

# ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК

*Toxicological Review*



Научно-практический журнал  
Издается с июля 1993 года, выходит 1 раз в 2 месяца

№4 (157), 2019

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

<b>Х.Х. Хамидулина</b> КОЛОНКА ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА.....	2	<b>Kh.Kh. Khamidulina</b> FROM THE EDITOR-IN-CHIEF.....	2
<b>А.Г. Синенченко, А.Н. Лодягин, Б.В. Батоцыренов, И.А. Шикалова, А.М. Антонова</b> ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ И СТРУКТУРЫ ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЙ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ (ПО ДАННЫМ МНОГОПРОФИЛЬНОГО СТАЦИОНАРА).....	4	<b>A.G. Sinenchenko, A.N. Lodyagin, B.V. Batocyrenov, I.A. Shikalova, A.M. Antonova</b> EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS OF PREVALENCE AND STRUCTURE OF ACUTE POISONINGS IN SAINT PETERSBURG (ACCORDING TO A MULTIPROFILE HOSPITAL) .....	4
<b>Л.Б. Завалий, С.С. Петриков, А.Ю. Симонова, Т.И. Дикая, М.М. Поцхверия, Ю.Н. Остапенко, М.В. Гайдук</b> ПСИХО-ЭМОЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ОТРАВЛЕНИЕМ ТАЛЛИЕМ.....	9	<b>L.B. Zavaliy, S.S. Petrikov, A.Yu. Simonova, T.I. Dikaya, M.M. Pochkveriya, Yu.N. Ostapenko, M.V. Gaiduk</b> PSYCHO-EMOTIONAL STATUS IN PATIENTS WITH ACUTE THALLIUM POISONING.....	9
<b>Т.В. Бушуева, И.А. Минигалиева, В.Г. Панов, А.Н. Кузнецова, А.С. Наумова, М.П. Сутункова, В.Я. Шур, Е.В. Шишкина, В.Б. Гурвич, Б.А. Кацнельсон</b> НОВЫЕ ДАННЫЕ К ВОПРОСУ ОБ ИНФОРМАТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ НА КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ДЛЯ ОЦЕНКИ СРАВНИТЕЛЬНОЙ И КОМБИНИРОВАННОЙ ТОКСИЧНОСТИ МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ.....	16	<b>T.V. Bushueva, I.A. Minigalieva, V.G. Panov, A.N. Kuznetsova, A.S. Naumova, M.P. Sutunkova, V.Ya. Shur, E.V. Shishkina, V.B. Gurvich, B.A. Katsnelson</b> NEW DATA ON THE QUESTION OF INFORMATIVENESS OF EXPERIMENTS ON CELL CULTURES FOR ASSESSMENT OF COMPARATIVE AND COMBINED TOXICITY OF METAL OXIDE NANOPARTICLES.....	16
<b>А.И. Уколов, М.Д. Шачнева, А.С. Радилев</b> ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОМАРКЕРОВ ЭКСПОЗИЦИИ И ЭФФЕКТА 1,4-ДИХЛОРОГЕКСАФТОРБУТЕНА-2 .....	23	<b>A.I. Ukolov, M.D. Shachneva, A.S. Radilov</b> IDENTIFICATION OF BIOMARKERS OF EXPOSURE AND EFFECT OF 1,4-DICHLOROHEXAFLUOROBUTENE-2 .....	23
<b>А.Ф. Быкова, С.Е. Галан, В.Ю. Малягин, С.Н. Субботина</b> ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРОИЗВОДНОГО АРИЛАЦЕТАМИДА GR 89,696, ОБЛАДАЮЩЕГО АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ..32	32	<b>A.F. Bykova, S.E. Galan, V.Yu. Malyagin, S.N. Subbotina</b> SAFETY ASSESSMENT OF ARYLACETAMIDE DERIVATIVE GR 89,696 WITH ANALGESIC ACTIVITY .....	32
<b>Э.Р. Кудояров, Д.Д. Каримов, Т.Г. Кутлина, Д.О. Каримов, Г.Ф. Мухаммадиева, Н.Ю. Хуснутдинова, К.В. Данилко, А.Р. Гимадиева, А.Б. Бакиров</b> ИЗУЧЕНИЕ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИНА IN VITRO .....	38	<b>E.R. Kudoyarov, D.D. Karimov, T.G. Kutlina, D.O. Karimov, G.F. Mukhammadieva, N.Yu. Khusnutdinova, K.V. Danilko, A.R. Gimadieva, A.B. Bakirov</b> RESEARCH OF HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY OF PYRIMIDINE DERIVATIVES IN VITRO .....	38
<b>М.В. Бидевкина, М.И. Голубева, Г.П. Панкратова, А.В. Лиманцев, И.Н. Разумная, А.Л. Караев, Т.Н. Поталова</b> МАТЕРИАЛЫ ПО ОБОСНОВАНИЮ ГИГИЕНИЧЕСКИХ НОРМАТИВОВ N-ПЕНТИЛОВОГО ЭФИРА ХЛОРОФОРМНОЙ КИСЛОТЫ В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ И В АТМОСФЕРЕ .....	43	<b>M.V. Bidevkina, M.I. Golubeva, G.P. Pankratova, A.V. Limantsev, I.N. Razumnaya, A.L. Karaev, T.N. Potapova</b> MATERIALS ON SUBSTANTIATION OF HYGIENIC STANDARDS FOR N-PENTYL ETHER OF CHLOROFORMIC ACID IN THE AIR OF THE WORKING AREA AND IN THE ATMOSPHERE.....	43
<b>□ Дискуссия</b> <b>Н.А. Илюшина, Ю.А. Ревазова</b> О РОЛИ ЭКСПЕРТНОГО СООБЩЕСТВА В ОЦЕНКЕ МУТАГЕННОСТИ И КАНЦЕРОГЕННОСТИ ПЕСТИЦИДОВ .....	48	<b>□ Discussion</b> <b>N.A. Ilyushina, Yu.A. Revazova</b> ROLE OF THE EXPERT COMMUNITY IN THE EVALUATION OF THE MUTAGENICITY AND CARCINOGENICITY OF PESTICIDES... 48	48
<b>□ Экологическая токсикология</b> <b>Е.К. Еськов, М.Д. Еськова, А.С. Рожников</b> ДЕСТРУКЦИЯ СТЕНОК МЕДОВОГО ЗОБИКА МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ ПРИ ОТРАВЛЕНИЯХ СВИНЦОМ И КАДМИЕМ.....	54	<b>□ Ecotoxicology</b> <b>E.K. Eskov, M.D. Eskova, A.S. Rozhenkov</b> DESTRUCTION OF BEE CROP WALL OF HONEYBEE AT THE POISONING OF LEAD AND CADMIUM.....	54
<b>А.С. Богачева, Е.В. Полозова, В.В. Шилов, Е.В. Давыдова, М.А. Юдин, И.Н. Ключкин</b> ИНДИКАЦИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДОЕМОВ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ ПРИ ПОМОЩИ ЦИАНОБАКТЕРИЙ SYNECHOCYTIS SP.....	57	<b>A.S. Bogacheva, E.V. Polozova, V.V. Shilov, E.V. Davydova, M.A. Yudin, I.N. Klyushkin</b> INDICATION OF WATER POLLUTION WITH HEAVY METALS BY MEANS OF CYANOBACTERIA SYNECHOCYTIS sp. ....	57
<b>□ Съезды, конференции, совещания</b> <b>Х.Х. Хамидулина</b> 59-е СОВМЕСТНОЕ ЗАСЕДАНИЕ КОМИТЕТА ОЭСР ПО ХИМИИ И РАБОЧЕЙ ГРУППЫ ОЭСР ПО ХИМИИ, ПЕСТИЦИДАМ И БИОТЕХНОЛОГИИ.....	63	<b>□ Congresses, conferences, meetings</b> <b>h.Kh. Khamidulina</b> 59 <sup>TH</sup> JOINT MEETING OF THE OECD COMMITTEE ON CHEMISTRY AND THE OECD WORKING GROUP ON CHEMISTRY, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY.....	63

## Уважаемые коллеги!

С 10 октября 2018 г. по 15 июня 2019 г. журналом «Токсикологический вестник» и учредителем журнала «Токсикологический вестник» – ФБУЗ РПОХБВ Роспотребнадзора проводился Конкурс работ молодых ученых и специалистов по следующим номинациям:

- «Лучшая работа в области профилактической токсикологии»;
- «Лучшая работа в области клинической токсикологии»;
- «Лучшая работа в области лекарственной токсикологии»;
- Лучшая работа в области экологической токсикологии».

В конкурсе приняло участие 11 номинантов – молодых ученых и специалистов различных направлений токсикологии:

**Абдулмуталимова Тамила Омариевна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории гидрогеологии и геоэкологии ФГБУН Института геологии Дагестанского научного центра Российской академии наук; **«Оценка канцерогенного риска здоровью населения при использовании подземных вод с высоким содержанием мышьяка в качестве источников питьевого водоснабжения на примере Республики Дагестан».**

**Белинская Екатерина Александровна**, старший научный сотрудник ФГУП НТЦ РХБГ ФМБА России; **«Влияние стойких органических загрязнителей и бенз[а]пирена на прорастание семян ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare* L.)».**

**Герунов Тарас Владимирович**, кандидат биологических наук, доцент кафедры диагностики, внутренних незаразных болезней, фармакологии, хирургии и акушерства ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»; **«Иммунотропные эффекты ивермектина у продуктивных и лабораторных животных».**

**Игнатова Анна Михайловна**, кандидат технических наук, научный сотрудник отдела биохимических и цитогенетических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; **«Биологическая оценка воздействия микро- и наноразмерных частиц оксида алюминия на организм лабораторных животных в условиях острой токсичности».**

**Кострова Таисия Александровна**, соискатель ученой степени кандидата медицинских наук, младший научный сотрудник лаборато-

рии биохимической токсикологии и фармакологии ФГБУН ИТ ФМБА России; **«Экспериментальная оценка изменений нейротрофических и апоптотических факторов в реализации отдаленных последствий острых тяжелых отравлений нейротоксикантами (экспериментальное исследование)».**

**Степанков Марк Сергеевич**, лаборант-исследователь лаборатории биохимической и наносенсорной диагностики ФБУН ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения; **«Исследование и оценка параметров токсичности нанодисперсного оксида магния при многократном ингаляционном воздействии».**

**Толкач Павел Геннадьевич**, кандидат медицинских наук, преподаватель кафедры военной токсикологии и медицинской защиты Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова МО РФ; **«Изучение механизма пульмонотоксического действия дихлорангидрида угольной кислоты».**

**Усов Константин Ильич**, кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией токсикологических испытаний и исследований НИИ Биофизики, ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет»; **«Антиоксидантные эффекты адеметионина при введении крысам противотуберкулезных препаратов в токсических дозах».**

**Чигринский Евгений Александрович**, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии ФГБОУ ВО Омского государственного медицинского университета Минздрава России, 644099, г. Омск; **«Тиреоидный статус мышевидных грызунов при воздействии синтетического пиретроида циперметрина».**

**Шафигуллина Злата Александровна**, аспирант Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Институт естественных наук и математики 620002, г. Екатеринбург, младший научный сотрудник Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, 620049, г. Екатеринбург; **«Иммунотропное влияние аминоталгидразида на клетки печени при диффузном токсическом повреждении».**

**Шемаев Михаил Евгеньевич**, сотрудник ФГБУН ИТ ФМБА России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация; **«Особенности элиминации свинца у крыс при его парентеральном введении».**

6 августа 2019 г. были подведены итоги конкурса комиссией в составе:

• Гребенюка Александра Николаевича – председателя Конкурсной комиссии (заместителя председателя Всероссийской общественной организации токсикологов, доктора медицинских наук, профессора);

- Шейной Натальи Ивановны – секретаря Конкурсной комиссии (доктора биологических наук, профессора кафедры гигиены ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» МЗ РФ);
- Голубевой Маргариты Ивановны – члена Конкурсной комиссии (кандидата биологических наук, заведующей лабораторией профилактической токсикологии и гигиены АО «ВНЦ БАВ»);
- Гуськовой Татьяны Анатольевны – члена Конкурсной комиссии (член-корреспондента РАН, профессора);
- Филенко Олега Федоровича – члена Конкурсной комиссии (доктора биологических наук, профессора кафедры гидробиологии МГУ, заведующего лабораторией водной токсикологии МГУ им. М.В. Ломоносова).

Оценка научных работ молодых ученых, представленных на конкурс проводилась по следующим критериям:

- актуальность,
- научная новизна;
- практическая значимость;
- перспективность внедрения результатов работы;
- оригинальность применяемых методов, аппаратуры для исследований;
- полученные по работе патенты (в т.ч. в соавторстве).

Все работы были рассмотрены и оценены рецензентами и на основе рейтинга балльных оценок и выявлены победители.

Решением Конкурсной комиссии от 06.08.2019 победителями конкурса работ молодых ученых и специалистов в следующих номинациях объявлены:

• **«Лучшая работа в области профилактической токсикологии»** – **Шемаев Михаил Евгеньевич**, сотрудник ФГБУН ИТ ФМБА России с работой «Особенности элиминации свинца у крыс при его парентеральном введении»;

• **«Лучшая работа в области клинической токсикологии»** – **Кострова Таисия Александровна**, соискатель ученой степени кандидата медицинских наук, младший научный сотрудник лаборатории биохимической токсикологии и фармакологии ФГБУН ИТ ФМБА России с работой

**«Экспериментальная оценка изменений нейротрофических и апоптотических факторов в реализации отдаленных последствий острых тяжелых отравлений нейротоксикантами (экспериментальное исследование)»** ;

• **«Лучшая работа в области лекарственной токсикологии»** – **Шафигуллина Злата Александровна**, аспирант Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Институт естественных наук и математики, младший научный сотрудник Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН с работой **«Иммуномодулирующее влияние аминоталгидразида на клетки печени при диффузном токсическом повреждении»**;

• **«Лучшая работа в области экологической токсикологии»** – **Чигринский Евгений Александрович**, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии ФГБОУ ВО Омского государственного медицинского университета Минздрава России с работой **«Тиреоидный статус мышевидных грызунов при воздействии синтетического пиретроида циперметрина»**.

Конкурсная комиссия отметила высокий уровень научных работ конкурсантов.

Победители конкурса будут награждены грамотами, ценными подарками и получают бесплатную подписку на журнал «Токсикологический вестник» 2020 года. Также научные работы участников Конкурса будут опубликованы в журнале «Токсикологический вестник»: победителей конкурса – в 5 номере, участников конкурса – в последующих выпусках журнала.

Информация о результатах конкурса будут опубликованы на сайте журнала «Токсикологический вестник» <http://www.toxreview.ru>, а также на сайте Регистра потенциально опасных химических и биологических веществ <http://www.rpohv.ru/>.

Редакционная коллегия журнала «Токсикологический вестник» и организационный комитет ФБУЗ РПОХБВ Роспотребнадзора благодарят участников Конкурса работ молодых ученых и специалистов, желает успехов в научной работе и надеется на дальнейшее сотрудничество с молодыми талантливыми учеными.

Особенную благодарность хотелось бы выразить членам конкурсной комиссии за быструю, хорошо слаженную профессиональную работу.

*Главный редактор журнала  
«Токсикологический вестник»  
Х.Х. Хамидулина*

614.881 : 615.099.036.11

# ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ И СТРУКТУРЫ ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЙ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ (ПО ДАННЫМ МНОГОПРОФИЛЬНОГО СТАЦИОНАРА)

А.Г. Синенченко,  
А.Н. Лодягин,  
Б.В. Батоцыренов,  
И.А. Шикалова,  
А.М. Антонова

ГБУ Санкт-Петербургский  
научно-исследовательский  
институт скорой помощи имени  
И.И. Джанелидзе, 192242,  
г. Санкт-Петербург, Российская  
Федерация

**Ц**ель исследования - провести анализ распространенности и структуры острых химических отравлений, поступающих в многопрофильный стационар за период с 2015-2017 гг. Материалы и методы исследования. Использованные данные получены из сводной учетной документации отделения острых отравлений. При статистической обработке материала использованы числовые характеристики переменных с оценкой их точности и надежности, достоверность различий показателя по непараметрическому критерию Пирсона, корреляционная связь по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена, для установления коэффициента и линии регрессии тренда использовался метод авторегрессии и интегрирования скользящего среднего (ARIMA). Результаты и обсуждение. Установлено, что в общем потоке поступающих в отделение скорой медицинской помощи (СМП) в анализируемый период больные с острыми химическими отравлениями составляли 21,4%. Доказано преобладание среди больных молодого возраста (18-25 лет) острых отравлений наркотиками и психодислептиками (43,5%,  $p \leq 0,05$ ), в возрастных категориях (26-45 лет), (46-59 лет) и (60-74 лет) – острых отравлений алкоголем (56,7%,  $p \leq 0,05$ ; 85,5%,  $p \leq 0,001$ ; 77,1%,  $p \leq 0,001$ ), больных старческого возраста (75-90 лет и старше) – острых отравлений лекарственными средствами (48,1%,  $p \leq 0,05$ ). Выявлена высокая эпидемиологическая значимость по показателю летальности среди больных с острыми отравлениями лекарственными средствами, наркотиками и психодислептиками и алкоголем (0,30%, 0,29%, 0,18%). Заключение. Сведения о распространенности и динамике острых химических отравлений за период с 2015-2017 гг. позволяют определить ориентиры организационных мероприятий в контексте оказания медицинской помощи в условиях многопрофильного стационара.

**Ключевые слова:** скорая медицинская помощь, многопрофильный стационар, острые химические отравления, токсикология, эпидемиология.

**Введение.** Известно, что острые химические отравления по показателям распространенности и летальности имеют высокую эпидемиологическую значимость для населения РФ [1]. Основываясь на данных официальной статистики острые химические отравления занимают четвертое место по распространенности и первое место по числу смертельных исходов в общей структуре заболеваемости населения РФ [2]. В последние годы особую актуальность

по распространенности представляют отравления природными и синтетическими наркотиками отдельно и в комбинации с галлюциногенами-стимуляторами и антидепрессантами [3], отравления неинъекционными веществами с наркотическим действием –  $\gamma$ -оксимасляной кислотой (ГОМК) и ее прекурсорами ( $\gamma$ -бутиролактон и 1,4-бутандиол) [4,5].

Исследование распространенности и структуры острых отравлений среди поступающих

**Синенченко Андрей Георгиевич (Sinchenko Andrej Georgievich)**, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела неотложной психиатрии, наркологии и психореабилитации ГБУ СПб НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, andreysin2013@yandex.ru

**Лодягин Алексей Николаевич (Lodyagin Aleksej Nikolaevich)**, доктор медицинских наук, доцент, руководитель отдела клинической токсикологии ГБУ СПб НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе

**Батоцыренов Баир Васильевич (Batocirenov Bair Vasil'evich)**, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отдела клинической токсикологии ГБУ СПб НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе

**Шикалова Ирина Анатольевна (Shikalova Irina Anatol'evna)**, кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела клинической токсикологии ГБУ СПб НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе

**Антонова Анна Михайловна (Antonova Anna Mihaylovna)**, кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела лучевой диагностики ГБУ СПб НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе

в многопрофильный стационар на сегодняшний день является крайне актуальным.

**Цель исследования:** провести анализ распространенности и структуры острых химических отравлений, поступающих в многопрофильный стационар за период с 2015-2017 гг.

**Материалы и методы исследования.** Исследование включало в себя изучение журналов регистрации химико-токсикологических исследований, госпитализированных в центр лечения острых отравлений многопрофильного стационара за период с 2015-2017 гг., годовых отчетов заведующих токсикологическими отделениями за данный временной период. Основным методом исследования явился клинико-эпидемиологический. Все больные с острыми химическими отравлениями были разделены на группы согласно критериям МКБ-10: I группа (T36-39, T41-50) – отравления лекарственными средствами, медикаментами и биологическими веществами; II группа (T40) – отравления наркотиками и психодислептиками (галлюциногенами); III группа (T51) – токсическое действие алкоголя; IV группа (T52-65) – токсическое действие веществ, преимущественно немедицинского назначения. Статистическая обработка материала производилась с помощью пакета прикладных программ для статистической обработки данных Statistica 10.0 с определением числовых характеристик переменных с оценкой их точности и надежности. С целью определения различий в распределении признака использовался непараметрический критерий Пирсона, для определения силы

и направленности корреляционной связи между признаками применялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для проведения эпидемиологического анализа с установлением коэффициента и линии регрессии тренда использовался метод авторегрессии и интегрирования скользящего среднего (ARIMA).

**Результаты и обсуждение.** В результате проведенного анализа общей заболеваемости среди пациентов, госпитализированных в многопрофильный стационар скорой помощи, в период с 2015 по 2017 гг., был установлен среднегодовой процент нуждающихся в оказании стационарной токсикологической помощи. Из всего входящего потока больных и пострадавших нуждались в госпитализации с острыми химическими отравлениями 21,4% (44787 чел.), в среднем  $20,3 \pm 1,9\%$  (min=19, max=23) ( $14929 \pm 2205,3$  чел. в год) (табл. 1). В ходе оценки динамических показателей заболеваемости выявлена общая тенденция роста частоты острых химических отравлений ( $y=2203x+10522$ ,  $RI=0,99$ ) за анализируемый временной период. В свою очередь встречаемость больных с острыми химическими отравлениями напрямую зависела от увеличения общего потока поступающих в многопрофильный стационар ( $r=1,0$   $p \leq 0,05$ ).

В данном временном периоде больше госпитализировались лица мужского пола ( $78,0 \pm 12,1\%$ ,  $p \leq 0,001$ ) (табл.2).

Среди больных с острыми химическими отравлениями преобладали лица трудоспособного возраста в возрастной категории 26-45 лет –

Таблица 1

**Структура входящего потока госпитализированных в многопрофильный стационар больных и пострадавших за период с 2015 по 2017 гг.**

Показатели	Временной период						Всего	
	2015		2016		2017			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Общее количество больных, поступивших в многопрофильный стационар	65913	100	69353	100	73235	100	208501	100
Количество больных с острыми отравлениями	12673	19,2	15034	21,6	17080	23,3	44787	21,4
Количество больных хирургического, терапевтического профиля	51872	78,7	52939	76,3	54745	74,8	159556	76,7
Количество больных психиатрического профиля	1368	2,1	1380	2,1	1410	1,9	4158	1,9

Таблица 2

**Распределение больных с острыми химическими отравлениями по полу  
за период с 2015-2017 гг.**

Половые отличия	Острые химические отравления (распределение по группам)									
	I (Т36-39, Т41-50)		II (Т40)		III (Т51)		IV (Т52-65)		Итого	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
мужчины	2653	56,8*	9140	82,7**	22571	81,3**	577	43,3*	34941	78,0**
женщины	2011	43,2	1900	17,3	5180	18,7	755	56,7	9846	22,0
ВСЕГО	4664	100	11040	100	27751	100	1332	100	44787	100

Примечание: \* – достоверное отличие  $p \leq 0,05$ , \*\* достоверное отличие  $p \leq 0,001$

Таблица 3

**Распределение больных с острыми химическими отравлениями по возрасту  
за период с 2015-2017 гг.**

Возраст (лет)	Острые химические отравления (распределение по группам)									
	I (Т36-39, Т41-50)		II (Т40)		III (Т51)		IV (Т52-65)		Всего	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
18-25	844	17,4	2109	43,5*	1721	35,4	174	3,7	4848	10,8
26-45	2135	8,1	8623	32,9	14848	56,7*	557	2,3	26163	58,4*
46-59	862	8,5	301	2,9	8603	85,5**	288	3,1	10054	22,4
60-74	520	16,8	7	0,3	2386	77,1**	180	5,8	3093	6,9
75-90 и >	303	48,1*	-	-	193	30,6	133	21,3	629	1,4

Примечание: \* – достоверное отличие  $p \leq 0,05$ , \*\* достоверное отличие  $p \leq 0,001$

58,4% ( $p \leq 0,05$ ), средний возраст составил  $45,4 \pm 0,6$  лет (табл.3).

Как видно из таблицы 3 больные молодого возраста (18-25 лет) поступали с острыми отравлениями наркотиками и психодислептиками (43,5%,  $p \leq 0,05$ ), лица в возрастных категориях (26-45 лет), (46-59 лет) и (60-74 лет) – с острыми отравлениями алкоголем (56,7%,  $p \leq 0,05$ ; 85,5%,

$p \leq 0,001$ ; 77,1%,  $p \leq 0,001$ ); больные старческого возраста (75-90 лет и старше) – чаще госпитализировались с острыми отравлениями лекарственными средствами (48,1%,  $p \leq 0,05$ ).

В ходе изучения структуры острых химических отравлений пациентов токсикологического профиля за анализируемый период было доказано, значительное преобладание больных с от-

равлением алкоголем (61,9%,  $p \leq 0,05$ ), наркотиками и психодислептиками (24,6%,  $p \leq 0,05$ ), реже встречались отравления лекарственными средствами (10,4%) и веществами немедицинского назначения (3,1%).

Необходимо отметить, что в группе больных с острыми отравлениями лекарственными средствами преобладали отравления противосудорожными, седативными, снотворными и противопаркинсоническими препаратами (52,6%,  $p \leq 0,05$ ). При этом, в среднем в 55,4±2,15% случаев данные лекарственные средства использовались больными с суицидальной целью. Причиной суицидального поведения явились невротические и связанные со стрессом расстройства (F40-F48) (70,2%), из которых наиболее часто встречались реакции на острый стресс (F43.20), кратковременные и пролонгированные депрессивные реакции (F43.21) (45,4% и 30,6%, соответственно).

Во II группе больных преобладали отравления неустановленными наркотиками и психодислептиками (61,2%,  $p \leq 0,001$ ) и отравления метадонном (29,2%,  $p \leq 0,05$ ).

В III группе в среднем за изучаемый временной период преобладали отравления этиловым спиртом (99,6%,  $p \leq 0,001$ ) и значительно реже другими спиртами. У пациентов с диагнозом «токсическое действие этанола» в 60,5% случаев превалировало сочетанное употребление этанола и других психоактивных веществ.

Среди пациентов IV группы преобладали отравления угарным газом и продуктами горения (44,1%,  $p \leq 0,001$ ) и отравления кислотами и щелочами (21,6%,  $p \leq 0,05$ ). С данным характером отравления поступали лица как трудоспособного возраста (68,3% случаев), так и, пожилого и старческого возраста в (31,7% случаев).

Показатель летальности среди госпитализированных с острыми химическими отравлениями в период с 2015 по 2017 гг. был выше у больных с острыми отравлениями лекарственными средствами, наркотиками и психодислептиками

и алкоголем (0,30%, 0,29%, 0,18%), что доказывает их высокую эпидемиологическую значимость (табл.4).

**Заключение.** Эпидемиологический анализ распространенности острых экзотоксикозов в структуре входящего потока поступающих в многопрофильный стационар в период с 2015 по 2017 гг. показал высокую распространенность острых отравлений (21,4%) с тенденцией к их увеличению.

В структуре острых химических отравлений значительно преобладали отравления алкоголем (61,9%,  $p \leq 0,001$ ), наркотиками и психодислептиками (24,6%,  $p \leq 0,001$ ), что свидетельствует о необходимости совершенствования мероприятий по первичной профилактике употребления алкоголя и наркотических веществ, особенно среди лиц молодого и трудоспособного возраста.

Высокая эпидемиологическая значимость по показателю летальности наблюдалась среди острых отравлений лекарственными средствами, наркотиками и психодислептиками и алкоголем. Значительная часть острых отравлений лекарственными средствами носило суицидальный характер (55,4±2,15%), что свидетельствует о необходимости продолжения совершенствования первичной профилактики по предотвращению суицидального поведения.

Организация оказания токсикологической помощи должна включать раннее разделение больных на дифференцированные группы (острые отравления лекарственными средствами и веществами немедицинского назначения; острые отравления наркотическими веществами и алкоголем), с учетом необходимости осуществления лечебно-охранительного режима для пациентов с суицидальным поведением, обеспечивать преемственность в ведении больных с психическими расстройствами и аддиктивной патологией, использовать высоко технологические методы диагностики и современные методы лечения.

Таблица 4

**Показатель летальности больных с острыми химическими отравлениями за период с 2015 по 2017 гг. (в процентах)**

№ п/п	Острые химические отравления (распределение по группам)	Число умерших (абс)	Показатель летальности в %
1	I (T36-39, T41-50)	136	0,30
2	II (T40)	130	0,29
3	III (T51)	85	0,18
4	IV (T52-65)	60	0,13

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зобнин Ю.В. Некоторые данные об эпидемиологии острых отравлений в Иркутской области. Сибирский медицинский журнал. 2010; 3(94): 94-98.
2. Остапенко Ю.Н., Литвинов Н.Н., Рожков П.Г., Гасимова З.М., Батурова И.В. Современное состояние эпидемиологии острых химических отравлений и токсикологической помощи населению. Токсикологический вестник. 2010; 3: 34-36.
3. Васильев С.А., Шилов В.В., Барабанов П.А., Сенцов В.Г., Яцинюк Б.Б. Острые отравления синтетическими наркотиками. Общая реаниматология. 2018; 4(1): 23-28.
4. Ливанов Г.А., Лодягин А.Н., Казияхмедов В.А., Починяева Л.М., Глушков С.И., Батоцыренов Б.В., Коваленко А.Л. Клинический случай острого тяжелого отравления 1,4-бутандиолом девочки-подростка. Анестезиология и реаниматология. 2017; 62(4): 297-300.
5. Corkery J.M., Loia B., Claridge H., Corazza O., Elliott S., Schifano F. Gamma hydroxybutyrate (GHB), gamma butyrolactone (GBL) and 1,4-butanediol (1,4-BD; BDO): A literature review with a focus on UK fatalities related to non-medical use. Neurosci Biobehav R. 2015; (53):52-78.

## REFERENCES:

1. Zobnin YU.V. Some data on the epidemiology of acute poisoning in the Irkutsk region. 2010; 3(94): 94-98 (in Russian).
2. Ostapenko YU.N., Litvinov N.N., Rozhkov P.G., Gasimova Z.M., Baturova I.V. The current state of epidemiology of acute chemical poisoning and toxicological assistance to the population. Toksikologicheskij vestnik. 2010; 3: 34-36 (in Russian).
3. Vasil'ev S.A., Shilov V.V., Barabanov P.A., Sencov V.G., Yacinyuk B.B. Acute poisoning with synthetic drugs. Obshchaya reanimatologiya. 2018; 4(1): 23-28 (in Russian).
4. Livanov G.A., Lodyagin A.N., Kaziahmedov V.A., Pochinyaeva L.M., Glushkov S.I., Batocyrenov B.V., Kovalenko A.L. Clinical case of acute severe poisoning with 1,4-butanediol of a teenage girl. Anesteziologiya i reanimatologiya. 2017; 62(4): 297-300 (in Russian).
5. Corkery J.M., Loia B., Claridge H., Corazza O., Elliott S., Schifano F. Gamma hydroxybutyrate (GHB), gamma butyrolactone (GBL) and 1,4-butanediol (1,4-BD; BDO): A literature review with a focus on UK fatalities related to non-medical use. Neurosci Biobehav R. 2015; (53):52-78.

*A.G. Sinenchenko, A.N. Lodyagin, B.V. Batocyrenov, I.A. Shikalova, A.M. Antonova*

### EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS OF PREVALENCE AND STRUCTURE OF ACUTE POISONINGS IN SAINT PETERSBURG (ACCORDING TO A MULTIPROFILE HOSPITAL)

Saint Petersburg I.I. Dzhaneldidze Research Institute of Emergency Medicine, 192242, Saint Petersburg, Russian Federation

The paper presents a clinical and epidemiological analysis of the prevalence of acute poisonings in the structure of the incoming flow of patients in a multidisciplinary hospital for the period from 2015 to 2017. It has been found that in the total flow of patients entering the emergency in the analyzed period patients with acute chemical poisoning accounted for 21.4%. The prevalence of acute poisonings with drugs and psychodislectics (43.5%,  $p \leq 0.05$ ) among young patients (18-25 years), acute poisonings with alcohol in the age categories of 26-45 years (56.7%,  $p \leq 0.05$ ), 46-59 years (85.5%,  $p \leq 0.001$ ) and 60-74 years (77.1%,  $p \leq 0.001$ ), acute poisonings with medicines (48.1%,  $p \leq 0.001$ ) in elderly patients (75-90 years and older) has been established. A high epidemiological significance in mortality among patients with acute poisonings with medicines, drugs and psychodislectics, and alcohol has been revealed (0.30%; 0.29%; 0.18%, respectively). Information on the prevalence and dynamics of acute chemical poisonings for the period from 2015 to 2017 allows determining the guidelines of organizational measures in the context of medical care in a multi-hospital.

**Keywords:** ambulance, multiprofile hospital, acute chemical poisoning, toxicology, epidemiology.

Материал поступил в редакцию 12.03.2019 г.



УДК 546.683 : 615.099.036.11

# ПСИХО- ЭМОЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ОТРАВЛЕНИЕМ ТАЛЛИЕМ

Л.Б. Завалий<sup>1</sup>, С.С. Петриков<sup>1,3</sup>, А.Ю. Симонова<sup>1,2</sup>,  
Т.И. Дикая<sup>1</sup>, М.М. Поцхверия<sup>1,2</sup>, Ю.Н. Остапенко<sup>1,2</sup>,  
М.В. Гайдук<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБУЗ г. Москвы «НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», 107045, г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup>ФГБУ «Научно-практический токсикологический центр ФМБА России», 129090, г. Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127473, г. Москва, Российская Федерация

Проведена оценка психоэмоционального статуса у пациентов с острым отравлением таллием. По результатам проведенного исследования установлено, что уровень тревоги и депрессии связан с концентрацией таллия в крови и моче у пострадавших, наблюдалась тенденция обратной корреляционной связи. Вероятно, причиной развития тревожно-депрессивных состояний стала стрессовая реакция в ответ на острую химическую травму. Показана необходимость оценки психоэмоционального статуса у пациентов с острым отравлением таллием с использованием шкалы «Тревоги и депрессии» (HADS) и проведения консультации психиатра для выбора адекватного метода терапевтической коррекции.

**Ключевые слова:** острое отравление таллием, психоэмоциональный статус.

**Введение.** В НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского проведено самое крупное в РФ и странах СНГ исследование по изучению клинических проявлений у пострадавших с лабораторно подтвержденным острым отравлением таллием. Установлено, что сочетание таких симптомов, как алопеция, боль мышечного характера различной локализации (преимущественно в грудной клетке, в проксимальных отделах ног), периферический парез или тетрапарез, расстройства чувствительности по полиневритическому типу в виде болезненных парестезий и/или гипестезий с дальнейшей трансформацией в мононевропатии, нарушение координации в виде статической и динамической атаксии, постуральный тремор, а также желудочно-кишечные рас-

стройства и нарушения зрения должны вызывать подозрение на интоксикацию соединениями таллия [1]. Существуют определенные закономерности, которые при тщательном сборе анамнеза, клиническом и общесоматическом осмотре позволяют заподозрить отравление таллием и аргументировать проведение химико-токсикологического исследования биосред больных [2]. Изучение клинических проявлений показало, что наряду с жалобами соматического характера многие пациенты отмечали общую слабость, утомляемость, которые сохранялись долгое время и были расценены как астенический синдром [1]. Помимо жалоб астенического характера многие пациенты отмечали отчетливое снижение настроения, тревогу, нарушение сна. Вариабель-

**Завалий Леся Богдановна (Zavaliy Lesya Bogdanovna)**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ГБУЗ г. Москвы «НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», l.zav@bk.ru

**Петриков Сергей Сергеевич (Petrikov Sergey Sergeevich)**, доктор медицинских наук, профессор РАН, директор ГБУЗ г. Москвы «НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», заведующий кафедрой анестезиологии, реаниматологии и неотложной медицины ФГБОУ ВО «Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, PetrikovSS@sklif.mos.ru

**Симонова Анастасия Юрьевна (Simonova Anastasiya Yur'evna)**, кандидат медицинских наук, врач-токсиколог, ведущий научный сотрудник ГБУЗ г. Москвы «НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы»; старший научный сотрудник ФГБУ «Научно-практический токсикологический центр ФМБА России», simonovatoxy@mail.ru

**Дикая Татьяна Ивановна (Dikaya Tat'yana Ivanovna)**, кандидат медицинских наук, врач-психиатр, старший научный сотрудник ГБУЗ г. Москвы «НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», mishleu2012@yandex.ru

**Поцхверия Михаил Михайлович (Pochkveriya Mihail Mihaylovich)**, кандидат медицинских наук, заведующий отделением острых отравлений ГБУЗ г. Москвы «НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы»; врач – токсиколог ФГБУ «Научно-практический токсикологический центр ФМБА России», potskhveriya@mail.ru

**Остапенко Юрий Николаевич (Ostapenko Yuriy Nikolaevich)**, кандидат медицинских наук, врач-токсиколог, ведущий научный сотрудник ГБУЗ г. Москвы «НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», руководитель отдела развития федерального банка по острой химической патологии ФГБУ «Научно-практический токсикологический центр ФМБА России», rtiac@mail.ru

**Гайдук Мария Владимировна (Gayduk Maria Vladimirovna)**, клинический ординатор по направлению неврология ГБУЗ г. Москвы «НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», mariagaiduk1994@gmail.com

ная оценка психоэмоциональных расстройств с синдромальной неоднозначностью и полиморфизмом клинических проявлений, с развитием в ряде случаев развернутых астено-депрессивных и тревожно-депрессивных состояний, обусловила необходимость проведения анализа психического статуса пациентов. В первую очередь необходимо было установить тип доминирующих психоэмоциональных нарушений у исследуемых пациентов, провести разграничение между тревожными реакциями, депрессивными, астеническими и астено-депрессивными расстройствами. Также был нерешенным вопрос о патогенезе психических нарушений у больных с отравлением таллием – интоксикационный фактор сыграл доминирующую роль в их формировании или стрессовая реакция в ответ на химическую травму полностью определяла развитие тревожных и/или депрессивных проявлений.

Следует отметить, что оценка психоэмоциональной сферы пострадавших определенно вызвала сложности, поскольку для правильной интерпретации данных необходима была шкала оценки психического здоровья. Для объективизации нарушений в исследовании был использован один из популярных инструментов диагностики – госпитальная шкала «Тревоги и депрессии» (HADS) [3]. Данный инструмент позволяет не только установить наличие эмоциональных расстройств, но и определить их вид и выраженность.

