



СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

Состав организационного комитета III Съезда токсикологов России.....	2
Ермолаева Е.Е., Гончаров Н.В., Радилов А.С., Кузнецов А.В., Глашкина Л.М., Миндукшев И.В., Кузнецов С.В., Протасова Г.А., Добрылко И.А. Активность эстераз, состояние тромбоцитарного звена гемостаза, нейро-мышечной проводимости и морфологические изменения при моделировании хронической пероральной интоксикации веществом типа Vx.....	2
Лопушов Д.В., Ситдикова И.Д., Севастьянова О.Н., Ахтямова Л.А., Балабанова Л.А., Ишуткина О.И. Идентификация метаболитов полициклических ароматических углеводородов в условиях канцерогенно-опасного производства	9
Катцнельсон Б.А., Макеев О.Г., Кочнева Н.И., Дегтярёва Т.Д., Привалова Л.И., Береснева О.Ю., Бушуева Т.В., Старовойтенко Ю.Л., Буханцев В.А., Минин В.В., Ерёмченко О.Е., Киреева Е.П. Контролируемое испытание на женщинах-добровольцах комплекса средств биологической защиты организма от экологически обусловленного токсического и канцерогенного риска	12
Зобов В.В., Ланцова А.В., Зобов А.В., Акамсин В.Д., Галяметдинова И.В., Фаттахов С.Г., Гуниятуллин Р.Х., Горбунов С.М., Резник В.С. Токсичность и терапевтическая широта замещенных 3-(ω-бензилдидиэтиламмониоалкил)-1,6-диметилурацилбромидов и их аналогов.....	19
Степанова Е.В., Слюзова О.В., Бучарская А.Б., Киреев Р.А., Игнатов В.В. Развитие адаптационных механизмов у самок белых крыс в ответ на воздействие ионов кадмия.....	23
Туховская Е.А., Ржевский Д.И., Хохлова О.Н., Мурашев А.Н., Витек М.П. Гемодинамические эффекты при передозировке нового нейропротектора – синтетического пептидного фрагмента аполипопротеина Е «COG1410»	28
Стратулат Т.Г., Сырку Р.Ф., Даскалюк А.П., Соколюк П.Т. Первичная токсикологическая оценка нового регулятора роста растений Reglalg	32
Дьяченко И.А., Мурашев А.Н., Овчинникова Т.В. Исследование нейротоксичности пептаиболов зервамицинов	35
БЮЛЛЕТЕНЬ РОССИЙСКОГО РЕГИСТРА ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫХ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ	
Новые сведения о токсичности и опасности химических и биологических веществ.....	39
Новые публикации по токсикологии и смежным дисциплинам	45
Новые гигиенические нормативы.....	45
Перечень химических и биологических веществ, для которых в мае-июне 2008 г. закончился срок действия государственной регистрации.....	51

Composition of the Organizing Committee of the III Congress of Russian Toxicologists.....	2
Yermolayeva Ye.Ye., Goncharov N.V., Radilov A.S., Kuznetsov A.V., Glashkina L.M., Mindukshev I.V., Kuznetsov S.V., Protasova G.A., Dobrylko I.A. Activity of esterase, status of hemostasis thrombocytic link, neuromuscular conductivity and morphologic changes at modeling chronic peroral intoxication by the substance of Vx type.....	2
Lopushov D.V., Sittikova I.D., Sevastyanova O.N., Akhtyamova L.A., Balabanova L.A., Ishutkina O.I. Identification of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons under conditions of carcinogenic hazardous production processes.....	9
Katsnelson B.A., Makeyev O.G., Kochneva N.I., Degtyaryova T.D., Privalova L.I., Beresneva O.Yu., Bushuyeva T.V., Starovoytenko Yu.L., Bukhanzev V.A., Minin V.V., Yeryomenko O.Ye., Kireyeva Ye.P. Controlled assays of a complex of bioprotective preparations on women-volunteers to protect the organism from ecologically-induced toxic and carcinogenic risk	12
Zobov V.V., Lantsova A.V., Zobov A.V., Akamsin V.D., Galyametdinova I.V., Fattakhov S.G., Guiniyatullin R.Kh., Gorbunov S.M., Reznik V.S. Toxicity and the therapeutic range of 3-(ω-benzyl-diethylammonioalkyl)-1,6-dimethyluracil bromides and their analogs	19
Stepanova Ye.V., Slyuzova O.V., Bucharskaya A.B., Kireyev R.A., Ignatov V.V. Development of adaptation mechanisms in white rats females in response to exposure to cadmium ions.....	23
Tukhovskaya Ye.A., Rzhevskiy D.I., Khokhlova O.N., Murashev A.N., Vitek M.P. Hemodynamic effects at overdose of a new neuroprotector – synthetic peptide fraction of apolipoprotein E «COG1410»	28
Stratulat T.G., Syrku R.F., Daskalyuk A.P., Sokolyuk P.T. Primary toxicological assessment of a new plant-growth regulator «Reglalg»	32
Dyachenko I.A., Murashev A.N., Ovchinnikova T.V. Investigation of neurotoxicity of peptaibol zervamicines.....	35
BULLETIN OF THE RUSSIAN REGISTER OF POTENTIALLY HAZARDOUS CHEMICAL AND BIOLOGICAL SUBSTANCES	
News on toxicity and hazard of chemical and biological substances.....	39
New publications on toxicology and related disciplines.....	45
New hygienic standards	45
List of chemical and biological substances for which the duration of state registration expires in May-June 2008.....	51

Состав организационного комитета III съезда токсикологов России 1–5 декабря 2008 г., Москва

Председатель оргкомитета

Онищенко Г.Г., г. Москва

Заместители председателя

Курляндский Б.А., г. Москва

Лужников Е.А., г. Москва

Секретарь оргкомитета

Хамидулина Х.Х., г. Москва

Члены оргкомитета

Арзамасцев Е.В., г. Москва

Березовская И.В., г. Москва

Гавриленко О.Л., Московская обл.

Гуськова Т.А., г. Москва

Двоскин Я.Г., г. Москва

Дурнев А.Д., г. Москва

Завьялов Н.В., г. Москва

Кацнельсон Б.А., Екатеринбург

Красовский Г.Н., г. Москва

Кучеренко А.И., г. Москва

Ливанов Г.А., г. С-Петербург

Нечипоренко С.П., г. С-Петербург

Остапенко Ю.Н., г. Москва

Петросян В.С., г. Москва

Ракитский В.Н., г. Москва

Ревазова Ю.А., г. Москва

Рембовский В.Р., г. С-Петербург

Рожнов Г.И., Московская обл.

Саноцкий И.В., г. Москва

Савченков М.Ф., г. Иркутск

Софронов Г.А., г. С-Петербург

Терегулова З.С., г. Уфа

Тутельян В.А., г. Москва

Усов Г.А., г. Москва

Филатов Б.Н., г. Волгоград

Филатов Н.Н., г. Москва

Филенко О.Ф., г. Москва

Шандала М.Г., г. Москва

УДК 615.91.092

**Е.Е.Ермолаева¹, Н.В.Гончаров¹, А.С.Радилов¹, А.В.Кузнецов¹, Л.М.Глашкина¹,
И.В.Миндукшев², С.В.Кузнецов², Г.А.Протасова¹, И.А.Добрылко¹**

АКТИВНОСТЬ ЭСТЕРАЗ, СОСТОЯНИЕ ТРОМБОЦИТАРНОГО ЗВЕНА ГЕМОСТАЗА, НЕЙРО-МЫШЕЧНОЙ ПРОВОДИМОСТИ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ПЕРОРАЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ВЕЩЕСТВОМ ТИПА Vx

¹НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России

²НИИ эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН, Санкт-Петербург

В результате длительных экспериментов на белых крысах с использованием перорального пути поступления растворов Vx в дозах от $1 \cdot 10^{-3}$ до $1 \cdot 10^{-7}$ мг/кг разработана модель хронической интоксикации Vx, воспроизводящей основные звенья патогенеза интоксикаций.

На основании полученных результатов с привлечением данных литературы предлагается вероятный механизм развития ФОС-индуцированной хронической патологии, заключающийся в первичном фосфорилировании белковых молекул, функциональных нарушениях на клеточном уровне с последующим развитием иммунореактивных и гипоксических/ишемических процессов.

Ключевые слова: Vx, модель хронической интоксикации, ФОС-индуцированная нейропатия, нехолинэстеразные эффекты.

Введение. Внимание научных коллективов, работающих в области медико-биологического обеспечения процесса уничтожения химического оружия, привлекает проблема выявления

воздействия малых доз (концентраций) фосфорорганических соединений, включая фосфорорганические отравляющие вещества (ФОВ) при интоксикации, особенно, хронической экспо-

зиции. Значение данной проблемы определяется масштабностью процесса уничтожения химического оружия, что предполагает вовлечение большого контингента лиц профессионально задействованных для обеспечения работ на объектах хранения и уничтожения химического оружия [1].

