определения реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на белых мышах максимизационным методом А.Д. Черноусова. Исследование острого ингаляционного воздействия аэрозоля натрия лаурилсульфата проводили в затравочных камерах объемом 200 литров с динамической подачей вещества. У животных регистрировали функцию

дыхательной системы (измеряли частоту дыхания и проводили анализ состава клеток смывов из носоглотки и легких), нервной системы (регистрировали СПП и поведенческие реакции), печени (определяли в сыворотки крови активность АЛАТ, АсАТ и щелочной фосфатазы, содержание общего белка, альбумина), почек (измеряли суточное количество мочи и содержание в ней общего белка и хлоридов). Для оценки сенсibilизирующей активности вещества через 7 дней после однократной ингаляционной экспозиции у крыс проводили провокационный тест опухания уха, подсчитывали общее количество эозинофилов и лейкоцитов в периферической крови.

Оценку достоверности различия данных подопытной и контрольной групп животных проводили по критерию Стьюдента, руководствуясь 5% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования показали, что при введении в желудок DL_{50} (мг/кг) натрия лаурилсульфата для крыс самцов составляет 2086,0 (1707,5 ÷ 2548,3), для мышей самцов - 2649,0 (2060,1 ÷ 3406,4), мышей самок - 2700 мг/кг (3 класс опасности по классификации ГОСТ 12.1.007-76). Клиническая картина отравления характеризовалась возбуждением, сменяющимся снижением двигательной активности, слабостью, попискиванием. Гибель наступала на 2-3 дни после введения. Натрия лаурилсульфат оказывал выраженный раздражающий эффект на кожу кроликов и мышей, обладал кожно-резорбтивным действием и кумулятивной активностью (коэффициент кумуляции 2,74). Выявлены сенсibilизирующие свойства изучаемого препарата методом воспроизведения ГЗТ на мышах.

Для определения Lim_{ac} натрия лаурилсульфата были испытаны 3 концентрации аэрозоля: $35,2 \pm 3,9$ мг/м³; $15,2 \pm 3,4$ мг/м³ и $4,5 \pm 0,7$ мг/м³. Как показали проведенные исследования, аэрозоль натрия лаурилсульфата при ингаляции оказывает на экспериментальных животных общетоксическое и раздражающее действие, сенсibilизирующий эффект не выявлен. Аэрозоль натрия лаурилсульфата в концентрации на уровне $35,2$ мг/м³ вызывал нарушение функционального состояния дыхательной и нервной систем, печени и почек (табл. 1). У крыс выявлено снижение частоты дыхания и увеличение общего количества клеток в смывах из легких и носоглотки. В смывах из верхних дыхательных путей отмечено пониженное содержание нейтрофилов. При изучении функции нервной системы установлено увеличение СПП, а также изменения показателей в тесте «открытое поле». В сыворотке крови зарегистрировано повышение активности ЛДГ и содержания общего белка. В моче также наблюдалось повышенное содержание белка.

После ингаляции аэрозоля натрия лаурилсуль-

Таблица 1

**Изменение регистрируемых показателей у крыс при ингаляции натрия лаурилсульфата
в концентрации $35,2 \pm 3,9$ мг/м³**

| Показатели | Опыт | Контроль |
|---|-------------------|-----------------|
| Частота дыхания/мин | $123,2 \pm 9,8^*$ | $150,5 \pm 7,4$ |
| Количество нейтрофилов на 100 клеток в смывах из носоглотки | $48,3 \pm 1,7^*$ | $59,2 \pm 1,8$ |
| Общее количество клеток в смывах из носоглотки, кл/мкл | $408 \pm 55^*$ | 221 ± 60 |
| Общее количество клеток в смывах из легких, кл/мкл | $1217 \pm 176^*$ | 716 ± 108 |
| СПП, усл.ед | $5,3 \pm 0,15^*$ | $4,7 \pm 0,2$ |
| Горизонтальная подвижность | $31,5 \pm 2,3^*$ | $16,0 \pm 3,3$ |
| Вертикальная подвижность | $5,7 \pm 1,02$ | $3,0 \pm 0,93$ |
| Норки в тесте «Открытое поле» | $7,8 \pm 1,22^*$ | $4,17 \pm 0,65$ |
| Содержание в крови ЛДГ, Е/л | $4049 \pm 116^*$ | 3324 ± 296 |
| Содержание в крови общего белка, г/л | $77,1 \pm 1,7^*$ | $72,9 \pm 0,4$ |
| Содержание в моче белка, мг% | $4,55 \pm 0,58^*$ | $2,81 \pm 0,60$ |