*Цель* - оценить психоэмоциональный статус у пациентов с острым отравлением таллием.

**Материалы и методы исследования.** В НИИ СП им. Н.В. Склифосовского за медицинской помощью обратились 44 пациента (32 женщины и 12 мужчин в возрасте от 19 до 50 лет) с подозрением на острое отравление таллием. Все пострадавшие были осмотрены токсикологом, неврологом, акушером-гинекологом, офтальмологом. Был предположен пероральный путь приема токсиканта за 3-3,5 месяца до обращения в стационар. Всем пациентам проводили качественное и количественное определение таллия в плазме крови методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой с использованием прибора спектрометра индуктивно-связанной плазмы с масс-спектральным детектированием и количественное определение таллия в моче. У 7-и больных содержание таллия в плазме крови превышало референтные значения (0,006-0,72 мкг/л) в среднем в 24 раза, составляя от 8,3 мкг/л до 26,67 мкг/л, в моче в среднем в 134 раза, составляя от 48,72 мкг/л до 356,1 мкг/л (референтные значения 0,0-1,0 мкг/л). Их состояние было оценено как средней тяжести. Отравление легкой степени

отмечено у 23-х пациентов, которым было рекомендовано амбулаторное лечение по месту жительства. Уровень таллия в крови у этих больных достигал от 0,325 мкг/л до 6,11 мкг/л, а в моче от 2,8 мкг/л до 68,48 мкг/л. У 14 пациентов на момент осмотра клинические признаки отравления таллием отсутствовали. Концентрация таллия у этих больных была в пределах референтных значений.

На первичном приеме невролога пострадавшие предъявляли не только «неврологические» жалобы (боль, двигательные, чувствительные, координаторные расстройства), но и отмечали эмоциональные расстройства, общую слабость и быструю утомляемость, нарушение концентрации внимания, ухудшение памяти. Не всегда жалобы совпадали с истинной клинической картиной. Поэтому дополнительное внимание уделяли оценке эмоциональной сферы. Пострадавшим было предложено анкетирование по госпитальной шкале «Тревоги и депрессии» (HADS) [3], после этого они были проконсультированы психиатром. В исследовании приняли участие 14 пациентов в возрасте 36,5 [33; 42,25] лет, по гендерному признаку – 2 мужчин и 12 женщин. Пострадавшие были сопоставимы по сроку и тяжести отравления. Уровень таллия в крови составил 8,05 [1,89; 13,36] мкг/л, в моче – 57,38 [14,73; 90,23] мкг/л.

**Результаты и обсуждение.** Всех пациентов с отравлением таллием (n=14) беспокоили общая слабость, быстрая утомляемость, выраженное снижение трудоспособности, что указывало на наличие астенической симптоматики. Пострадавшие отмечали, что у них появились трудности в привычной работе с документами, стало сложно сосредоточиться на текущих задачах, нарушилась концентрация внимания, что вызывало у них обоснованное беспокойство, поскольку люди имели высшее образование, являлись квалифицированными юристами, экономистами, бухгалтерами. Изменения в эмоциональной сфере наблюдали у себя 11 пострадавших (78,5%), которые проявлялись в виде снижения настроения (n=8), раздражительности, плаксивости (n=3), эмоциональной лабильности (n=3), нарушении сна (n=4).

С учетом предъявляемых жалоб пациентам было предложено пройти анкетирование для выявления признаков тревоги и депрессии, по результатам которого только у 5-и пациентов (35,7%) не было признаков тревоги и/или депрессии, у остальных – зарегистрированы расстройства различной степени выраженности. Субклиническая тревога выявлена у 2-х пациентов (14,3%), причем она не сопровождалась депрессией. Клиническая выраженная тревога зарегистрирована у 7-и пациентов (50%), из

них только у одного расстройство было изолированным, а у шести – сопровождалось депрессией разной степени выраженности от субклинической ( $n=3$ ) до клинически выраженной ( $n=3$ ). Следует отметить, что у пациентов с клинически выраженной тревогой уровень таллия в крови и моче был достоверно ниже в сравнении с пациентами без эмоциональных расстройств: 1,2 [0,8; 10,3] мкг/л против 17,55 [6,1; 2] мкг/л и 8,3 [6,3; 87] мкг/л против 74 [68,5; 95,6] мкг/л соответственно,  $p < 0,05$  (табл. 1).

Депрессия является более тяжелым психическим расстройством. Расстройство было выявлено у 6-и пациентов (42,9%) разной степени выраженности от субклинической формы ( $n=3$ , 21,4%) до клинически выраженной ( $n=3$ , 21,4%), причем во всех случаях депрессивные расстройства сопровождалась выраженной тревогой – 14 [14; 15,5] баллов по госпитальной шкале «Тревоги и депрессии». Признаков депрессии не было у 8-и пациентов (57,1%), однако у трех из них зарегистрированы тревожные расстройства в субклинической ( $n=2$ ) и клинической ( $n=1$ ) формах (табл. 2).

У пациентов с депрессивными расстройствами в целом уровень таллия в крови и моче был достоверно ниже в сравнении с остальными пациентами – 4,75 [0,8; 11,3] мкг/л против 9,9 [5,6; 19,2] мкг/л и 37,2 [6,3; 97,5] мкг/л против 58,6 [41,1; 79,4] мкг/л соответственно,  $p < 0,05$  (табл. 2). Только в трех случаях депрессия была у пациентов с высокими показателями токсиканта в крови и тяжелой неврологической симптоматикой. У 2-х женщин в возрасте 43 лет и 41 года с уровнем таллия в крови – 13,7 мкг/л, моче – 66 мкг/л и уровнем таллия в крови – 12,3 мкг/л, моче – 108 мкг/л соответственно имели место двигательные, чувствительные и координаторные расстройства, тотальная алопеция. Третья женщина 27 лет с уровнем таллия в крови – 8,3 мкг/л, моче – 128 мкг/л предъявляла жалобы на выраженный распространенный болевой синдром.

Проведен анализ ответов на вопросы (по шкале тревоги и депрессии). При прохождении тестирования в первой части при оценке уровня тревоги пациенты сообщали, что в большей степени испытывают напряжение, страх, неуверенность, беспокойные мысли и не могут легко расслабиться. Во второй части пациенты отмечали за собой медлительность, отсутствие бодрости и радости от того, что раньше приносило удовольствие.

Проведено сопоставление жалоб пациентов с различным уровнем эмоционального фона и данных объективного осмотра. С учетом малой выборки говорить о достоверных различиях в подгруппах не представляется возмож-

ным. Однако отмечено, что жалобы пациентов с отсутствием эмоциональных расстройств по госпитальной шкале «Тревоги и депрессии» соответствовали данным объективного осмотра. Пациенты с признаками клинической тревоги и/или депрессии ( $\geq 11$  баллов) акцентировали внимание врача на своем эмоциональном состоянии, растерянности, снижении концентрации внимания, снижении памяти, а не на развившихся неврологических расстройствах. Пациенты с тревогой и/или депрессией остро реагировали на боль и чувствительные расстройства, однако их не беспокоило наличие двигательных и координаторных нарушений, тремор. Несмотря на отсутствие жалоб, объективно данные симптомы были выявлены врачом при осмотре (табл. 3).

При тщательном сборе анамнеза, жалоб и проведении осмотра в большинстве случаев у пациентов с острым отравлением таллием определялись психоэмоциональные расстройства различной степени выраженности от субклинических форм тревожных и депрессивных проявлений до развернутых астено-депрессивных и тревожно-депрессивных состояний. Определенные сложности возникли при попытке уточнения патогенеза психоэмоциональных нарушений при отравлении таллием. С одной стороны, данные расстройства могли быть проявлением астенического, астено-депрессивного синдрома, возникающего в ответ на острую химическую травму с ее сложным многофакторным патогенезом развития болезни (нейротоксическое, энтеротоксическое, нефротоксическое действие, гемодинамические нарушения, гипоксия, метаболические расстройства). С другой стороны, психические нарушения могли быть психогенно спровоцированными и развились в ответ на стрессовую ситуацию (факт осознания болезни, сомато-неврологические симптомы на фоне отравления). При этом обязательно следует учитывать преморбидный склад личности пострадавших, определяющий особенности реагирования на болезнь/стрессовую ситуацию, а также отягощенность исследуемых больных аффективной психической патологией.

Пострадавшие работали в одном офисном помещении, тесно общались друг с другом, могли способствовать индуцированию развития некоторых симптомов у своих коллег. Вероятно, имела место эгротогения – отрицательное психологическое воздействие одних больных на других, что ведет к появлению новых симптомов невротического характера или усилению уже имеющихся [4].

Установлено, что тревожно-истеро-ипохондрические реакции развивались у больных с

Таблица 1

**Уровень таллия в крови и моче у пациентов с различным уровнем тревоги по госпитальной шкале «Тревоги и депрессии» (HADS)**

Тревога	n	Уровень таллия в крови, мкг/л	Уровень таллия в моче, мкг/л
Отсутствие расстройств (0-7 баллов)	5	17,55 [6,1; 2]	74 [68,5; 95,6]
Субклиническая тревога (8-10 баллов)	2	12,1 и 7,8	48,7 и 34,03
Клиническая тревога ( $\geq 11$ баллов)	7	1,2 [0,8; 10,3]*	8,3 [6,3; 87]*

Примечание: \*достоверное отличие  $p < 0,05$  по сравнению с группой больных без эмоциональных расстройств

Таблица 2

**Уровень таллия в крови и моче у пациентов с различным уровнем депрессии по госпитальной шкале «Тревоги и депрессии» (HADS)**

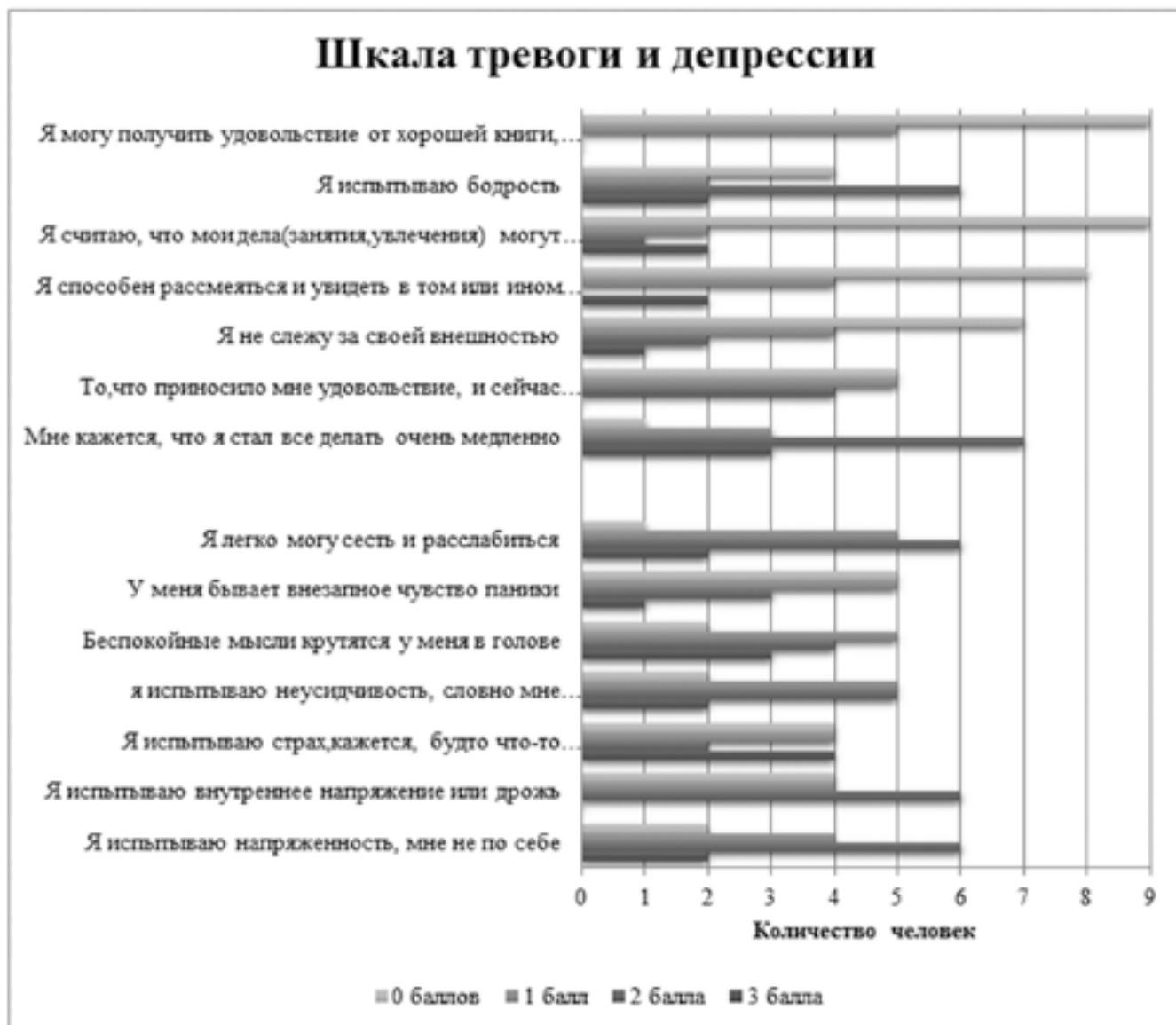
Депрессия	n	Уровень таллия в крови, мкг/л	Уровень таллия в моче, мкг/л
Отсутствие расстройств (0-7 баллов)	8	9,9 [5,6; 19,2]	58,6 [41,1; 79,4]
Субклиническая депрессия (8-10 баллов)	3	8,3 [4,5; 11]	66,03 [37,2; 97]
Клиническая депрессия ( $\geq 11$ баллов)	3	4,75 [0,8; 11,3]*	37,2 [6,3; 97,5]*

Примечание: \*достоверное отличие  $p < 0,05$  по сравнению с группой больных без эмоциональных расстройств

Таблица 3

**Сопоставление жалоб пациентов и данных объективного осмотра у пациентов с различным состоянием эмоциональной сферы по госпитальной шкале «Тревоги и депрессии» (HADS)**

Симптомы	Наличие признаков тревоги и депрессии, n-количество больных					
	нет эмоциональных расстройств (n=5)		признаки тревоги (n=7)		признаки депрессии (n=3)	
	жалобы (n)	объективно (n)	жалобы (n)	объективно (n)	жалобы (n)	объективно (n)
Двигательные нарушения	3	4	1	4	0	1
Чувствительные нарушения	4	3	5	6	2	3
Координаторные нарушения	3	4	1	4	0	2
Тремор	2	2	1	3	0	2
Боль	5	-	7	-	3	-



**Рис. 1.** Частота встречаемости различных симптомов тревоги и/или депрессии разной степени выраженности.

личностной акцентуацией по тревожно-мнительному или истерическому типу и являлись неосознанным проявлением получения внимания и заботы со стороны окружающих.

Отмечено, что у преобладающего большинства больных с отравлением таллием были отчетливые жалобы на значительное изменение эмоционального фона, неврологические расстройства в сочетании с выраженными проявлениями астении. Однако результаты проведенного исследования показали, что в большинстве случаев у пациентов с тревожно-депрессивными расстройствами, выявленными по госпитальной шкале «Тревоги и депрессии», уровень таллия в биосредах организма был статистически ниже, чем у больных без психоэмоциональных нарушений. Данную тенденцию связали с психической

травматизацией. Астенические расстройства отмечались в 100% случаев и варьировали в зависимости от тяжести отравления, преморбидных особенностей личности, коморбидности химической травмы с пограничной психической патологией, возраста пациентов. В данном случае астенический синдром можно рассматривать как патологически измененную реакцию адаптации нервной системы в ответ на химическую травму.

#### **Выводы.**

1. Психоэмоциональные расстройства возникают у 78,5% пострадавших с отравлением таллием. Признаки тревоги выявляются у 64,2%, симптомы депрессии – у 42,9%, астенический синдром – у 100% больных. Развитие депрессивных расстройств всегда сопровождается возникновением выраженной тревоги.

2. Уровень тревоги и депрессии связан с концентрацией таллия в крови и моче, наблюдалась тенденция обратной корреляционной связи. Вероятно, причиной развития тревожно-депрессивных состояний стала стрессовая реакция в ответ на острую химическую травму.

3. В протокол обследования больных с острым отравлением таллием должна входить оценка психоэмоционального статуса с использованием шкалы «Тревоги и депрессии» (HADS) и консультация психиатра для выбора адекватного метода терапевтической коррекции.

### Шкала тревоги и депрессии

Часть I (оценка уровня тревоги)	Часть II (оценка уровня депрессии)
Я испытываю напряжение, мне не по себе	То, что приносило мне большое удовольствие, и сейчас вызывает у меня такое же чувство
3 - все время	0 - определенно, это так
2 - часто	1 - наверное, это так
1 - время от времени, иногда	2 - лишь в очень малой степени это так
0 - совсем не испытываю	3 - это совсем не так
Я испытываю страх, кажется, будто что-то ужасное может вот-вот случиться	Я способен рассмеяться и увидеть в том или ином событии смешное
3 - определенно это так, и страх очень велик	0 - определенно это так
2 - да, это так, но страх не очень велик	1 - наверное, это так
1 - иногда, но это меня не беспокоит	2 - лишь в очень малой степени это так
0 - совсем не испытываю	3 - совсем не способен
Беспокойные мысли крутятся у меня в голове	Я испытываю бодрость
3 - постоянно	3 - совсем не испытываю
2 - большую часть времени	2 - очень редко
1 - время от времени и не так часто	1 - иногда
0 - только иногда	0 - практически все время
Я легко могу сесть и расслабиться	Мне кажется, что я стал все делать очень медленно
0 - определенно это так	3 - практически все время
1 - наверное, это так	2 - часто
2 - лишь изредка это так	1 - иногда
3 - совсем не могу	0 - совсем нет
Я испытываю внутреннее напряжение или дрожь	Я не слежу за своей внешностью
0 - совсем не испытываю	3 - определенно это так
1 - иногда	2 - я не уделяю этому столько времени, сколько нужно
2 - часто	1 - может быть, я стала меньше уделять этому времени
3 - очень часто	0 - я слежу за собой так же, как и раньше
Я испытываю неуверенность, мне постоянно нужно двигаться	Я считаю, что мои дела (занятия, увлечения) могут принести мне чувство удовлетворения
3 - определенно это так	0 - точно так же, как и обычно
2 - наверное, это так	1 - да, но не в той степени, как раньше 2 - значительно меньше, чем обычно
1 - лишь в некоторой степени это так	3 - совсем так не считаю
0 - совсем не испытываю	Я могу получить удовольствие от хорошей книги, радио- или телепрограммы
У меня бывает внезапное чувство паники	0 - часто
3 - очень часто	1 - иногда
2 - довольно часто	2 - редко
1 - не так уж часто	3 - очень редко
0 - совсем не бывает	

Оценка результатов проводится по каждой части отдельно, где

0-7 баллов – норма;

8-10 баллов – субклинически выраженная тревога и/или депрессия;

11 и более баллов – клинически выраженная тревога и/или депрессия.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Завалий Л.Б., Петриков С.С., Симонова А.Ю., Пощверия М.М., Остапенко Ю.Н., Гаджиева М.Г. Характеристика неврологических расстройств у пациентов с острым отравлением таллием. *Consilium Medicum*. 2019; 21 (2): 24–30.
2. Завалий Л.Б., Симонова А.Ю., Пощверия М.М., Остапенко Ю.Н., Гаджиева М.Г., Петриков С.С. Диагностика и лечение отравления таллием. *Токсикологический вестник*. 2018; 5(152): 9–16.
3. Zigmund A.S., Snaith R.P. The Hospital Anxiety and Depression Scale. *Acta Psychiatr Scand*. 1983; 67: 361–370.
4. Блейхер В.М., Крук И.В. Толковый словарь психиатрических терминов. Москва; 1995.
5. Отравление соединениями таллия (клиника, диагностика, лечение): метод. рек. Москва; 2010.
6. Osorio-Rico L., Santamaria A., Galván-Arzate S. Thallium Toxicity: General Issues, Neurological Symptoms, and Neurotoxic Mechanisms. *Adv Neurobiol*. 2017; 18: 345–353.
7. Rodriguez-Mercado J.J., Altamirano-Lozano M.A. Genetic toxicology of thallium: A review. *Drug Chem. Toxicol*. 2013; 36(3): 369–383.
8. Определение химических элементов в биологических средах и препаратах методами атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой: метод. указания. Москва: Минздрав России; 2003.
9. Шейман Б.С., Проданчук Н.Г., Волошина Н.А., Макаров А.А., Урин А.А., Иц В.В. Токсикокинетика таллия и параметры эндотоксемии при острой таллиевой интоксикации. *Медицина неотложных состояний*. 2014; 4 (59): 52–57.
10. Лужников Е. А., Суходолова Г. Н. Острые отравления у взрослых и детей: руководство по диагностике и лечению. Москва: Эксмо; 2009.
11. Остапенко Ю.Н., Ливанов Г.А., Гольдфарб Ю.С. Отравления соединениями таллия (клиника, диагностика, лечение): метод. рекомендации №44/10. Москва; 2010.
12. Ливанов Г.А., Батоцыренов Б.В., Остапенко Ю.Н., Шестова Г.В., Рутковский Г.В., Малыгин А.Ю. Особенности ранней диагностики и лечение острых отравлений соединениями таллия. *Общая реаниматология*. 2013; (3): 35–40.
13. Воробьев Н.В. Клинико-патогенетические особенности острых отравлений таллием: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб.; 2003.
14. Tsai Y.T., Huang C.C., Kuo H.C., Wang H.M., Shen W.S., Shih T.S. et al. Central nervous system effects in acute thallium poisoning. *Neurotoxicology*. 2006; 27 (2): 291 – 295.
15. Хажиханова Е.В. Особенности поражения нервной системы при остром пероральном отравлении солями таллия: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб.; 2006.
16. Маткевич В.А., Лужников Е.А., Белова М.В., Евдокимова Н.В., Сырмаятникова Е.Д., Курилкин Ю.А. Роль кишечной транслокации в генезе эндотоксемии при острых отравлениях и детоксикационный эффект кишечного лаважа. *Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь»*. 2015; (4): 16–21.

## REFERENCES:

1. Zavaliy L.B., Petrikov S.S., Simonova A.Yu., Pochkveriya M.M., Ostapenko Yu.N., Gadzhieva M.G. Neurological disorders in patients with acute thallium poisoning. *Consilium Medicum*. 2019; 21 (2): 24–30. (in Russian).
2. Zavaliy L.B., Simonova A.Yu., Pochkveriya M.M., Ostapenko Yu.N., Gadzhieva M.G., Petrikov S.S. Diagnosis and treatment of thallium poisoning. *Toxicological Review*. 2018; №5 (152): 9–16. (in Russian).
3. Zigmund A.S., Snaith R.P. The Hospital Anxiety and Depression Scale. *Acta Psychiatr Scand*. 1983;67:361–370.
4. Blejher V.M., Kruk I.V. Explanatory Dictionary of Psychiatric Terms. Moscow, 1995. (in Russian).
5. Poisoning with thallium compounds (clinic, diagnosis, treatment): methodical recommendation. Moscow; 2010 (in Russian).
6. Osorio-Rico L., Santamaria A., Galván-Arzate S. Thallium Toxicity: General Issues, Neurological Symptoms, and Neurotoxic Mechanisms. *Adv Neurobiol*. 2017; 18: 345–353.
7. Rodriguez-Mercado J.J., Altamirano-Lozano M.A. Genetic toxicology of thallium: A review. *Drug Chem Toxicol*. 2013; 36(3): 369–383.
8. Determination of chemical elements in biological media and preparations by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry: methodical recommendation. Moscow: RF Ministry of Health; 2003 (in Russian).
9. Sheiman B.S., Prodanchuk N.G., Voloshina N.A., Makarov A.A., Urin A.A., Itts V.V. Toxicokinetics of thallium and parameters of endotoxemia in acute thallium intoxication. *Emergency medicine*. 2014; 4 (59): 52–57 (in Russian).
10. Luzhnikov E.A., Suhodolova G.N. Acute poisoning in adults and children: a guide to diagnosis and treatment. Moscow; 2009 (in Russian).
11. Ostapenko Yu.N., Livanov G.A., Goldfarb Yu.S. Thallium compounds poisoning (clinic, diagnosis, treatment). Moscow; 2010 (in Russian).
12. Livanov G.A., Batocyrenov B.V., Ostapenko Yu.N., Shestova G.V., Rutkovskij G.V., Malygin A.Yu. Features of early diagnosis and treatment of acute poisoning with thallium compounds. *General Resuscitation*. 2013; (3): 35–40 (in Russian).
13. Vorobyov N.V. Clinico-pathogenetic features of acute poisoning with thallium. *Dr. med. sci. diss.; Saint Petersburg*, 2003 (in Russian).
14. Tsai Y.T., Huang C.C., Kuo H.C., Wang H.M., Shen W.S., Shih T.S. et al. Central nervous system effects in acute thallium poisoning. *Neurotoxicology*. 2006; 27 (2): 291 – 295.
15. Khazhikhanova E.V. Features of the defeat of the nervous system in acute oral poisoning with thallium salts. *Dr. med. sci. diss.; Saint Petersburg*; 2006 (in Russian).
16. Matkevich V.A., Luzhnikov E.A., Belova M.V., Evdokimova N.V., Syromyatnikova E.D., Kurilkin Yu.A. The role of intestinal translocation in the origin of endotoxemia in acute poisoning and detoxification effect of intestinal lavage. *N.V. Sklifosovsky Journal «Emergency medicine»*. 2015; (4): 16–21. (in Russian).

L.B. Zavaliy<sup>1</sup>, S.S. Petrikov<sup>1,3</sup>, A.Yu. Simonova<sup>1,2</sup>, T.I. Dikaya<sup>1</sup>, M.M. Pochkveriya<sup>1,2</sup>, Yu.N. Ostapenko<sup>1,2</sup>, M.V. Gaiduk<sup>1</sup>

## PSYCHO-EMOTIONAL STATUS IN PATIENTS WITH ACUTE THALLIUM POISONING

<sup>1</sup>N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine, 129090, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>Research and Applied Toxicology Center of Federal Medical and Biological Agency, 129090, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup>A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, 127473, Moscow, Russian Federation

The evaluation of psycho-emotional status in patients with acute thallium poisoning has been carried out. According to the study performed the level of anxiety and depression is associated with the concentration of thallium in the blood and urine of the victims, there was a tendency of inverse correlation. Probably the cause of anxiety and depression was the stress response as a result of acute chemical trauma. The necessity of evaluation of psycho-emotional status in patients with acute thallium poisoning using the scale of «Anxiety and depression» (HADS) and consultation of a psychiatrist to choose an adequate method of therapeutic correction has been shown.

**Keywords:** acute thallium poisoning, psycho-emotional status.

Материал поступил в редакцию 23.04.2019 г.



УДК 546.55/59 :546.81: 615.916

# НОВЫЕ ДАННЫЕ К ВОПРОСУ ОБ ИНФОРМАТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ НА КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ДЛЯ ОЦЕНКИ СРАВНИТЕЛЬНОЙ И КОМБИНИРОВАННОЙ ТОКСИЧНОСТИ МЕТАЛЛОКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Т.В. Бушueva<sup>1</sup>,  
И.А. Минигалиева<sup>1</sup>,  
В.Г. Панов<sup>2</sup>,  
А.Н. Кузнецова<sup>1</sup>,  
А.С. Наумова<sup>1</sup>,  
М.П. Сутункова<sup>1</sup>,  
В.Я. Шур<sup>3</sup>, Е.В. Шишкина<sup>3</sup>,  
В.Б. Гурвич<sup>1</sup>,  
Б.А. Кацнельсон<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Екатеринбургский  
медицинский научный центр  
профилактики и охраны здоровья  
рабочих промпредприятий»  
Роспотребнадзора, 620014,  
г. Екатеринбург, Российская  
Федерация

<sup>2</sup>Институт промышленной экологии  
УрО РАН, 620990, г. Екатеринбург,  
Российская Федерация

<sup>3</sup>Институт естествознания  
и математики Уральского  
федерального университета,  
620000, г. Екатеринбург, Российская  
Федерация

**И**золированное и комбинированное повреждающее действие наночастиц (НЧ) PbO и CuO оценены на стабильной линии человеческих фибробластов с помощью трёх различных показателей цитотоксичности, основанных на снижении (а) дегидрогеназной активности клеток (МТТ-тест); (б) содержания АТФ (тест на жизнеспособность культуры по интенсивности люминесценции); (в) интегральной оценки клеточной пролиферации, распластывания и прикрепления к поверхности по электрическому импедансу («нормализованный клеточный индекс»). По всем этим показателям продемонстрирована для обоих видов метало-оксидных наночастиц чёткая зависимость повреждения клетки от их концентрации, адекватно описываемая гиперболической функцией, в то время как при одном и том же уровне воздействия количественные характеристики цитотоксичности PbO-НЧ в сравнении с CuO-НЧ схожи. Последнее ранее наблюдалось и в субхроническом эксперименте на крысах. Математически описанная с помощью методологии построения поверхности отклика комбинированная цитотоксичность наночастиц *in vitro* найдена неоднозначной, что также согласуется с выводами из эксперимента на крысах с теми же наночастицами.

**Ключевые слова:** оксид свинца, оксид меди, наночастицы, токсичность *in vitro*.

**Бушueva Татьяна Викторовна (Bushueva Tatiana Victorovna)**, кандидат медицинских наук, заведующая Научно-производственным отделом Лабораторно-диагностических технологий ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, bushueva@ymrc.ru

**Минигалиева Ильзира Амировна (Minigalieva Ilzira Amirovna)**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией промышленной токсикологии ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, ilzira-minigalieva@yandex.ru

**Панов Владимир Григорьевич (Panov Vladimir Grigorievich)**, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории математического моделирования в экологии и медицине Института промышленной экологии УрО РАН, vpanov@esko.uran.ru

**Кузнецова Алиса Николаевна (Kuznetsova Alisa Nikolaevna)**, лаборант-исследователь НПО Лабораторно-диагностических технологий ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, alisa@ymrc.ru

**Наумова Анна Сергеевна (Naumova Anna Sergeevna)**, лаборант-исследователь НПО Лабораторно-диагностических технологий ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, naumova@ymrc.ru

**Сутункова Марина Петровна (Sutunkova Marina Petrovna)**, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией токсикологии среды обитания ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, sutunkova@ymrc.ru

**Шур Владимир Яковлевич (Shur Vladimir Yakovlevich)**, доктор физико-математических наук, профессор, директор Центра коллективного пользования «Современные нанотехнологии» ФГАОУ ВПО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», vladimir.shur@urfu.ru

**Шишкина Екатерина Владимировна (Shishkina Ekaterina Vladimirovna)**, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Центра коллективного пользования «Современные нанотехнологии» ФГАОУ ВПО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», ekaterina.shishkina@labfer.usu.ru

**Гурвич Владимир Борисович (Gurvich Vladimir Borisovich)**, доктор медицинских наук, директор ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, gurvich@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.** Большинство опубликованных нанотоксикологических исследований проведено *in vitro* (главным образом, на культурах стабильных клеточных линий). Однако наша группа была, насколько нам известно, первой использовавшей подобные экспериментальные модели для оценки сравнительной и комбинированной токсичности наночастиц и поставившей вопрос о том, соответствует ли такая оценка получаемой в экспериментах *in vivo* [1,2]. Актуальность вопроса определяется тем, что многие металлургические, электросварочные и лазерные технологические процессы связаны с образованием аэрозолей конденсации, значительная фракция которых представлена наночастицами оксидов разных металлов (MeO-NЧ).

В частности, изученная в наших первых экспериментах комбинация  $Mn_3O_4$ -НЧ и NiO-НЧ, достаточно часто входит в состав сварочных дымов. В этих экспериментах мы показали, что повреждение клеток в различных культурах находится в количественной зависимости от концентрации MeO-NЧ, причём  $Mn_3O_4$ -НЧ найдены более цитотоксичными, чем NiO-НЧ, как это ранее было найдено по ряду неспецифических признаков токсичности *in vivo*. Принципиально совпали и оценки типологии комбинированной токсичности, которая для клеточных культур, как и во многих исследованиях на крысах (см. например, обобщения у [3,4] и др.) оказалась неоднозначной в зависимости от ряда факторов. Вместе с тем, предсказать на основании тестирования *in vitro* конкретный тип комбинированного действия той же самой пары MeO-NЧ *in vivo* оказалось невозможным. Поэтому мы высказали мнение, что хотя такие эксперименты и могут иметь прогностическое значение для ускоренной оценки сравнительной токсичности наночастиц этого класса, различающихся по составу, однако для характеристики их комбинированной токсичности исследования на системно-организменном уровне по-прежнему приоритетны.

Для подтверждения этого заключения, пока освоенного лишь на одной серии экспериментов,

мы выбрали другую пару MeO-NЧ, которая типична для загрязнения воздуха в медеплавильном производстве, а именно CuO-НЧ и PbO-НЧ [4].

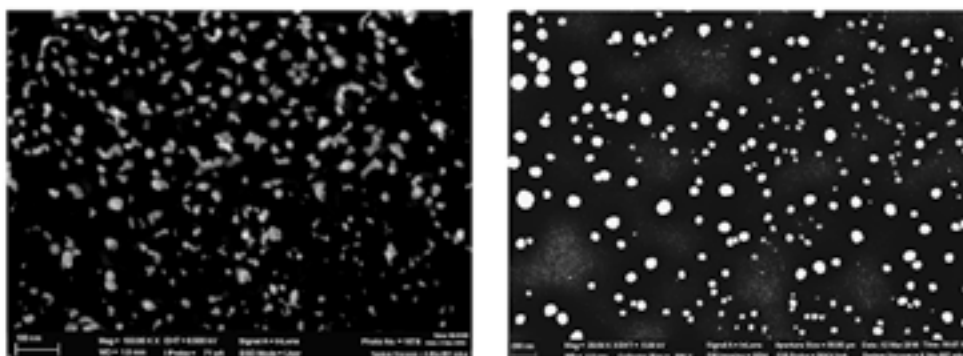
В специальной литературе можно найти немало данных для токсикологической характеристики CuO – НЧ, полученной на разных экспериментальных моделях ([5-17] и ряд других), в то время как токсикологическое изучение действия PbO-НЧ началось значительно позднее [18-22]. В целом, эти исследования показывают, что наряду с типичным фактически для всех пока изученных MeO-NЧ широким спектром неспецифических эффектов, каждый из них вызывает *in vivo* некоторые важные эффекты, качественно специфичные для соответствующего металла в любой химической форме [4]. Так при субхронической интоксикации, развивающейся у крыс при повторных внутривентральных введениях PbO-НЧ наблюдались типичные нарушения порфиринового синтеза и анемия [18], а при аналогичном воздействии CuO-НЧ - синдром, напоминающий болезнь Вильсона у человека [9]. Что же касается их комбинированной токсичности, нам известно только собственное исследование *in vivo* [18] и не найдено ни одной работы *in vitro*.

К сожалению, мы пока не нашли адекватный показатель действия на клеточную культуру, который соответствовал бы вышеназванным эффектам действия PbO-НЧ или CuO-НЧ на системно-организменном уровне. Тем не менее, заслуживает внимания и оценка их сравнительной и комбинированной неспецифической цитотоксичности для одной из тех клеток, которые наиболее часто используются в нанотоксикологических экспериментах *in vitro*, а именно для фибробласта.

#### Материалы и методы исследования.

Приготовление и характеристика наночастиц.

Водные суспензии обеих MeO-NЧ были получены с помощью лазерной абляции мишеней соответствующего металла 99.9% чистоты под слоем де-ионизированной воды с последующим частичным упариванием при 50 °С в течение 5 часов для достижения концентрации 0,5 мг/мл.



**Рис. 1.** Суспензии CuO-НЧ (слева) и PbO-НЧ (справа). Сканирующая электронная микроскопия при увеличении \*103 860 и \*29 640, соответственно.

При сканирующей электронной микроскопии (Cross Beam Workstation Auriga производства Carl Zeiss, Germany) было показано, что частицы обеих суспензий имели сферическую форму (рис. 1) при среднем  $\pm\sigma$  диаметре  $24,5\pm 4,8$  мкм для CuO-НЧ и  $47,0\pm 16,0$  мкм для PbO-НЧ. Спектроскопия с помощью Рамановского конфокального микроскопа Alpha 300 AR (Germany) подтвердила, что эти наночастицы действительно состояли из CuO и PbO.

Отсутствие заметных изменений дзета-потенциала, а также очертания и положения пика плазмонного резонанса при наблюдении в течение 2 недель свидетельствовали о достаточной стабильности обеих нано-суспензий, которые в наших экспериментах приводились в контакт с клетками не позднее, чем через несколько дней после приготовления.

*Культура клеток, параметры воздействия на них и оценка его эффектов.*

Эксперименты проведены на стабильной линии ФЛЭЧ-104 Коллекции клеточных культур ООО «БиолоТ» (Санкт-Петербург, Россия), которая представляет собой монослойную культуру фибробластоподобных клеток, полученную из лёгких 8-недельного эмбриона человека. Клеточную культуру поддерживали при  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  в среде DMEM с L-глутамином, с содержанием глюкозы 1 г/л, добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 0,5% гентамицина.

Клетки высевали в 96-луночный планшет (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) для тестирования дегидрогеназной активности или содержания АТФ и в 8-луночный планшет (ACEA Biosciences, San Diego, California, USA) для определения клеточного индекса по 70 000 клеток на лунку в объеме 100 мкл питательной среды для первых двух тестов или 300 мкл – для третьего и инкубировали в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  при  $37^\circ\text{C}$  в течение 24 часов до добавления MeO-НЧ, инкубация с которыми проводилась в тех же условиях в течение следующих 24 часов. Конечная концентрация наночастиц в среде инкубации параллельно экспонированных проб составляла 50 – 75 – 100 – 200 мкг/мл. Все варианты экспозиции осуществлялись в четырёх повторностях.

Для количественной оценки цитотоксического эффекта этой инкубации использовались три показателя: содержание АТФ в культуре по люминесцентному сигналу, дегидрогеназная активность в МТТ-тесте и изменение нормализованного клеточного индекса.