Помимо собственно процесса уничтожения ФОВ, возможность низкоуровневого воздействия фосфорорганических соединений нельзя полностью исключить при демилитаризации объектов, в прошлом производивших отравляющие вещества и химические боеприпасы, при обращении с отходами уничтожения химического оружия, при выведении из эксплуатации объектов хранения и уничтожения химического оружия [2, 3]. Развитие профессиональной патологии у работников бывшего производства ФОВ в относительно благоприятных условиях труда [4], отсутствие методов диагностики, позволяющих прогнозировать возможность развития отставленных последствий при субсимптоматических воздействиях ФОВ [5, 6], а также недостаточная эффективность традиционных методов диагностики в отдаленные сроки хронической интоксикации при воздействии малых доз, сделали актуальным поиск новых критериев диагностики интоксикации фосфорорганическими соединениями и, в частности, фосфорорганическими отравляющими веществами.

Функциональные нарушения нервной системы спустя 4–5 лет после воздействия низких доз зарина и циклозарина у ветеранов войны в Персидском заливе [7], отдаленные функциональные и органические нарушения нервной системы у жертв террористической атаки заринном в токийском метро [8–12], разнообразные проявления интоксикации у лиц с хроническим воздействием фосфорорганических пестицидов, включая выраженное угнетающее действие на систему кроветворения [13, 14], свидетельствуют о наличии в отдаленные сроки интоксикации неантихолинэстеразных признаков действия ФОВ. Следует отметить, не снижающуюся со временем эпидемиологическую распространенность последствий отравления ФОВ у жертв атаки в токийском метро; так, в 1995 г. численность пораженных составляла 5000 человек, из числа которых было госпитализировано 640 человек, 12 – погибло [10–12]. В настоящее время к жертвам атаки причисляют более 10 тысяч человек, получивших относительно низкие дозы зарина с бессимптомной на первых порах интоксикацией [15].

По результатам обследования в клинике НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека бывших работников производства Vx, более чем у половины из них установлен диагноз хро-

нической профинтоксикации Vx [16, 17]. Анализ 126 историй болезни лиц с диагнозом хроническая профинтоксикация Vx показал «лидирующую» патологию нервной системы – энцефалопатии и невропатии, характеризующиеся сочетанием микроорганической симптоматики, угнетением сухожильных и кожных рефлексов с полиневритическими проявлениями вегетосенсорной природы на уровне конечностей, на фоне астеноневротической симптоматики [18]. У больных с хронической профинтоксикацией Vx наблюдали изменения в обмене триптофана, повышенный уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ), нарушения иммунологических показателей [18].

Известно, что в основе нарушений иммунного гомеостаза при воздействии синапсотропных соединений, к которым относится Vx, лежит влияние на эффекторные свойства В-лимфоцитов и на процессы кооперации Т- и В-клеток [19]. Токсическое действие вещества на иммунную систему может быть опосредованным – известна способность некоторых соединений изменять конформационную структуру клеточной поверхности, что делает ее аутоантигенной [20]. В экспериментах на крысах было показано, что зарин и Vx ($0,5 DL_{50}$) вызывают супрессию антителообразования, снижение активности естественных клеток-киллеров, антителизависимую клеточную цитотоксичность и формируют гиперчувствительность замедленного типа [21]. Субхронические дозы зарина ингибируют Т-клеточный иммунитет и могут играть критическую роль в развитии иммуносупрессии [22]. Установлена корреляция между ингибированием АХЭ головного мозга и уровнем угнетения иммунной системы (понижение уровня цитокининов) [23].

В то же время, основу структурных изменений при отравлениях ФОС составляют проявления васкулита, сопровождающиеся демиелинизацией нервных проводников, связанной с аутоиммунным процессом, достигающим максимума в разгар неврологической симптоматики, предположительно вследствие изменения проницаемости гистогематического барьера [24]. Установлено, что циркулирующие антитела к гликофинголипидам могут разрушать плотные межклеточные контакты эндоневрального эндотелия, что приводит к выходу крупных молекул, в том числе иммуноглобулинов, в эндоневральное пространство и вызывает развитие аутоиммунной демиелинизирующей невропатии [25]. Считается, что специфическая сенсibilизация обусловлена наличием эстеразного участка в структуре белков комплемента (компонента С3), который, по мнению некоторых авторов, является мишенью для ФОС [26]. У IgM и некоторых подклассов IgG обнаружена способность

активировать комплемент по классическому пути. При демиелинизирующей нейропатии эти антитела могут оказывать цитотоксический эффект на эндотелиальные клетки, что свидетельствует, во-первых, об общности антигенных детерминант эндотелия и нервной ткани, во-вторых, объясняет возможный механизм нарушения гематотканевого барьера в периферических нервных волокнах [27]. Если процесс демиелинизации в принципе обратим и компенсируется ремиелинизацией при нейтрализации иммунных факторов, то сопутствующий процесс дегенерации аксона становится причиной необратимых функциональных последствий [28].

Следует отметить высокую зависимость трофики нервного волокна от капиллярного русла: объем капилляров составляет всего 2–4% от общего объема нервного волокна [29]. Кроме того, периферические нервы не имеют лимфатических сосудов, которые могли бы обеспечить отток капиллярного инфильтрата и предотвратить возникновение отека [30].

Несмотря на обилие информации, мы не обнаружили в литературе работ, посвященных экспериментальному исследованию хронического действия субсимптоматических концентраций Vx на функциональные составляющие системы гемостаза и нервно-мышечной проводимости. Также отсутствуют сведения о взаимосвязи систем гемостаза и нейромышечной проводимости.

Материалы и методы исследования. Для эксперимента продолжительностью 3 месяца были взяты беспородные крысы-самцы массой 200–220 г. О-этил-S-(2-диизопропиламиноэтил)метилтиофосфонат (вещество типа Vx) ежедневно разводили в питьевой воде для крыс до концентраций $5 \cdot 10^{-8}$, $5 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-6}$ г/100 мл. Группа из 5 крыс потребляла 20 мл водного раствора Vx в сутки. Таким образом, на протяжении трех месяцев подопытные животные 1-й группы ежедневно потребляли с питьевой водой Vx в дозе 10^{-5} мг (Min), 2-й группы – 10^{-4} мг (Med), 3-й группы – 10^{-3} мг (Max) на 1 кг массы. Крысы контрольной группы потребляли ту же питьевую воду без Vx. Во всех группах условия содержания и рацион были идентичными.

Измерение активности холинэстераз в эритроцитах (АХЭ) и плазме (БХЭ) проводили по методу Элмана [31].

Для исследования *тромбоцитарного звена гемостаза* забор крови у крыс, предварительно наркотизированных уретаном в дозе 1,2 г/кг, осуществляли из сонной артерии. В качестве антикоагулянта использовали 3,2% раствор цитрата натрия с апиразой (Sigma) 1 мг/мл, pH 6,0; соотношение кровь: антикоагулянт = 9:1. Обогащенную тромбоцитами плазму получали центрифугированием крови в течение 10 мин при

200g. Функциональную активность тромбоцитов исследовали методом малоуглового светорассеяния на приборе «Лайт-Скан» (НПФ «Люмекс», СПб) [32, 33]. Эксперименты проводились в солевой среде, содержащей: 140 mM NaCl; 10 mM Трис-НСl; 1 mM CaCl₂; pH 7,8; концентрация тромбоцитов не превышала 10^7 кл/мл. Активацию процесса осуществляли с помощью АДФ в диапазоне концентраций 10^{-7} – 10^{-5} М. Регистрация и обработка результатов осуществлялась в программах Etongue и Excel.

Исследование моносинаптического миотатического рефлекса и скорости проведения по периферическому нервному волокну. Результатом раздражения периферического нервного ствола интактных животных является возникновение 3 типов потенциалов действия (ПД) мышцы: М-ответ (результат прямого возбуждения аксонов α -мотонейронов), Н-ответ (собственно моносинаптический ответ), полисинаптические ответы с переменным латентным периодом от 8–12 до 40 и более мс. ПД включает несколько компонентов, отражающих процессы возбуждения афферентных и эфферентных волокон с различными диаметрами, порогами возбуждения и скоростями проведения импульса. По данным литературы [34, 35], у крыс в периферическом нерве по скоростям проведения можно выделить 4 группы волокон: А α – 30–55 м/с; А β – 14–30 м/с; А δ – 2,2–8 м/с; С – менее 1,4 м/с. В настоящей работе нам не удалось наблюдать возбуждения С-волокон, но остальные 3 составляющие потенциала действия полностью соответствовали тем, что описаны другими исследователями.

1. Н-рефлекс. Для моносинаптического тестирования применяли электрическую стимуляцию нерва с последующей регистрацией потенциала действия (ПД) соответствующей мышцы [36]. У крыс, находящихся под уретановым наркозом (1 г/кг), осуществляли ламинэктомию и перерезку спинного мозга в верхнегрудном отделе. В области подколенной ямки проводили секцию двуглавой мышцы бедра (m.biceps femoris) и препаровку седалищного (n.sciatic) и большеберцового (n.tibialis) нервов. С помощью микроманипулятора n.tibialis помещали на раздражающие биполярные платиновые электроды в 5 мм от места вхождения нерва в латеральную головку икроножной мышцы (m.gastrocnemius lateralis). Отведение потенциала действия мышцы осуществляли с помощью биполярных игольчатых электродов. Тестирование начинали через 30 мин после спинализации. Раздражение наносили импульсами прямоугольного тока амплитудой от 300–400 мВ (порог М-ответа) до 60–80 в, длительностью 0,5 мс, с интервалом 30 сек. Исследуемый сигнал через усилитель УУ-2М поступал на вход АЦП L-154 персонального компьютера,

где с помощью специально разработанной программы анализировался и записывался в файл для последующей обработки. Частота дискретизации сигнала составляла 10 мкс, эпоха анализа 250 мс (25000 точек).