* - $p < 0,05$

Таблица 2

**Изменение регистрируемых показателей у крыс при ингаляции натрия лаурилсульфата
в концентрации $15,2 \pm 3,4$ мг/м³**

| Показатели | Опыт | Контроль |
|--|------------------|-----------------|
| Частота дыхания/мин | $139,2 \pm 15,0$ | $139,3 \pm 6,3$ |
| Общее количество клеток в смывах из носоглотки, кл/мкл | $287 \pm 74^*$ | 95 ± 29 |
| Общее количество клеток в смывах из легких, кл/мкл | 732 ± 82 | 593 ± 94 |
| Горизонтальная подвижность | $15,7 \pm 3,6^*$ | $25,0 \pm 1,0$ |
| Вертикальная подвижность | $4,0 \pm 1,26$ | $3,5 \pm 0,6$ |
| Норки в тесте «Открытое поле» | $4,0 \pm 0,7^*$ | $7,0 \pm 1,2$ |

* - $p < 0,05$

фата в концентрации $15,2$ мг/м³ имели место изменения интегральных показателей (снижение горизонтальной двигательной активности и норкового рефлекса в тесте «открытое поле») и показателей, характеризующих раздражающее действие на слизистые оболочки верхних дыхательных путей (табл. 2). Эта концентрация принята за Lim_{ac} .

Ингаляция вещества на уровне $4,5$ мг/м³ не приводила к изменениям изученных показателей состояния животных. Таким образом, натрия лаурилсульфат обладает неспецифическим раздражающим действием на верхние дыхательные пути, $Z_{ir} = 1$.

Заключение. Натрия лаурилсульфат по основным токсикологическим характеристикам бли-

зок к хорошо изученным в токсиколого-гигиеническом аспекте представителям катионных ПАВ (лаурилдиметилгидроксиметил аммония хлорид, алкилтриметиламмоний хлорид, дидецилдиметиламмоний бромид клатрат с карбамидом). Эти вещества, также, как и натрия лаурилсульфат, умеренно опасны при поступлении внутрь (3 класс по ГОСТ 12.1.007-76), обладают выраженным раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки, способны проникать через кожные покровы. Все изученные ранее катионные ПАВ не обладают кумулятивным и ал-

лергенным действием. В воздухе рабочей зоны для аэрозолей этих веществ установлен ОБУВ – 0,5⁺ мг/м³ («требуется специальная защита кожи и глаз»). На основании расчетов, проведенных по установленным параметрам токсикометрии и с учетом выраженной кумулятивной активности, в воздухе рабочей зоны рекомендован ОБУВ натрия лаурилсульфата 0,2⁺ мг/м³ (аэрозоль, «требуется специальная защита кожи и глаз»). Метод определения в воздухе – спектрофотометрический, диапазон измеряемых концентраций 0,1–0,7 мг/м³.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES:

1. OECD; SIDS Initial Assessment Report for SIAM 5. Sodium dodecyl sulphate (CAS No: 151-21-3). – 2005 – p. 17-20. Available at: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+1315> (accessed 07 June, 2019).

M.V. Bidevkina¹, M.I. Golubeva², A.V. Limantsev¹, I.N. Razumnaya², T.N. Potapova¹, E.A. Fedorova²

ASSESSMENT OF THE TOXICITY AND HAZARD OF SODIUM LAURYL SULFATE AT DIFFERENT EXPOSURE ROUTES

¹Scientific Research Institute of Disinfectology of Rospotrebnadzor, 117246, Moscow, Russian Federation

²Joint-Stock Company «All-Union Scientific Center for the Safety of Biologically Active Substances», 142450, Staraya Kupavna, Moscow region, Russian Federation

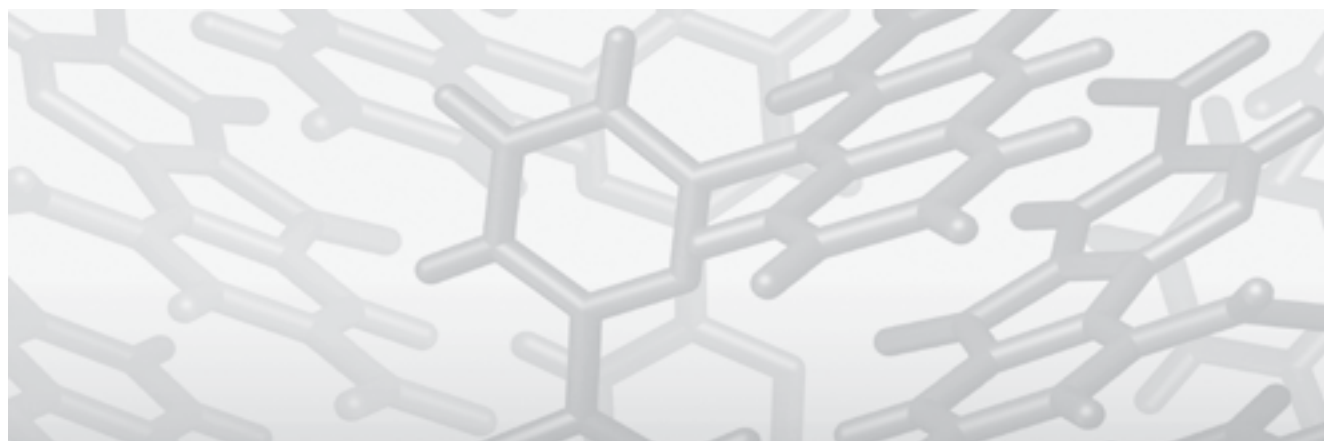
Sodium lauryl sulfate is the most common surfactant used in the production of detergents, chloroprene rubber, plastics, artificial furs and in pharmaceutical industry. Sodium lauryl sulfate is a moderately hazardous substance when introduced into the stomach (DL_{50} for white mice and rats is in the range of 2086-2700 mg/kg), has a pronounced local irritant effect on the skin and mucous membranes of the eyes, has a skin-resorptive, sensitizing and pronounced cumulative effects. The threshold for acute inhalation action is set at 15,3 mg/m³ for changes in the function of the nervous system and irritating effects on the mucous membranes of the upper respiratory tract (an increase in the total number of cells in the nasal flushes).