Биолюминесцентная АТФ-метрия проводилась с использованием реагентов CellTiter-Glo (Promega Corporation, USA). Рабочий раствор получали путем восстановления лиофилизированного CellTiter-Glo Substrate в CellTiter-Glo Buffer и подогревали на водяной бане до комнатной тем-

пературы. Этот раствор добавляли по 100 мкл в каждую лунку. Далее в течение 2 минут вращательными движениями перемещали планшет в одной плоскости, чтобы вызвать лизис клеток. После инкубации при комнатной температуре в течение 10 минут измеряли свечение клеток с использованием люминометра LM-01T с программным обеспечением Kilia (Immunotech, Beckman Coulter Company, Praha, Czech Republic). Результаты измерения представлялись в единицах относительной интенсивности люминесценции relative luminescence units (RLU).

Для определения дегидрогеназной активности с помощью МТТ-теста, использовали жёлтый тетразолиевый краситель 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), который в живых клетках восстанавливается до пурпурного формазана. В качестве растворяющего компонента использовали диметилсульфоксид (ДМСО). В каждую лунку с клетками добавляли по 20 мкл красителя в концентрации 5 мг/мл и инкубировали в течение 2 часов. После этого из планшетов полностью удаляли среду и в каждую лунку добавляли по 100 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Epoch™ (BioTek, Winooski, Vermont, USA) при длине волны 490 нм.

Оценку клеточного индекса осуществляли на клеточном анализаторе RTCA iCELLigence™ ACEA Biosciences, San Diego, California, U.S.A) в реальном времени. Метод основан на том, что в присутствии клеток, активно прикрепившихся к сенсорной поверхности электрода, погружённого в индивидуальную лунку, и действующих как изолятор увеличивается электрический импеданс. Повреждение клеток, снижающее их способность к пролиферации и к прикреплению, снижает импеданс.

Результаты выражаются в виде нормализованного клеточного индекса (NCI) в соответствии с рекомендациями производителя (Calculation principles of RTCA Software, ACEA Biosciences, USA).

*Математическое моделирование полученных данных.*

Зависимость цитотоксического эффекта от концентрации наночастиц в культуре моделировалась тремя математическими функциями, которые представлялись возможными при первоначальной визуальной оценке расположения точек в осях концентрация (X) – показатель эффекта (Y), а именно: линейной  $Y = b_0 + b_1X$ , лог-линейной  $Y = \exp(b_0 + b_1X)$  и гиперболической  $Y = \frac{b_0 + b_1X}{b_2 + b_3X}$

Коэффициенты  $b_i$ , подобранные по экспериментальным данным по критерию минимизации

ции суммы квадратов отклонений, оказались статистически значимыми для всех трёх показателей в любой из моделей. Однако, судя по тому же критерию, наиболее близкую аппроксимацию зависимости эффектов от концентрации обоих MeO-НЧ давала гиперболическая модель, на которую мы и опираемся при обсуждении результатов исследования.

Как и в большинстве наших ранее проведенных исследований по анализу закономерностей двухфакторной комбинированной токсичности ([1,4,24] и др.), мы и в этой работе использовали метод построения поверхности отклика (the Response Surface Methodology - RSM).

Уравнение регрессии, описывающее функцию отклика  $Y(x_1, x_2)$ , в нашем случае имеет вид:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad (1),$$

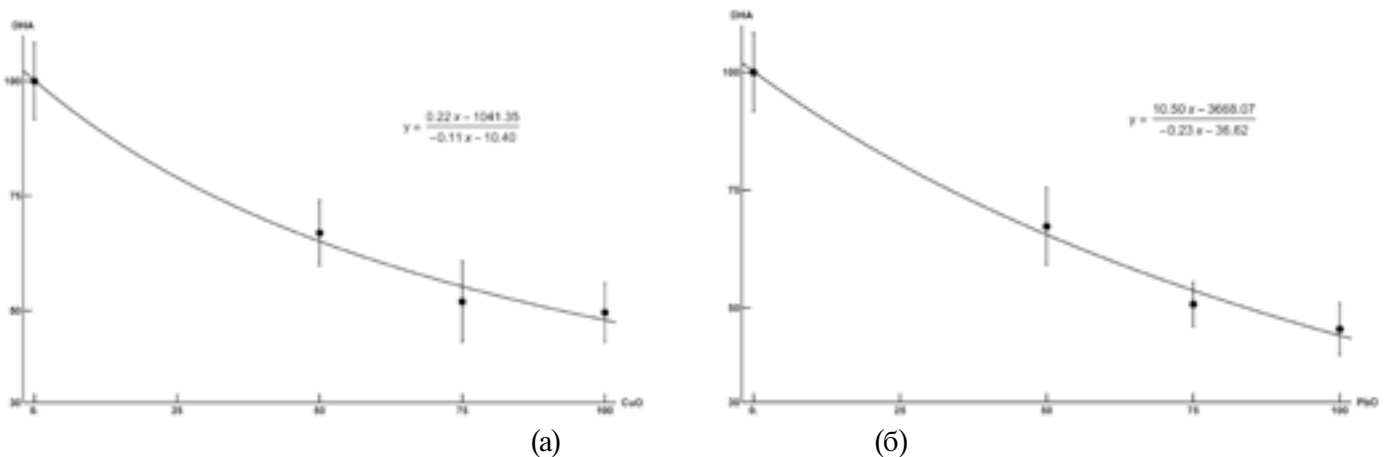
где  $Y$  есть тот или иной показатель цитотоксичности,  $x_1$  и  $x_2$  - дозы CuO-НЧ и PbO-НЧ, соответственно. Постоянный член уравнения  $b_0$ , коэффициенты регрессии для каждой независимой переменной  $b_1$ ,  $b_2$  и коэффициент регрессии для их комбинации  $b_{12}$  подбирались по экспериментальным данным на основе того же критерия наименьшей суммы квадратов отклонений.

Принимается, что комбинированное действие двух факторов является однонаправленным, если ответ  $Y$  в обеих однофакторных функциях  $Y(x_1, 0)$  и  $Y(0, x_2)$  возрастает или снижается с увеличением  $x_1$  или  $x_2$ , и противоположно направленным - если  $Y$  в одной функции при этом возрастает, а в другой - снижается. Теория метода RSM показывает, что даже на основе эксперимента, в котором использовались только по два уровня каждого воздействия, уравнение (1) позволяет прогнозировать зна-

чение  $Y$  для любой комбинации  $x_1$  и  $x_2$  в пределах этих уровней.

**Результаты и их обсуждение.** Наличие количественной зависимости между силой предположительно вредного внешнего воздействия на живую систему (например, дозой или концентрацией токсиканта) и величиной измеряемого показателя состояния этой системы является теоретически важным аргументом в пользу того, что сдвиг этого показателя действительно является эффектом указанного воздействия. Вместе с тем, анализ типа зависимости доза (концентрация)-эффект имеет и практическое значение как в сфере задач оценки рисков для здоровья и управления ими, так и в экспериментальной токсикологии для выбора диапазона доз, в котором имеет смысл проведение тех или иных исследований. В частности, для экспериментального моделирования комбинированной токсичности двух MeO-НЧ на клеточной культуре представляется наиболее целесообразным использовать такие концентрации каждого из них, которые при изолированном воздействии явно эффективны по используемому показателю, причём даже относительно небольшое увеличение концентрации заметно усиливает сдвиг этого показателя.

Именно поэтому первым этапом нашего исследования было экспериментальное и математическое моделирование однофакторных зависимостей доза-эффект по каждому из трёх использовавшихся показателей цитотоксичности. Как уже было указано выше, наиболее близкой аппроксимацией экспериментально найденной зависимости во всех случаях оказалась гиперболическая функция. Это подтверждает ту хорошо известную общую закономерность, что хотя зависимость токсического эффекта от дозы и может казаться квази-линейной, но только в ограничен-



**Рис. 2.** Зависимость цитотоксического эффекта, оцененного по снижению дегидрогеназной активности (DNA) в МТТ-тесте и выраженного в %% контрольного показателя (на оси ординат) от действующей концентрации (а) CuO-НЧ или (б) PbO-НЧ (на оси абсцисс в мг/мл). Кривые - геометрическая интерпретация приведенных уравнений, точки - средние арифметические значения показателя эффекта с 95%-ными доверительными интервалами.

ном диапазоне доз. В этом отношении, результаты настоящего исследования в принципе совпадают с результатами предыдущего, проведенного на клеточных культурах с NiO-НЧ и Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-НЧ [1]. Для сокращения объема статьи мы иллюстрируем рассматриваемую аппроксимацию примерами, относящимися только к оценке цитотоксичности по снижению дегидрогеназной активности культуры клеток, измеренной в МТТ-тесте как для CuO-НЧ, так и для PbO-НЧ (рис. 2).

При одном и том же уровне экспозиции цитотоксичность наночастиц PbO и CuO была количественно сопоставимой подобно тому, как это было ранее показано в отношении ряда неспецифических показателей действия тех же наночастиц *in vivo* [18].

Отметим, что не только тип рассматриваемой зависимости, но и эффективный дозовый диапазон оказался фактически одним и тем же для трёх разных показателей эффекта. Это косвенно подтверждает, что несмотря на разные ближайшие биохимические и биофизические механизмы изменения этих показателей, все три отражают степень цитотоксичности. Вместе с тем, выявленный в этом диапазоне тип комбинированной цитотоксичности оказался отчасти зависящим от того, по какому показателю она оценивалась.

Действительно, как видно из изоболограмм, полученных с помощью методики построения поверхности отклика (рис. 3), этот тип фактически один и тот же при оценке цитотоксического эффекта с помощью МТТ - теста и нормализованного клеточного индекса (НКИ), в обоих случаях свидетельствуя об аддитивности однонаправленного действия с некоторой тенденцией к субаддитивности. Однако, судя по показателю снижения люминесцентной активности, заключение о типе комбинированного действия изученных MeO-НЧ далеко не так однозначно. В этом случае субаддитивный тип однонаправленной комбинированной токсичности проявился только при низших дозах обоих агентов, в то время как при более высоких дозах хотя бы одного из них мы видим разные варианты противонаправленного действия.

Необходимо подчеркнуть, что как в целом ряде экспериментов *in vivo* ( см. обобщения [4, 25]), так и в предыдущем исследовании на клеточных культурах [1] мы обосновали в качестве одной из парадигм теории комбинированной токсичности именно неоднозначность её типологии для одной и той же пары токсикантов в зависимости, прежде всего, от оцениваемого эффекта, а также от его уровня и от соотношения действующих доз. Примеры такой неоднозначности представлены на рис. 4 изоболограммами, которые были построены при анализе данных экспериментов *in vivo* как раз с комбинацией [CuO-НЧ +

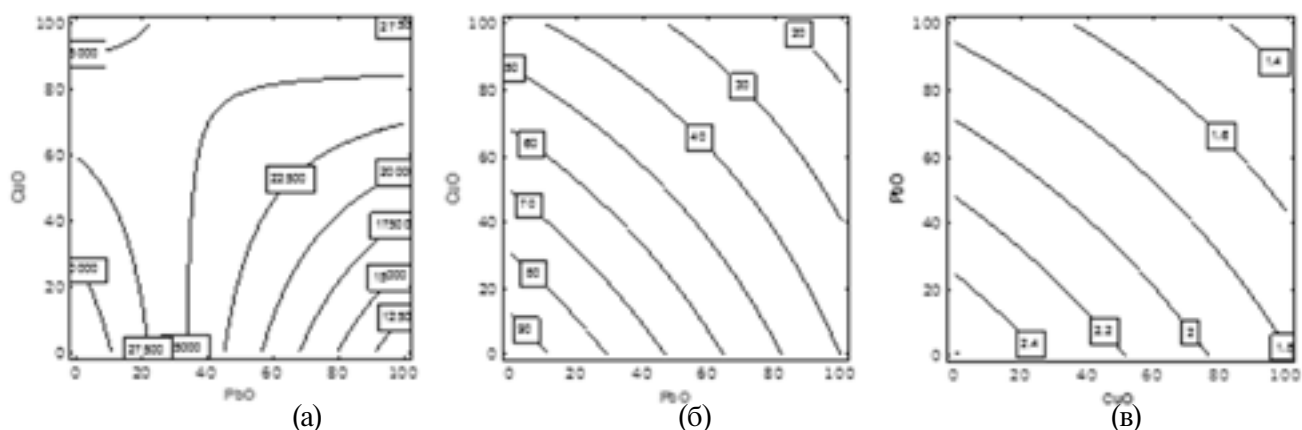
PbO-НЧ], но в опубликованной по его результатам статье [19] не приводились.

Из множества таких изоболограмм мы привели на рисунке 4 примеры только тех, которые по форме и наклону изобол схожи с типологией комбинированной цитотоксичности, выявленной на клеточной культуре (рис. 3). В частности, здесь видны: аддитивность однонаправленного действия на число тромбоцитов; некоторая тенденция к субаддитивности однонаправленного действия на общую двигательную активность крысы (судя по числу квадратов, пересеченных за 3 мин); и характерная зависимость типа комбинированной токсичности, оцененной по повышению концентрации мочевой кислоты в крови, от уровня эффекта и соотношения доз. В последнем случае она варьирует от антагонизма (в виде субаддитивности однонаправленного или даже противонаправленности действия) до синергизма (супераддитивности).

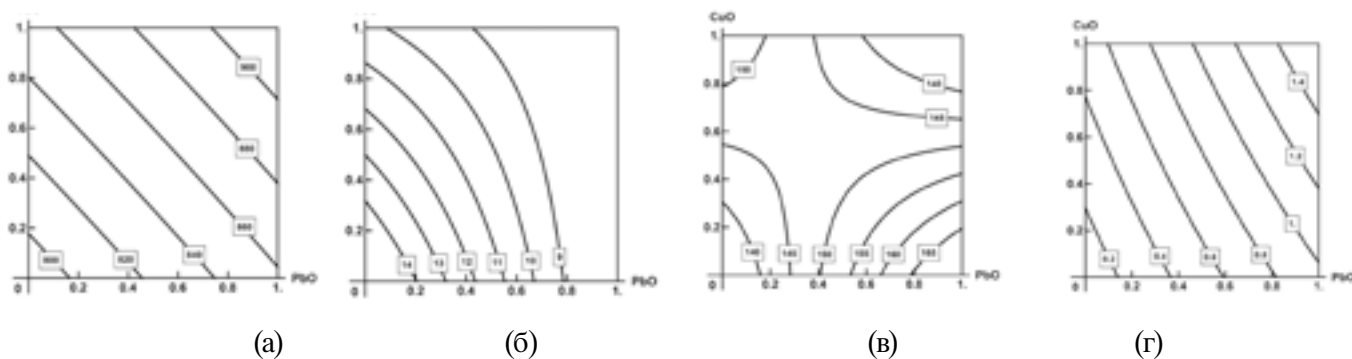
Мы привели также одну из изоболограмм, построенных по показателям цитологической характеристики жидкости, полученной при бронхоальвеолярном лаваже через 24 часа после однократного интратрахеального введения тех же наносuspензий отдельно или в комбинации (рис. 4г). Конкретно речь идёт о показателе отношения числа нейтрофильных лейкоцитов к числу альвеолярных макрофагов (НЛ/АМ), которое, как давно показано (начиная с [26]) хорошо коррелирует с цитотоксичностью различных частиц для макрофага *in vitro*. Поэтому интересно, что и по этому показателю комбинированное действие CuO-НЧ и PbO-НЧ *in vivo* оказалось явно аддитивным.

Таким образом, вариабельность типологии комбинированного цитотоксического действия CuO-НЧ и PbO-НЧ, выявленная *in vitro*, в целом схожа с её вариабельностью *in vivo* на системно-организменном уровне. То же самое было показано нами и при сопоставлении аналогичных экспериментальных моделей комбинированной токсичности NiO-НЧ и Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-НЧ [1]. Мы видим в этом новое подтверждение того, что неоднозначность типа комбинированной токсичности действительно может рассматриваться как парадигма общей токсикологической теории.

В том частном случае, который рассматривается в настоящей статье, можно высказать также гипотезу, что совпадение типа комбинированного действия *in vitro* по эффектам МТТ - теста и нормализованного клеточного индекса (НКИ) при отличии этого типа по эффекту снижения интенсивности люминесцентного сигнала не случайны, а связаны со схожестью или несхожестью механизмов развития этих эффектов. Действительно, потеря дегидрогеназной активности, выявляемая в МТТ -тесте, отража-



**Рис. 3.** Изоболограммы, характеризующие комбинированное цитотоксическое действие наночастиц CuO-НЧ и PbO-НЧ на культуру фибробластов, оцениваемое по снижению: (а) интенсивности люминесцентного сигнала, (б) дегидрогеназной активности в МТТ-тесте и (в) нормализованного клеточного индекса. Числа на осях – концентрации соответствующих MeO-НЧ в мкг/мл, числа на изоболах – уровни эффекта, которым соответствует данная изобола.



**Рис. 4.** Изоболограммы, характеризующие комбинированное токсическое действие наночастиц CuO-НЧ и PbO-НЧ на крысу, оценивавшееся после повторных внутрибрюшинных инъекций по (а) увеличению числа тромбоцитов в крови (б) уменьшению числа квадратов, пересеченных за 3 мин; (в) увеличению концентрации мочевой кислоты в крови, а после однократной интратрахеальной инстилляцией - (г) по увеличению отношения числа нейтрофильных лейкоцитов к числу альвеолярных макрофагов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа. Числа на осях – дозы соответствующих MeO-НЧ в долях от максимальной использованной, числа на изоболах – уровни эффекта, которым соответствует данная изобола.

ет гибель клеток, но эта же самая гибель ведёт и к отлипанию клеток с поверхности электрода и тем самым к снижению показателя НКИ. В отличие от этого, интенсивность люминесценции клеточной культуры отражает содержание АТФ в жизнеспособных клетках, которое зависит от процессов окислительного фосфорилирования. Последние же могут угнетаться в разной степени, а возможно, и усиливаться в части клеток культуры под активирующим влиянием продуктов разрушения других.

#### **Заключение.**

1. Вредные эффекты изолированного действия наночастиц PbO и CuO на культуру фибробласто-подобных клеток, количественно оцененные по трём разным показателям цитотоксичности, находятся в однотипной зависимости от концентрации этих MeO-НЧ, причем в практи-

чески реальном диапазоне концентраций эта зависимость может быть ближе всего аппроксимирована гиперболической функцией.

2. При одном и том же уровне экспозиции цитотоксичность наночастиц PbO и CuO была количественно сопоставимой подобно тому, как это было ранее показано в отношении ряда неспецифических показателей действия тех же наночастиц *in vivo*.

3. Типы комбинированной цитотоксичности изученных металло-оксидных наночастиц варьируют в зависимости от использованного показателя эффекта, а для одного из них – также от дозового соотношения, и в этом отношении мы также видим подтверждение выводов, ранее обоснованных в экспериментах с другой парой металло-оксидных наночастиц, а именно NiO-НЧ и Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-НЧ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES:

1. Minigaliev, I.A., Bushueva, T.V., Froehlich, E., Meindl C., Panov V.G., Varaksin A.N., Shur V. Ya., Shishkina E.V., Gurvich V.B., Katsnelson B.A. Are in vivo and in vitro assessments of comparative and combined toxicity of the same metallic nanoparticles compatible, or contradictory, or both? A juxtaposition of data obtained in respective experiments with NiO and Mn3O4 nanoparticles. *Food Chem. Toxicol.* 2017; 109: 393-4
2. Минигалиева И.А., Бушуева Т. В., Панов В. Г., Вараксин А.Н., Шур В.Я., Шишкина Е.В., Гурвич В.Б., Кацнельсон Б.А. Некоторые аспекты оценки токсичности металло- оксидных наночастиц на клеточных культурах (на примере NiO и Mn3O4). *Токсикологический вестник.* 2015: 35-43.
3. Minigaliev I.A., Bushueva, T.V., Panov V.G., Shur V. Ya., Shishkina E.V., Gurvich V.B., Katsnelson B.A. Some aspects of metal oxide nanoparticles toxicity assessment on cell cultures as exemplified by NiO and Mn3O4. *Toxicological Review.* 2015: 35-43 (in Russian).
4. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Minigaliev I.A., Gurvich V.B., Shur V.Y., et al. Experimental research into metallic and metal oxide nanoparticle toxicity in vivo. In: B. Yan, H. Zhou, J. Gardea-Torresdey (Eds.). "Bioactivity of Engineered Nanoparticles", Springer; 2017; Chapter 11: 259-319.
5. Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J., Möller, L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.* 2008; 21: 1726-1732.
6. Studer, A.M., Limbach, L.K., van Duc, L., Krumeich, F., Athanassiou, E.K., Gerber, L.C., Moch, H., Stark, W.J. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: Comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicol.* 2010; Lett. 1: 169-174.
7. Cronholm, P., Karlsson, H.L., Hedberg, J., Lowe, T.A., Winnberg, L., Elihn, K., Wallinder, I.O., Möller, L. Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: A comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions. *Small.* 2013; 8: 970-982.
8. Cuillel, M., Chevallet, M., Charbonnier, P., Fauquant, C., Pignot-Paintrand, I., Arnaud, J., Cassio, D., Michaud-Soret, I., Mintz, E. Interference of CuO nanoparticles with metal homeostasis in hepatocytes under sub-toxic conditions. *Nanoscale.* 2014; 16: 1707-1715.
9. Privalova L.I., Katsnelson B.A., Loginova N.V., Gurvich V.B., Shur V.Y., Valamina I.E., et al. Subchronic Toxicity of Copper Oxide Nanoparticles and Its Attenuation with the Help of a Combination of Bioprotectors. *Int J Mol Sci.* 2014; 15: 12379-12406.
10. Bondarenko, O., Ivask, A., Käkinen, A., Kahru A. Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: Kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action. *Environ. Pollut.* 2012; 169: 81-89.
11. Pang, C., Selck, H., Misra, S.K., Berhanu, D., Dybowska, A., Valsami-Jones, E., Forbes, V.E. Effects of sediment-associated copper to the deposit-feeding snail, *Potamopyrgus antipodarum*: A comparison of Cu added in aqueous form or as nano- and micro-CuO particles. *Aquat. Toxicol.* 2012; 15: 114-122.
12. Magaye, R., Zhao, J., Bowman, L., Ding, M. Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles. *Exp. Ther. Med.* 2012; 4: 551-561.
13. Liao, M., Liu, H. Gene expression profiling of nephrotoxicity from copper nanoparticles in rats after repeated oral administration. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2012; 34: 67-80.
14. Xu, J., Li, Z., Xu, P., Xiao, L., Yang, Z. Nanosized copper oxide induces apoptosis through oxidative stress in podocytes. *Arch. Toxicol.* 2013; 87: 1067-1073.
15. Sizova, E., Miroshnikov, S., Polyakova, V., Gluschenko, N., Skalny, A. Copper nanoparticles as modulators of apoptosis and structural changes in tissues. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* 2012; 3: 97-104.
16. Gomes, T., Araújo, O., Pereira, R., Almeida, A.C., Cravo, A., Bebianno, M.J. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 2013; 84: 51-59.
17. Alarifi, S., Ali, D., Verma, A., Alakhtani, S., Ali, B.A. Cytotoxicity and genotoxicity of copper oxide nanoparticles in human skin keratinocytes cells. *Int. J. Toxicol.* 2013; 32: 296-307.
18. Minigaliev, I.A., Katsnelson, B.A., Panov, V.G., Privalova, L.I., Varaksin, A.N., Gurvich, V.B., Sutunkova, M.P., Shur, V.Ya., Shishkina, E.V., Valamina, I.E., Zubarev, I.V., Makeyev, O.H., Meshtcheryakova, E.Y., Klinova, S.V. In vivo toxicity of copper oxide, lead oxide and zinc oxide nanoparticles acting in different combinations and its attenuation with a complex of innocuous bio-protectors. *Toxicology.* 2017; 380: 72-93.
19. Amiri, A., Mohammadi, M., Shabani, M. Synthesis and Toxicity Evaluation of Lead Oxide (PbO) Nanoparticles in Rats. *Electronic J Biol.* 2016; 12(2): 110-114.
20. Dumková, J., Smutná, T., Vrlíková, L., Le Coustumer, P., Večeřa, Z., Dočekal, B., Mikuška, P., Čapka, L., Fictum, P., Hampl, A., Buchtová M. Sub-chronic inhalation of lead oxide nanoparticles revealed their broad distribution and tissue-specific subcellular localization in target organs. *Part Fibre Toxicol.* 2017; 14(1):
21. Miri, A., Sarani, M., Hashemzadeh, A., Mardani Z., Darroudi, M., 2018. Biosynthesis and cytotoxic activity of lead oxide nanoparticles. *Green Chemistry Letters and Reports.* 2018; 11(4): 567-572.
22. Ng, D., Chu, Y., Tan, S., Wang, S., Lin, Y., Chu, C., Soo, Y., Song, Y., Chen, P. In vivo evidence of intestinal lead dissolution from lead dioxide (PbO2) nanoparticles and resulting bioaccumulation and toxicity in medaka fish. *Environ. Sci.: Nano.* 2019; 6: 580-5
23. Cimpan, M.R., Mordal, T., Schölermann J., Allouni Z.E., Pliquett U., Cimpan, E. An impedance-based high-throughput method for evaluating the cytotoxicity of nanoparticles. *Journal of Physics: Conf. Ser.* 2013; 429, 012026.
24. Varaksin A.N., Katsnelson B.A., Panov V.G., Privalova L.I., Kireyeva E.P., Valamina I.E., et al. Some considerations concerning the theory of combined toxicity: a case study of subchronic experimental intoxication with cadmium and lead. *Food Chem Toxicol.* 2014; 64: 144-156.
25. 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 summary of results obtained by the Ekaterinburg research team (Russia). *Toxicol Rep.* 2017; 4C: 194-201.
26. Privalova, L.I., Katsnelson, B.A., Osipenko, A.B., Yushkov, B.H., Babushkina, L.G. Response of a phagocyte cell system to products of macrophage breakdown as a probable mechanism of alveolar phagocytosis adaptation to deposition of particles of different cytotoxicity. *Environ. Health Perspect.* 1980; 35: 205-218.

*T.V. Bushueva<sup>1</sup>, I.A. Minigaliev<sup>1</sup>, V.G. Panov<sup>2</sup>, A.N. Kuznetsova<sup>1</sup>, A.S. Naumova<sup>1</sup>, M.P. Sutunkova<sup>1</sup>, V.Ya. Shur<sup>3</sup>, E.V. Shishkina<sup>3</sup>, V.B. Gurvich<sup>1</sup>, B.A. Katsnelson<sup>1</sup>*

### NEW DATA ON THE QUESTION OF INFORMATIVENESS OF EXPERIMENTS ON CELL CULTURES FOR ASSESSMENT OF COMPARATIVE AND COMBINED TOXICITY OF METAL OXIDE NANOPARTICLES

<sup>1</sup>Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, 620014, Ekaterinburg, Russian Federation

<sup>2</sup>Institute of Industrial Ecology, Urals Branch of the Russian Academy of Sciences, 620990, Ekaterinburg, Russian Federation

<sup>3</sup>School of Natural Sciences and Mathematics, Ural Federal University, 620000, Ekaterinburg, Russian Federation

Isolated and combined damaging effects of PbO and CuO nanoparticles have been estimated on an established line of human fibroblasts using three different cytotoxicity indices based on reduction in: (a) the cellular dehydrogenase activity (MTT Assay), (b) the ATP content (Luminescent Cell Viability Assay), (c) the cellular proliferation, viability, spreading, and attachment to substrate evaluated integrally by continuous impedance-based measurement of the Normalized Cell Index. For all these indicators a clear dependence of cell damage on concentration of metal oxide nanoparticles has been demonstrated for both types of metal oxide nanoparticles, which is adequately described by the hyperbolic function, while at the same level of exposure the quantitative characteristics of cytotoxicity of PbO-NPs in comparison with CuO-NPs are similar. The latter was previously observed in the subchronic experiment on rats. The combined in vitro cytotoxicity of nanoparticles has been also described mathematically using the response surface construction methodology and found to be ambiguous, which is also consistent with the conclusions from the experiment on rats with the same nanoparticles.

**Keywords:** lead oxide, copper oxide, nanoparticles, in vitro toxicity.

Переработанный материал поступил в редакцию 28.06.2019 г.

УДК: 543.544:543.51:615.91

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОМАРКЕРОВ ЭКСПОЗИЦИИ И ЭФФЕКТА 1,4-ДИХЛОРГЕКСА- ФТОРБУТЕНА-2

А.И. Уколов, М.Д. Шачнева,  
А.С. Радиллов

ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663 Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация

С использованием газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ-МС и ВЭЖХ-МС, соответственно) установлен метаболизм не изученного ранее хладона RL 316 (1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутена-2, далее – ДХГФ). В образцах крови и мочи крыс обнаружены и идентифицированы два летучих метаболита, являющихся продуктами восстановительного замещения атомов хлора: 1-хлор-1,1,2,3,3,4,4,4-октафторбутан и 1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2. Всего в результате исследований выявлено и идентифицировано 15 различных ранее неизвестных метаболитов. Установлено, что основным направлением метаболизма ДХГФ является образование аддуктов с глутатионом, и их дальнейшая деградация до цистеиновых и ацетилцистеиновых аддуктов. Также, среди продуктов распада аддуктов выявлены 4-метилсульфил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2, 4-метил-сульфинил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2 и 1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлор-бутантион-2 который оказался наиболее чувствительным биомаркером. Показано, что при поступлении ДХГФ в организм не происходит его биоактивация с образованием лабильных тиокетенов которые являются основной причиной мутагенного и канцерогенного действия некоторых галогенуглеводородов.

Метаболическое профилирование плазмы крови позволило выявить потенциальные метаболические маркеры воздействия ДХГФ в концентрации 18.8 мг/м<sup>3</sup>: отношение концентраций гулоновой кислоты и мио-инозитолфосфата. Сочетание определения химических маркеров – неметаболизированной формы ДХГФ и 1,4-дихлор-1,1,3,4,4-бутантиона-2 с определением обнаруженных метаболических маркеров позволит более точно оценивать полученную дозу или уровень воздействия ДХГФ на организм людей контактирующих с ним.

**Ключевые слова:** 1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2, хладон RL316, кровь, моча, хромато-масс-спектрометрия.

**Введение.** Хладон RL316 – (E)-1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутена-2 (далее – ДХГФ) по химической структуре относится к классу смешанных непредельных галогенпроизводных углеводородов [1]. Структурная формула приведена на рисунке 1.

ДХГФ предназначен для использования в качестве растворителя, теплоносителя, реагента при производстве перфторбутанадиена. В настоящее время известно, что смешанные галогенпроизводные непредельных углеводородов являются высокотоксичными и опасными соединениями. Однако, токсичность ДХГФ не изучена. У ДХГФ известен еще один изомер, 2,3-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбут-2-ен, который попал в сферу внимания токсикологов как примесь в галотане (фторотане) [2]. Описание токсического действия 2,3-ДХГФ включает: поражение респираторно-

го тракта (раздражение легких, пневмония, отек легких), изменения в почечных канальцах, дегенеративные изменения нейронов, хроматоз, гиперкалемия и гипонатремия, образование геморрагических зон в селезенке [3].

Тем не менее, имеющиеся в литературе сведения о токсичности 2,3-ДХГФ трудно отнести к 1,4-ДХГФ, так как многие симптомы, в частности дистрофические изменения в легких, печени и мозге [4,5] обусловлены образованием трифторуксусной кислоты в ходе метаболизма [6,7], а образование трифторуксусной кислоты из 1,4-ДХГФ невозможно, так как в структуре отсутствует трифторметильная группа.

Токсическое действие фторуглеводородов значительно отличается в зависимости от структуры [7], так, фторэтилен не оказывают вообще токсического действия, в то время как перфторизобу-

Уколов Антон Игоревич (Ukolov Anton Igorevich), кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, AntonUkolov@gmail.com  
Шачнева Мария Дмитриевна (Shachneva Maria Dmitrievna), младший научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, shachneva\_mariya@mail.ru  
Радиллов Андрей Станиславович (Radilov Andrey Stanislavovich), доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом токсикологии, и.о. директора ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, radilov@rihophe.ru

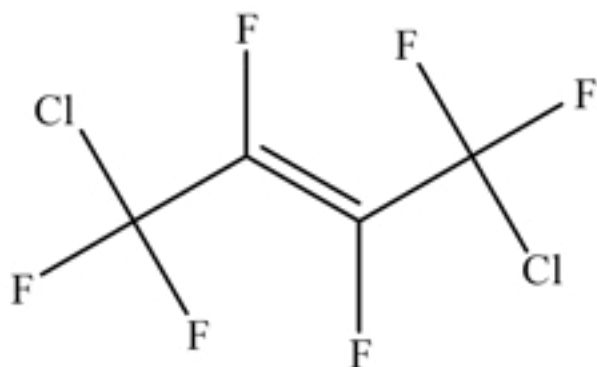


Рис.1. Структурная формула ДХГФ

тилен – крайне токсичен. Замена атомов фтора на хлор значительно повышает токсичность.

Определение метаболитов ДХГФ плазме крови и моче лабораторных крыс, подвергавшихся ингаляционному воздействию ДХГФ в концентрации 600 мг/м<sup>3</sup>, выполняли с использованием сочетания газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Несмотря на то, что метаболизм галогенированных углеводородов изучен достаточно хорошо, в литературе содержится крайне мало информации о токсичности высших галогеналкенов с числом атомов углерода более трех. При этом пути их биоактивации могут значительно отличаться в зависимости от структуры и, соответственно, могут отличаться токсическое действие, канцерогенность, мутагенность и пр. Так, например, при переходе от гексахлоробутадиена к перфторпропилену, токсические концентрации (в опытах *in vitro*) падают на два порядка [8].

*Цель настоящего исследования* – исследование путей химических превращений ДХГФ в организме при ингаляционном поступлении, разработка хроматомасс-спектрометрической методики определения ДХГФ в моче и крови, оценка возможностей методики при мониторинге острого и подострого воздействия ДХГФ. Нецелевое метаболическое профилирование плазмы крови и мочи [9] было проведено с целью выявления новых метаболических маркеров ингаляционного воздействия ДХГФ, а также получения новых сведений о возможном механизме его токсического действия.

**Материалы и методы исследования.** Для оценки токсических свойств ДХГФ был проведен эксперимент с однократным и многократным экспонированием крыс-самцов ДХГФ. Однократное экспонирование ДХГФ было проведено в течение 4-х часов при концентрации 600 мг/м<sup>3</sup>. При многократном ингаляционном эксперименте крысы подвергались воздействию ДХГФ в течение 30 суток по 4 часа в день, кроме выходных дней, в концентрациях: 84.4 ± 6.52 мг/м<sup>3</sup> (1 группа подопыт-

ных крыс), 18.8 ± 0.6 мг/м<sup>3</sup> (2 группа крыс) и 4.7 ± 0.2 мг/м<sup>3</sup> (3 группа крыс), 4 группа крыс служила контролем.

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180-230 г. Условия содержания экспериментальных животных соответствовали «Правила лабораторной практики в Российской Федерации (GLP)» (утв. Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 г. 199н). Для получения плазмы кровь, отобранную после декапитации крыс в пробирки с ЭДТА-К3, центрифугировали 15 мин при 4000 g.

Определение ДХГФ и его летучих метаболитов выполняли методом газовой хроматомасс-спектрометрии с твердофазной микроэкстракцией с использованием газового хроматографа Agilent 7890 с масс-спектрометром Agilent 5975. Газовый хроматограф оборудован высокополярной капиллярной колонкой SP2560, 75 м x 180 мкм x 0.14 мкм. Концентрирование летучих органических соединений из равновесной паровой фазы проводили на микроволокно карбоксен/полидиметилсилоксан/дивинилбензол с толщиной пленки неподвижной фазы 50 мкм («серое»). Перед началом анализа проб волокно регенерировали в токе азота при 200°C в течение 30 минут.

Образцы плазмы крови каждой исследуемой группы крыс объединяли таким образом, чтобы полученный объем пулированного образца составлял 3 мл, и помещали в вials для парового анализа объемом 10 мл с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками. Перед отбором паровой фазы проводили термостатирование проб в течение 10 минут при температуре 40 °С. Затем в паровую фазу над пробой вводили микроволокно и проводили концентрирование летучих компонентов паровой фазы в течение 10 минут. По окончании периода сорбции волокно вводили в инжектор хроматографа и проводили термодесорбцию сконцентрированных соединений в хроматографическую колонку в течение 1 минуты. Температурный режим термостата колонки: 2 минуты при температуре 40°C, затем подъем до 200°C со скоростью 5 °С/мин до 280 °С. Ионизация электронами с энергией 70 эВ. Температура источника ионов: 280°C. Температура квадруполя: 150°C. Температура интерфейса: 280°C. Масс-селективное детектирование в режиме мониторинга избранных ионов (SIM): m/z 147, 197 для ДХГФ и 63, 78 – 2-хлорпропан, 151 и 178 метаболиты L-I и L-II.

Масс-спектр ионизации электронами ДХГФ: 69 (10), 81 (3), 85 (8) [CF<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup>, 87 (3), 93 (37), 109 (8), 111 (3), 112 (9), 131 (16), 147 (85) [M-CF<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup>, 149 (31), 162 (6), 163 (25), 165 (16), 167 (3), 197 (100) [M-Cl]<sup>+</sup>, 198 (5), 199 (37), 232 (7) [M]<sup>+</sup>, 234 (5) [M+2]<sup>+</sup>, 236 (0.7) [M+4]<sup>+</sup>

Определение нелетучих метаболитов ДХГФ



методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения, нецелевое метаболическое профилирование, и определение жирных кислот крови выполняли в соответствии с опубликованными ранее процедурами [10-12].

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью прикладного пакета программ «STATISTICA» (версия 6.0, StatSoft Inc, 2001) и Microsoft Excel 2013 с дополнением Multibase 2015. В случае трех и более выборок различия по анализируемым показателям оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим попарным межгрупповым сравнением величин по критерию Фишера. Для всех видов анализа статистически значимыми по сравнению с контролем считали значения с  $p < 0.05$ .

### Результаты и обсуждение.

#### *Количественное определение ДХГФ в плазме крови и моче*

Для количественного определения ДХГФ в крови и моче лабораторных животных была разработана хромато-масс-спектрометрическая методика. Определение проводили с помощью твердофазной микроэкстракции из паровой фазы над образцом и разделением компонентов на газовом хроматографе.

Твердофазная микроэкстракция из паровой фазы для извлечения ДХГФ позволяет использовать в качестве образцов кровь различного качества: цельную, плазму крови, сыворотку, размороженную и гемолизованную, что особенно актуально при определении причин отравления *postmortem*. Методика количественного анализа разработана при использовании плазмы крови и мочи в качестве матрицы.