2. Измерение скорости проведения по нерву. Проводили полную препаровку n.tibialis до места его перехода в nn.plantar. Седалищный нерв помещали на биполярный раздражающий электрод, установленный около места вхождения нерва в тазовую полость. Потенциал действия регистрировали с помощью монополярного серебряного электрода, установленного на расстоянии 1 см от бифуркации большеберцового нерва. Нерв прищипывали и в область его травматизации устанавливали игольчатый индифферентный электрод. Дальнейшая процедура аналогична моносиноптическому тестированию [37].

Гистологическое исследование проводили на тканях печени, почек, селезенки, желудка и кишечника. Срезы толщиной 6–8 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, наличие коллагеновых волокон в ткани печени выявляли методом Ван-Гизона. Для обнаружения жировых включений срезы из печени толщиной 10–15 мкм окрашивали суданом III. В отдельных экспериментах в культуре ткани печени определяли степень роста 50 эксплантатов по методике органо-типического культивирования с оценкой индекса площади (ИП), который рассчитывается как отношение площади всего эксплантата, включая периферическую зону роста, к исходной площади (т. е. площади центральной зоны).

Результаты исследования обработаны методами вариационной статистики с использованием программы MS Excel.

Результаты и обсуждение. По данным биохимических исследований отмечено снижение активности только АХЭ плазмы и только в начальный период (1 месяц) отравления в группе крыс с наибольшей из примененных в наших экспериментах доз Vx ($1 \cdot 10^{-3}$ мг/кг). Дальнейший сравнительный анализ биохимических параметров свидетельствовал об отсутствии значимых изменений активности холинэстераз плазмы и эритроцитов крыс во всех трех группах относительно контроля. Поэтому дальнейшее описание будет посвящено изменениям состояния тромбоцитов, физиологии сегментарного рефлекторного аппарата спинного мозга и нервных волокон, морфологическим изменениям.

Тромбоциты контрольных животных в отсутствие активатора не меняли уровень светорассеяния на протяжении нескольких минут. Добавление АДФ вызывало активацию тромбоцитов, которая обусловлена, во-первых, взаимодействием АДФ с рецепторами $P2Y_1$ и входом

катионов (главным образом Ca^{2+}) в клетки через неспецифические каналы, во-вторых, взаимодействием АДФ с рецепторами $P2Y_1$ и мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных депо вследствие активации инозитольного обмена [32]. Дальнейшая агрегация тромбоцитов обусловлена взаимодействием АДФ с пуриновыми рецепторами $P2Y_1$ и $P2Y_{ADP}$ и экспрессией интегринных рецепторов GPIIb/IIIa [38, 39, 40]. Тромбоциты подопытных животных после воздействия Vx в дозах 10^{-3} – 10^{-5} мг/кг отличались от контроля выраженной неустойчивостью, заключающейся в развитии спонтанной активации и агрегации без внесения в среду АДФ. Кинетические параметры агрегации при добавлении АДФ были достоверно увеличены как по нормированной максимальной скорости агрегации (U_{max}) (во всех подопытных группах), так и по уровню эффективной концентрации АДФ (EC_{50}) в группах Med (10^{-4} мг/кг) и Max (10^{-3} мг/кг). Наблюдаемое в группе Min (10^{-5} мг/кг) достоверное увеличение только U_{max} при добавлении АДФ, вероятно, свидетельствовало о сенсibilизации тромбоцитов с преимущественной активацией сигнальных путей через протеинкиназу C (ПКС), фосфотирозиную и/или фосфоинозитол-3-киназу, действие которых связано с усилением экспрессии интегринных рецепторов GPIIb/IIIa [41, 42]. Кроме того, мы допускаем возможность неспецифического Vx-фосфорилирования белка VASP по остаткам Ser-157 и Ser-239, что могло бы конкурировать с естественным фосфорили-

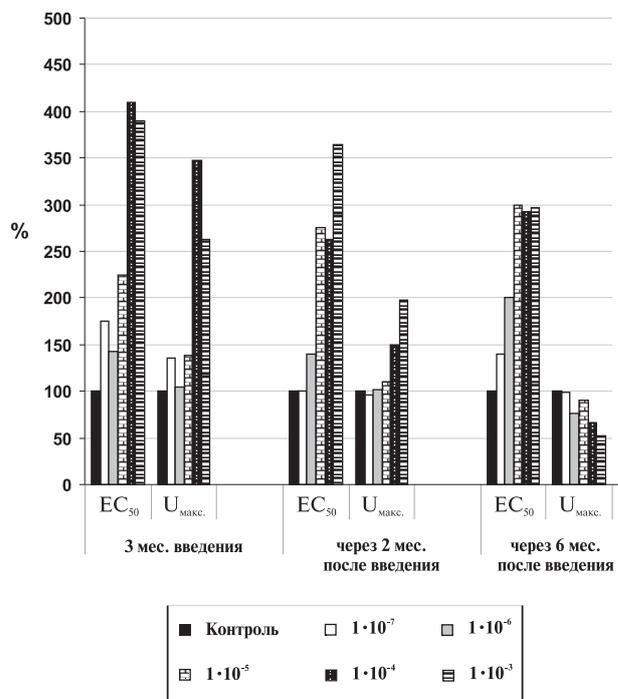


Рис. Относительные изменения параметров агрегации тромбоцитов крыс после энтерального воздействия Vx в дозах $1 \cdot 10^{-3}$ – $1 \cdot 10^{-7}$ мг/кг

**Электрофизиологические показатели периферической нервной системы крыс
после хронического действия Vx**

Показатель	Контроль	10 ⁻³ мг/кг (Max)	10 ⁻⁴ мг/кг (Med)	10 ⁻⁵ мг/кг (Min)
Латентный период М-ответа	1,36±0,29	1,07±0,14*	1,72±0,33**	1,50±0,19
Латентный период максимума 1 компонента М-ответа	2,33±0,54	1,74±0,44*	3,06±0,42**	2,79±0,38
Длительность М-ответа	5,02±1,87	3,62±0,96*	7,29±1,70**	6,73±2,26
Латентный период Н-ответа	4,00±0,41	4,02±0,58	3,78±0,20	3,51±0,20
Латентный период максимума 1 компонента Н-ответа	4,60±0,74	4,35±0,70	3,95±0,56*	4,12±0,33

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

рованием этого белка цАМФ- и цГМФ-зависимыми киназами [40, 43] и способствовать, таким образом, экспрессии интегриновых рецепторов и агрегации тромбоцитов. Увеличение EC_{50} в группах Med и Max при дальнейшем увеличении U_{max} можно объяснить частичной десенситизацией и/или уменьшением количества рецепторов $P2X_1$ и $P2Y_1$, а также нарастающей активностью перечисленных выше киназ вследствие развития патологии на уровне микроциркуляторного русла.

Через два месяца после прекращения перорального поступления Vx во всех группах сохранялись изменения кинетических параметров агрегации: повышение EC_{50} и повышение U_{max} . Однако достоверные отклонения от контроля по обоим параметрам наблюдались только в группе Max. В группе Med имело место достоверное повышение EC_{50} и тенденция ($p < 0,1$) к повышению U_{max} . У животных группы Min наблюдалась тенденция ($p < 0,1$) к повышению EC_{50} .

Заключительная оценка кинетических параметров агрегации тромбоцитов крысы была проведена через шесть месяцев после прекращения воздействия Vx в дозах $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$ и $1 \cdot 10^{-3}$ мг/кг. Показатели EC_{50} были повышены во всех опытных группах, но достоверные отличия от контроля определены только в группе Max (10^{-3} мг/кг). Уровень U_{max} был повышен под воздействием Vx весь предыдущий период, но снизился после 6 месяцев восстановительного периода во всех подопытных группах, причем падение показателя, достоверно ниже контроля, было в группах Max и Med (рис.).

После того как были получены данные по воздействию указанных доз Vx на систему гемостаза, были испытаны еще более низкие дозы Vx: $1 \cdot 10^{-6}$ мг/кг и $1 \cdot 10^{-7}$ мг/кг. Результаты, полученные сразу после 3 месяцев внутрижелудочного поступления вещества в организм и через 2 месяца после прекращения интоксикации, свидетельствовали об отсутствии достоверных изменений Vx в дозах $1 \cdot 10^{-7}$ мг/кг и $1 \cdot 10^{-6}$ мг/кг на

функциональную активность тромбоцитов крысы. Однако через 6 месяцев после завершения трёхмесячного перорального поступления Vx в дозе $1 \cdot 10^{-6}$ мг/кг достоверно повысилась EC_{50} .

Сопоставление результатов, полученных сразу после трёх месяцев интоксикации и в период после прекращения поступления вещества в организм, в целом, свидетельствует о дозозависимом влиянии Vx на процессы агрегации тромбоцитов крысы во всех подопытных группах.