Recommended for approval tentative safe exposure level of sodium lauryl sulfate in the air of the working area is 0.2⁺ mg/m³ (aerosol).

Keywords: *sodium lauryl sulfate, sodium dodecyl sulfate, toxicity, irritant effect, rats, hygienic regulation.*

Quote: M.V. Bidevkina, M.I. Golubeva, A.V. Limantsev, I.N. Razumnaya, T.N. Potapova, E.A. Fedorova. Assessment of the toxicity and nazard of sodium lauryl sulfate at different exposure routes. Toxicological Review. 2020; 4:56-59.

Материал поступил в редакцию 10.08.2019 г.



ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

ПЕТРОВ АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ

(к 80-летию со дня рождения)

Александр Николаевич Петров родился 7 июля 1940 года в Ленинграде в семье врачей. Его детство пришлось на тяжелые военные годы – семья Петровых пережила блокаду Ленинграда. Окончив среднюю школу с золотой медалью, в 1963 году Александр Николаевич поступил в 1-й Ленинградский медицинский институт имени академика И.П. Павлова. После окончания института он был зачислен в аспирантуру Института токсикологии, где успешно защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям «фармакология», «токсикология» в 1967 году. В 1991 г. им была защищена диссертация и получена ученая степень доктора медицинских наук. В 2004 году, решением Высшей аттестационной комиссии Российской Федерации А.Н. Петрову было присвоено ученое звание профессор по специальности «токсикология».

Одним из важнейших этапов жизненного пути ученого явилось руководство Институтом токсикологии с 1987 по 2007 год. А.Н. Петров возглавил институт в сложный период распада СССР и значительных изменений в российской науке. Он достойно справился с выпавшей на его долю задачей, сумев сохранить научный коллектив, воспитать новую смену научных сотрудников, развить научные достижения института. В те сложные годы Институт токсикологии стал головным исполнителем в отраслевой научно-исследовательской программе «Патогенез и молекулярные механизмы экзогенных интоксикаций. Разработка средств и методов диагностики и лечения», была создана единственная в России консультативно-диагностическая поликлиника. За период работы Института токсикологии под руководством А.Н. Петрова разработан оригинальный высокоэффективный реактиватор холинэстеразы. Созданный на его основе препарат Карбоксим успешно внедрен в практику для лечения отравлений ФОС и ФОВ. Были завершены работы по внедрению антидота само- и взаимопомощи – Пеликсима. Результатом многолетней



творческой работы токсикологов и химиков института стал принятый на снабжение МО РФ индивидуальный противохимический пакет (ИПП-11) – средство защиты и дегазации кожных покровов.

Александр Николаевич внес значительный вклад в организацию медицинского обеспечения химической безопасности населения России. С 1993 года он является председателем Межведомственного научного совета по токсикологии.

С 2001 по 2004 год А.Н. Петров был главным внештатным специалистом-токсикологом Минздрава России

В настоящее время Александр Николаевич является одним из ведущих специалистов нашей страны в области токсикологии и фармакологии. Под его руководством проведены многочисленные научные исследования механизмов токсического действия химических соединений на организм человека и животных. Научные труды А.Н. Петрова опубликованы более чем в 150 научных изданиях. Он является автором 10 монографий, 11 патентов РФ на изобретения, 7 учебно-методических пособий.

Александр Николаевич ведет активную педагогическую деятельность. За выдающиеся заслуги в научно-исследовательской деятельности, в воспитании и подготовке высококвалифицированных научных кадров А.Н. Петров награжден орденом «Знак почета», медалью «Ветеран труда», знаком «Житель блокадного Ленинграда». Ему присвоено почётное звание «Заслуженный врач России».

Чуткость и внимание к людям, тактичность и интеллигентность в сочетании с профессиональной целеустремленностью, ответственностью и принципиальностью в работе снискали Александру Николаевичу заслуженную любовь и уважение коллег.

Коллектив ФГБУН ИТ ФМБА России, редколлегия журнала «Токсикологический вестник» сердечно поздравляют Александра Николаевича с Юбилеем! Желают крепкого здоровья, бодрости духа, благополучия, счастья и мира.