Пределы обнаружения ДХГФ в плазме крови и моче составили 5 нг/мл (5 ppb). Количественное определение выполняли методом относительной градуировки с использованием 2-хлорпропана в качестве внутреннего стандарта. Такой предел обнаружения позволяет проводить определение ДХГФ при однократном воздействии 600 мг/м<sup>3</sup>, а также при многократных в диапазоне концентраций от 18.8 до 84.4 мг/м<sup>3</sup>.

Учитывая высокую летучесть и низкую температуру кипения (62 °С), наиболее очевидным способом подготовки проб для определения ДХГФ методом ГХ-МС, является твердофазная микроэкстракция из паровой фазы. В ходе разработки методики нами были установлены оптимальные условия экстракции и хроматографического анализа.

Твердофазная микроэкстракция из паровой фазы для извлечения ДХГФ позволяет использовать в качестве образцов кровь различного качества: цельную, плазму крови, сыворотку, разморожен-

ную и гемолизованную, что особенно актуально при определении причин отравления *post mortem*. Методика количественного анализа разработана при использовании плазмы крови и мочи в качестве матрицы. В качестве внутреннего стандарта был использован 2-хлорпропан. Выбор обусловлен его высокой летучестью и близкими параметрами хроматографического удерживания. Температура кипения составляет 35.7 °С.

Выбор оптимального типа микроволокна проводили с использованием растворов ДХГФ и 2-хлорпропана в концентрации 30 нг/мл каждый. Установлено, что наилучшее извлечение ДХГФ из паровой фазы достигается при использовании волокна с тройным покрытием из дивинилбензола, карбоксена и полидиметилсилоксана. Наибольшая степень извлечения достигается при температуре экстракции 35 °С и продолжительности экстракции 5 минут. Стоит отметить, что извлечение внутреннего стандарта в данных условиях коррелировало с извлечением ДХГФ.

В результате, для химико-аналитического исследования образцов крови и мочи крыс, подвергавшихся острому ингаляционному воздействию ДХГФ, была разработана методика определения целевого соединения методом газовой хромато-масс-спектрометрии с твердофазной микроэкстракцией из равновесного пара. Достигнутые пределы обнаружения составили 5 нг/мл в крови и моче. Такой предел обнаружения позволяет проводить мониторинг ингаляционного воздействия ДХГФ на уровне 18.8 мг/м<sup>3</sup>.

#### *Идентификация метаболитов ДХГФ в плазме крови и моче*

В ходе выполнения работы нами были исследованы известные пути метаболизма фторхлоралкенов. К основным процессам их превращений в организме относятся: т.н. «восстановительный путь», гидролиз и образование конъюгатов с глутатионом [13]. Известный окислительный путь метаболизма в случае ДХГФ невозможен вследствие отсутствия связей С-Н в молекуле. Восстановительный путь детоксикации и биоактивации начинается с замещения одного или двух галогенов атомами водорода в цитохромах [14]. Образующиеся галогеналкены могут в дальнейшем активироваться за счет образования аддуктов с глутатионом в печени (рис. 6) [15]. Глутатионовые аддукты через несколько последовательных реакций образуют цистеиновые и ацетилцистеиновые аддукты в почках [16]. Многочисленные исследования указывают на то, что нефротоксичность и нефроканцерогенность галогеналкенов вызвана в основном за счет образования крайне реакционноспособных интермедиатов – тиокетенов, при воздействии β-лиаз на цистеиновые аддукты [17]. Тиокетены – крайне электрофильные соединения, они легко вступают в реакции нуклеофильного присоеди-

нения. В частности, способны образовывать ковалентные аддукты с протеинами и азотистыми основаниями ДНК, чем и обусловлена их мутагенность и канцерогенность [17].

Образование лабильных тиолов, предшественников тиокетенов, было доказано при введении в реакцию *in vitro* специальных ловушек-нуклеофилов [18].

Образование тиокетенов возможно при наличии галогена в  $\alpha$ -положении к тиольной группе, структура же ДХГФ не обладает такой особенностью, поэтому образование тиокетенов из цистеиновых аддуктов ДХГФ без расщепления достаточно прочной связи С-С невозможно (рис. 2). Однако образование предшественников тиокетенов было нами показано, так нам удалось выявить стабильный тиокетон XIII в моче и плазме крови.

Идентификацию метаболитов проводили тремя различными способами: ГХ-МС паровой фазы, ГХ-МС экстрактов и ВЭЖХ-МС высокого разрешения. В паровой фазе обнаружено два метаболита (рис. 3).

Масс-спектры метаболитов с использованием доступных баз данных идентифицировать не удалось. Предположительные структуры приписаны на основании известных закономерностей фрагментации и интерпретации масс-спектров электронного удара. Метаболит с массой 198 а.е.м., изображенный на рисунке 3 справа (L-II), является продуктом восстановительного замещения атома хлора в  $\text{CF}_2\text{Cl}$  группе. Путь образования метаболита слева (L-I) предположить не удалось, однако, судя по структуре, он является продуктом восстановительного присоединения двух атомов фтора.

В таблице приведены приблизительные концентрации метаболитов L-I и L-II в образцах крови

и мочи крыс после экспонирования концентрацией  $600 \text{ мг/м}^3$ . Приблизительные концентрации метаболитов определены методом абсолютной градуировки с использованием ДХГФ в качестве внешнего стандарта.

В ходе эксперимента были отобраны образцы крови сразу после окончания экспонирования (0 ч) и через 24 часа, мочу собирали в течение 24 часов после экспонирования. Стоит отметить, что потери летучих соединений из мочи предотвращены не были, так как мочу собирали в открытые емкости.

Оценка возможных путей метаболизма ДХГФ на основании известных закономерностей позволила нам предсказать структуры возможных метаболитов. Нами были выявлены продукты гидролиза ДХГФ: V и XIV (рис. 4).

Образование аддуктов ДХГФ с глутатионом может проходить по различным путям. Нами выявлено четыре различных направления (рис. 5): восстановительное присоединение глутатиона ( $\text{GS-C}_4\text{HF}_6\text{Cl}_2$ ), винильное или аллильное замещение фтора ( $\text{GS-C}_4\text{F}_5\text{Cl}_2$ , два возможных изомера), нуклеофильное замещение фтора или хлора в восстановленной форме ДХГФ ( $\text{GS-C}_4\text{H}_2\text{F}_5\text{Cl}_2$  или  $\text{GS-C}_4\text{H}_2\text{F}_6\text{Cl}$ , соответственно).

Интересно отметить, что в ДХГФ не происходит очевидного замещения атома хлора под действием GS- в группе  $\text{CF}_2\text{Cl}$ , то есть в невосстановленной форме не происходит аллильное замещение хлора. Необычным является тот факт, что продукт аллильного замещения фтора выявлен в моче крыс (X). Хотя хлор должен легче вступать в реакции аллильного нуклеофильного замещения, некоторые исследования [19,20] показывают, что фтор также является подходящей уходящей группой в реакциях замещения глутатионом под дей-

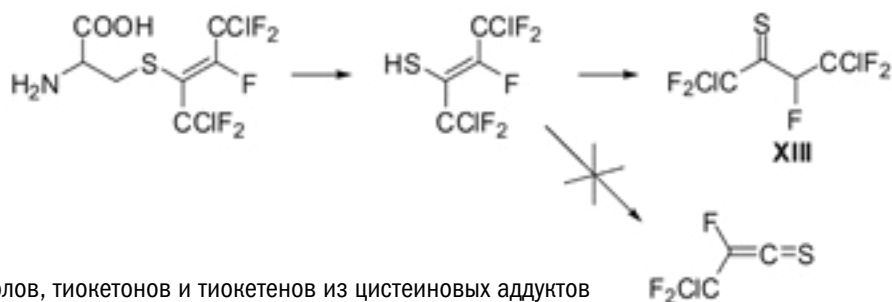


Рис. 2. Схема образования тиолов, тиокетенов и тиокетенов из цистеиновых аддуктов

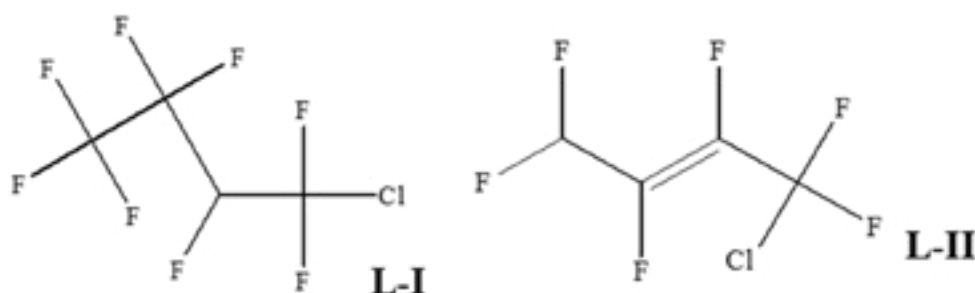


Рис. 3. Предполагаемые структурные формулы метаболитов ДХГФ обнаруженных в паровой фазе

**Результаты определения концентрации ДХГФ и его метаболитов методом ГХ-МС с твердофазной микроэкстракцией**

Соединение	Концентрация соединений после экспонирования ДХГФ в концентрации 600 мг/м <sup>3</sup>		
	Плазма крови 0 ч	Плазма крови 24 ч	Моча 24 ч
ДХГФ	30 нг/мл	0	3 нг/мл
Метаболит L-I	1091 нг/мл	86 нг/мл	541 нг/мл
Метаболит L-II	1353 нг/мл	17 нг/мл	253 нг/мл

ствием глутатион-S-трансферазы.

Возможным объяснением может быть то, что этот продукт легче вступает в дальнейшие реакции метаболизма и не накапливается в организме.

Ферментативный гидролиз аддуктов ДХГФ с глутатионом, а также некоторые их дальнейшие превращения показаны на рисунке 6.

Наиболее показательными метаболитами являются ацетилстеиновый аддукт VIII и метилсульфид I. Обнаружение метаболитов, образующихся в ходе различных путей образования глутатионовых аддуктов, позволяет нам сделать некоторые выводы, о соотношении различных путей сравнивая концентрации метаболитов. Так, соотношение XII/VIII/VII равно 34 к 17 к 1 в плазме 0 ч, и 11 к 63 к 1 в моче. Следовательно, преобладающим путем образования аддуктов является винильное или аллильное замещения фтора, а также восстановительное присоединение глутатиона. Нуклеофильное замещение галогенов в восстановленной форме ДХГФ являются минорными процессами. Их накопление выявлено в моче, при этом VII выводится из крови в течение 24 часов, а IV в плазме не обнаружен. Концентрация VIII, одного из наи-

более показательных метаболитов, в плазме падает в 20 раз за 24 часа.

Цистеиновый аддукт XI – основной. Несмотря на то, что XII основной ацетилстеиновый аддукт, выводится он быстрее, чем VIII и через 24 ч в плазме не обнаруживается.

Единственным глутатионовым аддуктом, который был обнаружен в исходной форме, был аддукт X в моче, который является продуктом винильного или аллильного замещения фтора в ДХГФ.

Для выявления наиболее чувствительных биомаркеров экспозиции ДХГФ было проведено исследование образцов плазмы крови крыс, экспонированных концентрациями ДХГФ на уровне от 4.7 до 84.4 мг/м<sup>3</sup>. В результате, показано, что неметаболизированная форма ДХГФ была обнаружена в плазме крови всех групп животных. Концентрации не превышают следового уровня, однако несут дозозависимый характер. Метаболит L-I был обнаружен только в группе подвергавшейся экспонированию высокой концентрацией ДХГФ.

Образцы плазмы крови крыс были исследованы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией вы-

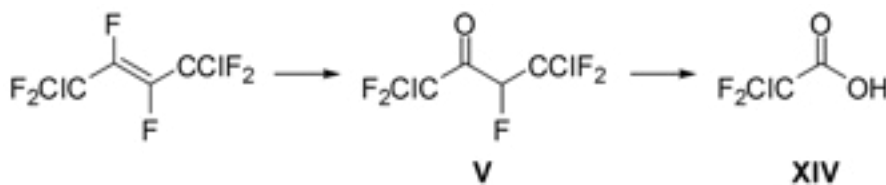


Рис. 4. Схема образования кетона и кислоты при гидролизе ДХГФ

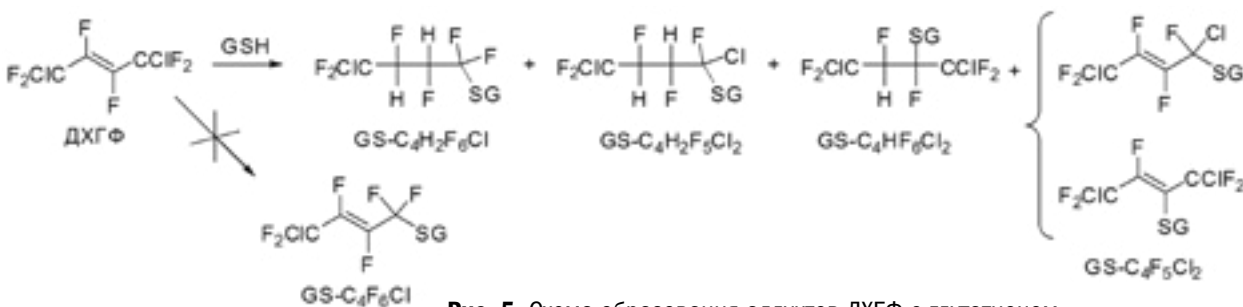


Рис. 5. Схема образования аддуктов ДХГФ с глутатионом

сокого разрешения. Поиск и идентификация метаболитов были выполнены на основании данных, полученных в ходе исследования образцов после острой интоксикации.

Таким образом были выявлены цистеиновые и ацетилцистеиновые аддукты ДХГФ в плазме крови крыс группы 1, экспонированных ДХГФ в концентрации 84.4 мг/м<sup>3</sup>, единственным метаболитом ДХГФ, выявленным в группе 2 (18.8 мг/м<sup>3</sup>), является тиокетон XIII. Наиболее чувствительным биомаркером экспозиции ДХГФ является его неметаболизированная форма. Тем не менее, скорее всего этот факт связан с использованием чувствительной методики целевого анализа для определения ДХГФ.

Использование сочетания ГХ-МС паровой фазы с твердофазной микроэкстракцией и ВЭЖХ-МС высокого разрешения позволяет выявлять в плазме крови два биомаркера экспозиции ДХГФ концентрациями до 18.8 мг/м<sup>3</sup>.

Рассмотрим далее возможность обоснования целевого списка биомаркеров экспозиции экстраполированного для биомониторинга воздействия ДХГФ на человека. Все обнаруженные метаболиты ДХГФ в крови являются продуктами образования и последующей деградации аддуктов ДХГФ с глутатионом. Реакция присоединения или замещения глутатиона к ДХГФ катализируется глутатион S-трансферазами (GST, КФ 2.5.1.18), которые представляют собой целое семейство ферментов играющих ключевую роль в обезвреживании ксенобиотиков. Образование аддуктов происходит в основном внутри клеток печени и почек [21], так как концентрация глутатиона в плазме крови составляет всего 2-20 мкМ в то время как, концентрация внутриклеточного глутатиона составляет 3-4 мМ [22], причем 85-90 % сосредоточено в цитозоле, а оставшиеся 10-15 % в митохондриях и пероксисомах. После образования, аддукты выводятся из клеток с использованием активного транспорта [23] и затем, под влиянием гамма-глутамилтрансферазы (КФ 2.3.2.2), от аддуктов отщепляется остаток глутаминовой

кислоты. Продуктами первой стадии гидролиза являются цистеилглициновые аддукты. Дальнейший гидролиз аддуктов катализируется дипептидазой (КФ 3.4.13.19), что приводит к цистеиновым аддуктам, которые в дальнейшем могут либо ацилироваться под действием специфичных к цистеиновым аддуктам ацетилтрансфераз (КФ 2.3.1.80), либо расщепляться по связи С-S в цистеине под действием β-лиаз (КФ 4.4.1.13) в почках с образованием тиолов или других реакционноспособных соединений [24]. Именно ацетилцистеиновые аддукты зачастую используют в качестве маркеров образования исходных аддуктов ксенобиотиков с глутатионом [22].

Межвидовые различия в активностях GST или ферментов, которые катализируют гидролиз аддуктов с глутатионом могут определять видовую чувствительность к токсическому действию ксенобиотиков. Оценка таких различий необходима для повышения точности экстраполяции при гигиеническом регламентировании, а также для создания физиологически обоснованных фармако- и токсикокинетических моделей. Сравнение активности GST между человеком и крысами проводилось неоднократно, однако есть основания полагать, что межвидовая чувствительность может отличаться по отношению к различным химическим веществам. Например, в работе [25] проведено межвидовое сравнение активности GST по отношению к йодистому метилу: активность GST по образованию аддуктов с СН<sub>3</sub>I в печени крыс и человека оказалась сравнимой (40 и 47 нмоль/мин/мг гомогената), а у кроликов значительно меньше (10 нмоль/мин/мг гомогената). В почках разница в активности GST была приблизительно схожей: 15.0, 11.8 и 4.38 нмоль/мин/мг гомогената у крысы, человека и кролика, соответственно [22].

Наиболее близким по структуре к ДХГФ соединением для которого удалось обнаружить результаты межвидового сравнения активности GST это гексахлоробутадиен-1,3. Этот полихлорированный углеводород так же содержит в своей структуре четыре атома углерода, связи С=C и Сsp<sup>2</sup>-Cl, по-

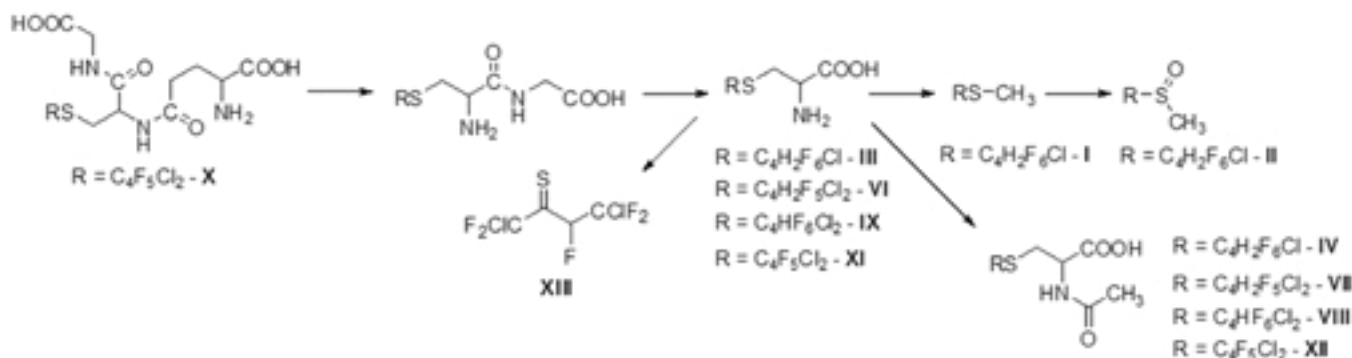


Рис. 6. Схема деградации различных аддуктов ДХГФ с глутатионом. Показаны различные обнаруженные метаболиты

этому можно сделать предположение о близкой субстратной специфичности рассматриваемых ферментов.

В отличие от  $\text{CH}_3\text{I}$ , конъюгация гексахлорбутадиена-1,3 с глутатионом в микросомальной фракции печени крыс была в 5 раз более интенсивной чем у человека [24]. При этом константа связывания была в 1.3 раза выше у крысы. Метаболизм цистеинового аддукта почечными  $\beta$ -лиазами был приблизительно в 23 раза менее интенсивным у человека, чем у крысы. Аналогичным образом отличались активности ацилазы в почках: 7.36 нмоль/мин/мг гомогената у крыс, против 0.1 нмоль/мин/мг гомогената у человека. В то же время, активность ацетилтрансфераз в почках крыс и человека отличалась значительно меньше и составила 144.9 и 40.8 нмоль/мин/мг гомогената, соответственно.

Таким образом, при биомониторинге воздействия ДХГФ на человека стоит в первую очередь в качестве целевых биомаркеров экспозиции рассматривать:

- Цистеиновые аддукты: 1-цистеинил-1,2,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутен-2 или его возможный изомер – 2-цистеинил-1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутен-2.

- Ацетилцистеиновые аддукты: 1-(N-ацетилцистеинил)-1,2,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутен-2 или его возможный изомер – 2-(N-ацетилцистеинил)-1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутен-2, 1-(N-ацетилцистеинил)-1,2,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутан, 1-(N-ацетилцистеинил)-1,1,2,3,4,4-гексафтор-1,4-дихлорбутан.

Так как активность почечных  $\beta$ -лиаз была приблизительно в 23 раза меньше у человека [24], то можно не рассматривать продукты расщепления цистеиновых аддуктов по связи C-S в качестве целевых биомаркеров экспозиции при биомониторинге воздействия ДХГФ на человека. К данному классу соединений относятся, обнаруженные в крови крыс – 4-метилсульфил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2, 4-метилсульфинил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2 и 1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутантион-2, который оказался наиболее чувствительным биомаркером экспозиции ДХГФ у крыс.

Механизм образования легколетучих метаболитов ДХГФ, продуктов восстановительного замещения атомов хлора: 1-хлор-1,1,2,3,3,4,4,4-октафторбутан и 1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2 не был установлен, поэтому не удалось сделать предположение о возможности их обнаружения в крови человека после воздействия ДХГФ.

#### *Нецелелевое метаболическое профилирование*

Для выявления метаболических маркеров ингаляционного воздействия ДХГФ на организм нами было проведено нецелелевое метаболическое про-

филирование образцов плазмы крови, подвергавшихся острому и подострому воздействию ДХГФ.

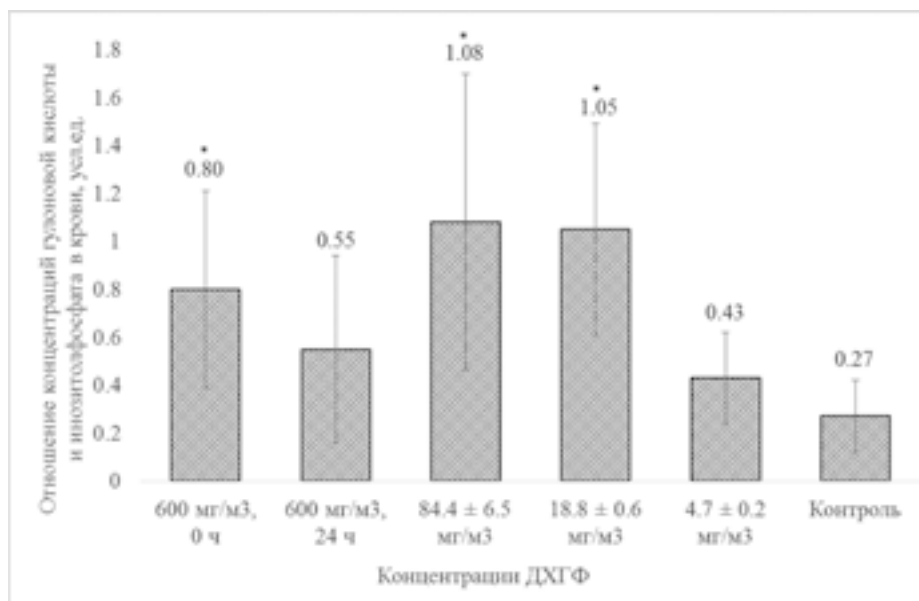
Для выявления биомаркеров эффекта ДХГФ при ингаляционном воздействии на организм, нами было проведено нецелелевое метаболическое профилирование образцов плазмы крови, подвергавшихся острому и подострому воздействию ДХГФ.

Для выявления возможных биомаркеров эффекта низких концентраций ДХГФ нами был оценена статистическая значимость отношений концентраций различных соединений, в частности показано, что отношение концентраций инозитолфосфат/инозитол дозозависимо изменяется. Однако значительное стандартное отклонение не позволяет говорить о достаточной статистической значимости ни в одной группе.

Отношение концентраций гулоновой кислоты и инозитолфосфата (рис. 7) оказывается достаточно чувствительным биомаркером эффекта концентрации ДХГФ 18.8 мг/м<sup>3</sup>, а также, в первые часы после воздействия концентрации 600 мг/м<sup>3</sup>. Однако после 24 часов или при меньших концентрациях и многократном экспонировании, выявленный маркер не носит статистически значимого характера ( $p = 0.18$ ).

Сочетание определения биомаркеров экспозиции – ДХГФ и 1,4-дихлор-1,1,3,4,4-бутантиона-2 в крови с определением биомаркеров эффекта – отношением концентраций гулоновой кислоты и инозитолфосфата позволит более точно оценивать полученную дозу или уровень воздействия ДХГФ на организм людей, контактирующих с ним.

**Заключение.** Использование нецелевых методов метаболического профилирования позволило получить новые знания о метаболизме и механизмах действия не изученных ранее химических соединений. К таким соединениям относятся хладон RL 316 (1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутена-2, ДХГФ) и гидроксилламин. При экспериментальном моделировании интоксикации ДХГФ в образцах крови и мочи крыс обнаружены и идентифицированы два летучих метаболита, продукта восстановительного замещения атомов хлора: 1-хлор-1,1,2,3,3,4,4,4-октафторбутан и 1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2. Всего в результате исследований выявлено и идентифицировано 15 различных ранее неизвестных метаболитов. Установлено, что основным путем превращений ДХГФ в организме является образование аддуктов с глутатионом и их дальнейшая деградация до цистеиновых и ацетилцистеиновых аддуктов. Также, среди продуктов распада аддуктов выявлены 4-метилсульфил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2, 4-метилсульфинил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафтор-бутен-2 и – 1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутантион-2, который оказался наиболее чувствительным маркером у крыс. Показано, что



**Рис. 7.** Отношение концентраций гулоновой кислоты и инозитолфосфата в крови крыс, экспонированных различными концентрациями ДХГФ

при поступлении ДХГФ в организм не происходит его биоактивация с образованием лабильных тикетенов, которые являются основной причиной мутагенного и канцерогенного действия некоторых галогенуглеводородов.

Для обоснования экстраполированного списка биомаркеров экспозиции для биомониторинга воздействия ДХГФ на человека были использованы результаты сравнения активностей глутатион S-трансфераз, β-лиаз, дипептидаз и ацетилтрансфераз печени и почек крысы и человека по отношению к гексахлорбутадиену-1,3, который обладает достаточно близкой структурой к ДХГФ. Конъюгация гексахлорбутадиена-1,3 с глутатионом в микросомальной фракции печени крыс была в 5 раз более интенсивной чем у человека, в то время как метаболизм цистеинового аддукта почечными β-лиазами был приблизительно в 23 раза менее интенсивным у человека, чем у крысы. Активность ацетилтрансфераз в почках крыс и человека отличалась значительно меньше: в 3.5 раза больше у крыс. Таким образом, при биомониторинге воздействия ДХГФ на человека стоит в первую очередь в качестве целевых биомаркеров экспозиции рассматривать следующие соединения.

- Цистеиновые аддукты: 1-цистеинил-1,2,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутен-2 или его возможный изомер – 2-цистеинил-1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутен-2.

- Ацетилцистеиновые аддукты: 1-(N-ацетилцистеинил)-1,2,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутен-2 или его возможный изомер – 2-(N-ацетилцистеинил)-1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутан, 1-(N-ацетилцистеинил)-1,2,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутан, 1-(N-ацетилцистеинил)-1,1,2,3,4,4-гексафтор-1,4-дихлорбутан.

Так как активность почечных β-лиаз была приблизительно в 23 раза меньше у человека, то можно не рассматривать продукты расщепления цистеиновых аддуктов по связи C-S в качестве целевых биомаркеров экспозиции при биомониторинге воздействия ДХГФ на человека: 4-метилсульфил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2, 4-метилсульфинил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2 и 1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутантион-2.

Благодарности  
Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России: к.х.н. Л.К. Густылевой, к.х.н. Т.И. Алюшиной и к.б.н. Г.В. Каракашеву.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Материалы по экспериментальному обоснованию ориентировочного безопасного уровня воздействия (ОБУВ) 1,4-дихлоргексафторбутена-2 (хладона RL316) в воздухе рабочей зоны // Отчет о НИР / ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, рук. д.м.н., проф. Радилов А.С. Санкт-Петербург, 2015 г.
2. *Trahaut R., Boudene C., Jouany J.M., Bouant A.* Experimental study of the toxicity of a fluoroalkene derivative, the hexafluorodichlorobutene (HFCB). *Fluoride*. 1972; 5: 1: 4-14.
3. *Corrigan D.S., McHattie G.V., Reventos J.* Halothane and Dichlorohexafluorobutene. *Brit. J. Anaesthesia*. 1963; 35: 824-825.
4. *Грушко Я.М.* Вредные органические соединения в промышленных выбросах в атмосферу. Л.: Химия. – 1986. – 143 с.
5. *Муравьева С.И., Казнина Н.И., Прохорова Е.К.* Справочник по контролю вредных веществ в воздухе. М.: Химия. 1988.-143 с.
6. *Филов В.А.* Вредные химические вещества. Углеводороды, галогенпроизводные углеводородов: справ Л.: «Химия». 1990.-732 с.
7. *Лазарев Н.В.* Вредные химические вещества. Органические вещества: справ. / Лазарев Н.В. Л.: «Химия». – 1976. – Т. 1. – С. 300.
8. *Hayden P.J., Hayden P.J., Stevens J.L.* Cysteine conjugate toxicity, metabolism, and binding to macromolecules in isolated rat kidney mitochondria. *Mol. Pharm.* 1990; 37: 468-476.
9. *Уколов А.И., Орлова Т.И., Мигаловская Е.Д., Войтенко Н.Г., Гончаров Н.В.* Мета-

боломина: на пути интеграции биохимии, аналитической химии, информатики. Успехи современной биологии. 2015; 135; 1: 3-17.

10. Уколов А.И., Кессених Е.Д., Радиллов А.С., Гончаров Н.В. Токсикометаболизма: поиск маркеров хронического воздействия низких концентраций алифатических углеводородов. Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2017; 53; 1: 24-32.

11. Орлова Т.И., Уколов А.И., Савельева Е.И., Радиллов А.С. Определение свободных и этерифицированных жирных кислот в плазме крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием. Аналитика и контроль. 2015; 19; 2: 183-188.

12. Уколов А.И., Орлова Т.И., Савельева Е.И., Радиллов А.С. Хромато-масс-спектрометрическое определение свободных жирных кислот в плазме крови и моче с использованием

экстрактивного алкилирования. Журнал аналитической химии. 2015; 70; 9: С. 968.

13. Dekant W. Toxicology of Chlorofluorocarbon Replacements. Environ. Health Perspect. 1996; 104; 1: 75-83.

14. Anders M.W. Metabolism and Toxicity of Hydrochlorofluorocarbons: Current Knowledge and Needs for the Future. Environ. Health Perspect. 1991; 96: 185-191.

15. Dekant W., Vamvakas S., Berthold K., Schmidt S., Wild D., Henschler D. Bacterial-lyase mediated cleavage and mutagenicity of cysteine conjugates derived from the nephrocarcinogenic alkenes trichloroethylene, tetrachloroethylene and hexachlorobutadiene. Chem.-Biol. Interact. 1986; 60: 31-45.

16. Anders M.W., Lash L., Dekant W., Elfarra A.A., Dohn D.R. Biosynthesis and bioconversion of glutathione S-conjugates to

toxic metabolites. CRC Crit. Rev. Toxicol. 1988; 18: 311-341.

17. Dreehen B., Westphal G. Mutagenicity of the glutathione and cysteine S-conjugates of the haloalkenes 1,1,2-trichloro-3,3,3-trifluoro-1-propene and trichlorofluoroethene in the Ames test in comparison with the tetrachloroethene-analogues. Mut. Res. 2003; 539: 157-166.

18. Lock E.A., Berndt W.O. Studies on the Mechanism of Nephrotoxicity and Nephrocarcinogenicity of Halogenated Alkenes. CRC Crit. Rev. Toxicol. 1988; 19: 1: 23-42.

19. MacNichol D.D., Robertson D.D. New and unexpected reactivity of saturated fluorocarbons. Nature. 1988; 332: 59-61.

20. Wkelman C., Kazis C. Recent advances in the chemistry of halogenofluorocarbons. J. FluorineChem. 1986; 33: 347-359.

21. Blair I.A. Analysis of endogenous glutathione-adducts and their metabolites. Biomed. Chromatogr. 2010; 24; 1: P. 29-38.

22. Blair I.A. Endogenous glutathione adducts. Curr. Drug Metab. 2006; 7; 8: 853-872.

23. Awasthi Y.C., Sharma R., Yadav S., Dwivedi S., Sharma A., Awasthi S. The non-ABC drug transporter RLP76 (RALBP-1) plays a major role in the mechanisms of drug resistance. Curr. Drug Metab. 2007; 8; 4: 315-323.

24. Green T., Lee R., Farrar D., Hill J. Assessing the health risks following environmental exposure to hexachlorobutadiene. Toxicol. Lett. 2003; 138; 1-2: 63-73.

25. Poet T.S., Wu H., Corley R.A., Thrall K.D. In vitro glutathione conjugation of methyl iodide in rat, rabbit, and human blood and tissues. Inhal. Toxicol. - 2009. - V. 21. - N. 6. - P. 524-530.

## REFERENCES:

1. Materials on the experimental substantiation of the approximate safe exposure level of 1,4-dichlorohexafluorobutene-2 (RL316) in the air of the working area. FSUE RIHOPHE FMBA of Russia, prof. Radilov A.S. Saint-Petersburg, 2015 (in Russian).

2. Truhaut R., Boudene C., Jouany J.M., Bouant A. Experimental study of the toxicity of a fluoroalkene derivative, the hexafluorodichlorobutene (HFCD). Fluoride. 1972; 5; 1: 4-14.

3. Corrigan D.S., McHattie G.V., Reventos J. Haloethane and Dichlorohexafluorobutene. Brit. J. Anaesthesia. 1963; 35: 824-825.

4. Grushko Ya.M. Harmful organic compounds in industrial emissions. Leningrad: Khimiya. 1986. - 143 p. (in Russian).

5. Muravieva S.I., Kaznina N.I., Prokhorova E.K. Handbook for the control of harmful substances in the air. Moscow: Khimiya. 1988. - 143 p. (in Russian).

6. Filov V.A. Harmful chemicals. Hydrocarbons, halogen derivatives of hydrocarbons: a handbook. Leningrad: Khimiya. 1990. - 732 p. (in Russian).

7. Lazarev N.V. Harmful chemicals. Organic

compounds: Handbook. Leningrad: Khimiya. 1976; V.1. - 300 p. (in Russian).

8. Hayden P.J., Hayden P.J., Stevens J.L. Cysteine conjugate toxicity, metabolism, and binding to macromolecules in isolated rat kidney mitochondria. Mol. Pharm. 1990; 37: 468-476.

9. Ukolov A.I., Orlova T.I., Migalovskaya E.D., Voitenko N.G., Goncharov N.V. Metabolomics: On the Way to an Integration of Biochemistry, Analytical Chemistry, and Informatics. Biol. Bulletin Reviews. 2015; 135; 1: 3-17.

10. Ukolov A.I., Kessenikh, E.D., Radilov, A.S., Goncharov N.V. Toxicometabolomics: Identification of markers of chronic exposure to low doses of aliphatic hydrocarbons. J. Evol. Biochem. Phys. 2017; 53; 1: 24-32. (in Russian)

11. Orlova T.I., Ukolov A.I., Savelieva E.I., Radilov A.S. GC-MS quantification of free and esterified fatty acids in blood plasma. Analitika i kontrol. 2015; 19(2): 183 (in Russian).

12. Ukolov A.I., Orlova T.I., Savelieva E.I., Radilov A.S. Chromatographic-Mass Spectrometric Determination of Free Fatty Acids in Blood Plasma and Urine Using Extractive Alkylation. J. of Anal. Chemistry. 2015; 70(9): 968. (in Russian).

13. Dekant W. Toxicology of Chlorofluorocarbon

Replacements. Environ. Health Perspect. 1996; 104; 1: 75-83.

14. Anders M.W. Metabolism and Toxicity of Hydrochlorofluorocarbons: Current Knowledge and Needs for the Future. Environ. Health Perspect. 1991; 96: 185-191.

15. Dekant W., Vamvakas S., Berthold K., Schmidt S., Wild D., Henschler D. Bacterial-lyase mediated cleavage and mutagenicity of cysteine conjugates derived from the nephrocarcinogenic alkenes trichloroethylene, tetrachloroethylene and hexachlorobutadiene. Chem.-Biol. Interact. 1986; 60: 31-45.

16. Anders M.W., Lash L., Dekant W., Elfarra A.A., Dohn D.R. Biosynthesis and bioconversion of glutathione S-conjugates to toxic metabolites. CRC Crit. Rev. Toxicol. 1988; 18: 311-341.

17. Dreehen B., Westphal G. Mutagenicity of the glutathione and cysteine S-conjugates of the haloalkenes 1,1,2-trichloro-3,3,3-trifluoro-1-propene and trichlorofluoroethene in the Ames test in comparison with the tetrachloroethene-analogues. Mut. Res. 2003; 539: 157-166.

18. Lock E.A., Berndt W.O. Studies on the Mechanism of Nephrotoxicity and

Nephrocarcinogenicity of Halogenated Alkenes. CRC Crit. Rev. Toxicol. 1988; 19: 1: 23-42.

19. MacNichol D.D., Robertson D.D. New and unexpected reactivity of saturated fluorocarbons. Nature. 1988; 332: 59-61.

20. Wkelman C., Kazis C. Recent advances in the chemistry of halogenofluorocarbons. J. FluorineChem. 1986; 33: 347-359.

21. Blair I.A. Analysis of endogenous glutathione-adducts and their metabolites. Biomed. Chromatogr. 2010; 24; 1: P. 29-38.

22. Blair I.A. Endogenous glutathione adducts. Curr. Drug Metab. 2006; 7; 8: 853-872.

23. Awasthi Y.C., Sharma R., Yadav S., Dwivedi S., Sharma A., Awasthi S. The non-ABC drug transporter RLP76 (RALBP-1) plays a major role in the mechanisms of drug resistance. Curr. Drug Metab. 2007; 8; 4: 315-323.

24. Green T., Lee R., Farrar D., Hill J. Assessing the health risks following environmental exposure to hexachlorobutadiene. Toxicol. Lett. 2003; 138; 1-2: 63-73.