Исследование моносинаптического миотатического рефлекса показало, что у подопытных животных, получавших Vx в дозе Max (10^{-3} мг/кг), наблюдалось по сравнению с контролем увеличение амплитуды Н-ответа, изменения временных параметров латентного периода и длительности М-ответа. Полисинаптические ответы возникали при всех силах возбуждения, носили более выраженный характер чем в контроле, с более четкой дифференциацией пиков составного ПД. Определялась тенденция к возрастанию скорости проведения по волокнам группы Ad. В группе Med (10^{-4} мг/кг) наблюдались более выраженные отличия от контроля: наряду с нормальными ПД («спайкового» типа) определялись медленные волны деполяризации (до 30 мс); латентный период М-ответа был значительно длиннее, увеличена скорость нарастания ПД и его длительность (табл.).

Отличительной особенностью было отсутствие градуальности увеличения амплитуды ПД при усилении раздражающего стимула. В норме такое явление имеет место у новорожденных животных и обусловлено слабой дифференцированностью мотонейронов [34]. Отмечено возникновение высокоамплитудных моторных разрядов, характерных для мышцы с нарушенными регуляторными влияниями. Дифференциация компонентов ПД была наиболее выражена в группах волокон Aa и Ad. Результаты тестирования у крыс группы Min (10^{-5} мг/кг) достоверно не отличались от контроля. В то же время, у части животных можно было наблюдать спектр

патологических реакций: фасцикуляции, наличие медленных (местных, деполяризационных) потенциалов и парадоксальные разряды. Ввиду очевидности пороговых изменений вышеуказанных физиологических показателей мы не проводили исследования на животных, получавших более низкие дозы Vx. Тенденция к увеличению скоростей проведения по миелинизированным нервным волокнам среднего и малого диаметра может быть обусловлена повышением калиевой проницаемости и, как следствие, усилением процессов реполяризации мембраны. Известно, что мембрана нервного волокна млекопитающих под миелиновой оболочкой практически лишена натриевых каналов [44]. Так как при интоксикации более тонкое волокно быстрее очищается от миелина, то и ускорение проведения по нерву выражено в этой группе волокон сильнее. Можно предположить, что по мере развития патологического процесса увеличение ширины демиелинизованного участка нерва (расширение области перехватов Ранвье) приведет к нарушению сальтаторного проведения и, следовательно, снижению скорости проведения нервного импульса.

Анализ гистологических препаратов внутренних органов при хроническом воздействии Vx в дозах 10^{-3} , 10^{-4} и 10^{-5} мг/кг показал отсутствие четкой дозовой зависимости. Выявленные патологические изменения, как местного, так и резорбтивного действия, отмечались у животных всех исследованных групп:

- местное действие проявлялось дистрофическими изменениями эпителия желудочно-кишечного тракта;
- резорбтивное действие отмечалось преимущественно в печени, в меньшей степени в почках и селезенке и характеризовалось белковой дистрофией паренхимы печени и эпителия проксимальных канальцев почки.

Выявленные очаговые дистрофические изменения в паренхиме печени были, скорее всего, обусловлены сосудистыми расстройствами, связанными с нарушением их проницаемости, проявляющимися в виде периваскулярных отеков, плазматического пропитывания стенок сосудов и периваскулярных пространств, со слабо выраженными склеротическими процессами (периваскулярное разрастание коллагеновых волокон).

Выводы. 1. Проведенные исследования позволяют предложить в качестве адекватной экспериментальной модели хронической интоксикации Vx пероральное воздействие растворов Vx на белых крыс в течение 3-х месяцев в дозах $1 \cdot 10^{-3}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ от DL_{50} с параллельным и последующим 2-месячным наблюдением.

2. Отсутствие существенных изменений в ак-

тивности маркерных ферментов (холинэстераз) при длительном воздействии не является фактом благополучного состояния организма, т. к. развитие патологических процессов и отдаленные последствия не связаны с холинэргическими механизмами.

3. Результаты исследований функциональной активности тромбоцитов позволяют говорить об участии системы гемостаза в формировании реакции организма на воздействие вещества типа Vx.

4. Выраженные морфологические изменения в печени отравленных животных (сосудистые расстройства и дистрофические процессы) свидетельствуют об определенном вкладе патологии печени в патогенез развития интоксикации Vx.

5. Исследование моносинаптического миотатического рефлекса и скорости проведения по периферическому нервному волокну у крыс показало развитие ФОС-индуцированной neuropathии через 3 месяца перорального поступления Vx в дозе $1 \cdot 10^{-4}$ мг/кг.

6. На основании полученных результатов с привлечением данных литературы предлагается вероятный механизм развития ФОС-индуцированной хронической патологии, заключающийся в первичном фосфорилировании белковых молекул, функциональных нарушениях на клеточном уровне с последующим развитием иммунореактивных и гипоксических/ишемических процессов.

7. Представленные результаты исследований позволяют с уверенностью говорить о ведущей роли несинаптических механизмов в развитии хронической интоксикации фосфорорганическими соединениями типа Vx.

Список литературы

1. Рембовский В.Р. // Сборник трудов Всероссийской научно-практической конференции. – СПб., 2007. – С. 42-45.
2. Ермолаева Е.Е. и др. // Сборник трудов Всероссийской научно-практической конференции. – СПб., 2007. – С. 104-107.
3. Ермолаева Е.Е. Автореф. дис. канд. мед. наук. – СПб, 2000. – 30 с.
4. Крилицын Н.В. // Росс. хим. журнал, 2004. – Т. XLVIII. – № 2. – С 51–60.
5. Янно Л.В., Федорченко А.Н., Конева Т.А. // Труды научно-практической конференции. – СПб., 2002. – С. 392-398.
6. Саватеев Н.В., Мусийчук Ю.И., Козяков В.П. // Материалы Российской научной конференции. – СПб.: ВМА, 2001. – С. 341-342.
7. Proctor Susan P. et al. // NeuroToxicology, 2006. – V. 27. – P. 931-939.
8. Miyaki K. et al. // Occup Health, 2005. – 47:299–304.

9. **Murata K. et al.** // *Neurol.*, 1997. – 244. – P. 601-606
10. **Nishiwaki Y. et al.** // *Environ. Health Perspect.*, 2001. – V. 109. – P. 1169-1173.
11. **Yokoyama K. et al.** // *Physiol. (Paris)*, 1998. – V. 92. – P. 317-323.
12. **Yokoyama, K. et al.** // *Arch. Environ. Health*, 1998. – V. 53. – P. 249-256.
13. **Шуляк В.Г.** // *Современные проблемы токсикологии*, 2002. – Т. 2. – С. 21-29.
14. **Misra U.K. et al.** // *Electromyogr Clin Neurophysiol.*, 1994. – 34:197-203. 87-95.
15. **Okumura T. et al.** // *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005. – V. 207. – P. 471-476.
16. **Янно Л.В., Федорченко А.Н.** // *Материалы Всесоюзной научно-практической конференции.* – СПб., 2000. – С. 318.
17. **Прохоренко О.А. и др.** // *Сборник трудов Всероссийской научно-практической конференции.* – СПб., 2007. – С. 342.
18. **Конева Т.А. и др.** // *Сборник трудов Всероссийской научно-практической конференции.* – СПб., 2007. – С. 341.
19. **Петров Р.В., Хаитов Р.М.** Иммунологические механизмы клеточного гомеостаза. // В кн. «Гомеостаз» / Под ред. П.Д. Горизонтова. – М.: Медицина, 1981. – 576 с.
20. **Алексеева О.Г., Дзева Л.А.** Аллергия к промышленным химическим соединениям. – М., 1978. – 270 с.
21. **Забродский П.Ф. и др.** // *Токсикологический вестник*, 2006. – № 6. – С. 48-54.
22. **Kalra R. et al.** // *Toxicology. Appl. Pharmacology*, 2002. – V. 184. – P. 82-87.
23. **Rogene F. et al.** // *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2003. – V. 189. – P. 170-179.
24. **Плужников Н.Н. и др.** // *Труды научно-практической конференции.* – СПб., 2002. – С. 407-408.
25. **Kanda T., Yamawaki M., Iwasaki T., Mizusawa H.** *Glycosphingolipid antibodies and blood-nerve barrier in autoimmune demyelinating neuropathy* // *Neurology*, 2000. – V. 54. – № 7. – P. 1459-1464.
26. **Lan C.T. et al.** // *Anat. Embryol. (Berl.)*, 1996. – V. 194. – № 2. – P. 177-185.
27. **Kanda T. et al.** // *Cell. Biol.*, 1994. – V. 126. – № 1. – P. 235-246.
28. **Hughes et al.** // *Mult. Scler.*, 1997. – V. 3. – № 2. – P. 88-92.
29. **Ollson Y.** // In: *Peripheral Neuropathy (2nd ed.)* / Ed. by Dyck P.J. et al., 1984. – P. 579-597.
30. **Odman S. et al.** // *Am. J. Physiol.*, 1987. – V. 252 (Cell Physiol., 21). – P. 335-341.
31. **Ellman G.L. et al.** // *Biochem. Pharmacol.*, 1961. – V. 7. – P. 88-95.
32. **Деркачев Э.Ф. и др.** // *Способ исследования активации и агрегации тромбоцитов. Патент RU 2108579 C1 6 G01 N 33/49.* 1998. – Б.И. № 10 (II). – С. 298.
33. **Mindukshev I. et al.** // *Spectroscopy*, 2005. – 19. – 247-257.
34. **Harper A.A., Lawson S.N.** // *J. Physiol. (Lond)*, 1985. – V. 359. – P. 47-63.
35. **Lewin G.R., McMahon S.B.** // *J. Neurophysiol.*, 1991. – V. 66. – № 4. – P. 1218-1231.
36. **Hoffman P.** // *Z. Biol.*, 1918. – Bd. 68. – P. 351-370.
37. **Кузнецов С.В.** // *Эвол. биохим. и физиол.*, 1991. – Т. 27. – № 6. – С. 749-756. – Т. 27. – № 6. – С. 749-756.
38. **Jin J., Kunapuli S.P.** // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998. – V. 95. – P. 8070-8074.
39. **Clapham D.E., Neer E.G.** // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1997. – V. 37. – P. 167-203.
40. **Walter U. et al.** // NY, 1993. – P. 237-249.
41. **Geiger J., Nolte C., Walter U.** // *Amer. J. Physiol.*, 1994. – V. 267. – P. C236-C244.
42. **Shattil S.J., Kashiwagi H., Pampori M.** // *Blood*, 1998. – V. 91. – P. 2645-2657.
43. **Geiger J. et al.** // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1999. – V. 19. – P. 2007-2011.
44. **Жуков Е.К.** *Очерки по нервно-мышечной физиологии.* – Л., 1969. – 287 с.

Материал поступил в редакцию 30.07.07.

Ye.Ye.Yermolayeva¹, N.V.Goncharov¹, A.S.Radilov¹, A.V.Kuznetsov¹, L.M.Glashkina¹, I.V.Mindukshev², S.V.Kuznetsov², G.A.Protasova¹, I.A.Dobrylko¹

ACTIVITY OF ESTERASE, STATUS OF HEMOSTASIS TROMBOCYTIC LINK, NEUROMUSCULAR CONDUCTIVITY AND MORPHOLOGIC CHANGES AT MODELING CHRONIC PERORAL INTOXICATION BY THE SUBSTANCE OF VX TYPE

¹Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology
²I.M.Sechenov Research Institute of Evolutional Physiology and Biochemistry,
 Russian Academy of Sciences, St. Petersburg

The development of a model of chronic intoxication reproducing main links of intoxication pathogenesis resulted from long experiments on white rats using a peroral route of administration of Vx solutions in doses of $1 \cdot 10^{-3}$ to $1 \cdot 10^{-7}$ mg/kg. Basing on the results received and using literature references, it is proposed a plausible mechanism of development of chronic pathology induced by organophosphoric toxic agents. This mechanism includes a primary phosphorylation of albuminous molecules, functional disturbances at a cellular level with a subsequent development of immunoreactive and hypoxic/ ischemic processes.

УДК 613.632:547.21

Д.В.Лопушов*, И.Д.Ситдикова, О.Н.Севастьянова,
Л.А.Ахтямова, Л.А.Балабанова, О.И.Ишуткина**ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕТАБОЛИТОВ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ
УГЛЕВОДОРОДОВ В УСЛОВИЯХ КАНЦЕРОГЕНООПАСНОГО ПРОИЗВОДСТВА***ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет»*

Разработан метод идентификации метаболита бенз(а)пирена 7,8-дигидрокси-пирена, который может использоваться в качестве биомаркера производственной экспозиции к бенз(а)пирену.

Ключевые слова: злокачественные новообразования, бенз(а)пирен, метаболиты, профессиональный отбор, производство.

Введение. Проблема профессиональных злокачественных новообразований – одна из наименее разработанных в нашей стране с научной, практической и правовой точек зрения. Удельный вес злокачественных новообразований (ЗН) профессионального генеза в структуре общей онкологической заболеваемости населения Российской Федерации в 50-х гг. XX в. не превышал 1%, в 70–90-е гг. он составлял уже 4–15%, а в начале третьего тысячелетия он может достигнуть 25–38% [2].

В современную эпоху научно-технического прогресса, сопровождающегося внедрением модернизированных технологических процессов с получением новых промежуточных и конечных химических веществ, продуктов, использование новых способов обработки материалов, на первый план по актуальности выдвигаются вопросы возможных канцерогенных воздействий производственных факторов на обширные контингенты работающих [3].

Профессиональный рак – это совокупность различных злокачественных новообразований, развивающихся в ответ на воздействие профессиональных факторов, обладающих канцерогенным действием. Длительный период развития позволяет рассматривать эту патологию как отдаленное последствие такого воздействия [1].

По мнению зарубежных экспертов, масштабы распространения профессионального рака колеблются в широких пределах – от 1 до 40% всех впервые выявленных случаев. В первую очередь это касается так называемых онкоопасных производственных процессов, осуществление которых либо невозможно без применения тех или иных химических веществ и продуктов, обладающих канцерогенными свойствами, либо сопровождается их образованием [7, 9].

Для целей эффективной профилактики возможных нарушений в состоянии здоровья рабо-

тающих, в особенности предшествующих развитию опухолевой болезни, необходимо применение высокоинформативных специфических показателей и тестов. К сожалению, сегодня при проведении обследований состояния здоровья трудящихся и населения в целом, а также в онкологической практике, принято устанавливать диагноз онкопатологии на основании рентгенологических данных, данных УЗИ, компьютерной томографии и др., которые позволяют выявить уже развившуюся болезнь. Поэтому для целей первичной гигиенической профилактики онкопатологии эти методы мало пригодны. Все они направлены на хотя и раннее, но все же выявление уже сформировавшейся опухоли. На наш взгляд, поиск методов ранней диагностики предпатологических состояний в контексте медицинской профилактики – перспективный путь повышения эффективности и действенности управления риском.

К настоящему времени накоплено большое количество данных о возникновении злокачественных новообразований в результате контакта в процессе работы с различными канцерогенными факторами [4, 5].

Особое значение уделялось определению в воздухе рабочей зоны бенз(а)пирена как типичного представителя полициклических ароматических углеводородов. Международная группа экспертов отнесла бенз(а)пирен к числу канцерогенов. Профессиональное действие технических продуктов, содержащих бенз(а)пирен (БП) и его метаболиты вызывают у людей рак нескольких локализаций, включая кожу, легкие, мочевой пузырь.

Бенз(а)пирен является наиболее типичным химическим канцерогеном окружающей среды. Он присутствует во всех сферах окружающей среды: в атмосферном воздухе населенных мест и их окрестностях, в воздухе производственных помещений, в почве, в воде открытых водоемов.

* Фрагмент диссертационной работы

Одним из распространенных источников бенз(а)пирена является процесс горения практически всех горючих материалов, он присутствует в дымовых газах, копоти, саже. Максимальный выход бенз(а)пирена наблюдается при температуре пиролиза около 80°C, минеральные масла и другие технические продукты на их основе также содержат бенз(а)пирен.

Бенз(а)пирен – типичный пример соединения, которое может участвовать в обмене веществ на разных стадиях. Это пятичленное соединение имеет 11 участков гидроксирования и 4 участка образования диолов. Так же могут образовываться хиноны. Один из наиболее активных метаболитов БП 7,8-дигидродиол-9,10 эпоксид взаимодействует с ДНК с образованием аддукта.

В Российской Федерации разработка и использование новых биомаркеров канцерогенного риска только начинается, но исключительно в научно – исследовательских целях. В тоже время внедрение новых методов профотбора создаст основу для наиболее научно обоснованного формирования групп риска на онкоопасных производствах. В литературе есть указания на разработанный метод ВЭЖХ для определения 5-бензилмеркаптуровой кислоты в моче человека, которая является метаболитом бензола и толуола. Данный метод применяли для определения бензола и толуола в моче лиц, подвергающихся воздействию ароматических углеводородов на производстве и у курильщиков [6, 8].

Цель исследования заключалась в разработке метода индикации маркерного метаболита бенз(а)пирена: 7,8 дигидроксибенз(а)пирена (7,8-БП) у работников, имеющих производственный и бытовой контакт с бенз(а)пиреном в условиях канцерогенноопасного производства и изучение индивидуальных уровней их экскреции.

Исследования проводились на промышленных предприятиях машиностроительной отрасли Республики Татарстан, признанных канцерогенноопасными.

Материалы и методы исследования. В работе использовали следующие соединения: раствор бенз(h,g,i)пирелен в циклогексане фирмы Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, для экстракции метаболитов бенз(а)пирена из экскретов применяли ионообменную смолу Amberlite XAD фирмы Supelco, для деконъюгации применяли ферменты Sulfatase, β -glucuronidase фирмы Sigma. Остальные реактивы (в основном растворители) были отечественного производства. Все химические реактивы были химически чистые и в случае необходимости подвергались дополнительной очистке. В качестве внутреннего стандарта при количественной оценке метаболитов бенз(а)пирена применялся бенз(h,g,i)пи-

релен, добавляемый к пробе в известных количествах.

Для проведения спектрально-флуоресцентного анализа метаболитов бенз(а)пирена использовали эффект Шпольского (1952), состоящий в оценке квазилинейчатых спектров флуоресценции полициклических ароматических углеводородов при температуре кипения жидкого азота.