25. Poet T.S., Wu H., Corley R.A., Thrall K.D. In vitro glutathione conjugation of methyl iodide in rat, rabbit, and human blood and tissues. Inhal. Toxicol. - 2009. - V. 21. - N. 6. - P. 524-530.

A.I. Ukolov, M.D. Shachneva, A.S. Radilov

## IDENTIFICATION OF BIOMARKERS OF EXPOSURE AND EFFECT OF 1,4-DICHLOROHEXAFLUOROBUTENE-2

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical and Biological Agency, 188663, Leningrad region, Kuzmolovsky, Russian Federation

Using gas and high-performance liquid chromatography with mass-selective detection (GC/MS and HPLC/MS, respectively), the metabolism of previously unstudied freon RL316 (1,4-dichloro-1,1,2,3,4,4-hexafluorobutene-2, hereinafter – DCHF) has been investigated. Two volatile metabolites, which are products of reductive replacement of chlorine atoms: 1-chloro-1,1,2,3,4,4-octafluorobutane and 1-chloro-1,1,2,3,4,4-hexafluorobutene-2, have been detected and identified in the blood and urine samples of rats. In total 15 different previously unknown metabolites have been revealed and identified. The main direction of metabolism of DCHF is the formation of adducts with glutathione and their further degradation to cysteine and acetylcysteine adducts. Among all metabolites 4-methylsulfyl-1-chloro-1,1,2,3,4,4-hexafluorobutene-2, 4-methylsulfynyl-1-chloro-1,1,2,3,4,4-hexafluorobutene-2 and 1,1,3,4,4-pentafluoro-1,4-dichlorobutanethion-2 were found to be the most sensitive biomarkers. The intake of DCHF in the body does not lead to its bioactivation with the formation of labile thioketenes which are the main cause of mutagenic and carcinogenic effects of some halocarbons.

Metabolic profiling of blood plasma revealed potential metabolic markers of exposure to DCHF at a concentration of 18,8 mg/m<sup>3</sup>: the ratio of concentrations of gulonic acid and myo-inositol phosphate. The combination of the determination of the chemical markers – nonmetabolic forms of DCHF and 1,4-dichloro-1,1,3,4,4-butanethion-2 with the definition of discovered metabolic markers allows to estimate more accurately the dose or level of exposure of DCHF on the body of people in contact with it.

**Keywords:** 1,4-dichloro-1,1,2,3,4,4-hexafluorobutene-2, freon RL316, blood, urine, chromatography/mass spectrometry.

Материал поступил в редакцию 02.04.2019 г.

УДК 615.065 : 615.212.3

# ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРОИЗВОДНОГО АРИЛАЦЕТАМИДА GR 89,696, ОБЛАДАЮЩЕГО АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

А.Ф. Быкова, С.Е. Галан,  
В.Ю. Малягин, С.Н. Субботина

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины»  
Министерства Обороны Российской Федерации (ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ),  
195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Проведено изучение анальгетической активности и побочных эффектов субстанции производного арилацетамида GR 89,696. Показано, что возникновение анальгетического эффекта сопровождается изменением соотношения между болевыми и альтернативными паттернами поведения, при этом снижение выраженности нормального поведения отмечается только после введения образца в максимальной анальгетической дозе 2000 мкг/кг. В качестве побочных эффектов при внутримышечном введении образца в диапазоне доз 1-100 мкг/кг показано последовательное развитие замирания, адинамии, ослабление рефлекса переворачивания, значительное увеличение диуреза. Негативного влияния образца на дыхательную и сердечно-сосудистую функции животных не выявлено. Терапевтический индекс (более 2900) и фактор безопасности (менее 0,02), рассчитанные на основе полученных данных, позволяют рассматривать GR 89,696 в качестве потенциального обезболивающего средства, однако для установления возможности его практического использования необходимо более детальное изучение побочных эффектов соединения.

**Ключевые слова:** GR 89,696, агонисты κ-опиоидных рецепторов, побочные эффекты, анальгетическая активность.

**Введение.** На сегодняшний день наиболее эффективными препаратами, применяемыми для купирования острого болевого синдрома, являются опиоидные анальгетики [1,2,3]. Однако их применение сопряжено с возникновением ряда нежелательных эффектов, в первую очередь респираторной депрессии, а также наркотической зависимости и толерантности к обезболивающему действию, характерных для мю- и дельта-опиоидных агонистов [4,5,6,7,8].

Перспективным направлением поиска веществ с высокой анальгетической активностью, лишенных побочных эффектов, присущих опиатам, является разработка новых анальгетиков на основе агонистов каппа-опиоидных рецепторов [9, 10, 11]. В отличие от мю-опиоидов, они не вызывают нарушений дыхания, а также явлений физической и психической зависимости, что обусловлено различной локализацией подтипов опиоидных рецепторов в мозге [9, 12], и может в значительной мере повысить эффективность и безопасность обезболивающей терапии.

В настоящее время синтезировано большое количество селективных агонистов κ-опиоидных рецепторов, в частности кетоциклазоцин, U-50,488, U-69593, спирадолин и др. [13,14,15,16,17,18,19]. Показано, что данные соединения существенно повышают порог болевой чувствительности и, в отличие от других опиатов, не влияют на респираторную функцию [14, 9]. Наиболее селективными агонистами каппа-опиоидных рецепторов, к числу которых относится GR 89,696 (далее GR), являются производные арилацетамидов [16, 20], что позволяет рассматривать их в качестве перспективного класса соединений для разработки на их основе новых обезболивающих препаратов. Проблемы при применении каппа-агонистов могут быть связаны с развитием дисфории, седации и галлюцинаций [21,22,23,24].

Учитывая вышеуказанное, *цель исследования* состояла в изучении анальгетической активности и безопасности субстанции производного арилацетамида GR с установленной каппа-рецепторной агонистической активностью.

**Быкова Анна Федоровна (Bykova Anna Fedorovna)**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ, [anna-kiryaakova@rambler.ru](mailto:anna-kiryaakova@rambler.ru)

**Галан Сергей Евгеньевич (Galan Sergej Evgen'evich)**, кандидат химических наук, старший научный сотрудник ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ, [sergey-x-70@mail.ru](mailto:sergey-x-70@mail.ru)

**Малягин Вадим Юрьевич (Maljagin Vadim Jur'evich)**, научный сотрудник ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ

**Субботина Светлана Николаевна (Subbotina Svetlana Nikolaevna)**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ, [ssubbotina@inbox.ru](mailto:ssubbotina@inbox.ru)



**Материалы и методы исследования.** Эксперименты выполнены на 120 беспородных белых крысах-самцах массой 180-220 г, полученных из питомника РАН «Рапполово». Животных содержали в условиях вивария на стандартном рационе. До начала экспериментов они находились в карантине от 14 до 30 сут [25]. Все манипуляции проводили в соответствии с правилами и принципами гуманного обращения с животными.

Экспериментальные исследования проводили с использованием водного раствора GR. Структурная формула соединения представлена на рисунке 1.

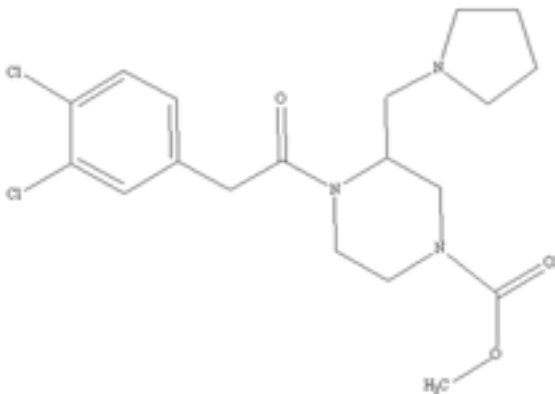


Рис. 1. Структурная формула GR 89,696

Растворы соединения вводили крысам однократно внутримышечно (в/м) из расчета 0,1 мл на 100 г массы тела в диапазонах доз 2-2000 мкг/кг. Животным контрольных групп в/м вводили растворитель (вода для инъекций) в аналогичном объеме.

Исследование обезболивающих свойств соединения GR проводили, применяя тест горячей пластины (hot plate) [25]. В ходе тестирования регистрировали латентный период болевой реакции в виде облизывания задних лап, а также элементы поведения животных (болевые, нормальное поведение, обездвиживание). Критерием анальгетического эффекта считали статистически значимое увеличение латентного периода реакции после введения исследуемого вещества, критерием полной анальгезии – увеличение ЛП более 120 с.

В качестве основных побочных эффектов применения GR рассматривали развитие у лабораторных животных седативного эффекта и нарушений координации движений. Развитие седативного действия регистрировали на основании изменения параметров теста открытое поле [25,26], полученных при автоматизированной регистрации поведения с помощью программы Noldus Ethovision XT 11 (Установка «Открытое поле», круглое (НПК Открытая Наука, Россия)).

В качестве основного параметра, по изменению которого оценивали влияние GR на двигательную активность животных, рассматривали пройденную дистанцию.

Оценку координации движений крыс проводили с помощью теста Rota-Rod [27]. При выполнении тестирования регистрировали время пробежки и количество попыток, совершенных животными. Критерием прохождения теста служило время пробежки не менее 80 с вне зависимости от количества попыток (но не более 3-х). Определяли также долю животных в группе, у которых при введении им соединения в применяемой дозе развивалось нарушение координации движений. На основании полученных данных рассчитывали среднюю токсическую дозу GR по эффекту атаксии.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. Различия по сравнению с контролем считали статистически значимыми при  $p < 0,05$  [28, 29]. Средние эффективные ( $ED_{50}$ ), токсические ( $TD_{50}$ ) и другие расчётные дозы определяли методом пробит-анализа по Финни с вычислением стандартной ошибки среднего (SEM).

#### Результаты и обсуждение.

##### Исследование анальгетической активности

Результаты исследования анальгетической активности GR в тесте горячей пластины (hot plate) представлены в таблице 1. Тестирование животных осуществляли через 15 мин после введения образца, принимая во внимание тот факт, что анальгетический эффект достигает своего максимального значения в период 15-30 мин.

Пороговый анальгетический эффект наблюдался при введении образца GR в дозе 16 мкг/кг, при этом латентный период болевой реакции возрастал в 2 раза. При увеличении дозы отмечали дозозависимое повышение ЛП вплоть до 120 с. Средняя эффективная доза по эффекту полной анальгезии в тесте горячей пластины составила  $168 \pm 82$  мкг/кг.

Наряду с определением латентного периода болевой реакции у животных регистрировали различные элементы поведения, в частности, болевые элементы, нормальное поведение и обездвиживание (рис.2).

У животных контрольной группы при их помещении на горячую пластинку отмечали преобладание болевых реакций (более 60 %), сохранение элементов нормального (исследовательского) поведения (около 30 %) и малую выраженность альтернативного поведения (обездвиживание).

При введении GR возникновение анальгетического эффекта сопровождалось изменением соотношения между болевыми и альтернативными паттернами поведения, при этом статистически

значимое уменьшение выраженности нормального поведения отмечали только после введения образца в максимальной анальгетической дозе 2000 мкг/кг.

При рассмотрении влияния образца на соотношение паттернов поведения в тесте отмечали, что введение GR в диапазоне доз 20-400 мкг/кг приводило к значительному снижению выраженности болевого поведения (около 10 % в структуре всех двигательных актов), при этом значительно возрастала доля альтернативного поведения, а доля паттернов нормального поведения сохранялась на уровне контрольных значений (40-50 %).

Таким образом, показано, что введение образца в дозах до 2000 мкг/кг не сопровождается полным угнетением нормального поведения.

#### *Изучение побочных эффектов*

Поскольку большинство клинических исследований к-опиоидных агонистов были приостановлены из-за развития дисфории и седации [21, 22, 23, 24], в качестве основных побочных эффектов GR у лабораторных животных рассматривали развитие седативного эффекта и нарушений координации движений.

Седативный эффект образца GR оценивали с помощью теста открытое поле с автоматизированной регистрацией поведения. В качестве основного параметра, по изменению которого оценивали влияние соединения на двигательную

активность животных, рассматривали пройденную дистанцию. При проведении экспериментов также регистрировали среднюю скорость, суммарное время и частоту пребывания в зонах, длительность движений и остановок – параметры, которые характеризуют двигательную активность грызунов.

Динамика показателя «пройденная дистанция» при введении GR в различных дозах представлена на рисунке 3.

При введении GR у животных отмечали снижение двигательной активности, которое сопровождалось дозозависимым уменьшением пройденной дистанции. Статистически значимое снижение данного показателя по сравнению с контролем отмечали при введении образца в дозе 10 мкг/кг и более. При введении GR в дозе 100 мкг/кг пройденная дистанция в открытом поле была более чем в 6 раз меньше, чем в группе контроля. Снижение общей подвижности крыс в данном тесте, очевидно, является следствием повышения уровня их стрессированности или тревожности. Однако для детального изучения влияния соединения на тревожность целесообразно проведение других тестов, таких как поднятый крестообразный лабиринт, многопараметровый тест и пр. [25].

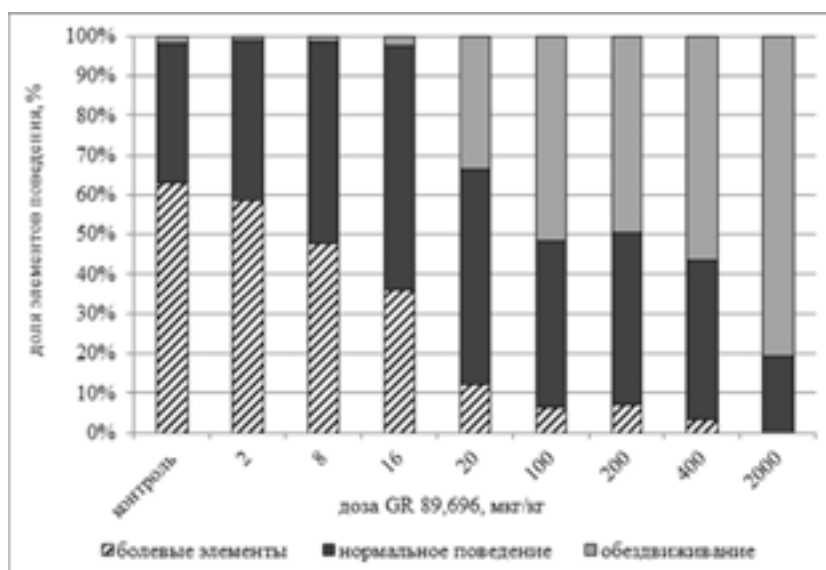
Влияние GR на координацию движений оценивали с помощью теста Rota-Rod. Для расче-

Таблица 1

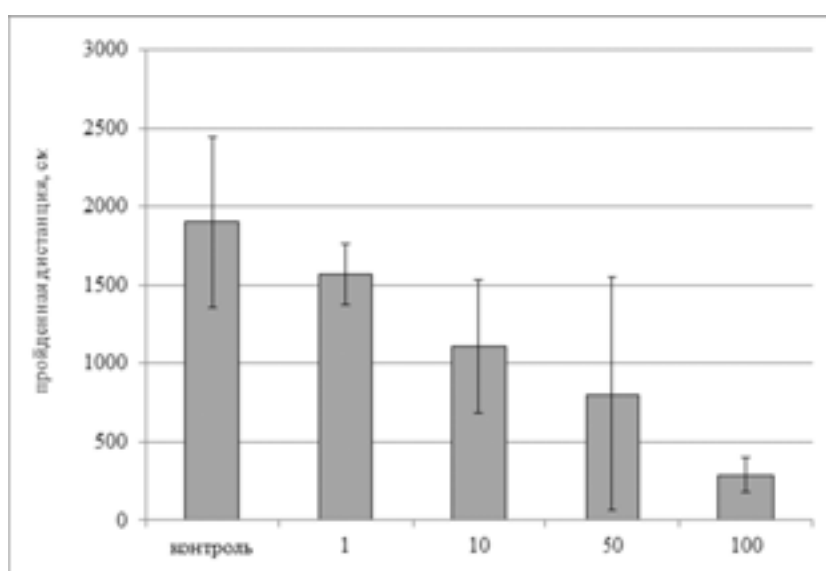
### **Анальгетическая активность GR в тесте горячей пластины через 15 мин после внутримышечного введения образца крысам в различных дозах (Mean±SD, n=4)**

Доза, мкг/кг	Латентный период, с
контроль	13,9±1,1
2	14,8±1,8
8	20,8±3,0
16	31,3±1,6*
20	80,0±17,8*
100	58,8±21,8
200	85,0±20,6*
400	97,5±22,5*
2000	>120*

Примечание: \* – различия по сравнению с контролем статистически значимы при  $p < 0,05$



**Рис. 2.** Дозозависимое влияние GR 89,696 на соотношении паттернов поведения в тесте горячей пластины через 15 мин после внутримышечного введения крысам



**Рис. 3.** Динамика показателя «пройденная дистанция» через 30 мин после внутримышечного введения GR 89,696 в диапазоне доз

та эффективной дозы по эффекту атаксии введение образца осуществляли в диапазоне доз 1-10 мкг/кг. Регистрировали количество попыток (не более 3-х) и длительность удерживания на стержне через различное время после введения. Определяли долю животных в группе, у которых при введении образца в исследуемой дозе развивалось нарушение координации движений. Полученные экспериментальные данные представлены в таблице 2.

При в/м введении GR в диапазоне доз 1-10 мкг/кг отмечали дозозависимое изменение доли животных с нарушениями координации движений. Увеличение дозы приводило к более выраженным

нарушениям локомоторной активности, что проявлялось в увеличении количества попыток и снижении времени побежки на вращающемся стержне. При введении GR в дозе 10 мкг/кг образец вызывал нарушения у большинства животных в группе ( $83 \pm 17\%$ ). Время развития атаксии составило в среднем 30 мин, длительность эффекта – 60 мин.

На основании полученных данных была рассчитана средняя токсическая доза GR по развитию эффекта атаксии, которая составила  $3,4 \pm 1,3$  мкг/кг.

В экспериментах на лабораторных животных исследовали признаки интоксикации GR. Уста-

### Локомоторная активность крыс в тесте RotaRod при внутримышечном введении GR в различных дозах (Mean±SD, n=6)

Доза GR, мкг/кг	Максимальное количество попыток	Минимальное время побежки, с	Начало действия, мин	Окончание действия, мин	Доля животных с нарушениями локомоторной активности, %
1	1,8±1,0	112±20	30,0	45,0	17±17
5	2,7±0,8	47±58	33,8±7,5	105±17	67±21
10	3,0±0,0	39±36	33,0±6,7	84±13	83±17

новлено, что в диапазоне доз 0,01-100 мг/кг образец вызывал последовательное развитие замирания и адинамии, при этом у животных не отмечали нарушений дыхания и сердечной деятельности. Действие GR в больших дозах характеризовалось гипотермией, выраженной гиподинамией, ослаблением рефлекса переворачивания, значительным увеличением диуреза. После введения образца в дозе 500 мг/кг не отмечали развития бокового положения и гибели животных.

Установленные признаки фармакологического действия GR, такие как седация, отсутствие кататонии и обездвиживания, характерные для опиатных анальгетиков, гипотония мышц, умеренная гипотермия на фоне сохранения двигательной активности, отсутствие угнетения дыхания, брадикардии, градуальное увеличение анальгетического эффекта с увеличением дозы, увеличения диуреза позволили отнести образец к избирательным агонистам каппа-рецепторов.

Тем не менее, фактор безопасности, представляющий собой отношение средней токсической дозы к средней эффективной дозе, составил менее 0,02 (при расчете использовали среднюю токсическую дозу по развитию нарушений координации движений).

Таким образом, полученные результаты исследования позволяют рассматривать GR в качестве обезболивающего средства, однако для того, чтобы сделать заключение о возможности его практического использования необходимо дальнейшее детальное изучение побочных эффектов соединения.

#### Выводы.

1. Средняя эффективная доза образца GR 89,696 по эффекту анальгезии в тесте горячей пластины составила 168±82 мкг/кг.

2. Терапевтический индекс GR 89,696 составляет более 2900.

3. Фактор безопасности GR 89,696 составляет менее 0,020.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гузевых Л.С. Поиск новых средств фармакологической регуляции болевой чувствительности среди фрагментов атипичных опиоидных пептидов: Автореф. дис... док. биол. наук, М.; 2009.
2. Fields H.L. The doctor's dilemma: opiate analgesics and chronic pain. *Neuron*. 2011; 69 (4): 591-594.
3. Ahlbeck K. Opioids: a two-faced Janus. *Curr. Med. Res. Opin.* 2011; 27 (2): 439-448.
4. Кубынин А.Н., Пчелинцев Э.Э. Опиоидные анальгетики: пути совершенствования терапии болевых синдромов. *РМЖ*. 2007; 5: 417-425.
5. Игнатов Ю.Д., Зайцев А.А. Современные аспекты терапии боли: опиаты. *Качественная клиническая практика*. 2001; 2: 2-13.
6. Kivell B., Prinszano T.E. Kappa opioids and the modulation of pain. *Psychopharmacology*. 2010; 210 (2): 109-119.
7. Collett B.J. Opioid tolerance: the clinical perspective. *Br. J. Anaesth.* 1998; 81 (1): 58-68.
8. Ballantyne J.C., Mao J. Opioid therapy for chronic pain. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349 (20): 1943-1953.
9. Lemos J.C., Chavkin C. Kappa opioid receptor function. In: Pasternak G., ed. *The opiate receptors*. 2nd ed. New York: Humana; 2011: 226-305.
10. Vanderah T.W. Delta and kappa opioid receptors as suitable drug targets for pain. *Clin. J. Pain*. 2010; 26 (Suppl. 10): 10-15.
11. Carlezon W.A.Jr., Beguin C., Knoll A.T., Cohen B.M. Kappa-opioid ligands in the study and treatment of mood disorders. *Pharmacol. Ther.* 2009; 123 (3): 334-343.
12. Raehal K.M., Bohn L.M. Mu opioid receptor regulation and opiate responsiveness. *AAPS J.* 2005; 7 (3): 587-591.
13. Yekkirala A.S. Opioid receptors in analgesic drug design – the past, present and future. *J. of Postdoctoral Research*. 2013; 1 (4): 9-23.
14. Rusovici D.E., Negus S.S., Mello N.K., Bidlack J.M. Kappa-opioid receptors are differentially labeled by arylacetamides and benzomorphans. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; 485 (1): 119-125.
15. Nagase H., Fujii H. Opioids in preclinical and clinical trials. *Top. Curr. Chem.* 2011; 299: 29-62.
16. Aldrich J.V. Narcotic analgesics. *Am. J. Pharm. Educ.* 1993; 57: 153-161.
17. Piercey M.F., Einspahr F.J. Spinal analgesic actions of kappa receptor agonists, U50488H and spiradoline (U-62066). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989; 251: 267-271.
18. Gharagozlou P., Hashemi E., DeLorey T.M., Clark G.D., Lameh J. Pharmacological profiles of opioid ligands at kappa opioid receptors. *BMC Pharmacol.* 2006; 6:3.
19. Kumar V., Marella M.A., Cortes-Burgos L., Chang A.C., Cassel J.A., Daubert J.D. et al. Arylacetamides as peripherally restricted kappa opioid receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000; 10 (22): 2567-2570.
20. Vonvoigtlander P.F., Lahti R.A., Ludens J.H. U-50,488: a selective and structurally novel non-Mu (kappa) opioid agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1983; 224 (1): 7-12.
21. Pande A.C., Pyke R.E., Greiner M., Cooper S.A., Benjamin R., Pierce M.W. Analgesic efficacy of the kappa-receptor agonist, enadoline, in dental surgery pain. *Clin. Neuropharmacol.*, 19 (1), 92-97 (1996).
22. Kumor K.M., Haertzen C.A., Johnson R.E., Kocher T., Jasinski D. Human psychopharmacology of ketocyclazocine as compared with cyclazocine, morphine and placebo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986; 238 (3): 960-968.
23. Wadenberg M.L. A review of the properties of spiradoline: a potent and selective kappa-opioid receptor agonist. *CNS Dr. Rev.* 2003; 9 (2): 187-201.
24. Reece P.A., Sedman A.J., Rose S., Wright D.S., Dawkins R., Rajagopalan R. Diuretic effects, pharmacokinetics, and safety of a new centrally acting kappa-opioid agonist (CI-977) in humans. *J. Clin. Pharmacol.* 1994; 34 (11): 1126-1132.
25. Миронов А.Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012.
26. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высшая школа; 1991.
27. Shiotsuki H., Yoshimi K., Shimo Y. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J. Neurosci. Methods*. 2010; 189 (2): 180-185.
28. Юнкеров В.И., Григорьев С.И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. СПб.: ВМЕДА, 2005.
29. Бельный М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Медгиз; 1963.

## REFERENCES:

1. Guzevatykh L.S. Search for new means of pharmacological regulation of pain sensitivity among fragments of atypical opioid peptides: autoref. dis... Doc. Biol. Sciences, M.; 2009 (in Russian).
2. Fields, H. L. The doctor's dilemma: opiate analgesics and chronic pain. *Neuron*. 2011; 69 (4): 591-594.
3. Ahlbeck K. Opioids: a two-faced Janus. *Curr. Med. Res. Opin.* 2011; 27 (2): 439-448.
4. Kubanin A.N., Pchelintsev E.E. Opioid analgesics: ways to improve the treatment of pain. *Russian Medical Journal* 2007; 5: 417-425 (in Russian).
5. Ignatov Yu.D., Zaitsev A.A. Modern aspects of pain therapy: opiates. *Good clinical practice*. 2001; 2: 2-13 (in Russian).
6. Kivell B., Prinszano T.E. Kappa opioids and the modulation of pain. *Psychopharmacology*. 2010; 210 (2): 109-119.
7. Collett B.J. Opioid tolerance: the clinical perspective. *Br. J. Anaesth.* 1998; 81 (1): 58-68.
8. Ballantyne J.C., Mao J. Opioid therapy for chronic pain. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349 (20): 1943-1953.
9. Lemos J.C., Chavkin C. Kappa opioid receptor function. In: Pasternak G., ed. *The opiate receptors*. 2nd ed. New York: Humana; 2011: 226-305.
10. Vanderah T. W. Delta and kappa opioid receptors as suitable drug targets for pain. *Clin. J. Pain.* 2010; 26 (Supplement. 10): 10-15.
11. Carlezon W.A. Jr., Begin C., Knoll A.T., Cohen B. M. Kappa-opioid ligands in the study and treatment of mood disorders. *Pharmacol. Ther.* 2009; 123 (3): 334-343.
12. Raehal K.M., Bohn L.M. Mu opioid receptor regulation and opiate responsiveness. *AAPS J.* 2005; 7 (3): 587-591.
13. Yekkirala A.S. Opioid receptors in analgesic drug design – the past, present and future. *J. of Postdoctoral Research*. 2013; 1 (4): 9-23.
14. Rusovici D.E., Negus S.S., Mello N.K., Bidlack J.M. Kappa-opioid receptors are differentially labeled by arylacetamides and benzomorphans. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; 485 (1): 119-125.
15. Nagase H., Fujii H. Opioids in preclinical and clinical trials. *Top. Curr. Chem.* 2011; 299: 29-62.
16. Aldrich J.V. Narcotic Analytics. *Am. J. Pharm. Educ.* 1993; 57: 153-161.
17. Piercey M.F., Einspahr F.J. Spinal analgesic actions of kappa receptor agonists, U 50488H and spiradolone (U-62066). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989; 251: 267-271.
18. Gharagozlou P., Hashemi E., DeLorey T.M., Clark D.G., Lameh J. Pharmacological profiles of opioid ligands at kappa opioid receptors. *BMC Pharmacol.* 2006; 6:3.
19. Kumar V., Marella, M.A., Cortes-Burgos L., Chang A.C., Cassel, J.A., Daubert, J.D. et al. Arylacetamides as peripherally restricted kappa opioid receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000; 10 (22): 2567-2570.
20. Vonvoigtlander P.F., Lahti R.A., Ludens J.H. U-50,488: a selective and structurally novel non-Mu (kappa) opioid agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1983; 224 (1): 7-12.
21. Pande A.C., Pyke R.E., Greiner M., Cooper S.A., Benjamin R., Pierce M.W. Analytical efficiency of the kappa-receptor agonist, enadoline, in dental surgery pain clinic. *Neuropharmacol.*, 19 (1), 92-97 (1996).
22. Kumor K.M., Haertzen C.A., Johnson R.E., Kocher T., Jasinski D. Human psychopharmacology of ketocyclazocine as compared with cyclazocine, morphine and placebo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986; 238 (3): 960-968.
23. Wadenberg M.L. A review of the properties of spiradolone: a potent and selective kappa-opioid receptor agonist. *CNS Dr. Rev.* 2003; 9 (2): 187-201.
24. Reece P.A., Sedman A.J., Rose S., Wright D.S., Dawkins R., Rajagopalan R. Diuretic effects, pharmaceuticals, and safety of a new centrally acting kappa-opioid agonist (CI-977) in humans. *J. Clin. Pharmacol.* 1994; 34 (11): 1126-1132.
25. Mironov A. N., ed. Guidelines for preclinical studies of drugs. Part 1. M.: Grif and K, 2012 (in Russian).
26. Buresh J., Buresova O., Houston J. P. Techniques and basic experiments for study of brain and behavior. M.: Higher school; 1991 (in Russian).
27. Shiotsuki H., Yoshim K., Shimo Y. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J. Neurosci. Methods.* 2010; 189 (2): 180-185.
28. Junkerov V.I., Grigoriev S.I. Mathematical and statistical processing of medical research data. Spb.: MMA, 2005 (in Russian).
29. Belenky M.L. Elements of quantitative assessment of pharmacological effect. L.: Medgiz; 1963 (in Russian).

A.F. Bykova, S.E. Galan, V.Yu. Malyagin, S.N. Subbotina

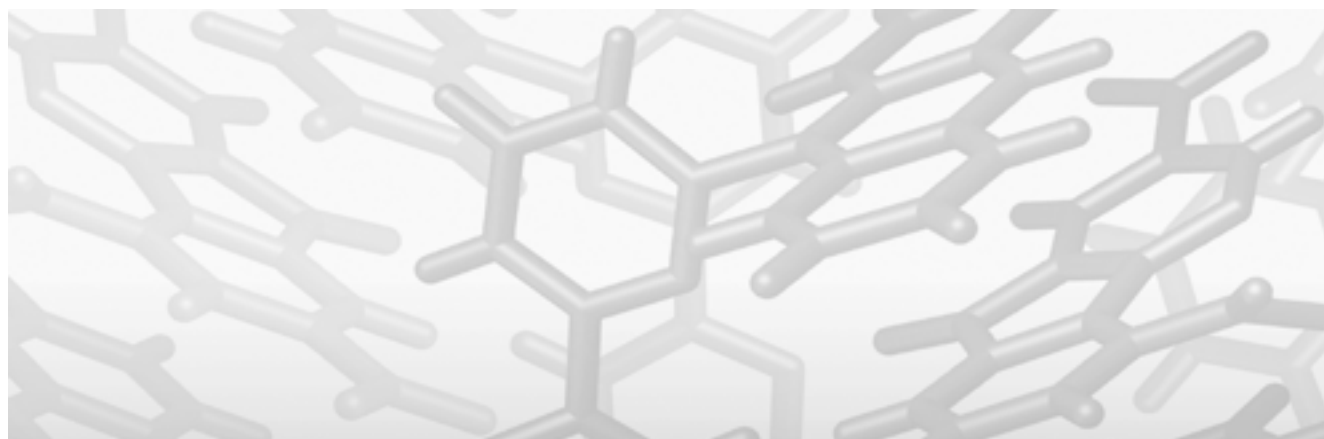
### SAFETY ASSESSMENT OF ARYLACETAMIDE DERIVATIVE GR 89,696 WITH ANALGESIC ACTIVITY

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

The analgesic activity and side effects of arylacetamide derivative GR 89,696 have been studied. It has been shown that the occurrence of analgesic effect is accompanied by a change in the ratio between pain and alternative patterns of behavior, while the decrease in the severity of normal behavior is observed only after the introduction of the sample at a maximum analgesic dose of 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The consistent developments of fading, adynamia, weakening of the flip reflex, a significant increase in diuresis are the side effects of intramuscular administration of the sample in the dose range of 1-100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Negative influence of the sample on respiratory and cardiovascular functions of animals has not been revealed. Therapeutic index (more than 2900) and safety factor (less than 0.02) calculated on the basis of the obtained data allow to consider GR 89,696 as a potential anesthetic, however, to establish the possibility of its practical use a more detailed study of the side effects of the compound is necessary.

**Keywords:** GR 89,696; opioid receptor agonists; side effects; analgesic activity.

Переработанный материал поступил в редакцию 07.05.2019 г.



УДК 615.076.9 : 615.91

# ИЗУЧЕНИЕ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИНА *IN VITRO*

Э.Р. Кудояров<sup>1</sup>, Д.Д. Каримов<sup>1</sup>,  
Т.Г. Кутлина<sup>1</sup>, Д.О. Каримов<sup>1</sup>,  
Г.Ф. Мухаммадиева<sup>1</sup>, Н.Ю. Хуснутдинова<sup>1</sup>,  
К.В. Данилко<sup>2</sup>, А.Р. Гимадиева<sup>3</sup>,  
А.Б. Бакиров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» Минздрава России, 450106, г. Уфа, Российская Федерация

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 450008, г. Уфа, Российская Федерация

<sup>3</sup>ФГБУН «Уфимский институт химии» РАН, 450054, г. Уфа, Российская Федерация

**В** статье представлены данные об экспериментальном изучении гепатопротекторной активности производных пиримидина (5-амино-6-метилурацил, 5-метиламино-6-метилурацил, 1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ила N-фталилвалинат, 5-пиперидинометил-6-метилурацил, 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацил) при инкубации гепатоцитов мыши МН-22а, затравленных тетрахлорметаном. Для определения жизнеспособности клеток использовали МТТ-тест. Положительным контролем были клетки, затравленные только тетрахлорметаном (100 мМ, 1% ДМСО). Среди соединений, исследованных в настоящем эксперименте, наибольшей эффективностью для выживания клеток печени в условиях затравки тетрахлорметаном обладали 5-амино-6-метилурацил (400 мкМ) и 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацил (50 мкМ). Повышение выживаемости клеток (относительно значений в группе положительного контроля) в условиях затравки тетрахлорметаном и лечения этими препаратами составило: 5-амино-6-метилурацил – до 27,5% ( $p < 0,05$ ), 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацил – до 22,42% ( $p < 0,05$ ). 5-метиламино-6-метилурацил и 1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ила N-фталилвалинат имеют низкую токсичность, но не проявили антиоксидантных свойств. 5-пиперидинометил-6-метилурацил (400 мкМ) проявил высокую токсичность ( $30,04 \pm 0,90\%$ ;  $p < 0,05$ ) и выживаемость обработанных им клеток при затравке тетрахлорметаном оказалась ниже или равна значениям положительного контроля, что не позволяет применять его в качестве антиоксиданта.

**Ключевые слова:** пиримидин, урацил, выживаемость, антиоксидант, *in vitro*.

**Введение.** Химические вещества, содержащие в своей структуре пиримидиновое кольцо, часто встречаются в природе и участвуют в биологических процессах (в частности, урацил, тимин, цитозин, группа витамина В<sub>1</sub>) [1]. Синтетические соединения, имеющие в составе пири-

мидиновое кольцо, представляют собой группу химических веществ с большим разнообразием фармакологических свойств. Заслуга в основополагающем изучении производных пиримидина и, особенно, метилурацила принадлежит Н. В. Лазареву [2]. Метилурацил ускоряет про-

**Кудояров Эльдар Ренатович (Kudoyarov Eldar Renatovich)**, младший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», e.kudoyarov@yandex.ru

**Каримов Денис Дмитриевич (Karimov Denis Dmitrievich)**, младший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», karriden@gmail.com

**Кутлина Татьяна Георгиевна (Kutlina Tatyana Georgievna)**, младший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», tatyana.kutlina.92@mail.ru

**Каримов Денис Олегович (Karimov Denis Olegovich)**, кандидат медицинских наук, заведующий отделом токсикологии и генетики ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», karimovdo@gmail.com

**Мухаммадиева Гузель Фанисовна (Mukhammadieva Guzel Fanisovna)**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», ufniiimt@mail.ru

**Хуснутдинова Надежда Юрьевна (Khusnutdinova Nadezhda Yurevna)**, научный сотрудник отдела токсикологии и генетики ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», h-n-yu@yandex.ru

**Данилко Ксения Владимировна (Danilko Kseniya Vladimirovna)**, кандидат биологических наук, доцент, руководитель лаборатории клеточных культур, старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава РФ, kse-danilko@yandex.ru

**Гимадиева Альфия Раисовна (Gimadieva Alfiya Raisovna)**, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакофорных циклических систем ФГБУН «Уфимский институт химии» РАН, alf\_gim@mail.ru

**Бакиров Ахат Бариевич (Bakirov Akhat Barievich)**, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», fbun@uniimtech.ru

цессы клеточной регенерации, ускоряет заживление ран, стимулирует клеточные и тканевые факторы защиты, стимулирует лейко- и эритропоэз [1]. Оксиметилурацил всесторонне был изучен коллективом ученых под руководством В. А. Мышкина [3]. Производные пиримидина используют в терапии инфекционных, хирургических, неврологических, онкологических и многих других заболеваний [4-6].

Тетрахлорметан относят к веществам, часто применяемым в модельных системах для развития окислительного стресса. При поступлении тетрахлорметана (ТХМ) в организм млекопитающего в гепатоцитах происходит нарушение структуры и функций клеточных мембран, приводящее к генерации активных форм кислорода и перекисному окислению биомолекул клетки [3]. Одним из результатов интоксикации ТХМ является образование аддуктов АФК с ДНК [3,7], что может привести к возникновению мутаций [3, 8].

В лаборатории фармакофорных циклических систем Уфимского института химии РАН были разработаны и синтезированы следующие вещества, потенциально имеющие антиоксидантные свойства: 5-амино-6-метилурацил, 5-метиламино-6-метилурацил, 1,3,6-триметил-2,4-диоксо-тетрагидропиримидин-5-ила N-фталилваллилат, 5-пиперидинометил-6-метилурацил, 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацил [2,9].

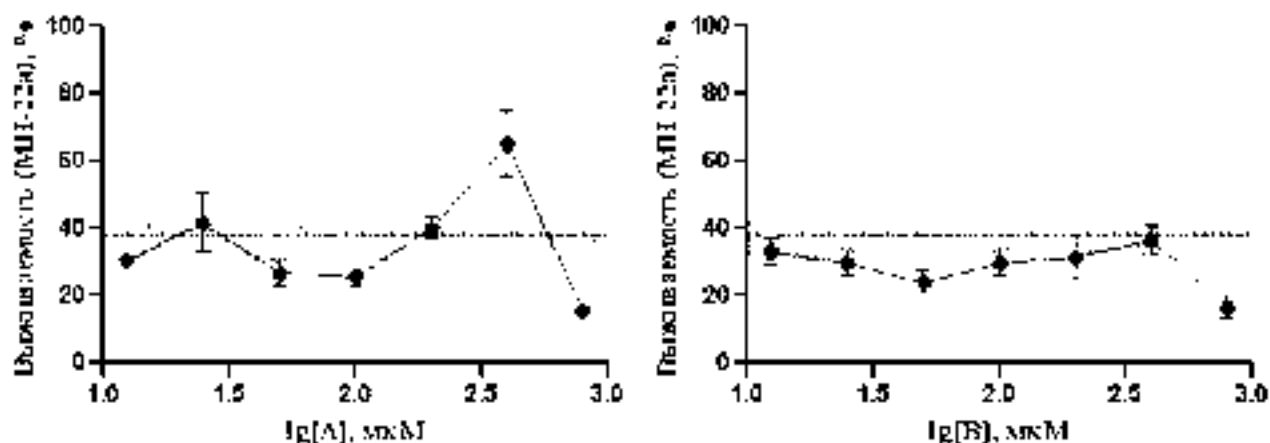
*Цель нашего исследования:* определение антиоксидантной активности вышеупомянутых веществ на культуре гепатоцитов мыши МН-22а и интерпретация полученных данных для дальнейшей характеристики исследуемых субстанций *in vivo*.

**Материалы и методы исследования.** Исследование антиоксидантных свойств веществ выполнено на клеточной линии МН-22а (мышь СЗНА, гепатома, монослой; «Биолот»). Культура клеток была посеяна в стерильные 96-луночные планшеты для адгезионных клеточных культур (SPL Life Sciences, Республика Корея). Для затравки клеток были сформированы экспериментальные группы: интактные клетки (отрицательный контроль); клетки, затравленные 100 мМ ТХМ (положительный контроль); клетки, затравленные испытуемым веществом в концентрации 400 мкМ; клетки, затравленные 100 мМ раствором ТХМ и обработанные испытуемым веществом в одной из 7 концентраций (12,5, 25, 50, 100, 200, 400 или 800 мкМ). На каждом микропланшете определялась выживаемость клеток в группах положительного и отрицательного контролей.

Все группы клеток инкубировали 48 часов после затравки ТХМ и добавления растворов со-

единений. Для растворения тетрахлорметана применяли диметилсульфоксид (ДМСО), который также содержался в питательной среде для культивирования клеток в каждой из экспериментальных групп (1% об.). Для измерения метаболической активности и последующего расчета выживаемости инкубированных клеток с помощью МТТ-теста по оптической плотности культуральной среды руководствовались методикой СТП14.621.21.0008.12-2015 [10]. Оптическую плотность растворов измеряли на многофункциональном микропланшетном ридере Spark 20M (Tecan, Швейцария) при длинах волн света 530 и 620 нм. Для проверки статистической достоверности различий между группами по оптической плотности применяли критерий Краскела-Уоллиса для сравнения нескольких независимых выборок и критерий Манна-Уитни для сравнения двух независимых выборок. По каждой группе были рассчитаны среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего. Полученные значения выживаемости клеток использовали для построения графиков зависимости от концентрации исследуемых веществ. Заштрихованной областью на графиках для наглядности обозначены среднее арифметическое и ошибку среднего выживаемости клеток группы положительного контроля. Статистический анализ результатов выполнен в программе SPSS Statistics 21. Построение графиков выполнено в программе GraphPad Prism 8. Обработка рисунков произведена в программе Adobe Photoshop CS3. Для оценки гепатозащитных свойств находили разность (P) между значениями выживаемости экспериментальной группы и группы клеток, затравленной 100 мМ раствором ТХМ. Экспериментальная часть работы была выполнена в лаборатории клеточных культур Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава РФ.

**Результаты и обсуждение.** Влияние 5-амино- и 5-метиламино-6-метилурацила было проверено на клетках, культивированных на одном микропланшете. Выживаемость в группе клеток, обработанных только 400 мкМ 5-амино-6-метилурацилом составила  $96,35 \pm 5,92\%$  ( $p > 0,05$ ) относительно группы отрицательного контроля, что указывает на отсутствие токсичности соединения. Выживаемость в группе клеток, затравленных 100 мМ ТХМ составила в среднем  $37,75 \pm 4,68\%$ . Различия между экспериментальными группами, обработанными 5-амино-6-метилурацилом и положительным контролем являются статистически значимыми (критерий Краскала-Уоллиса  $H=17,707$ ;  $p=0,013$ ). Средняя выживаемость клеток, затравленных ТХМ и обработанных 400 мкМ 5-амино-6-метилурацилом была равна  $65,25 \pm 9,85\%$ . Выживаемость



**Рис. 1.** Графики зависимости выживаемости от логарифма концентрации 5-амино-6-метилурацила (А) и 5-метиламино-6-метилурацила (В) при затравке тетрахлорметаном.

при упомянутой концентрации соединения явилась наивысшей среди экспериментальных групп и оказалась на 27,5% выше, чем в группе клеток, затравленных только 100 мМ ТХМ ( $p < 0,05$ ) (рис.1).

Выживаемость в группе клеток, обработанных только 400 мкМ 5-метиламино-6-метилурацилом составила  $81,45 \pm 2,19\%$ , что указывает на токсичность соединения относительно группы отрицательного контроля ( $p < 0,05$ ). Различия между экспериментальными группами, обработанными 5-метиламино-6-метилурацилом, и положительным контролем являются статистически незначимыми (критерий Крускала-Уоллиса  $H=10,867$ ;  $p=0,145$ ) (рис. 1). Выявленный факт указывает на неэффективность применения 5-метиламино-6-метилурацила для преодоления окислительного воздействия тетрахлорметана. Сравнение химической структуры 5-амино-6-метилурацила и 5-метиламино-6-метилурацила позволяет предположить, что причина разницы в результатах эксперимента вызваны наличием метильной группы, ковалентно связанной с аминогруппой в С5-положении. Кроме того, возможно, антиоксидантные свойства молекулы 5-амино-6-метилурацила могут быть связаны с тем, что аминогруппа является донором ионов водорода, которые реагируют с анионами, образующимися при окислительном стрессе. Важность отсутствия метильной группы, связанной с аминогруппой в С5-положении также подтверждает ранее обнаруженный факт, что при экспресс-оценке антиоксидантной активностиДФПГ-тестом [9] 5-амино-6-метилурацил проявлял более высокие антиоксидантные свойства ( $IC_{50}=5$  мкг/мл;  $fk_7^1$

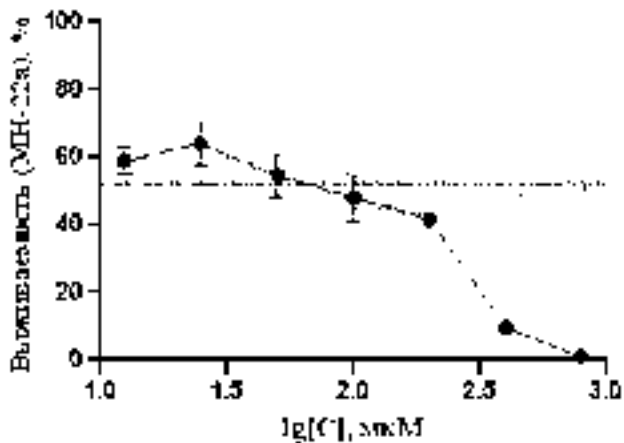
(333 K) =  $(1,44 \pm 0,14) \cdot 10^5 M^{-1}c^{-1}$ ), по сравнению с 5-метиламино-6-метилурацилом ( $IC_{50}=20$  мкг/мл;  $fk_7$ (333 K) =  $(3,8 \pm 0,4) \cdot 10^3 M^{-1}c^{-1}$ ).

Выживаемость в группе клеток, обработанных только 400 мкМ 5-пиперидинометил-6-метилурацилом составила  $30,04 \pm 0,90\%$ , что указывает на повышенную токсичность соединения ( $p < 0,05$ ). Различия между экспериментальными группами, обработанными 5-пиперидинометил-6-метилурацилом, и положительным контролем являются статистически значимыми (критерий Крускала-Уоллиса  $H=16,651$ ;  $p=0,02$ ). Однако, средняя выживаемость клеток, затравленных ТХМ и инкубированных с 5-пиперидинометил-6-метилурацилом была ниже (при концентрациях 400, 800 мкМ;  $p < 0,05$ ) или не отличалась от значений (при концентрациях 12,5, 25, 50, 100, 200 мкМ;  $p > 0,05$ ) в группе клеток, затравленных только 100 мМ ТХМ ( $51,61 \pm 8,40\%$ ) при попарном сравнении с применением критерия Манна-Уитни (рис.2). Из полученных результатов можно сделать вывод о том, что совместная инкубация в клеточной среде синтетического соединения (400 мкМ) с тетрахлорметаном приводит к повышению суммарной токсичности ( $p < 0,05$ ), что констатирует неэффективность применения 5-пиперидинометил-6-метилурацила в качестве антиоксиданта.

Выживаемость в группе клеток, обработанных только 400 мкМ 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацилом составила  $82,00 \pm 1,12\%$ , что указывает на повышенную токсичность соединения ( $p < 0,05$ ). Различия между экспериментальными группами и положительным контролем являются статистически значимыми (критерий Крускала-Уоллиса  $H=16,467$ ;  $p=0,021$ ). Однако, выживаемость гепатоци-

<sup>1</sup>  $fk_7$  – константа скорости реакции пероксидных радикалов 1,4-диоксана с производными урацила ( $f$  – стехиометрический коэффициент ингибирования) [9].





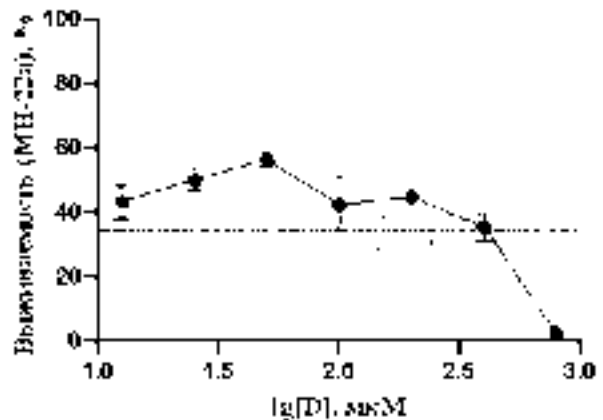
**Рис. 2.** График зависимости выживаемости от логарифма концентрации 5-пиперидинометил-6-метилурацила (С) при затравке тетрахлорметаном.

тов, затравленных ТХМ и инкубированных с 50 мкМ 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацилом составила  $56,63 \pm 2,13\%$ , что на 22,42% выше аналогичного показателя в положительном контроле ( $p < 0,05$ ) (рис.3). Полученный результат свидетельствует о наличии антиоксидантных свойств у 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацила.

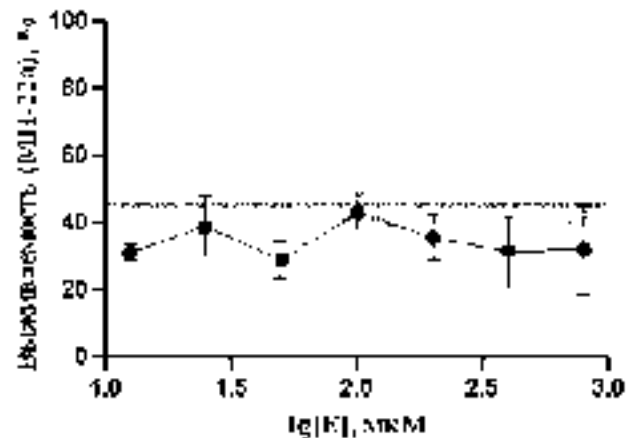
Еще одно из исследованных производных урацила – 1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ила N-фталилвалинат (соединение Е) представляет собой конъюгат производного пиримидина с аминокислотой валином. Выживаемость в группе клеток, обработанных 400 мкМ соединением Е без затравки ТХМ составила  $95,26 \pm 4,07\%$ , что указывает на отсутствие токсичности испытываемого вещества ( $p > 0,05$ ).

Статистически достоверных различий между экспериментальными группами и положительным контролем нет (рис. 4) (критерий Крускала-Уоллиса  $H=4,579$ ;  $p=0,711$ ), что исключает необходимость дальнейшего изучения выраженности антиоксидантных свойств у соединения Е.

**Заключение.** Таким образом, среди соединений, исследованных в настоящем эксперименте, наибольшей эффективностью для выживания клеток печени в условиях затравки тетрахлорметаном обладали 5-амино-6-метилурацил (400 мкМ) и 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацил (50 мкМ). Повышение выживаемости клеток (относительно значений в группе положительного контроля) в условиях затравки тетрахлорметаном и составило при обработке: 5-амино-6-метилурацилом – до 27,5% ( $p < 0,05$ ), 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацилом – до 22,42% ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 3.** График зависимости выживаемости от логарифма концентрации 3-морфолинометил-5-нитро-6-метилурацила (D) при затравке тетрахлорметаном. Выживаемость при затравке 100 мМ тетрахлорметаном составила  $34,21 \pm 5,52\%$ .



**Рис. 4.** График зависимости выживаемости от логарифма концентрации 1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ила N-фталилвалината (Е) при затравке тетрахлорметаном. Выживаемость при затравке 100 мМ тетрахлорметаном составила  $45,29 \pm 5,69\%$ .

5-метиламино-6-метилурацил и 1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ила N-фталилвалинат имеют низкую токсичность, но не проявили антиоксидантных свойств. 5-пиперидинометил-6-метилурацил (400 мкМ) проявил высокую токсичность ( $30,04 \pm 0,90\%$ ;  $p < 0,05$ ) и выживаемость обработанных им клеток при затравке тетрахлорметаном оказалась ниже или равна значениям положительного контроля, что констатирует неэффективность его применения в качестве антиоксиданта.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна; 2002.
2. Гимадиева А.Р., Чернышенко Ю.Н., Абдрахманов И.Б., Мустафин А.Г. Синтез, модификации и биологическая активность урацилов. Уфа: Гилем; 2013.
3. Мышкин В.А., Ибатуллина Р.Б., Бакиров А.Б. Поражение печени химическими веществами (функционально-метаболические нарушения, фармакологическая коррекция). Уфа: Гилем; 2007.
4. Петрова И.В., Катаев В.А., Мещерякова С.А., Николаева К.В., Мунасипова Д.А., Фархутдинов Р.Р. Антиоксидантные свойства производных пиримидина. Медицинский вестник Башкортостана. 2013; 8(4):64-7.
5. Самотруева М.А., Цибизова А.А., Ясенявская А.Л., Озеров А.А., Тюренков И. Н. Фармакологическая активность производных пиримидинов. Астраханский медицинский журнал. 2067(4):44-6
6. Зимин Ю.С., Борисова Н.С., Тимербаева Г.Р., Гимадиева А.Р., Мустафин А.Г. Получение, токсичность и противовоспалительная активность комплексных соединений производных урацила с полифункциональными кислотами. Химико-фармацевтический журнал. 2016; 50(10):22-6.
7. Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями. Успехи биологической химии. 2013; 53:245-96
8. de Fouw J. Environmental Health Criteria 208, Carbon Tetrachloride. Available at: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc208.htm>. (Accessed 9 March 2019).
9. Гимадиева А.Р., Хазимуллина Ю.З., Белая Е.А., Зимин Ю.С., Абдрахманов И.Б., Мустафин А.Г. Экспресс-оценка антиоксидантной активности производных урацила. Биомедицинская химия. 2015; 61(6):765-9.
10. СТП-14.621.21.0008.12-20 Методика определения цитотоксичности веществ МТТ-тестом на культуре нормальных клеток человека HEK-2 Черногловка: Издательство ИФАВ; 2015.

## REFERENCES:

1. Mashkovsky M.D. Medicines. Moscow: New wave; 2002 (in Russian).
2. Gimadieva A.R., Chernyshenko Yu.N., Abdrakhmanov I.B., Mustafin A.G. Synthesis, modifications and biological activity of uracils. Ufa: Gilem; 2013 (in Russian).
3. Myshkin V.A., Ibatullina R.B., Bakirov A.B. Liver damage by chemicals (functional and metabolic disorders, pharmacological correction). Ufa: Gilem; 2007 (in Russian).
4. Petrova I.V., Kataev V.A., Meshcheryakova S.A., Nikolaeva K.V., Munasipova D.A., Farkhutdinov R.R. Antioxidant properties of pyrimidine derivatives. Medical Bulletin of Bashkortostan. 2013; 8(4):64-7 (in Russian).
5. Samotrueva M.A., Tsibizova A.A., Yasyavskaya A.L., Ozerov A.A., Tyurenkov I. N. Pharmacological activity of pyrimidine derivatives. Astrakhan Medical Journal. 2067(4):44-6 (in Russian).
6. Zimin Yu.S., Borisova N.S., Timerbaeva G.R., Gimadieva A.R., Mustafin A.G. Complexes of uracil derivatives with polyfunctional acids: preparation, toxicity and anti-inflammatory activity. Chemical and Pharmaceutical Journal. 2016; 50(10):226 (in Russian).
7. Grivennikova V.G., Vinogradov A.D. Generation of reactive oxygen species by mitochondria. // Advances in biological chemistry. 2013; 53:245-96 (in Russian).
8. de Fouw J. Environmental Health Criteria 208, Carbon Tetrachloride. Available at: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc208.htm>. (Accessed 9 March 2019).
9. Gimadieva A.R., Khazimullina Yu.Z., Belaya E.A., Zimin Yu.S., Abdrakhmanov I.B., Mustafin A.G. Rapid assessment of antioxidant activity of uracil derivatives. Biomedical chemistry. 2015; 61(6):765-9 (in Russian).
10. STP-14.621.21.0008.12-20 Methods of determining the cytotoxicity of MTT-test substances on the culture of normal human cells HEK-2 Chernogolovka: IPAC Publ., 2015 (in Russian).

*E.R. Kudoyarov<sup>1</sup>, D.D. Karimov<sup>1</sup>, T.G. Kutlina<sup>1</sup>, D.O. Karimov<sup>1</sup>, G.F. Mukhammadieva<sup>1</sup>, N.Yu. Khusnutdinova<sup>1</sup>, K.V. Danilko<sup>2</sup>, A.R. Gimadieva<sup>3</sup>, A.B. Bakirov<sup>1</sup>*

### RESEARCH OF HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY OF PYRIMIDINE DERIVATIVES IN VITRO

<sup>1</sup>Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, 450106, Ufa, Russian Federation

<sup>2</sup>Bashkir State Medical University, 450008, Ufa, Russia Federation

<sup>3</sup>Ufa Institute of Chemistry, Ufa Branch of RAS, 450054, Ufa, Russian Federation

The article presents data on experimental study of the hepatoprotective activity of pyrimidine derivatives (5-amino-6-methyluracil, 5-methylamino-6-methyluracil, 1,3,6-trimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl N-phtalyl valinate, 5-piperidinomethyl-6-methyluracil, 3-morpholinomethyl-5-nitro-6-methyluracil) by incubation of mouse hepatocytes MH-22a poisoned with carbon tetrachloride. MTT-test was used to determine cell viability. Positive control was cells treated only with carbon tetrachloride (100 mM, 1% DMSO). Among compounds studied in this experiment 5-amino-6-methyluracil (400 μM) and 3-morpholinomethyl-5-nitro-6-methyluracil (50 μM) were the most effective for the survival of liver cells under seeding conditions. The increase in cell survival (relative to the values in the positive control group) under the conditions of tetrachloromethane priming and treatment with these drugs was up to 27,5% ( $p < 0,05$ ) for 5-amino-6-methyluracil and 22,42% ( $p < 0,05$ ) for 3-morpholinomethyl-5-nitro-6-methyluracil. The compounds 5-methylamino-6-methyluracil and 1,3,6-trimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl N-phtalyl valinate have low toxicity, but did not show antioxidant properties. The derivative 5-piperidinomethyl-6-methyluracil (400 μM) showed high toxicity ( $30,04 \pm 0,90\%$ ;  $p < 0,05$ ) and the survival of the cells treated with carbon tetrachloride was lower or equal to the values of positive control, which does not allow it to be used as an antioxidant.

**Keywords:** pyrimidine, uracil, survival, antioxidant, in vitro.

Материал поступил в редакцию 02.04.2019 г.

УДК 613.63 : 615.917 : 547-326

# МАТЕРИАЛЫ ПО ОБОСНОВАНИЮ ГИГИЕНИЧЕСКИХ НОРМАТИВОВ Н-ПЕНТИЛОВОГО ЭФИРА ХЛОРМУРАВЬИНОЙ КИСЛОТЫ В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ И В АТМОСФЕРЕ

М.В. Бидевкина<sup>1</sup>, М.И. Голубева<sup>2</sup>,  
Г.П. Панкратова<sup>1</sup>, А.В. Лиманцев<sup>1</sup>,  
И.Н. Разумная<sup>2</sup>, А.Л. Караев<sup>1</sup>,  
Т.Н. Потапова<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>АО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ» (АО «ВНЦ БАВ»), г. Старая Купавна Московской области, Российская Федерация

**П**ентилхлорформиат относится к умеренно токсичным веществам при введении в желудок ( $DL_{50}$  для белых мышей  $1000,0 \pm 86,0$  мг/кг), оказывает выраженное раздражающее действие на кожу и слизистую оболочку глаз, не обладает кожно-резорбтивным и сенсибилизирующим действием, слабо кумулирует в организме. При ингаляции проявляет избирательное раздражающее действие на состояние дыхательной системы. Порог раздражающего действия для крыс составляет  $7,8$  мг/м<sup>3</sup>, для человека –  $2,3$  мг/м<sup>3</sup>. Для пентилхлорформиата рекомендованы к утверждению гигиенические нормативы: ПДК в воздухе рабочей зоны –  $0,5$  мг/м<sup>3</sup> (пары, 2 класс опасности, с пометкой «требуется специальная защита кожи и глаз»); ОБУВ в атмосферном воздухе населенных мест –  $0,005$  мг/м<sup>3</sup>.

**Ключевые слова:** пентилхлорформиат, токсичность, раздражающее действие, крысы, гигиеническое нормирование.

**Введение.** Эфиры хлормуравьиной кислоты относятся к веществам с выраженным раздражающим действием. По физико-химическим свойствам и характеру биологического действия к н-пентилловому эфиру хлормуравьиной кислоты близкими соединениями, для которых установлены ПДК в воздухе рабочей зоны, являются сложные эфиры хлормуравьиной кислоты – метиловый (метилхлорформиат,  $C_2H_5ClO_2$ , CAS 79-22-1), этиловый (этилхлорформиат, этилхлоркарбонат,  $C_3H_7ClO_2$ , CAS 541-41-3) и изопропиловый (изопропилхлоркарбонат, 2-метилхлорформиат,  $C_4H_9ClO_2$ , CAS 108-23-6).

Сравнительная характеристика параметров токсикометрии этих веществ приведена в таблице 1. Как следует из представленных данных, наиболее токсичен из них метилхлорформиат: чрез-

вычайно опасен при ингаляционном воздействии, высоко опасен при введении в желудок и умеренно опасен при нанесении на кожу (1, 2 и 3 классы опасности по ГОСТ 12.1.007-76 соответственно). Порог острого ингаляционного действия для крыс установлен на уровне  $50$  мг/м<sup>3</sup> по изменению нервно-мышечной возбудимости, частоты дыхания, содержанию каталазы в крови [1].

Этилхлорформиат относится к высоко опасным веществам при ингаляционном воздействии, умеренно опасным при введении в желудок и мало опасным при нанесении на кожу кроликов. Порог острого интегрального ингаляционного действия установлен на уровне  $17,8$  мг/м<sup>3</sup> по изменению состояния нервной, дыхательной систем, функции почек. Порог раздражающего действия установлен на уровне  $2,3$  мг/м<sup>3</sup> по снижению ча-

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

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

**Панкратова Галина Павловна (Pankratova Galina Pavlovna)** кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории токсикологии дезинфекционных средств ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора, gala@onrush.ru

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

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

**Караев Андрей Львович (Karaev Andrey L'vovich)**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории токсикологии дезинфекционных средств ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора, karaev-al@mail.ru

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

стоты дыхания и изменению клеточного состава смывов из дыхательных путей. К изопропилхлорформиату наиболее чувствительны мыши при ингаляционном и накожном воздействии (1 класс чрезвычайно опасных веществ). При введении в желудок на уровне  $DL_{50}$  (560 мг/кг) мыши погибают через 10-15 мин, клиническая картина отравления характеризуется затрудненным дыханием, судорогами [1].

В связи с производством новой активной фармацевтической субстанции, используемой для получения противоопухолевого препарата капецитабина, проведено исследование токсичности и опасности промежуточного продукта синтеза пентилхлорформиата с целью обоснования ПДК в воздухе рабочей зоны и ОБУВ в атмосферном воздухе городских и сельских поселений (населенных мест).

**Материалы и методы исследования.** Пентилхлорформиат (н-пентилловый эфир хлормуравьиной кислоты, пентилхлоркарбонат) – бесцветная прозрачная жидкость с резким запахом. № CAS: 638-41-5. Эмпирическая формула:  $C_6H_{11}ClO_2$ . М. м.: 150,6. Ткип: 159-165°C при давлении 760 мм рт. ст., Твспышки: 47,7-53,0°C. Плотность: 1,048 г/см<sup>3</sup>. Давление паров: 1,92 мм рт.ст. при 25°C. Нерастворим в воде, хорошо растворим в метаноле, этаноле, гексане.

Исследование токсичности, опасности и характера биологического действия пентилхлор-

формиата проводили при различных путях поступления в организм на 100 белых беспородных крысах, 70 белых беспородных мышах и 6 кроликах в соответствии с существующими методическими указаниями [2-4]. Сенсибилизирующее действие вещества изучали на мышах по реакции гиперчувствительности замедленного типа. Динамические ингаляционные затравки животных проводили в затравочных камерах объемом 200 литров. Функцию дыхательной системы изучали с помощью комплекса оценки кардиореспираторной системы мелких лабораторных животных, на котором регистрировали частоту дыхания. Как показатель раздражающего действия вещества исследовали клеточную реакцию легких и верхних дыхательных путей по методу Г.С. Комовникова [3]. Для этого через 1 час после однократной ингаляционной затравки у животных под тиопенталовым наркозом получали смывы из носоглотки и легких. Общее количество клеток подсчитывали в камере Горяева. На цитологических препаратах подсчитывали количество основных клеточных элементов: нейтрофилов, лимфоцитов и макрофагов.

Состояние нервной системы оценивали по изменению поведенческих реакций: методы «открытого поля» и «темной камеры с отверстиями» (ТКСО), регистрации порога нервно-мышечной возбудимости по методу С.В. Сперанского.

Таблица 1

### Характеристика параметров токсикометрии сложных эфиров хлормуравьиной кислоты

Параметры токсикометрии	Метилхлорформиат	Этилхлорформиат	Изопропилхлорформиат
$CL_{50}$ , крысы, мг/м <sup>3</sup>	450	840	>1000
$CL_{50}$ , мыши, мг/м <sup>3</sup>	185	-	200
C20, мыши	-	100% гибель	-
$DL_{50}$ , в/ж, крысы, мг/кг	60	210-270	630-1070
$DL_{50}$ , в/ж, мыши, мг/кг	67	870	178-560
$DL_{50}$ , н/к, мыши, мг/кг,	1750	7120	12, 1
$DL_{50}$ , н/к, кролики, мг/кг,	7120	-	1130
Limac int, крысы, мг/м <sup>3</sup>	50	17,8	-
Limir, крысы, мг/м <sup>3</sup>	-	2,3	-
Limir, человек, мг/м <sup>3</sup>	2	-	-
Limch, крысы, мг/м <sup>3</sup>	0,2	-	-
ПДкр.з., мг/м <sup>3</sup>	0,05	0,2	0,1
ОБУВатмосф. мг/м <sup>3</sup>	0,001	-	-

Для оценки функционального состояния печени в сыворотке крови подопытных животных измеряли активность ферментов: аминотрансфераз (АЛТ и АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), лактатдегидрогеназы и холинэстеразы. В сыворотке крови крыс также определяли содержание глюкозы и креатинина. Функцию почек оценивали по суточному количеству мочи и содержанию в ней общего белка, креатинина, хлоридов, глюкозы. Биохимический анализ крови и мочи проводили на автоматическом биохимическом фотометре Cham Well (Австрия). В периферической крови регистрировали общее количество эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов и тромбоцитов. Исследования выполняли в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Оценку достоверности различия данных подопытной и контрольной групп животных проводили по критерию Стьюдента, руководствуясь 5% ( $p < 0,05$ ) уровнем значимости с учетом числа животных, используемых в каждом опыте.

**Результаты и обсуждение.** Величина  $DL_{50}$  пентилхлорформиата при введении в желудок для белых мышей составила  $1000,0 \pm 86,0$  мг/кг, для белых крыс (методом одной точки) –  $750$  мг/кг (3 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76). Клиническая картина отравления проявлялась первоначальным возбуждением, сменявшимся в дальнейшем заторможенным состоянием, у животных наблюдали вялость, скученность, неопрятный внешний вид. При нанесении на кожу мышей вещества в дозе  $2500$  мг/кг гибели животных не отмечали (4 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76). В условиях статической затравки пары пентилхлорформиата в концентрации, близкой к насыщающей ( $C_{20}$ ), обладают выраженным токсическим действием, вызывая гибель подопытных мышей. Вещество оказывает выраженное раздражающее действие на кожу и слизистую оболочку глаз кроликов, не обладает кожно-резорбтивным и сенсibiliзирующим действием.  $Sc_{50}$ , установленный на мышах по методу Lim et al, составил  $4,7$ , что свидетельствует об слабой кумулятивной активности пентилхлорформиата в организме.

Для определения  $Lim_{ac}$  и  $Lim_{ir}$  пентилхлорформиата испытаны 4 концентрации:  $56,2 \pm 6,3$ ;  $27,0 \pm 2,5$ ;  $7,8 \pm 1,7$  и  $2,1 \pm 0,1$  мг/м<sup>3</sup>. Как показали проведенные исследования, пентилхлорформиат при ингаляции оказывает на экспериментальных животных раздражающее и общетоксическое действие. Раздражающие свойства выявлены в концентрациях  $56,2$ ;  $27,0$  и  $7,8$  мг/м<sup>3</sup>. Изменение частоты дыхания (дыхательных движений/мин) зарегистрировано при воздействии на уровне  $56,2$

мг/м<sup>3</sup> (опыт:  $97,4 \pm 5,4$ , контроль:  $128,9 \pm 6,0$ ,  $p < 0,01$ ) и  $27,0$  мг/м<sup>3</sup> (опыт:  $104,5 \pm 6,6$ , контроль:  $127,0 \pm 6,1$ ,  $p < 0,05$ ).

Ингаляция пентилхлорформиата в концентрации  $27,0$  мг/м<sup>3</sup> приводила к увеличению общего количества клеток в смывах из легких крыс, а также изменению клеточного состава: увеличению эпителиальных клеток и снижению нейтрофилов в смывах из носоглотки и росту числа лимфоцитов в смывах из легких (табл. 2).

При воздействии вещества в концентрации  $7,8$  мг/м<sup>3</sup> установлено изменение состава клеток в смывах, аналогичное воздействию в более высокой концентрации. Пентилхлорформиат в концентрации на уровне  $2,1$  мг/м<sup>3</sup> не вызывал изменения частоты дыхания и клеточного состава смывов из дыхательных путей.

Полученные данные позволили установить  $Lim_{ir}$  пентилхлорформиата на уровне  $7,8$  мг/м<sup>3</sup> по изменению состава клеток в смывах из носоглотки и легких.

Пентилхлорформиат в концентрациях  $56,2$  и  $27,0$  мг/м<sup>3</sup> оказывал токсическое действие на нервную систему, печень и почки. При воздействии максимальной концентрации в тесте «ТКСО» выявлено снижение количества выгладываний (опыт:  $1,5 \pm 0,7$ , контроль:  $4,9 \pm 1,2$ ,  $p < 0,05$ ), ректальной температуры (опыт:  $38,4 \pm 0,2$ , контроль:  $39,6 \pm 0,3^\circ\text{C}$ ,  $p < 0,01$ ). В сыворотке крови обнаружено повышение уровня АСТ (опыт:  $75,0 \pm 2,7$ , контроль:  $63,2 \pm 3,2$  Е/л,  $p < 0,02$ ), ЩФ (опыт:  $80,8 \pm 10,4$ , контроль:  $42,8 \pm 6,5$  Е/л,  $p < 0,02$ ), содержания глюкозы (опыт:  $4,07 \pm 0,34$ , контроль:  $2,46 \pm 0,23$  мМ/л,  $p < 0,01$ ). Нарушение почечных функций проявлялось в увеличении содержания хлоридов в моче (опыт:  $70,6 \pm 12,1$ , контроль:  $28,0 \pm 2,42$  мМ/л,  $p < 0,01$ ). Кроме того, в периферической крови отмечено повышенное содержание эритроцитов (опыт:  $7,82 \pm 0,08$ , контроль:  $7,03 \pm 0,13$  10<sup>12</sup>/л,  $p < 0,001$ ) и гемоглобина (опыт:  $148 \pm 2,36$ , контроль:  $137 \pm 2,67$  г/л,  $p < 0,01$ ).

Концентрация вещества на уровне  $27,0$  мг/м<sup>3</sup> вызывала снижение вертикальной подвижности в тесте «открытое поле» (опыт:  $7,9 \pm 0,9$ , контроль:  $11,4 \pm 1,2$ ,  $p < 0,05$ ), ректальной температуры (опыт:  $38,5 \pm 0,4$ , контроль:  $39,7 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ,  $p < 0,01$ ), а также повышение активности ЩФ в сыворотке крови (опыт:  $86,8 \pm 11,3$ , контроль:  $54,7 \pm 6,7$  Е/л,  $p < 0,05$ ) и содержания хлоридов в моче (опыт:  $67,9 \pm 7,26$ , контроль:  $38,8 \pm 4,57$  мМ/л,  $p < 0,01$ ). Пентилхлорформиат в концентрации  $7,8$  мг/м<sup>3</sup> не влиял на все указанные показатели. Следовательно,  $Lim_{ac}$  пентилхлорформиата находится на уровне  $27$  мг/м<sup>3</sup> по изменению показателей состояния нервной системы, печени и почек.

Таким образом, лимитирующим показателем вредного действия паров вещества при ингаляции оказалось функциональное состояние

**Клеточный состав смывов из носоглотки и легких после однократной ингаляции паров пентилхлорформиата в различных концентрациях**

Показатели	Группы	Концентрация, мг/м <sup>3</sup>		
		27,0±2,5	7,8±1,7	2,1±0,15
НОСОГЛОТКА				
Лимфоциты, на 100 клеток	Опыт	48,0±4,6	54,5±3,3	50,0±2,3
	Контроль	52,3±1,7	52,3±3,3	48,0±3,4
Нейтрофилы, на 100 клеток	Опыт	28,5±2,6*	23,2±2,8*	37,7±1,3
	Контроль	36,0±1,8	31,5±2,3	34,6±2,7
Эпителиальные клетки, на 100 клеток	Опыт	23,5±3,6*	16,2±1,9*	12,3±1,3
	Контроль	11,7±1,2	22,3±1,3	17,4±2,1
Общее количество клеток, 10 <sup>9</sup> /л	Опыт	0,30±0,05	0,34±0,09	0,32±0,05
	Контроль	0,35±0,10	0,30±0,06	0,31±0,07
ЛЕГКИЕ				
Лимфоциты, на 100 клеток	Опыт	51,7±2,3*	54,8±3,2*	39,3±2,7
	Контроль	45,2±1,6	45,3±1,8	42,3±3,4
Нейтрофилы, на 100 клеток	Опыт	29,0±2,7	25,0±2,1	30,2±2,4
	Контроль	35,1±2,7	29,3±1,8	29,8±1,2
Макрофаги, на 100 клеток	Опыт	7,7±0,6	10,0±1,0	13,3±1,1
	Контроль	9,5±0,7	12,2±1,8	13,0±1,1
Эпителиальные клетки, на 100 клеток	Опыт	11,8±1,1	10,2±0,7	17,2±1,1
	Контроль	9,8±1,6	13,2±1,1	14,9±1,3
Общее количество клеток, 10 <sup>9</sup> /л	Опыт	2,19±0,29*	1,13±0,14	1,12±0,14
	Контроль	1,31±0,16	1,10±0,12	1,14±0,10

Примечание: \* достоверное отличие -  $p < 0,05$

дыхательной системы. Порог острого действия пентилхлорформиата для крыс по интегральным показателям составляет 27,0 мг/м<sup>3</sup>,  $Lim_{ir}$  – 7,8 мг/м<sup>3</sup>,  $Zir = 3,5$ . Порог раздражающего действия пентилхлорформиата для человека составил  $2,31 \pm 0,41$  мг/м<sup>3</sup>.

Исходя из полученных результатов, величину ПДК пентилхлорформиата вычисляли согласно методическим указаниям по нормированию в воздухе рабочей зоны [3] для веществ, обладающих избирательным раздражающим действием, с учетом величин  $Lim_{ac}$ ,  $Lim_{ir}$  и  $Zir$ .

Кроме того, проведено сравнение параметров токсикометрии пентилхлорформиата с нормированными ранее сложными эфирами хлормуравьиной кислоты (табл. 1). Пентилхлорформиат, как и этилхлорформиат является

очень опасным веществом по степени летучести; по величинам  $DL_{50}$  при введении в желудок лабораторным животным он аналогичен этилхлорформиату и изопропилхлорформиату. При ингаляционном воздействии выявлено избирательное раздражающее действие эфиров хлормуравьиной кислоты.  $Lim_{ir}$  пентилхлорформиата и метилхлорформиата для человека зарегистрированы на одном уровне.  $Lim_{ir}$  пентилхлорформиата для крыс в 3 раза выше по сравнению с  $Lim_{ir}$  этилхлорформиата.  $Lim_{ac}$  изученных соединений по общетоксическому действию находятся в диапазоне от 17,8 до 50 мг/м<sup>3</sup>. ПДК сложных эфиров хлормуравьиной кислоты установлены в диапазоне от 0,05 (для наиболее токсичного соединения метилхлорформиата) до 0,2 мг/м<sup>3</sup> для этилхлор-

формиата. Таким образом, по характеру биологического действия и параметрам токсикометрии пентилхлорформиат близок к другим сложным эфирам хлормуравьиной кислоты.