Методика определения метаболитов бенз(а)пирена включала в себя ряд этапов: *1-ый этап сбор и обработка проб мочи.* Сбор суточного количества мочи проводится у работающих в последнюю смену рабочей недели. При проведении анализа рН мочи доводят до 8,0 при помощи 0,01% раствора соляной кислоты, в зависимости от исходной кислотности и при комнатной температуре центрифугируют при 2500g в течении 30 мин, для удаления нерастворимых осадков. Далее пробы мочи пропускали через хроматографическую колонку, заполненную сорбентом Amberlite XAD-2, после фильтрации проводилась экстракция содержимого из колонок 10 мл ацетона, элюаты объединяют, обезвоживают добавлением 3 г обезвоженного сульфата натрия. Далее производят концентрирование пробы под вакуумом при 4°C до полного удаления ацетона. В каждую концентрированную пробу добавляют 75 mM фосфатный буфер и ферменты деконъюгации: β -глюкуронидазу и арилсульфатазу. После этого из инкубационного раствора производят 3 последовательные экстракции метаболитов бенз(а)пирена, добавляя с этой целью в него каждый раз по 10 мл этилацетата: смесь энергично встряхивают и экстракты объединяют.

2-ой этап. Спектрально-флуоресцентный анализ метаболитов бенз(а)пирена.

Идентификацию метаболитов бенз(а)пирена и количественное определение производится с помощью квазилинейчатого спектра, наблюдаемого в октане. Для избирательного возбуждения свечения определяемого вещества использовано монохроматическое излучение соответствующей спектральной области, выделяемое с помощью монохроматора спектрофлуориметра «Флюорат-Панорама».

Таблица 1

Уровни метаболитов 7,8-БП в моче рабочих 1–4 групп и в контроле

Профессиональная группа	Уровень метаболитов в моче, мкг/кг
1	1,8±1,11
2	1,28±0,71
3	1,4±0,82
4	0,0±0,02
Контроль	0,02±0,008

Уровень 7,8-БП – БП в моче работников 1–3 групп в зависимости от стажа

Стаж	Менее 4 лет	5–9 лет	10–14 лет	15–19 лет	20–29 лет	Более 30 лет
Уровень метаболитов, мг/кг	1,36±1,2	1,71±0,99	1,41±0,4	1,56±0,47	1,31±0,66	1,51±0,73

Такое избирательное возбуждение компенсирует отсутствие предварительной хроматографии проб, что особенно важно, поскольку аналитические линии бенз(а)пирена и бензфлуорантена совпадают.

В ходе экспериментальной части для выявления индивидуальных особенностей экскреции с мочой маркерных метаболитов БП у работников проведено две серии исследований по вышеописанной методике.

В первой серии изучали экскрецию метаболитов БП у лиц с высоким уровнем производственной экспозиции к БП, а также у лиц, не имеющих производственного контакта с бенз(а)пиреном. Во второй серии изучали экскрецию метаболитов БП у курильщиков табака, так и некурящих. С этой целью собирали суточную порцию мочи у курильщиков табака и некурящих мужчин – жителей Казани. Все исследуемые лица не имели контактов с канцерогенными, токсичными, а также радиоактивными веществами.

Результаты и обсуждение. В первую профессиональную группу вошли работники литейного и кузнечно-прессового цехов. Средний уровень 7,8-БП составил $1,8 \pm 1,11$ мкг/кг. Основной контингент данной группы составили мужчины. Основные профессии данной группы: формовщик, литейщик, плавильщик металла, механик, контролер. Во вторую профессиональную группу вошли работники механического и механосборочного цехов. Средний уровень 7,8-БП составил $1,28 \pm 0,71$ мкг/кг. Основные профессии данной группы: шлифовщик, штамповщик, сверловщик, токарь, слесарь-формовщик, электрогазосварщик, оператор станков ЧПУ. В третью профессиональную группу вошли работники резинотехнического цеха. Средний уровень 7,8-БП составил $1,4 \pm 0,82$ мкг/кг. Основные профессии данной группы: вулканизаторщик, клейщик.

В четвертую группу вошли представители администрации предприятий и инженерный персонал не имеющий производственной экспозиции к бенз(а)пирену.

Таким образом, в трех приведенных профессиональных группах отмечается превышение уровня экскреции метаболитов бенз(а)пирена, что в сочетании с высоким уровнем нестандартных проб по содержанию БП в воздухе рабочей зоны цехов, к которым принадлежат приведенные профессиональные группы, является неблагоприятным признаком.

По полученным данным была проведена оценка уровня метаболитов в моче у рабочих трех профессиональных групп среди мужчин и женщин в зависимости от профессионального стажа (табл. 2).

В табл. 2 обращает на себя внимание повышенный уровень метаболитов при стаже работы от 5-ти лет и в дальнейшем их уровень приходит к среднему, данный факт возможно объясняется наличием «критического» периода, когда система дезактивации ксенобиотиков испытывает максимальные нагрузки, а в дальнейшем происходит адаптация организма, происходит стабилизация работы ферментов системы обезвреживания.

Изучение взаимосвязи общего стажа работы, наследственного отягощенного семейного анамнеза, контакта с СОЖ и стажа курения с содержанием метаболитов бенз(а)пирена показало наличие достоверной прямой положительной корреляционной связи во всех трех группах работников, имеющих экспозицию к бенз(а)пирену. Проведенный корреляционный анализ выявил зависимость средней силы уровня метаболитов бенз(а)пирена в моче у работников 3-й профессиональной группы машиностроительных предприятий от профессионального стажа ($r = 0,421$; $p < 0,05$). Для 1-й профессиональной группы характерным оказалось наличие корреляционной связи с наследственным отягощенным семейным анамнезом ($r = 0,515$; $p < 0,05$) и стажем курения ($r = 0,512$; $p < 0,05$).

Разработанный метод идентификации метаболита бенз(а)пирена: 7,8-дигидроксипирена, может использоваться в качестве биомаркера производственной экспозиции к бенз(а)пирену.

Заключение. Используемые подходы к выявлению лиц, имеющих повышенный профессиональный риск развития онкопатологии, могут быть применены с целью повышения эффективности мер первичной и вторичной профилактики профессионального рака.

Список литературы

1. Александров А.П., Беспалов В.Г. Доклиническое и клиническое изучение средств химиопрофилактики рака // Эскулап, 1997. – 25 с.
2. Амиров Н.Х., Ситдикова И.Д., Хасанов Р.Ш. Аспекты промышленной экологии в формировании злокачественного процесса. – Казань: КГМУ, 1999. – 33 с.
3. Заридзе Д.Г., Мень Т.Х. Приоритетные направления противораковой борьбы // Росс. онкол. журнал, 2001. – № 38. – С. 1066-1073.

4. **Кобляков В.А.** Индукторы цитохрома P450 как промоторы канцерогенеза // *Биохимия*, 1998. — № 8. — С. 1043-1048.

5. **Савочкина И.В., Лихачев А.Я.** Теоретические основы и возможные пути прогнозирования индивидуальной чувствительности к канцерогенному действию полициклических ароматических углеводородов // *Вопросы онкологии*, 1989. — № 4. — С. 407-415.

6. **Смулевич В.Б., Соленова Л.Г.** Производственные канцерогены и здоровье населения // *Гигиена и санитария*, 1997. — № 4. — С. 22-25.

7. **Angerer J., Mannschreck C., Gundel J.** Biological monitoring and biochemical effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons // *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 1997. — Т. 6. — № 2. — P. 365-377.

8. **Pastorelli R., Cerri A., Rozio M. et al.** Benzo(a)pyrene diol-epoxide adducts to albumin in workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons, association with specific CYP1A1, GSTM1, GSTP1, and EHPX genotypes // *Biomarkers*, 2001. — № 6. — P. 357-374.

9. **Talaska G., Maier A., Henn S. et al.** Carcinogen biomonitoring in human exposures and laboratory research: validation and application to human occupational exposures // *Toxicology Letters*, 2002. — № 2. — P. 39-49.

Материал поступил в редакцию 01.08.07.

D.V.Lopushov, I.D.Sitdikova, O.N.Sevastyanova, L.A.Akhtyamova, L.A.Balabanova, O.I.Ishutkina

IDENTIFICATION OF METABOLITES OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS UNDER CONDITIONS OF CARCINOGENIC HAZARDOUS PRODUCTION PROCESSES

Satate Medical University of Kazan

A method is developed for identification of benzo(a)pyrene 7,8-dihydroxypyrene metabolite, this method can serve as a biomarker of occupational exposure to benzo(a)pyrene.

УДК 613.632.055.2.084

Б.А.Кацнельсон, О.Г.Макеев, Н.И.Кочнева, Т.Д.Дегтярёва, Л.И.Привалова, О.Ю.Береснева, Т.В.Бушуева, Ю.Л.Старовойтенко, В.А.Буханцев, В.В.Минин, О.Е.Ерёменко, Е.П.Киреева

КОНТРОЛИРУЕМОЕ ИСПЫТАНИЕ НА ЖЕНЩИНАХ-ДОБРОВОЛЬЦАХ КОМПЛЕКСА СРЕДСТВ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА ОТ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННОГО ТОКСИЧЕСКОГО И КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА

Екатеринбургский Медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий Роспотребнадзора МЗиСР РФ, Управление Роспотребнадзора по Свердловской области, Лаборатория молекулярных медицинских технологий СУНЦ РАМН и Правительства Свердловской области, Уральская государственная медицинская академия, Уральская государственная медакадемия, г. Екатеринбург

Анализ результатов специально проведенного анкетирования женского населения, проведенный с учётом ранее установленных популяционных и индивидуальных факторов риска развития рака легких, кишечника и молочной железы, позволил сформировать группу высокого онкологического риска, из которой по данным целенаправленного медицинского обследования отобраны женщины, не имеющие онкологических заболеваний, для испытания эффективности биопрофилактического комплекса (БПК), ранее успешно апробированного в токсикологическом эксперименте. По ряду функциональных, иммунологических и цитогенетических показателей в группе, получавшей БПК, выявлена положительная динамика, не отмеченная или менее выраженная в контрольной группе. По тестам на усиление репарации ДНК положительная динамика имела место только в основной группе, что позволяет прогнозировать не только противотоксическую, но и противораковую эффективность испытанного БПК.

Ключевые слова: биологическая защита, онкологический риск.

Введение. «Токсикологический вестник» опубликовал [1] результаты эксперимента на крысах, подвергавшихся субхронической затрав-

ке комбинацией токсичных и мутагенных металлов (Pb, Cr, Ni, As, Cd), фторида и бензо(a)пирена, характерной для загрязнения среды обита-

ния в г. Карпинске (Свердловская область), характеризующемся особо высокой онкологической заболеваемостью населения. Было показано, что на фоне приёма биопрофилактического комплекса (БПК), состоящего из глутамината натрия, пектинового энтеросорбента, поливитамино-минерального препарата и кальциевой добавки, благоприятно изменяется токсикокинетика канцерогенов и ослабляется их генотоксическое действие, что позволяет прогнозировать эффект профилактики онкологических заболеваний. Дополнительное включение в БПК биологически активной добавки «Эйковитол», содержащей полиненасыщенные жирные кислоты (способствующие через внутриклеточное образование эйкозаноидов репликации ДНК и, тем самым, репарации повреждений ДНК), усилило как токсикокинетический, так и антимуtagenный эффект того же комплекса.

В соответствии с обоснованной нами [2, 3 и др.], неоднократно апробированной в условиях Свердловской области и одобренной Учёным Советом Минздравсоцразвития РФ [4] системой внедрения в широкую практику тех или иных биопротекторов, эффективных в токсикологическом эксперименте, обязательным промежуточным этапом является подтверждение эффективности того же самого (или близкого по составу) БПК в контролируемых испытаниях на ограниченных группах населения. Именно такой контролируемый курс биопрофилактики был запланирован и осуществлён нами после завершения вышеуказанного эксперимента.

Материалы и методы исследования. *Формирование групп испытуемых.* Мы поставили перед собой задачу испытания БПК не на случайной группе добровольцев, а на такой целенаправленно сформированной выборке из населения, для которой риск развития онкологических заболеваний особенно высок, но которая на данный момент этой патологией ещё не страдает. Прежде всего были выбраны 19 кварталов в разных частях города с наиболее высоким уровнем химического загрязнения почвы, а также по данным фактического мониторинга и моделирования приземных концентраций бензо(а)пирена от различных источников. В этих кварталах было проведено анкетирование женщин в возрасте от 25 лет и старше по специальной анкете, разработанной с учетом наиболее значимых индивидуальных факторов риска развития раков лёгких, кишечника и молочной железы, выявленных при ранее проведенном эколого-эпидемиологическом исследовании [5]. (Поскольку некоторые важные факторы риска рака молочной железы связаны с репродуктивным анамнезом, было решено не включать в анкетирование жен-

щин более молодого возраста, у которых такой анамнез в силу естественных причин ещё недостаточен.)

Было распространено 812 анкет, которые все возвращены заполненными. По данным анкетирования были выбраны 155 женщин с наиболее выраженными факторами риска. Следующим этапом было проведение медицинского осмотра таких женщин по стандарту, включающему в себя комплекс клинико-лабораторных и инструментальных методов исследования и осмотр специалистами, включая онколога. На такой медицинский осмотр дали согласие 139 женщин. По результатам осмотра выбраны 90 женщин со средним возрастом 44 года (от 25 до 78 лет, стандартное отклонение $\pm 12,5$), не имеющих рака или других серьёзных заболеваний, требующих незамедлительного лечения. Эти женщины и должны были пройти курс биопрофилактики, на что от каждой (после разъяснения задач и способов проведения этого курса) было получено письменное согласие. Вся выборка была разделена на 2 практически равные по возрасту группы, одна из которых наблюдалась на фоне получения БПК, а другая (контрольная группа) — параллельно, но без каких-либо организуемых воздействий. Из этических соображений, все члены контрольной группы получили тот же курс БПК после завершения исследования.

Состав БПК, дозы и схема проведения испытания. Испытываемый БПК включал в себя:

1. Биологически активную добавку к пище «Пектин яблочный» (ООО «Промавтоматика», Белгород); суточная доза 5 г в виде киселя, приготавливаемого по технологической карте, полученной испытуемой; 2 раз в день по $\frac{1}{2}$ стакана.

2. Глутаминат натрия — добавкой в первые блюда по 1 г 1 раз в день.

3. Поливитаминно-полиминеральный препарат «Витрум» (Юнифарм, США) — 1 раз в день по 1 таблетке после еды. Получаемая с этим препаратом доза кальция была сочтена достаточной, и дополнительная кальцийсодержащая добавка в состав БПК не включалась.

4. Биологически-активную добавку «Эйковитол» (ООО «Фармавит», Тюмень), полный аналог испытывавшегося в эксперименте «Эйковитола» (3 раза в день по $\frac{1}{2}$ чайной ложки во время еды).

Все эти средства допущены Министерством здравоохранения и соцразвития РФ для широкого применения. Они были переданы каждой женщине в индивидуальной упаковке в полном объёме на весь курс и применялись ею самостоятельно на основании данной ей письменной инструкции и устных разъяснений. Приём препа-

ратов и возможные побочные явления регистрировались в дневниках самонаблюдения.

По соображениям, связанным с организацией лабораторных исследований, группа была разбита на две половины, в одной из которых курс биофилактики был проведен с 01.11.2006 по 30.11.2006, а в другой — с 16.11.2006 по 15.12.2006. В те же сроки брали мазки эпителия ротовой полости и пробы крови и мочи для исследования в соответствующих подгруппах контрольной группы.

Лабораторные показатели. Проводили клинический анализ крови; оценивали активность сукцинатдегидрогеназы в лимфоцитах крови (СДГ) и аланин- и аспартатаминотрансфераз в крови; содержание дельта-аминолевулиновой кислоты (δ -АЛК) в моче с использованием общепринятых методов.

Оценку некоторых показателей иммунологического статуса организма (интерферон-гамма, лактоферин, муциноподобный антиген, лизоцим в сыворотке крови) осуществляли ИФА методом на плащечном фотометре «MULTISKAN EX» со встроенным программным обеспечением, реактивами ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск) и ОАО «Хема» (Москва).

Микроядерный тест на клетках эпителия слизистой щеки проводили в соответствии с методикой [6]. Собранный стерильным шпателем с внутренней стороны щеки материал наносили на предметное стекло и делали мазок, который фиксировали в метаноле и окрашивали по Паппенгейму. Препараты анализировали под микроскопом в проходящем свете при увеличении 10×40 и 10×100 . Пригодными для анализа считали препараты с хорошо расправленными клетками. В каждом мазке оценивали по 2000 клеток. К микроядрам относили округлые образования с ровными краями, размером $1/20$ – $1/5$ диаметра ядра клетки и окраской, соответствующей окраске основного ядра. Кроме микроядер, учитывали дополнительные кариологические показатели: протрузии, двуядерные клетки и клетки с перетяжкой ядра.

Для тестирования повреждения и репарации ДНК использовали: метод ДНК-комет, метод анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (ПДАФ), модельный эксперимент с воздействием ионизирующего излучения на лейкоцитарную фракцию крови перед проведением полимеразной цепной реакции (ПЦР). Все три теста достаточно подробно описаны в предыдущей публикации [1].

В статистическую обработку результатов любого из лабораторных тестов брали только парные выборки, то есть данные по тем женщинам, у которых соответствующее исследование уда-

лось осуществить как до, так и после курса биофилактики (или в соответствующие сроки наблюдения над контрольной выборкой); число таких пар применительно к каждому тесту приводится при изложении результатов.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 приводятся некоторые данные по клиническому анализу крови, а также по полученным биохимическим показателям. Можно отметить, что в группе, получившей курс биофилактики, произошло статистически значимое повышение содержания гемоглобина в крови и несколько увеличилось число эритроцитов. В контрольной группе оба показателя за то же время имели, напротив, тенденцию к снижению. Несмотря на стабильность содержания ретикулоцитов, в пользу связи положительного гематологического эффекта биофилактического комплекса (БПК) с ослаблением токсического действия свинца на порфириновый обмен может говорить то, что уровень почечной экскреции дельта-аминолевулиновой кислоты при приеме БПК имел тенденцию к снижению, в то время как в контрольной группе оставался на исходном значении.