**Заключение.** При ингаляционном воздействии на организм пентилхлорформиат обладает избирательным раздражающим действием. Для пен-

тилхлорформиата рекомендованы к утверждению гигиенические нормативы: ПДК в воздухе рабочей зоны – 0,5 мг/м<sup>3</sup> (пары, 2 класс опасности, с пометкой «требуется специальная защита кожи и глаз») и ОБУВ в атмосферном воздухе городских и сельских поселений (населенных мест) – 0,05 мг/м<sup>3</sup>.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вредные вещества в окружающей среде. Кислородсодержащие органические соединения. Ч. III. Под ред. В.А. Филова, Б.А. Ивина, Ю.И. Мусийчука. СПб.: АНО НПО «Профессионал»; 2004: 237-240.
2. Методические указания к постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций избирательно действующих раздражающих веществ в воздухе рабочей зоны. МУ № 2196-80. – М., МЗ СССР; 1980.
3. Методические указания по установлению ориентировочных безопасных уровней воздействия вредных веществ в воздухе рабочей зоны. МУ № 4000-85. – М., МЗ СССР; 1985.
4. Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы. МУ № 1.1.578-96. – М.; 1996.
5. Методические указания по установлению ориентировочных безопасных уровней воздействия (ОБУВ) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест. МУ № 2630-82-88. – М., МЗ СССР, 1988.

## REFERENCES:

1. Harmful substances in the environment. Oxygenated organic compounds. Part III. Ed. V.A. Filova, B.A. Ivina, Yu.I. Musiychuka. SPb.: ANO NPO Professional; 2004: 237-240. (in Russian)
2. Guidelines for the formulation of studies on the study of irritant properties and the justification of the maximum allowable concentrations of selectively acting irritants in the air of the working area. MU number 2196-80. M., USSR Ministry of Health; 1980. (in Russian)
3. Guidelines for the establishment of approximate safe levels of exposure to harmful substances in the air of the working area. MU number 4000-85. M., USSR Ministry of Health; 1985. (in Russian)
4. Requirements for the formulation of experimental studies to substantiate the maximum allowable concentrations of industrial allergens in the air of the working area and atmosphere. MU number 1.1.578-96. M.; 1996. (in Russian)
5. Guidelines for the establishment of approximate safe exposure levels (TSEL) of pollutants in the atmospheric air of populated areas. MU No. 2630-82-88. M., Ministry of Health of the USSR; 1988. (in Russian)

*M.V. Bidevkina<sup>1</sup>, M.I. Golubeva<sup>2</sup>, G.P. Pankratova<sup>1</sup>, A.V. Limantsev<sup>1</sup>, I.N. Razumnaya<sup>2</sup>,  
A.L. Karaev<sup>1</sup>, T.N. Potapova<sup>1</sup>*

## MATERIALS ON SUBSTANTIATION OF HYGIENIC STANDARDS FOR N-PENTYL ETHER OF CHLOROFORMIC ACID IN THE AIR OF THE WORKING AREA AND IN THE ATMOSPHERE

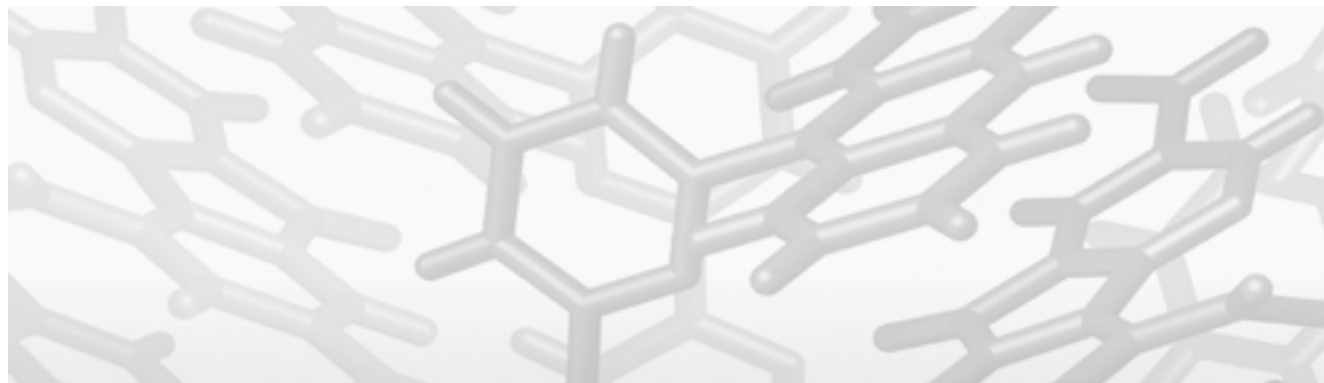
<sup>1</sup>Scientific Research Disinfectology Institute, 117246, Moscow, Russian Federation

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

Pentyl chloroformate refers to moderately toxic substances when administered in the stomach ( $DL_{50}$  for white mice  $1000,0 \pm 86,0$  mg/kg), has a pronounced irritant effect on the skin and mucous membrane of the eyes, has no skin-resorptive and sensitizing effect, weakly accumulates in the body. It shows selective irritant effect on the respiratory system on inhalation. The irritant threshold for rats is 7,8 mg/m<sup>3</sup>, for humans – 2,3 mg/m<sup>3</sup>. Hygienic standards for pentyl chloroformate are recommended for approval: MAC in the air of the working area – 0,5 mg/m<sup>3</sup> (vapors, hazard class 2, marked «requires special protection for the skin and eyes»); tentative safe exposure level in the atmospheric air of populated areas – 0,005 mg/m<sup>3</sup>.

**Keywords:** pentyl chloroformate, toxicity, irritant effects, rats, hygienic regulation.

Материал поступил в редакцию 26.03.2019 г.





УДК 615.076.9 : 615.91

## О РОЛИ ЭКСПЕРТНОГО СООБЩЕСТВА В ОЦЕНКЕ МУТАГЕННОСТИ И КАНЦЕРОГЕННОСТИ ПЕСТИЦИДОВ

*Н.А. Илюшина, Ю.А. Ревазова*

ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 141014, г. Мытищи Московской области, Российская Федерация

**Р**егламентация вредного воздействия на человека различных факторов окружающей среды, в том числе пестицидов, осуществляется специально созданными государственными организациями на основании заключений экспертов. Однако в силу разных обстоятельств: методических, экономических, информационных, политических и др. появляются противоречивые данные о наличии или отсутствии канцерогенности и генотоксичности у ряда пестицидов, что приводит к неоднозначным экспертным заключениям и решениям международных и национальных органов. В ряде случаев состав, область применения, нормы расходов пестицидных препаратов отличаются в разных странах и регионах. Поэтому несмотря на стремление к международной гармонизации подходов, могут и должны существовать национальные особенности в определении критериев и наборов методов для оценки мутагенности и канцерогенности химических веществ (в том числе пестицидов).

**Ключевые слова:** пестициды, канцерогенность, мутагенность, критерии оценки.

В мире регламентация вредного воздействия на человека различных факторов окружающей среды, в том числе пестицидов, осуществляется целой группой научных сообществ и государственными организациями, специально для этого созданными. Так, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) имеет отделение FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), в США регуляторная функция возложена на FDA (Food and Drug Administration) и EPA (Environmental Protection Agency), в Европе – ECHA (European Chemical Agency), OECD (Организация экономического сотрудничества и развития), EFSA ((Европейское агентство по безопасности продуктов питания), в Австралии, Бразилии, Канаде, Японии и многих других странах существуют аналогичные комитеты, комиссии и прочие организации. Целью и задачами этих организаций является выявление вредных факторов для человека, оценка их способности индуцировать оксидативные, мутагенные, канцерогенные, тератогенные, эмбриотропные и другие эффекты.

Законодателем в области оценки потенциальной канцерогенности был и остается МАИР (Международное агентство по изучению рака), который в течение многих лет выпускает монографии (на сегодняшний день их более ста) по оценке канцерогенности различных веществ на основе публикаций результатов, полученных исследователями разных стран с целью классификации опасности для человека. В монографиях МАИР приводится оценка силы доказательства того, что определенный агент может вызывать рак, т.е. определяется канцерогенная опасность, что, в свою очередь, означает только возможность возникновения рака при экспозиции с таким агентом. Однако, это не указывает на уровень риска, связанный с определенной экспозицией. Канцерогенный риск, обусловленный веществами или агентами, классифицированными в одну и ту же группу, может сильно различаться в зависимости от таких факторов как тип и длительность экспозиции, а также сила эффекта, вызываемого агентом. Какова разница между риском и опасностью? В преам-

**Илюшина Наталья Алексеевна (Ilyushina Nataliya Alexeevna)**, кандидат биологических наук, заведующая отделом генетической токсикологии Института гигиены, токсикологии пестицидов и химической безопасности ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, [Ilyushina-na@mail.ru](mailto:Ilyushina-na@mail.ru)  
**Ревазова Юлия Анатольевна (Revazova Yulia Anatolievna)**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела генетической токсикологии Института гигиены, токсикологии пестицидов и химической безопасности ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, [revazova013@gmail.com](mailto:revazova013@gmail.com).



буле к монографиям МАИР указано: «Различие между опасностью и риском имеет принципиальное значение. В монографиях идентифицируется канцерогенная опасность даже в том случае, когда риски оказываются низкими при некоторых сценариях воздействия. Это связано с тем, что воздействие на низких уровнях может быть широко распространено, а также с тем, что уровни воздействия во многих популяциях неизвестны». Также отмечается, что «экстраполяция взаимосвязи экспозиция-ответ на ситуации вне диапазона имеющихся данных (например, к более низким уровням экспозиции или от экспериментальных животных к человеку) не входит в объем монографий. Кроме того, программа монографий не включает в себя обзор количественных характеристик риска, которые определяются другими агентствами» [1]. К сожалению, такое понимание заключений МАИР известно не всем исследователям и чиновникам, работающим в области регламентации применения пестицидов.

В последние годы в силу разных обстоятельств: методических (различия в используемых тест-системах, протоколах экспериментов и оценках результатов при общем стремлении к гармонизации и унификации), экономических (конкуренция фирм-производителей пестицидов), информационных (вмешательство средств информации и рекламного бизнеса), политических и др. в литературе появляются противоречивые данные о наличии или отсутствии канцерогенности и генотоксичности у ряда пестицидов. Так, основные дискуссии развернулись в отношении глифосата, диазинона и малатиона. МАИР отнес эти три пестицида к группе 2А, т.е. к вероятным канцерогенам для человека [2]. Вместе с тем, FAO/WHO в заключительном отчете 2016 года, Женева, 9-13 мая, постулирует, что все три вещества не могут быть позиционированы как вероятные канцерогены для человека при пероральном поступлении [3]. Эту же точку зрения разделяют эксперты EFSA и ряда других организаций. Что послужило причиной таких разночтений в оценке результатов многочисленных экспериментальных исследований?

Иногда, разные лаборатории обнаруживают различающиеся по уровню и даже противоположные эффекты. Поэтому эксперты должны оценить не только результаты исследований, но и качество проведения экспериментов, а также весомость полученных доказательств. Важным моментом для вынесения решения на основании экспериментальных данных является правильность выбора тест-объектов и методов, четкого следования протоколам экспериментов и контроля на всех этапах выполнения работ со стороны отделов обеспечения качества, т.е. выполнения принципов надлежащей лабораторной практики (GLP – Good Laboratory Practice) [4].

Несомненно, тест-системы отличаются по чувствительности из-за видоспецифичности метаболических процессов, различий в структуре и стабильности генома и других факторов. Например, бактериальный тест на мутагенность (тест Эймса) и микроядерный тест *in vivo* давали разные результаты при оценке генотоксического действия некоторых пестицидов [5]. Как правило, в таких случаях больший вес придается результатам экспериментов *in vivo*.

Немаловажное значение имеет стандартизация самих методов. Гармонизация используемых методов и унификация протоколов исследований началась несколько десятилетий назад с целью уменьшения различий и взаимного признания результатов экспериментов. В настоящее время заключения экспертов основываются на анализе данных, полученных с использованием стандартных тест-систем и стандартных протоколов, принятых мировым сообществом. Понятно, что возможен пересмотр систем оценки, набора методов и особенностей их проведения. Так в последние годы были пересмотрены протоколы оценки генотоксичности химических веществ с целью повышения качества проведения исследований. В частности, в новых версиях протоколов OECD больше внимания уделяется вопросам квалификации лабораторий, критериям установления исторических отрицательных и положительных контролей. Кроме того, существенно увеличен объем анализируемого материала, чтобы снизить вероятность получения ложноотрицательных результатов. Более четко определены критерии отнесения вещества к мутагенам с учетом статистической и биологической значимости результатов. Кроме того, новые научные исследования, развитие современных молекулярно-генетических технологий приводят к исключению некоторых методов из стандартных батарей тестов и введению новых методов в системную оценку мутагенности и, связанную с этим, прогностическую и не только прогностическую оценку канцерогенности [6]. Так, в последние годы в систему оценки мутагенности включают анализ ДНК-комет, позволяющий выявлять повреждения ДНК. Повреждения ДНК рассматриваются, с одной стороны, как первичные мутационные события, с другой – первичные ДНК-повреждения могут активировать проонкогены и/или ингибировать гены-супрессоры [7,8]. Эксперты, работающие в этой области, должны учитывать возможные изменения в системных подходах, а также в изменениях стандартизованных протоколов и, соответственно, в оценке результатов экспериментальных исследований.

Уровень квалификации лабораторий и приемлемость применяемых тест-систем для конкретных исследований должны быть оценены по

ряду критериев, в том числе на основании значений, полученных для отрицательных и положительных контролей. И если контрольные значения существенно отклоняются от диапазонов, полученных в большинстве лабораторий мира, то к таким данным следует подходить с большой осторожностью, и они не могут быть использованы в регуляторных целях.

В классических экспериментах на животных с продолжительным введением широкого диапазона доз изучаемого вещества от полутора до двух лет на мышах и крысах (как правило), кроме изучения общетоксического действия, проводят макро- и микроскопический анализ органов и тканей на предмет появления предраковых и опухолевых изменений. Сравнение проводят с параллельно идущим контролем и, в ряде случаев с «историческим», т.е. с характерным для данной лаборатории и для линий используемых животных. В ситуациях, когда уровень зафиксированных опухолей находится между этими двумя контролями (исторический выше параллельно идущего) авторы склонны полагать, что наблюдаемый эффект случаен и препарат не оказал канцерогенного эффекта. Более того, при обсуждении механизмов полученных позитивных эффектов, допустим, только на одном виде млекопитающих или только у одного пола, можно найти причины в метаболических или гормональных различиях у экспериментальных животных, что и дает возможность неоднозначной трактовки результатов. Публикации по результатам подобного рода исследований носят, как правило, феноменологический характер, а обсуждение – предположительный.

В экспериментах по оценке генотоксичности, например, с использованием цитогенетических методов, для того чтобы считать результат положительным, недостаточно только выявления статистически значимого по сравнению с параллельным отрицательным контролем и зависимого от дозы эффекта. Важно, чтобы значения оцениваемого параметра выходили за пределы исторического контроля [9].

Также важно, чтобы наблюдаемые эффекты были воспроизводимы в повторных экспериментах. Интересно, что повторные исследования канцерогенности в классическом варианте, проводимые на тех же линиях животных, зачастую дают разные результаты, причем, как правило, это касается вариантов с разной чистотой препаратов, с небольшой разностью в дозах, путями введения и различными уровнями исторического контроля. Для канцерогенов с высокой активностью этого не было показано никогда. Речь в данном случае может идти о достаточно слабых воздействиях или о ложно-положительных результатах.

Кроме того, чистота химических веществ, за-

висящаяся от технологии их получения, от квалификации производителя, а, следовательно, от наличия в техническом продукте потенциально опасных примесей, может влиять на результаты итоговой оценки эксперимента. Например, в отделе генетической токсикологии ФБУН ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана показано, что мутагенный эффект в микроядерном тесте дал положительный эффект только у одного образца глифосата (из 3-х изученных), вероятно связанный с наличием в образце формальдегида, известного мутагена [10].

Процесс химического канцерогенеза в настоящее время условно подразделяют на две стадии: инициацию и промоцию. На первой в генетическом аппарате клетки возникают стойкие изменения (мутации), на второй, в основном за счет эпигенетических эффектов, создаются условия для преимущественной пролиферации клеток. Полный объем понятия «канцерогенные соединения» включает в себя вещества, способные увеличивать в популяциях количество опухолей различных локализаций по сравнению с соответствующим контролем. Сюда входят не только полные канцерогены, способные вызывать опухоли без дополнительных воздействий, но также иницирующие агенты, промоторы и коканцерогены. Коканцерогены усиливают мутагенное действие канцерогена, могут стимулировать пролиферацию клеток, инактивируя белки-продукты антионкогенов, или усиливать передачу ростостимулирующих факторов.

Вместе с тем, изучению механизмов канцерогенного действия различных веществ ученые уделяют большое внимание, не забывая при этом и механизмы генотоксического действия. Известно, что прогностическая ценность изучения мутагенности веществ для оценки возможного канцерогенного действия принята во всем мире и широко используется в разных странах. Общепринято полагать, что стадия инициации опухолевого процесса напрямую связана с мутационными событиями в клетке.

Существует понятие «негенотоксических» канцерогенов, но следует согласиться с мнением А.Д. Дурнева с соавторами [8], что «негенотоксические канцерогены» – это вещества с пока еще не установленной генотоксической активностью», поскольку они могут выступать в роли коканцерогенов, промоторов, инактиваторов онкосупрессоров, индукторов оксидативного стресса и других процессов, нарушающих клеточный и тканевой гомеостаз. По поводу «еще не установленной активности» существует хорошо известный пример с тератогенностью талидомида [11]. Этот лекарственный препарат применялся как седативный, причем хорошо себя зарекомендовал у беременных. До выхода на рынок он про-

шел полную доклиническую оценку, в том числе и потенциальных эмбриотропных и тератогенных свойств на двух видах млекопитающих – мышах и крысах. Когда случилась «талидомидная катастрофа» – рождение детей с аномалиями конечностей, встал вопрос о достаточности тех методов и объектов, которые позволяют выявить нежелательные эффекты. Тератогенность была выявлена на кроликах, которые не включались стандарты подобных исследований. Таких трагедий больше не было отмечено, хотя кролики не входят как обязательный объект в стандарты доклинических испытаний. Кстати, мутагенность известного и безусловного канцерогена бензпирена была выявлена много позже, чем его канцерогенная активность [12]. Закономерно встает вопрос, насколько необходимо увеличивать объем и спектр проводимых исследований в этой области, ведь в любом случае эксперименты дают только вероятностный прогноз? Мнения экспертного сообщества не очень сильно расходятся, минимальный набор методов достаточен, увеличивать его целесообразно в случае известных или предполагаемых особенностей механизмов действия тех или иных веществ в разных организмах, в случае большого объема поступающего в среду обитания человека продукта (этот принцип положен в основу регламента REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals), действующего в странах Евросоюза) [13], или значительного контингента лиц, контактирующего с ним.

Основопологающими в определении «канцероген для человека» являются эпидемиологические исследования, которые осуществляются, как правило, двумя методами: случай – контроль и когортные исследования. Каждый из этих подходов имеет свои преимущества и недостатки. Подбор пар «случай/контроль» учитывает много компонентов – пол, возраст, профессию, хронические заболевания, сроки контакта с пестицидом и, по возможности, вероятные дозы и пути поступления агента и др. Однако, индивидуальная чувствительность (а мы живем в век молекулярной биологии), наличие или отсутствие мутаций, вызывающих активацию онкогенов, и целый ряд метаболических полиморфизмов у участников исследования, конечно не входят в требования подбора этих пар. Более того, дозы пестицидов, с которыми контактируют люди, на порядки меньше допустимых регламентами многих стран. Поэтому и результаты проведенных работ, как правило, говорят о тренде наблюдаемых патологий.

В когортных исследованиях очень трудно верифицировать и исключить контакты обследуемых с другими пестицидами или с другими химическими, биологическими или физическими фактора-

ми, которые могут модифицировать получаемые эффекты. К сожалению, генетический или метаболический паспорт еще не стал обязательным для населения, и мы не можем учитывать индивидуальную чувствительность человека к воздействиям и частоты генетических полиморфизмов с повышенной чувствительностью к токсикантам в изучаемых популяциях.

Таким образом, первые заключения о наличии или отсутствии нежелательных активностей делают экспериментаторы, а решение о возможности (невозможности) и условиях реального применения пестицидов в каждой стране делают регламентирующие органы. Ведь даже заключения МАИР носят сугубо рекомендательный характер, а анализ литературных данных подвергается вторичному осмыслению экспертами соответствующих региональных комитетов и комиссий.

В токсикологии не подвергается сомнению парадигма «доза – время – эффект» и именно этот принцип положен в основу классификации мутагенности и канцерогенности пестицидов в России. Функции МАИР в России возложены на Комиссию по канцерогенным факторам Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заключения которой также имеют рекомендательный характер. Регламентация применения пестицидов осуществляется в соответствии с Гигиенической классификацией пестицидов, разработанной в Федеральном научном центре гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана и включенной в СанПиН 1.2.2584-10 [14]. Для пестицидов, отнесенных к 1-му классу, имеются достаточные доказательства канцерогенности для человека или, в порядке исключения, ограниченные доказательства канцерогенности для человека в сочетании с достаточными доказательствами для животных и полученными на человеке данными о едином для человека и животных механизме канцерогенеза. Они полностью запрещены к использованию на территории РФ. К второму классу (с тремя подклассами 2А, 2В и 2С) относят пестициды, для которых доказательства канцерогенности для человека варьируют от почти достаточных до их полного отсутствия при наличии доказательств канцерогенности для животных. Характеристика подклассов 2В и 2С включает дозовые ограничения, вводится критерий МПД (максимально переносимая доза для млекопитающих) и нежелательные находки оценивают при дозах выше или ниже МПД. Пестициды, отнесенные экспертами к подклассу 2С должны иметь достаточные доказательства канцерогенности для животных с развитием опухолей при дозах, равных или превышающих МПД, или достаточные доказательства канце-

рогенности для животных с механизмом канцерогенеза, частично действующим на человека, или развитие злокачественных опухолей у одного вида при дозах ниже МПД, или ограниченные доказательства канцерогенности, усиленные поддерживающими данными, или, в порядке исключения, только эпидемиологические данные, по степени доказательности, находящиеся между ограниченными и неадекватными. В классификации МАИР нет подкласса 2С. В Российской Федерации пестициды, относящиеся к этому подклассу, могут применяться в сельском хозяйстве, но с большими ограничениями. В частности, широко обсуждаемый в последние годы пестицид глифосат отнесен подклассу 2С по канцерогенности.

Для отнесения пестицида к 3-му классу следует иметь достаточные доказательства канцерогенности для животных, но с механизмом канцерогенеза, не действующим на человеке, или развитие злокачественных опухолей у одного вида животных при дозах, равных или превышающих МПД, или ограниченные доказательства канцерогенности для животных. В этот класс помещают агенты, которые не могут быть включены в другие классы. В частности, сюда относят пестициды, для которых установлена генотоксичность, но канцерогенность не показана. К 4-му классу относят препараты, не показавшие канцерогенности и мутагенности в стандартных наборах методов.

Столь подробное изложение критериев классификации веществ крайне важно для экспертов, рассматривающих все первичные экспериментальные и литературные данные по рецензируемому пестициду.

Аналогичен подход к классификации пестицидов – мутагенов, с дополнительным учетом использования методов *in vivo* и *in vitro*, придавая больший вес результатам экспериментов на млекопитающих *in vivo*.

Эксперт, учитывая все вышесказанное, решает к какому классу по гигиенической классификации относится тот или иной пестицид, что позво-

ляет определить область и условия его применения в соответствии с определенным классом опасности.

Таким образом, экспертизу начинают осуществлять с поиска в базах данных об аналогах по химической структуре (QSAR), обладающих нежелательными активностями, затем следует экспертиза результатов проведенных экспериментов и их соответствия гармонизированным общепринятым протоколам с учетом всех перечисленных выше требований, экспертиза литературных данных, непременно включая имеющиеся работы по изучению механизмов действия данного вещества или его близких химических родственников, наконец, экспертиза всех материалов для заключительного решения о возможности применения данного пестицида и его безопасности для человека.

Роль экспертного сообщества возрастает в связи с многими противоречиями в законодательной базе. Так, хорошим примером этому является приводимая ниже классификация сульфата меди разными ведомствами. Так, Росстандарт определяет сульфат меди как высокоопасное вещество (2-й класс опасности), Ростехнадзор не классифицирует как опасное вещество, Минсельхоз – как умеренно опасное вещество (3-й класс опасности), Роспотребнадзор – как высокоопасное вещество (2-й класс опасности), а рекомендации ООН-СГС дает 4-й класс опасности (вредно при попадании на кожу и при проглатывании) [15]. В связи с вышесказанным особое значение приобретает квалификация и профессионализм эксперта, подготавливающего заключение.

Естественно, необходима единая система определения опасности/ безопасности применения химических веществ в стране и несмотря на стремление к международной гармонизации подходов, могут и должны существовать национальные особенности в определении критериев и наборов методов для оценки мутагенности и канцерогенности химических веществ (в том числе пестицидов).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. Preamble. 20 Available at: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2019/01/Preamble-2019.pdf>
2. IARC Monographs Volume 112: Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. Lyon, France, 20 March 20 Available at: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/mono112.pdf>
3. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues Geneva, 9–13 May 2016 Summary Report. Available at: <https://www.who.int/foodsafety/jmprsummary2016.pdf?ua=1>
4. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance Monitoring. Available at <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm>.
5. Ilyushina N., Egorova O., Rakitskii V. Limitations of pesticide genotoxicity testing using the bacterial *in vitro* method. *Toxicology in vitro*. 2019; 57: 110–119.
6. Ракитский В.Н., Илюшина Н.А., Ревазова Ю.А. Современные методические подходы в оценке мутагенности пестицидов. Гигиена и санитария. 2017; 96(11): 1017–20.
7. Bartek J., Bartkova J., Lukos J. DNA damage signaling guards against activated oncogenes and tumor progression. *Oncogene*. 2007; 26(56): 7773–9.
8. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Шредер О.В., Середина В.С. Генотоксические поражения и болезни. Молекулярная медицина. 2013; 3: 3–19.
9. OECD Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, 20 Available at: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264762-en.pdf?expires=1553081299&id=id&accname=guest&checksum=99FBDD49C8D2789DBB5F21D1480BBE25>
10. Илюшина Н.А., Аверьянова Н.С., Масальцев Г.В., Ревазова Ю.А. Сравнительное исследование генотоксической активности технических продуктов глифосата в микроядерном тесте *in vivo*. *Токсикологический вестник*. 2018; 4 (151): 24–28.
11. McBride W.G. Thalidomide embryopathy. *Teratology*. 1977; 16 (1): 79–82.
12. IARC MONOGRAPHS – 100F. Chemical Agents and Related Occupations. BENZO[a]PYRENE. 20 Available at: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono100F-14.pdf>
13. Combes R., Grindon C., Cronin M.T., Roberts D.W., Garrod J. Proposed integrated decision-tree testing strategies for mutagenicity and carcinogenicity in relation to the EU REACH legislation. *Altern. Lab. Anim.* 2007; 35(2): 267–87.
14. Санитарные правила и нормативы

СанПиН 1.2.2584-10 «Гигиенические требования к безопасности процессов испытаний, хранения, перевозки, ре-

лизации, применения, обезвреживания и утилизации пестицидов и агрохимикатов», 2010 г.

15. Зажигалкин А.В. Нормативно-правовое обеспечение химической безопасности в РФ. Доступно по: <https://reach.ru/reglament-reach/pyblikachii/406-chembezopasnost>.

## REFERENCES:

1. IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. Preamble. 20 Available at: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2019/01/Preamble-2019.pdf>
2. IARC Monographs Volume 112: Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. Lyon, France, 20 March 20 Available at: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/mono112.pdf>
3. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues Geneva, 9–13 May 2016 Summary Report. Available at: <https://www.who.int/foodsafety/jmprsummary2016.pdf?ua=1>
4. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance Monitoring. Available at <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm>.
5. Ilyushina N., Egorova O., Rakitskii V. Limitations of pesticide genotoxicity testing using the bacterial *in vitro* method. *Toxicology in vitro*. 2019; 57: 110–119.
6. Rakitskii V.N., Ilyushina N.A., Revazova Yu.A. Modern approaches to the assessment of pesticide mutagenicity. *Hygiene and Sanitation*. 2017; 96(11): 1017–20 (in Russian).
7. Bartek J., Bartkova J., Lukos J. DNA damage signaling guards against activated oncogenes and tumor progression. *Oncogene*. 2007; 26(56): 7773–9.
8. Durnev A.D., Zhanataev A.K., Schröder O.W., Seredenina V.S. Genotoxic events and diseases. *Molecular medicine*. 2013; 3: 3–19 (in Russian).
9. OECD Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, 20 Available at: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264762-en.pdf?expires=1553081299&id=id&accname=guest&checksum=99FBDD49C8D2789DBB5F21D1480BBE25>
10. Ilyushina N.A., Averianova N.S., Masaltsev G.V., Revazova Yu.A. Comparative investigation of genotoxic activity of glyphosate technical products in the micronucleus test *in vivo*. *Toxicological Review*. 2018; 4 (151): 24–8.
11. McBride W.G. Thalidomide embryopathy. *Teratology*. 1977; 16 (1): 79–82.
12. IARC MONOGRAPHS – 100F. Chemical Agents and Related Occupations. Benzo[*a*]pyrene. 20 Available at: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono100F-14.pdf>
13. Combes R., Grindon C., Cronin M.T., Roberts D.W., Garrod J. Proposed integrated decision-tree testing strategies for mutagenicity and carcinogenicity in relation to the EU REACH legislation. *Altern. Lab. Anim*. 2007; 35(2): 267–87.
14. SanPin 1.2.2584-Hygienic requirements for protection of research process safety, storage, transportation, realization, deactivation and disposal of pesticides and agrochemicals. Sanitary rules and norms. – M.: Federal centre for hygiene and epidemiology of the Rospotrebnadzor 2010 (in Russian).
15. Zazhigalkin A.V. Regulatory support of chemical safety in the Russian Federation (in Russian). Available at: <https://reach.ru/reglament-reach/pyblikachii/406-chembezopasnost>.

N.A. Ilyushina, Yu.A. Revazova

## ROLE OF THE EXPERT COMMUNITY IN THE EVALUATION OF THE MUTAGENICITY AND CARCINOGENICITY OF PESTICIDES

F.F. Erisman Federal Research Center of Hygiene of Rospotrebnadzor, 141014, Mytishchi, Moscow Region, Russian Federation

The regulation of harmful effects of various environmental factors including pesticides on humans is carried out by specially created state organizations on the basis of expert opinions. However, due to various circumstances: methodological, economic, informational, political etc. there are conflicting data on the presence or absence of carcinogenicity and genotoxicity of a number of pesticides, which lead to ambiguous expert opinions and decisions of international and national authorities. In some cases, the composition, scope, consumption rates of pesticides differ in different countries and regions. Therefore, despite the desire for international harmonization of approaches, there can and should be national specificities in the definition of criteria and sets of methods for the assessment of mutagenicity and carcinogenicity of chemicals (including pesticides).

**Keywords:** pesticides, carcinogenicity, mutagenicity, assessment criteria.

Материал поступил в редакцию 25.03.2019 г.



# ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

УДК 615.099.097

## ДЕСТРУКЦИЯ СТенок МЕДОВОГО ЗОБИКА МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ ПРИ ОТРАВЛЕНИЯХ СВИНЦОМ И КАДМИЕМ

Е.К. Еськов, М.Д. Еськова,  
А.С. Роженов

ФГБОУ ВО «Российский государственный  
аграрный заочный университет»  
Минсельхоза РФ, 143900, г. Балашиха  
Московской области, Российская Федерация

**О**травление пчелы свинцом порождает дегенеративно-дистрофические и некробиотические изменения стенки зобика. Этому сопутствует сморщивание отдельных групп эпителиальных клеток и частичная утрата ими межклеточных соединений. В мышечных волокнах образуются очаги зернисто-глыбчатого распада, а местами исчезает поперечнополосатая исчерченность

**Ключевые слова:** отравления, медоносная пчела, свинец, кадмий, зобик.

**Введение.** Медовый зобик медоносной пчелы представляет собой эластичный тонкостенный резервуар, используемый для транспортировки и хранения индивидуальных запасов углеводного корма или воды [6]. От емкости зобика зависит эффективность использования пчелой кормовых ресурсов. Зобик используется также для переработки нектара в мед и подготовки трофического субстрата для кормления личинок.

В годичном цикле жизни пчелиной семьи рабочие пчелы потребляют углеводный корм, различающийся по содержанию воды, эссенциальных и токсичных элементов. С возрастающим техногенным загрязнением природной среды связано загрязнение кормовых субстратов, потребляемых пчелами (преимущественно нектара и цветочной пыльцы), что, вероятно, имеет отношение к массовой гибели пчелиных семей, наблюдаемой в последние годы [3, 5].

*Настоящей работой* предпринято изучение изменений микроструктуры стенок зобиков пчел, потреблявших с углеводным кормом летальные дозы свинца или кадмия.

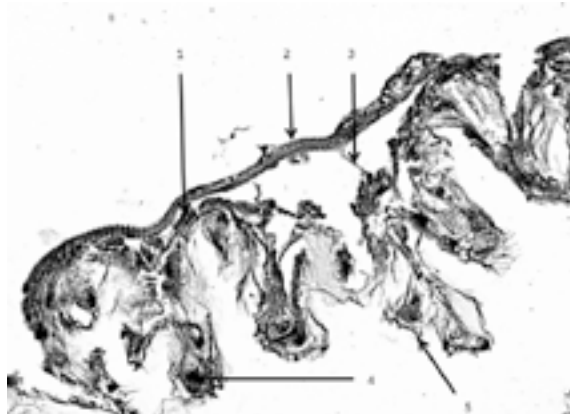
**Материалы и методы исследования.** Исследование выполнено на рабочих пчелах *Apis mellifera* L., содержащихся по 400–500 особей в энтомологических садках. Пчелы, находившиеся в садках, потребляли чистые растворы сахарозы в дистиллированной воде или с солями токсикантов, в качестве которых использовали трехводный уксусно-кислый свинец или двухводный ацетат кадмия. Концентрация свинца в 50%-ном растворе сахарозы составляла 0,5 г/л, кадмия – 0,05 г/л. Раствор, загрязненный свинцом, пчелы потребляли в течение  $6 \pm 0,4$  сут., кадмием –  $13 \pm 0,6$  сут. После этого пчелы удалялись от кормушек.

Изменения микроструктуры стенок зобиков под влиянием отравления свинцом и кадмием определяли гистологическим методом. Для этого ампутированные зобики пчел, потреблявших корм, загрязненный солями свинца или кадмия, а также чистые растворы сахарозы, фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине. После промывания в дистиллированной воде зобики пропитывали парафином в рабочей камере типа АТ-4м. В качестве обезвоживающей среды ис-

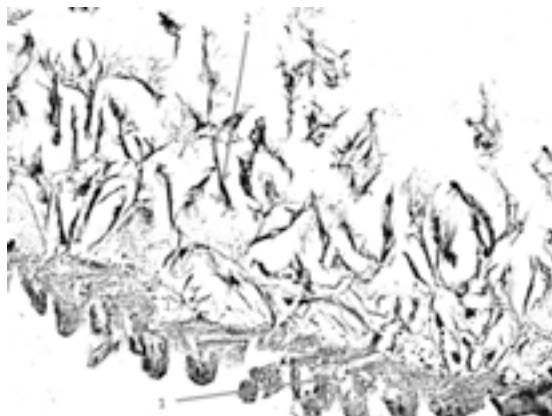
**Еськов Евгений Константинович (Eskov Eugeny Konstantinovich)**, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки и техники РФ, профессор кафедры охотоведения и биоэкологии ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный заочный университет» Минсельхоза РФ, [ekeskov@yandex.ru](mailto:ekeskov@yandex.ru)

**Еськова Майя Дмитриевна (Eskova Majy Dmitrievna)**, доктор биологических наук, профессор кафедры охотоведения и биоэкологии ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный заочный университет» Минсельхоза РФ, [mdekeskova@yandex.ru](mailto:mdekeskova@yandex.ru)

**Роженов Алексей Сергеевич (Rojenkov Aleksey Sergeevich)**, аспирант ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный заочный университет» Минсельхоза РФ, [rozenkov-as@yandex.ru](mailto:rozenkov-as@yandex.ru)



**Рис. 1.** Гистограмма фрагмента неповрежденной стенки медового зобика: 1 – ядро базально расположенной клетки; 2 – слой поперечнополосатых мышечных волокон; 3 – трахеальная трубка; 4 – ядро эпителиальной клетки; 5 – микроворсинка эпителиальной клетки.



**Рис. 2.** Фрагмент стенки медового зобика пчелы, отравленной свинцом: 1 – мышечный слой с признаками дегенерации, выражающейся в исчезновении поперечнополосатой исчерченности и некробиотических изменениях; 2 – цитоплазма сморщенных клеток.

пользовался изопропиловый спирт. Это позволяло, исключить промежуточные среды перед заливкой препаратов в парафине. Для получения гистологических срезов использовали роторный микротом. Срезы (их толщина составляла около 4 мкм) помещали на предметное стекло и окрашивали гематоксилин-эозином [4]. Для визуального анализа препаратов использовали светоптический микроскоп.

**Результаты и обсуждение.** В норме наружную часть стенки зобика образует мышечный слой, под которым располагаются слизистая оболочка, представленная однослойным эпителием. Ее образуют клетки вытянутой формы, со светлой цитоплазмой и овальным базофильным ядром. Эти клетки имеют неровную мембрану со множеством коротких отростков (микроворсинок). Ими обеспечивается увеличение поверхности клеточных мембран. На границе мышечного слоя и слизистой оболочки выявляются единичные трахейные трубки и тонкие соединительнотканые перемычки.

Ориентация клеток слизистой оболочки зависит от наполнения зобика. У пустого зобика клетки располагаются под прямым углом к мышечному слою. По мере заполнения зобика происходит распрямление складок и изменение наклона клеток (рис. 1). У наполненного зобика клетки слизистой оболочки располагаются (вытягиваются) вдоль мышечного слоя.

Отравление пчелы свинцом порождает дегенеративно-дистрофические и некробиотические изменения стенки зобика. Этому сопутствует сморщивание отдельных групп эпителиальных клеток и частичная утрата ими межклеточных соединений. В мышечных волокнах образуются очаги зернисто-глыбчатого распада, а местами исчезает поперечнополосатая исчерченность (рис. 2).

Сходные изменения микроструктуры стенки зобика происходят при отравлении пчел солями кадмия. В мышечном слое дегенеративно-дистрофические и некробиотические изменения выражаются в возникновении очагов зернисто-глыбчатого распада. В цитоплазме образу-



**Рис. 3.** Фрагмент стенки медового зобика пчелы, отравленной кадмием: 1 – цитоплазма сморщенной клетки с эозинофильными массами; 2 – дегенеративно-дистрофические изменения клеток мышечного слоя; 3 – сморщенные гиперхромные ядра эпителиальных клеток.

ются эозинофильные включения и происходит сморщивание эпителиальных клеток. При этом ядра приобретают признаки гиперхромозы и пикноза (рис 3).

#### **Заключение:**

Отравления пчел свинцом или кадмием порождают необратимые дегенеративно-дистрофические и некробиотические изменения стенок зобика. Эпителиальные клетки сморщиваются, а в мышечном слое возникают очаги зернисто-глыбчатого распада.

Свинцовые отравления отличаются от кадмиевых отсутствием эозинофильных масс в эпителиальных клетках слизистой оболочки и менее выраженными изменениями в мышечном слое, что происходит без признаков некробиотических изменений.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Московской области в рамках научного проекта № 17-41-500101

## **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Еськов Е.К. Экология медоносной пчелы. Рязань: Русское слово. 1995. 396 с.
2. Еськов Е.К., Бабкина Н.Г. Возрастная и сезонная изменчивость индивидуальной устойчивости медоносной пчелы *Apis mellifera* L. к экстремальным температурам // Энтомологическое обозрение. 1990. Т. 69. № 1. С. 481-485.
3. Лебедев В.И. Причины гибели семей пчел в период осени 2002 г и зимы 2002-2003 гг. // Пчеловодство. 2003. № 5. С. 34-35.
4. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. Четвёртое издание Л.: «МЕДГИЗ». 1961. 343 с.
5. Dainat B., Vanengelsdorp D, Neumann P. Colony collapse disorder in Europe. // Environmental Microbiology Reports. 2012. V. 4. P. 123-125.
6. Snodgrass R. E. The anatomy of the honey-bee. New York: Univ. press. 1956. 334 p.

## **REFERENCES:**

1. Eskov E.K. Ecology of honey bees. Ryazan: Russkoe Slovo, 1995, 396 p. (in Russian).
2. Eskov E.K., Babkina N.D. Age and seasonal variability of individual resistance of honey bee *Apis mellifera* L. to extreme temperatures. Entomological Review, 1990, Vol. 69, No. 1, P. 481-485 (in Russian).
3. Lebedev V.I. Causes of death of bee families in autumn 2002 and winter 2002-2003. Beekeeping, 2003, No. 5, P. 34-35 (in Russian).
4. Merkulov G.A. Course of pathologistological technology. Fourth edition L.: Medgiz, 1961, 343 p. (in Russian).
5. Dainat B., Vanengelsdorp D, Neumann P. Colony collapse disorder in Europe. Environmental Microbiology Reports, 2012, V. 4, P. 123-125.
6. Snodgrass R. E. The anatomy of the honey bee. New York: Univ. press. 1956, 334 p.

*E.K. Eskov, M.D. Eskova, A.S. Rozhenkov*

## **DESTRUCTION OF BEE CROP WALL OF HONEYBEE AT THE POISONING OF LEAD AND CADMIUM**

Russian State Agrarian Correspondence University, Ministry of Agriculture of the Russian Federation, 143900, Balashikha, Moscow Region, Russian Federation

The bee poisoning with lead generates degenerative-dystrophic and necrobiotic changes in the wall of the crop. This is accompanied by the wrinkling of individual groups of epithelial cells and the partial loss of intercellular connections. In muscle fibers, foci of granular-cumulative decomposition are formed, and in some places the striation disappears.

**Keywords:** poisoning, honeybee, lead, cadmium, crop.

Переработанный материал поступил в редакцию 08.07.2019 г.



УДК 546.4 : 546.55/59 : 579.8

# ИНДИКАЦИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДОЕМОВ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ ПРИ ПОМОЩИ ЦИАНОБАКТЕРИЙ *SYNECHOCYTIS SP.*

*А.С. Богачева<sup>1,2</sup>, Е.В. Полозова<sup>1,2</sup>, В.В. Шилов<sup>2</sup>,  
Е.В. Давыдова<sup>3,2</sup>, М.А. Юдин<sup>2,4</sup>, И.Н. Ключкин<sup>5</sup>*

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, 195271, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>3</sup>ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, 194044, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>4</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>5</sup>Филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в г. Санкт-Петербург в Московском, Фрунзенском, Пушкинском, Колпинском районах и г. Павловске, 192102, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

**И**сследована чувствительность цианобактерий к солям тяжелых металлов при различных условиях культивирования. Показано, что снижение температуры и недостаток освещения среды обитания усиливают токсическое действие тяжелых металлов. Представлены данные о морфологических изменениях цианобактерий, вызванных токсическим влиянием тяжелых металлов. Отмечено, что цианобактерии могут быть использованы в качестве экспериментальной модели для исследования токсичности тяжёлых металлов при тестировании загрязнений водной и почвенной среды.

**Ключевые слова:** цианобактерии, тяжёлые металлы, электронная микроскопия, экспериментальная модель, морфологические изменения, *Synechocystis sp.*

**Введение.** Особую роль в оценке загрязнения водоёмов играют биологические тесты [1]. Это связано с тем, что результаты химического анализа, проводимого с помощью сложного аналитического оборудования, во многих случаях не позволяют оценить истинную опасность тех или иных загрязнителей на среду обитания, прогнозировать последствия их воздействия на живые организмы [2, 3]. Многообразные загрязняющие вещества, попадая в водную среду, могут претерпевать в ней различные превращения, усиливая при этом своё токсическое действие. По этой причине необходимо применять методы интегральной оценки качества воды. Огромную роль

при этом играют методы биотестирования. Под биотестированием понимают методы исследования, при которых о качестве среды, факторах, действующих самостоятельно или в сочетании с другими, судят по выживаемости, состоянию и поведению специально помещённых в эту среду организмов – тест-объектов [4]. Поэтому в качестве биотестов выбирают наиболее чувствительные к исследуемым загрязнителям организмы.

Уникальными представителями мира микроорганизмов являются цианобактерии. Обладая пластичным метаболизмом, они в настоящее время являются удобными модельными объектами для изучения целого ряда биологических

**Богачева Александра Сергеевна (Bogacheva Alexandra Sergeevna)**, кандидат биологических наук, доцент кафедры токсикологии, экстремальной и водолазной медицины СЗГМУ им. И.И. Мечникова; доцент кафедры мобилизационной подготовки и медицины катастроф ПСПбГМУ им. академика И.П. Павлова, [baltagy@list.ru](mailto:baltagy@list.ru)

**Полозова Елена Валентиновна (Polozova Elena Valentinovna)**, доктор медицинских наук, профессор кафедры мобилизационной подготовки и медицины катастроф ПСПбГМУ им. академика И.П. Павлова; профессор кафедры общей и военной гигиены СЗГМУ им. И.И. Мечникова, [doctorpolozova@yandex.ru](mailto:doctorpolozova@yandex.ru)

**Шилов Виктор Васильевич (Shilov Viktor Vasilyevich)**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой токсикологии, экстремальной и водолазной медицины СЗГМУ им. И.И. Мечникова, [vshilov@inbox.ru](mailto:vshilov@inbox.ru)

**Давыдова Елена Владимировна (Davydova Elena Vladimirovna)**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры военной токсикологии и медицинской защиты ВМедА им. С.М. Кирова; доцент кафедры мобилизационной подготовки и медицины катастроф ПСПбГМУ им. академика И.П. Павлова, [davilena@yandex.ru](mailto:davilena@yandex.ru)

**Юдин Михаил Анатольевич (Yudin Mikhail Anatolyevich)**, доктор медицинских наук, доцент, доцент кафедры токсикологии, экстремальной и водолазной медицины ФГБОУ ВО СЗГМУ имени И.И. Мечникова, [mikhail.judin@gmail.com](mailto:mikhail.judin@gmail.com)

**Ключкин Иван Николаевич (Klyushkin Ivan Nikolaevich)**, и.о. заместителя главного врача Филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в г. Санкт-Петербург в Московском, Фрунзенском, Пушкинском, Колпинском районах и г. Павловске, [gupper10@yandex.ru](mailto:gupper10@yandex.ru)

процессов [1, 5, 6]. Благодаря короткому циклу их развития можно проследить на нескольких поколениях действие вредных факторов. Одним из малоизученных, с точки зрения чувствительности к токсикантам, классом цианобактерий являются *Synechocystis* sp. [7, 8, 9].

В связи с этим в наших исследованиях проведена оценка возможности использования цианобактерий *Synechocystis* sp. в качестве тест-объекта для оценки токсичности ксенобиотиков на примере солей тяжёлых металлов.

*Цель настоящей работы* - сравнительная оценка чувствительности цианобактерий к солям тяжёлых металлов для возможности использования цианобактерий в качестве индикатора загрязнения водных объектов.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали штаммы цианобактерий *Synechocystis minuscula* CALU 713 из коллекции цианобактерий Санкт-Петербургского государственного университета и *Synechocystis* sp. PCC 6803 Московского государственного университета. В процессе работы исследовали влияние температуры и освещенности на чувствительность цианобактерий к токсическому действию тяжёлых металлов, оценивали морфологические и ультраструктурные изменения цианобактерий при токсическом действии солей тяжёлых металлов с помощью световой микроскопии.

Культивирование проводили в жидкой минеральной среде № 6 [3] в колбах объемом 200-250 мл при температуре 23°C и непрерывном освещении люминесцентными лампами 2300 лк. Для эксперимента использовали штамм в активной фазе роста. Посевной материал инокулировали в пробирки с 4.5 мл жидкой минеральной среды №6, разведённой в 10 раз с добавлением 4.5 мл солей металлов ( $\text{AgNO}_3$ ;  $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{HgCOOH}$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) в различных концентрациях при различных температурных и световых условиях. Эксперимент проводили в трехкратной повторности. Подсчёт клеток в культурах осуществляли на 7-е сутки культивирования, т.к. данное время является наиболее оптимальным для воздействия тяжёлых металлов на *Synechocystis* sp. Численность клеток в культурах рассчитывали микроскопическим учётом с использованием камеры Горяева по формуле:

$$\mu = \frac{a10^3n}{hS}, \text{ где}$$

$\mu$  - численность клеток в 1 мл;

$a$  - средняя численность клеток в большом квадрате сетки;

$h$  - глубина камеры в мм;

$S$  - площадь большого квадрата клетки в  $\text{мм}^2$ ;

$n$  - разведение исследуемой суспензии в 10 больших квадратах.

Морфометрический анализ клеток выполняли в световом микроскопе с телевизионным анализатором (МТ-9). Исследования ультраструктуры клеток *Synechocystis* sp. при воздействии различных солей тяжёлых металлов проводили с помощью электронного микроскопа. Оценивали форму и размер клеток, толщину клеточной стенки, процесс деления, изучали состояния нуклеоплазмы и цитоплазмы, а также изменения, происходящие в области нуклеоида, рибосом и тилакоидных мембран.

**Результаты и обсуждение.** На первом этапе проводили сравнительную оценку чувствительности цианобактерий *Synechocystis* двух штаммов (PCC 6803 И CALU 713) к токсическому действию солей тяжёлых металлов.

Токсичность солей тяжёлых металлов ( $\text{AgNO}_3$ ;  $\text{PbSO}_4$ ;  $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) оценивали по их среднеэффективным концентрациям ( $\text{EC}_{50}$ ,  $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ ).

Опыт проводили в 3-х параллельных пробах. За среднеэффективные концентрации солей тяжёлых металлов ( $\text{EC}_{50}$ ,  $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ ) – принимали концентрации, при которых количество клеток в культуре цианобактерий при инкубации с разными концентрациями солей тяжёлых металлов снижалось на 50% по сравнению с начальной плотностью культуры к определенному сроку.

Данные о токсичности солей тяжёлых металлов для *Synechocystis* sp. PCC 6803 представлены в таблице 1.

В результате проведённых исследований установлено, что для *Synechocystis* sp. PCC 6803 (на 7-е сутки) наибольшую токсичность проявляют ионы меди ( $\text{LC}_{50} = 1,7 - 170 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ ), а наименьшую ( $\text{LC}_{50} = 700 - 1700 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ ) – кадмия. Однако надо отметить, что при оптимальных условиях (23°C; 2200 лк) для *Synechocystis* sp. PCC 6803 токсический эффект всех исследуемых металлов был в 10-20 раз ниже, чем при том же освещении и пониженной температуре (15°C; 2200 лк), к тому же  $\text{LC}_{50}$  превышала предельно допустимые концентрации ПДК в 10-300 раз. При низкой освещенности (500 лк; 23°C) токсичность всех металлов была значительно выше, чем при 2200 лк (почти в 10 раз – ртути и в 100 раз – меди). Таким образом, в условиях низкой освещенности ионы тяжёлых металлов проявляли более высокий токсический эффект, чем при 2200 лк.

Из полученных данных можно сделать вывод, что низкая температура и освещенность усиливают токсичность тяжёлых металлов для *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Данные о токсичности солей тяжёлых металлов для *Synechocystis* sp. CALU 713 представлены в таблице 2.

Согласно представленным данным, для *Synechocystis* sp. CALU 713 при 23°C, независи-

Таблица 1

Летальные концентрации ионов тяжелых металлов ( $LC_{50}$ ,  $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ ) для *Synechocystis* sp. PCC. 6803 на 7-е сутки культивирования при разной температуре и освещенности

Ион металла	ПДК, $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$	$LC_{50}$			
		23 °С; 2200 лк	23 °С; 500 лк	15 °С; 2200 лк	15 °С; 500 лк
$\text{Cu}^{2+}$	1	170 ± 12,4	1,7 ± 0,3	11,9 ± 2,7	21 ± 0,9
$\text{Cd}^{2+}$	5	1700 ± 12,5	700 ± 5,4	80 ± 5,5	18,7 ± 0,3
$\text{Hg}^{2+}$	0,5	170 ± 8,5	16 ± 0,6	52 ± 1,6	71 ± 6,8
$\text{Ag}^+$	50	130 ± 2,5	62 ± 3,1	11,6 ± 0,5	15,8 ± 2,1

Таблица 2

Летальные концентрации ионов тяжелых металлов ( $LC_{50}$ ,  $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ ) для *Synechocystis* sp. CALU 713 на 7-е сутки культивирования в разных условиях температуры и освещенности

Ион металла	ПДК $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$	$LC_{50}$			
		23 °С; 2200 лк	23 °С; 500 лк	15 °С; 2200 лк	15 °С; 500 лк
$\text{Cu}^{2+}$	1	53 ± 4,3	30 ± 2,1	30 ± 2,1	1,5 ± 0,3
$\text{Cd}^{2+}$	5	2 ± 0,3	2 ± 0,35	17,5 ± 1,2	1,7 ± 0,3
$\text{Hg}^{2+}$	0,5	20 ± 1,6	14 ± 2,3	1,3 ± 0,28	1,7 ± 0,1
$\text{Ag}^+$	50	14 ± 0,1	16 ± 0,4	1,5 ± 0,1	16,6 ± 2,1

мо от освещенности, наибольшей токсичностью обладал кадмий, а наименьшей – медь. Однако при такой же температуре (23 °С) и пониженном освещении (500 лк) токсический эффект соли меди увеличился в 1,7 раза. При 15 °С и освещении 2200 лк наибольшую токсичность проявили ртуть и серебро ( $\text{Hg} \geq \text{Ag} > \text{Cd} > \text{Cu}$ ). В условиях низкой температуры и низкой освещенности (15 °С; 500 лк) для *Synechocystis* sp. CALU 713 все металлы на протяжении опыта оказывали постоянный и высокий токсический эффект; наиболее токсичными оказались ионы меди, кадмия и ртути. Надо отметить, что при пониженных температурах и освещении 500 лк концентрации ионов кадмия, вызывающие 50% ингибиторные эффекты, превышали предельно допустимые концентрации для этих металлов в 3 раз. Таким образом, для *Synechocystis* CALU 713 при пониженной освещенности и 15 °С все испытанные металлы на протяжении опыта имели постоянный и высокий токсический эффект.

В результате проведенных исследований установлено, что цианобактерии *Synechocystis* sp. чувствительны к действию солей тяжелых металлов. Однако наиболее чувствительным к токсическому действию солей тяжелых металлов и, соответственно, наиболее подходящим для использования в токсиколого-гигиенических исследованиях

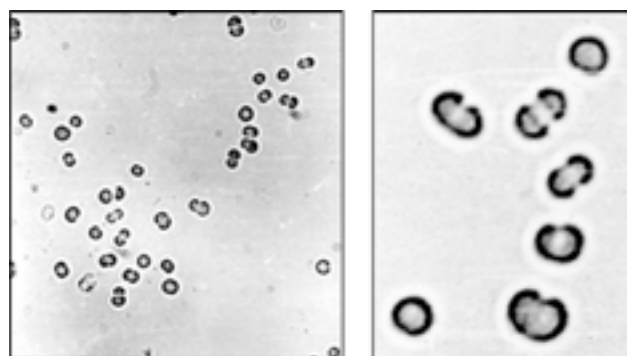


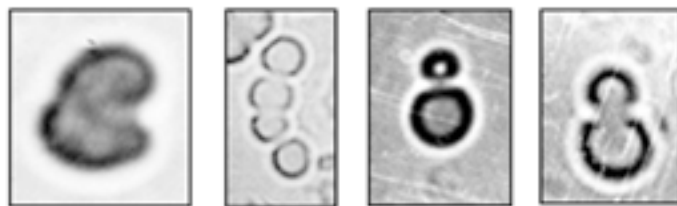
Рис. 1. Клетки *Synechocystis* sp. PCC 6803 (контроль)

является штамм *Synechocystis* sp. CALU 713.

Для этого штамма наиболее токсичными были соли ртути ( $EC_{50} = 1,0 \pm 0,1 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ ) и свинца ( $EC_{50} = 2,0 \pm 0,3 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ ), а наименее – мышьяка ( $EC_{50} = 14,0 \pm 0,1 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ ) и меди ( $EC_{50} = 15,0 \pm 2,1 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ ).

Для штамма CALU 713 токсичность металлов убывает в следующей последовательности ( $\text{Hg} > \text{Pb} > \text{As} > \text{Cu}$ ), для штамма *Synechocystis* sp. PCC 6803 ( $\text{As} > \text{Hg} > \text{Pb} > \text{Cu}$ ).

Для изучения основных проявлений цитотоксического действия солей тяжелых металлов исследовали их влияние на структурные изменения цианобактерий.



**Рис. 2.** Клетки *Synechocystis* sp. PCC 6803 после 7 суток культивирования в среде с ионами тяжелых металлов

Для решения этой задачи использовали световую и электронную микроскопию. Исследование проводили на 7-е сутки инкубации цианобактерий с солями тяжелых металлов. Данный срок исследования был выбран с учётом того, что к этому времени культуры цианобактерий достигают оптимальной репродуктивной активности (Гусев М.В., 2003).

В результате проведенных исследований установлено, что в контроле при оптимальных условиях культивирования (23 °С, 2200 лк) оба штамма *Synechocystis* sp. CALU 713 и PCC 6803 были представлены клетками сферической формы. Диаметр клеток 2 – 3 мкм. Клетки в культуре обычно располагались парами (рис. 1).

В присутствии солей тяжелых металлов у цианобактерий были обнаружены изменения формы и размеров клеток – наблюдали появление как относительно крупных (до 4,7 мкм), так и мелких клеток (до 1,3 мкм). Отмечено появление атипичных форм клеток, а также появление нехарактерных для данных штаммов многоклеточных цепочек (рис. 2).

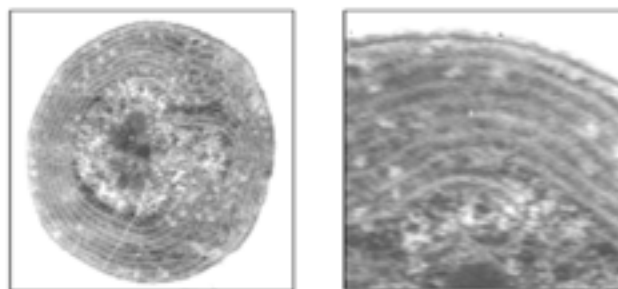
Выявленные по данным световой микроскопии морфологические признаки токсического действия солей тяжелых металлов позволили предположить отражение этого эффекта и на ультраструктурном уровне.

В связи с этим были проведены исследования ультраструктуры клеток цианобактерий (на трансмиссионном электронном микроскопе *Synechocystis* sp. штаммов PCC 6803 и CALU 713 при культивировании в средах с тяжелыми металлами).

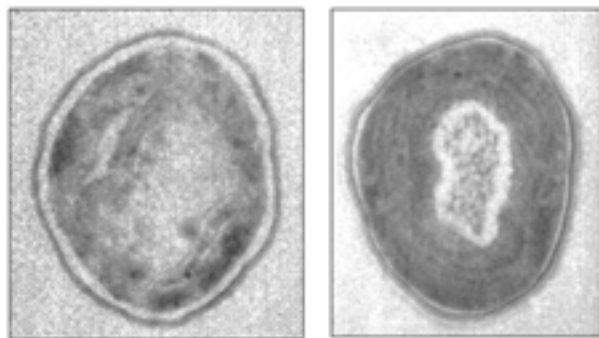
В результате проведенных исследований установлено, что в контроле у цианобактерий внутриклеточные органеллы тилакоиды расположены в концентрических рядах, наружный чехол дифференцирован слабо. Область нуклеоида зернистой структуры, четко выражена, сферической формы у штамма PCC 6803 и полигональной формы у штамма CALU 713 (рис. 3).

При культивировании цианобактерий в средах с солями тяжелых металлов были выявлены изменения ультраструктуры клеток, однотипные при действии всех исследованных солей тяжелых металлов, что позволяет предположить, что морфологические изменения имеют неспецифический характер.

Полученные результаты исследований показали, что у *Synechocystis* sp. PCC 6803 в присутствии всех исследованных металлов происходило утолщение клеточной стенки, в следствие адсорбции ионов на клеточной поверхности. Деградация пептидогликанового слоя – характерное проявление токсического действия тяжелых металлов на штаммы *Synechocystis*. Местами он утолщается и становится менее электроноплотным. В последующем клетка теряет сферическую форму и происходит плазмолиз – отслоение клеточной стенки от протопласта. Наблюдалась деструкция тилакоидных мембран. В нуклеоплазме выявляли накопление полифосфатных гранул, по-видимому, играющих важную роль в связывании ионов металлов и их детоксикации. В результате разрушений рибосом цитоплазма теряет характерную зернистость и в ней появлялись обширные светлые участки. Нуклеоид, в норме гомоген-



**Рис. 3.** Ультраструктура клеток *Synechocystis* sp. PCC 6803 и CALU 713 в контроле. Звездочкой отмечена зона нуклеоида, черным треугольником – тилакоиды, белым треугольником – фикобилисомы. Масштаб – 0,2 мкм.



**Рис. 4.** Ультраструктура клеток *Synechocystis* sp. PCC 6803 после 7 суток культивирования в среде с солями тяжелых металлов. Звездочкой отмечена зона нуклеоида, черным треугольником – деструкция тилакоидов в хроматоплазме, черной стрелкой – отслоение клеточной стенки. Масштаб – 0,5 мкм

ный, агрегировал в нерегулярно расположенные плотные тяжи (рис.4).

При культивировании цианобактерий в средах, содержащих соли тяжелых металлов, происходило скопление муреина в области септы, что препятствовало процессу деления клеток (рис. 5).

Таким образом, токсическое действие солей тяжелых металлов проявлялось морфологическими изменениями клеток в виде изменения в форме и размере клеток, в появлении способности, не свойственной для данных штаммов, формировать многоклеточные микроагрегаты и цепочки. Ультраструктурные изменения выражались в утолщении клеточной стенки; расхождении тилакоидных мембран с расширением внутритилакоидного пространства внутри клетки; цитоплазма теряла характерную зернистость и в ней появлялись обширные светлые участки; нуклеоид приобретал волокнистую структуру; в нуклеоплазме на некоторых срезах отмечены электроплотные внутрицитоплазматические структуры. Зафиксировано нарушение в процессе деления, что, очевидно, связано с объяснялось наличием между дочерними клетками толстого слоя муреина. Выяв-

ленные морфологические изменения цианобактерий носили неспецифический характер.

#### **Заключение.**

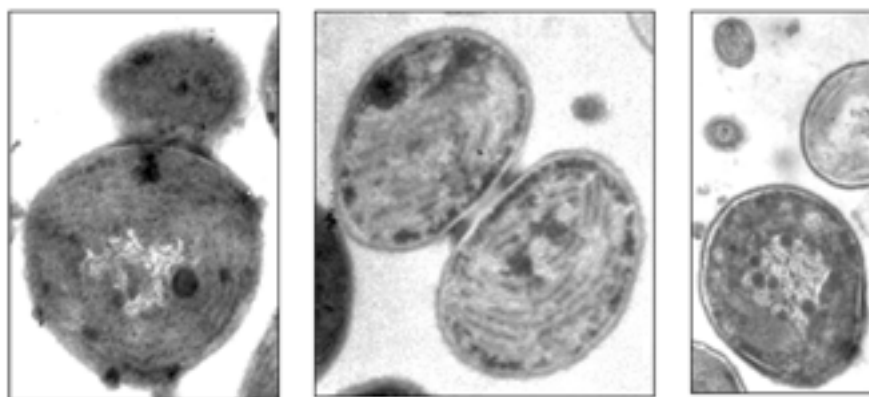
Таким образом, выявленные морфологические адаптации могут быть использованы в качестве тестов при биоиндикации загрязненной среды.

#### **Выводы:**

1. Цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 и *Synechocystis* sp. CALU 713 проявляли высокую чувствительность к тяжелым металлам (меди, кадмию, серебру и ртути); рост культуры ингибировали все испытанные металлы; чувствительность к ним у *Synechocystis* sp. CALU 713 была на порядок выше, чем у *Synechocystis* sp. PCC 6803.

2. *Synechocystis* sp. PCC 6803 и *Synechocystis* sp. CALU 713 могут быть использованы при тестировании загрязнений водной среды. Поскольку принятые в России ПДК по кадмию и серебру для тест-объектов токсичны, они недопустимы для экологической экспертизы загрязненных сред и нуждаются в пересмотре.

3. Морфологические изменения, вызванные тяжелыми металлами, носили неспецифический характер и проявлялись в нарушении деления и появления клеток с измененной формой и размером.



**Рис. 5.** Ультраструктура клеток CALU 713 после 7 суток культивирования в среде с тяжелыми металлами. Черной стрелкой отмечено отслоение клеточной стенки, белой стрелкой – муреин. Масштаб – 0,5 мкм.

4. При воздействии тяжёлыми металлами на клетки цианобактерий выявлены неспецифические нарушения на ультроструктурном уровне, выраженные в изменении толщины и целостности пептидогликанового слоя, расхождении тилакоидных мембран с образованием внутритилакоидных пространств; агглютинации фикобилисом и накоплении полифосфатных гранул; нуклеоплазма те-

ряет зернистость и становится волокнистой. Все эти структуры, возможно, участвуют в связывании катионов металлов и их детоксикации.

5. *Synechocystis* sp. PCC 6803 и *Synechocystis* sp. CALU 713 могут быть использованы в качестве экспериментальной модели для исследования токсичности тяжёлых металлов при тестировании загрязнений водной и почвенной среды.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беккер А.А., Агаев Т.Б. Охрана и контроль загрязнения природной среды. Л.: Гидрометеоздат; 1989.
2. Богачева А.С., Шилов В.В., Полозова Е.В., Ключкин И.Н. Перспективы использования цианобактерий *Synechocystis* sp. для оценки степени загрязненности водных объектов солями тяжелых металлов. Санитария и гигиена. 2017; 7: 656-61.
3. Зарицкая Е.В., Шилов В.В., Полозова Е.В., Богачева А.С. Современные альтернативные методы исследования, используемые для оценки безопасности продукции. Экология человека. 2017; 3: 21-5.
4. Громов Б.В., Павленко Г.В. Экология бактерий. Л.: Издательство Ленингр. ун-та; 1989.
5. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. М.: Академия; 2003.
6. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение в природоведческую микробиологию. М.: Университет; 2001.
7. Ramus J. The capture and transduction of light energy. The Biology of Seaweeds. Oxford: Blackwell Sci. Publ. 1981: 458-92.
8. Skulberg O.M., Geoffrey A., Carmichael C., Carmichael W.W. Toxic blue-green algal blooms in Europe: a growing problem. AMBIO. 1984; 13: 244-7.
9. Савельев И.Б., Селях И.О. Влияние ионов цинка на морфологию и ультроструктуру клеток цианобактерий. В кн.: Материалы международной научной конференции «Автотрофные микроорганизмы». М.; 2000: 159-60.

## REFERENCES:

1. Bekker A.A., Agayev T.B. Protection and control of environmental pollution. L.: Hydrometeoizdat; 1989. (in Russian)
2. Bogacheva A.S., Shilov V.V., Polozova E.V., Klyushkin I.N. Prospects for the use of cyanobacteria *Synechocystis* sp. to assess the degree of contamination of water bodies with heavy metal salts. Sanitation and hygiene. 2017; 7: 656-61. (in Russian)
3. Zaritskaya E.V., Shilov V.V., Polozova E.V., Bogacheva A.S. Modern alternative research methods used to assess product safety. Human ecology. 2017; 3: 21-5. (in Russian)
4. Gromov B.V., Pavlenko G.V. Ecology of bacteria. L: Leningrad Publishers. un-that; 1989. (in Russian)
5. Gusev M.V., Mineeva L.A. Microbiology. M.: Academy; 2003. (in Russian)
6. Zavarzin G.A., Kolotilova N.N. Introduction to the natural history of microbiology. M.: University; 2001. (in Russian)
7. Ramus J. The capture and transduction of light energy. The Biology of Seaweeds. Oxford: Blackwell Sci. Publ. 1981: 458-92.
8. Skulberg O.M., Geoffrey A., Carmichael C., Carmichael W.W. Toxic blue-green algal blooms in Europe: a growing problem. AMBIO. 1984; 13: 244-7.
9. Saveliev I.B., Selyah I.O. The effect of zinc ions on the morphology and ultrastructure of cyanobacteria cells. In: Materials of the International Scientific Conference "Autotrophic Microorganisms". M.; 2000: 159-60. (in Russian)

A.S. Bogacheva<sup>1,2</sup>, E.V. Polozova<sup>1,2</sup>, V.V. Shilov<sup>2</sup>, E.V. Davydova<sup>2,3</sup>, M.A. Yudin<sup>2,4</sup>, I.N. Klyushkin<sup>5</sup>

## INDICATION OF WATER POLLUTION WITH HEAVY METALS BY MEANS OF CYANOBACTERIA *SYNECHOCYSTITIS* sp.

<sup>1</sup>I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 197022, Saint Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup>I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 195271, Saint Petersburg, Russian Federation

<sup>3</sup>S.M. Kirov Military Medical Academy, 194044, Saint Petersburg, Russian Federation

<sup>4</sup>State Research Testing Institute of Military Medicine, Ministry of Defense of the Russian Federation, 195043, Saint Petersburg, Russian Federation

<sup>5</sup>Center for Hygiene and Epidemiology in Saint Petersburg in Moscow, Frunze, Pushkin, Kolpinsky districts and the city of Pavlovsk, 192102, Saint Petersburg, Russian Federation

The sensitivity of cyanobacteria to heavy metal salts under different cultivation conditions has been investigated. It is shown that the decrease in temperature and the lack of illumination of the environment increase the toxic effect of heavy metals. Data on morphological changes of cyanobacteria caused by toxic effects of heavy metals are presented. It is noted that cyanobacteria can be used as an experimental model to study the toxicity of heavy metals in the testing of water and soil pollution.

**Keywords:** cyanobacteria, heavy metals, electron microscopy, experimental model, morphological changes, *Synechocystis* sp.

Материал поступил в редакцию 23.04.2019 г.

**СЪЕЗДЫ И КОНФЕРЕНЦИИ****59-е СОВМЕСТНОЕ ЗАСЕДАНИЕ КОМИТЕТА ОЭСР ПО ХИМИИ И РАБОЧЕЙ ГРУППЫ ПО ХИМИЧЕСКИМ, ПЕСТИЦИДАМ И БИОТЕХНОЛОГИЯМ (г. Париж, Франция, 04.06.2019 – 06.06.2019)**

4-6 июня 2019 года в Париже состоялось 59-е совместное заседание Комитета ОЭСР по химии и Рабочей группы по химическим веществам, пестицидам и биотехнологиям (далее – Комитет) Организации экономического сотрудничества и развития (далее – ОЭСР).

В заседании Комитета приняли участие представители государств-членов ОЭСР, государств и международных организаций-наблюдателей. В состав делегации Российской Федерации были включены представители Роспотребнадзора (Х.Х. Хамидулина), НП «КИЦ», НИУ ВШЭ.

Ключевыми вопросами повестки дня заседания Комитета были следующие:

1. Актуальность деятельности, направленной на согласование системы комплексного подхода к испытанию и оценке (IATA) и системы взаимного признания данных (MAD). Принимая во внимание актуальность проблем, связанных с взаимным признанием данных между странами членами ОЭСР и кандидатами в члены, данный документ отражает стремление ОЭСР к ясности и осведомленности в отношении новых подходов к оценке опасности, стимулирует дискуссии о дополнительных актах и изменениях процедуры MAD с целью ее использования на национальном и международном уровнях. В этой связи актуальным является внедрение компьютерных методов моделирования (QSAR) в деятельность структур Роспотребнадзора. ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора активно работает над внедрением современных методов QSAR в практику оценки опасности химических веществ и химической продукции, что является чрезвычайно актуальным, т.к. исследования с использованием инструментов QSAR ОЭСР – один из путей взаимного признания данных.

2. Подготовка ОЭСР методов тестирования безопасности нановеществ для здоровья человека, для представителей водной биоты, а также рекомендации по оценке риска и управления им. Знание данных документов необходимо для сравнительного анализа международных подходов по тестированию и рекомендаций по регулированию нановеществ и наноматериалов с отечественными нормативными документами.

3. Обзорные исследования по правам интеллектуальной собственности на данные о безопасности химических веществ. Этот вопрос представляет огромный интерес для Роспотребнадзора, в связи ведением государственной информационной системы – Федеральный регистр потенциально опасных химических и биологических веществ, а также с вступлением в силу Технического регламента ЕАЭС «О безопасности химической продукции» (ТР ЕАЭС 041/2017). У Российской Федерации нет соглашений с иностранными государствами об обмене конфиденциальной информацией о свойствах химических веществ. В связи с планами по созданию единого в Таможенном союзе Реестра химических веществ и химической продукции, что предусмотрено проектом Технического регламента «О безопасности химической продукции», планируется выработать порядок обмена конфиденциальной информацией о свойствах химических веществ и химической продукции с иностранными государствами. Опыт ОЭСР может быть полезен при решении юридических вопросов по правам интеллектуальной собственности на информацию о безопасности химического вещества для здоровья человека и среды его обитания.

4. Представлен обзор Программы работы Комитета по экологической политике ОЭСР на 2019-2020 гг. Основными определены такие направления, как: социально-экономический анализ регулирования химических веществ и оценка



негативного воздействия на здоровье; методология оценки затрат и выгоды регулирования химических веществ; инструменты и подходы к выявлению и замене опасных химических веществ; основные методологии, политика и анализ подходов к снижению риска воздействия химических веществ; развитие инструментов для оценки и регулирования пестицидов и биоцидов, а также меры противодействия их нелегального оборота; обзор экологической эффективности химического регулирования; химические аварии; регистры выбросов и сбросов; безопасность продуктов питания; оценка безопасности биотехнологий. Пункты программы ОЭСР на 2019 – 2020 гг. по оценке эффективности химического регулирования для сохранения здоровья человека (в условиях трудовой деятельности человека, воздействия на организм детей и подростков), оценке качества воды созвучны ориентирам, определенным Посланием Президента Российской Федерации Федеральному Собранию Российской Федерации от 1 марта 2018 года, а также основными положениями Указа Президента Российской Федерации от 7 мая 2018 года № 204 «О национальных целях и стратегических задачах развития Российской Федерации на период до 2024 года».

5. Особое внимание было сфокусировано на проблемах устойчивого развития и социально – экономической политики, определенными как ключевые вопросы при проведении Глобального форума по охране окружающей среды в рамках совместной деятельности экспертов из стран ОЭСР и не членов ОЭСР. Глобальный форум рассматривается ОЭСР как хорошая площадка для определения стратегии в области химической и биологической безопасности.

6. Рассматривались вопросы будущего взаимодействия стран по вопросам решения сложностей, возникающих в процессе приоритизации химических веществ.

7. Циркулярная модель экономики как одна из целей устойчивого развития, принятого 25 сентября 2015 г. государствами – членами ООН. Основным принципом внедрения данной модели экономики является обеспечение максимальной эффективности от каждого процесса в жизненном цикле товара или услуги, поэтому обращение с отходами становится одним из приоритетных направлений данной экономики. Этот тип экономики характеризуется «3R» – Reduce, Reuse and Recycle: оптимизация производственного процесса, повторное или совместное использование продукта, переработка отходов. В этой связи, возникает необходимость экспертной оценки безопасности для здоровья новых видов сырья, производственных технологий, способов переработки отходов и конечной продукции из отходов производства и потребления.

**Директор ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ»  
Роспотребнадзора  
Х.Х. Хамидулина**