Активность сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов крови, уровень которой отражает интенсивность работы цикла Кребса, в обеих группах находилась в пределах верхнего уровня нормы, что свидетельствует об определенном напряжении реакций биоэнергетического обмена. Прием БПК приводил к его значимому ослаблению, в то время как в контрольной группе никакой динамики не наблюдалось. Помимо этого, в группе женщин, получавших БПК, отмечалась некоторая положительная тенденция к усилению ферментативной активности печени, судя по уровню активности аланинаминотрансферазы, в то время как в контрольной группе наблюдалась противоположная динамика.

Результаты оценки влияния биофилактического курса на исследованные неспецифические факторы иммунной защиты организма обобщены в табл. 2, в которой даны также приводимые в литературе нормальные значения соответствующих показателей и значения, полученные теми же методами на группе здоровых жительниц Екатеринбурга возраста 20–39 лет, не подвергающихся воздействию вредных производственных факторов. Наблюдавшееся нами снижение концентрации как лактоферрина, так и интерферона-гамма в сыворотке крови ко второму сроку исследования может, в принципе, иметь двоякое значение. С одной стороны, если это снижение вызвано действием вредных факторов, угнетающих иммунную систему (в частности, токсических веществ, загрязняющих среду обитания), то оно может привести к ослабле-

нию многообразных защитных механизмов, связанных с этими регуляторами неспецифического иммунного ответа, в том числе, противоопухолевых и противовирусных. С другой стороны, если под действием других (не иммунных) механизмов защиты в организме ослабевает развитие нарушений, связанных с предопухолевой трансформацией клеток, повреждением ДНК или размножением вируса, то сложные механизмы обратной связи, регулирующие активность иммунной системы в целом, могут привести к ослаблению выработки лактоферрина и интерферона.

С этих позиций, отметим прежде всего, что уровень лактоферрина у исследованных жительниц города Карпинска в обеих группах и в оба срока исследования укладывается в диапазон нормальных показателей, приводимых в литературе, и не отличается статистически значимо от среднего показателя «группы сравнения». При этом различие между исходными величинами в группах, получавшей и не получавшей БПК, невелико и статистически не значимо. Статистически не значимым является также снижение (в 1,19 раза) этого показателя ко второму сроку исследования по сравнению с первым в контрольной группе, не получавшей БПК. Однако снижение в 1,54 раза, произошедшее за тот же срок в группе, получавшей БПК, является статистически значимым.

Исходные средние показатели уровня интерферона-гамма в обеих группах жительниц Карпинска были выше, чем в «группе сравнения» (причём в группе, которой затем давался БПК, эта разница значима при $p < 0,1$), и во всех этих группах средние результаты превышают диапазон нормальных величин, приводимых в литературе. В соответствии с соображениями, изло-

женными выше, последующее снижение показателя в обеих группах, изученных в Карпинске (в 2,3 раза у получавших и в 1,6 раза у не получавших БПК) может рассматриваться как свидетельствующее об уменьшении напряжённости процессов, на защиту от которых направлена активность интерферона-гамма, однако только в группе, получавшей БПК, этот сдвиг был статистически значим (при $p < 0,05$).

Обращает на себя внимание однонаправленность сдвигов по интерферону и лактоферрину, что делает их трактовку в качестве позитивных более обоснованной, поскольку лактоферрин и интерферон участвуют в защите организма от возникновения злокачественных новообразований по разным, но физиологически сопряжённым механизмам. Это придаёт особое значение анализу корреляционных связей между уровнями этих факторов в сыворотке крови. Такой анализ показал, что коэффициент ранговой корреляции Спирмена в группе, не получавшей БПК, в оба срока был близок к нулю (соответственно, 0,02 и 0,045), свидетельствуя об отсутствии связи между показателями. Прямая связь между ними была показана по исходным уровням в группе, предназначавшейся для проведения биопротекции, но и в этом случае она была слабой (коэффициент 0,197). Однако после проведения курса биопротекции такая связь стала значительно более прочной (коэффициент 0,541). Таким образом, приём БПК, по-видимому, повысил сопряжённость различных неспецифических иммунных механизмов противоопухолевой защиты.

Повышение уровня муцин-связывающего антигена (МСА, или М22) в сыворотке крови

Таблица 1

Влияние БПК на некоторые гематологические и биохимические показатели ($M \pm m$)

Показатель	Группа женщин (численность)			
	Получавшие БПК (30)		Не получавшие БПК (38)	
	1-е исследование	2-е исследование	1-е исследование	2-е исследование
Гемоглобин крови, г/л	128,6±2,3	135,8±2,2*	132,5±2,0	128,7±2,3
Эритроциты крови, $\cdot 10^{12}/л$	4,7±0,1	4,9±0,1	4,7±0,1	4,5±0,1
Ретикулоциты, %	8,4±0,1	8,6±0,5	7,7±0,6	7,9±0,6
Активность СДГ, число гранул в 50 лимфоцитах	871,0±21,5	804,0±18,4*	840,0±12,4	840,0±13,2
Активность АсТ в сыворотке крови, ммоль/чл	0,343±0,02	0,346±0,03	0,318±0,02	0,306±0,02
Активность АлТ в сыворотке крови, ммоль/чл	0,310±0,02	0,355±0,03	0,327±0,02	0,285±0,02
Δ -АЛК в моче, мкмоль/л	26,66±1,92	24,78±1,44	24,87±1,63	24,48±1,28

Здесь и в табл. 2–5: * – статистическая значимость ($p \leq 0,05$) отличия от аналогичного показателя 1-го срока исследования в данной группе

Значения изученных факторов иммунитета в группах женщин, получавших и не получавших биопротифилактический комплекс (M±m)

Группа (численность)	Исследование	Лактоферрин, нг/мл	Муцин-связывающий антиген, ед/мл	Интерферон-γ, пкг/мл	Лизоцим, мг/мл
Получавшие БПК (26)	Первое	1033,81±147,8	11,53±2,96	18,12±3,58	2,01±0,14
	Второе	672,93±78,93*	14,47±2,58	7,96±2,11*	5,19±0,31*
Не получавшие БПК (32)	Первое	940,88±122,91	13,68±1,99	12,72±1,84	6,1±0,59
	Второе	784,8±101,3	17,8±2,75	7,71±1,69	6,057±0,36
Группа сравнения (30)	-	1200,12±350,25	10,57±4,51	9,62±2,5	15,75±3,24
Нормальные значения показателей	-	130–1500	0–30,0	0–10,0	8–12

может наблюдаться при раке молочной железы легких, яичников, шейки матки, желудочно-кишечного тракта, а также при доброкачественных изменениях этих же органов. Поскольку формирование обеих групп было, как описано выше, построено таким образом, чтобы с максимальной надёжностью исключить из них больных онкологическими заболеваниями, неудивительно, что в обеих обнаружены нормальные уровни МСА (хотя и несколько более высокие, чем в группе сравнения, что вероятнее всего, связано с возрастными различиями) при отсутствии статистически значимых межгрупповых и внутригрупповых различий.

Напротив, такие различия были выявлены по показателям содержания лизоцима в сыворотке крови. Лизоцим – фактор противомикробной защиты, который связан с секреторной активностью фагоцитарной системы. Обращает на себя внимание тот факт, что этот уровень в Карпинске существенно ниже, чем в Екатеринбургской «группе сравнения», и ниже диапазона нормальных значений. Допустимо связать это с экологическим неблагополучием условий проживания в городе Карпинске. То, что рассматриваемый показатель по исходному уровню в группе, предназначенной для биопротифилактики, оказался самым низким, вероятнее всего, относится к случайностям малой выборки, но на этом фоне несомненным оказалось статистически значимое повышение его ко второму сроку исследования, то есть после проведения курса биопротифилактики.

Исходная частота цитогенетических нарушений (микроядра или протрузии) в клетках слизистой оболочки ротовой полости у исследованных женщин той группы, которая затем получила биопротифилактический курс, составляла 1,412±0,285 на 2000 клеток эпителия; 62,5% этих нарушений составляют клетки с протрузиями. Соответствующие показатели того же сро-

ка исследования у женщин контрольной группы были 0,870±0,181 и 44,9%. Объединение этих двух феноменов в общий цитогенетический показатель представляется вполне оправданным, поскольку значительная часть ядерных протрузий является результатом разрыва хромосомных или хроматидных мостов в анафазе митоза [7]. Именно за счёт статистически значимого 3-кратного уменьшения числа клеток с протрузиями произошло снижение общего цитогенетического показателя после месячного курса приёма БПК до 0,941±0,181. В контрольной группе он практически остался на исходном уровне (0,826±0,185).

Вместе с тем, под влиянием БПК не изменилась частота кариологических феноменов, рассматриваемых как показатели интенсивности клеточной пролиферации: число двуядерных клеток 7,000±0,840 до и 6,765±0,802 после БПК, число клеток с перетяжкой ядра – 6,235±0,838 и 6,176±0,693, соответственно. Однако за тот же период в контрольной группе оба показателя имели более выраженную тенденцию к снижению (двуядерные клетки с 6,870±0,630 до 5,217±0,470; клетки с перетяжкой ядра 6,609±0,679 и 4,174±0,528, соответственно), и поэтому нельзя исключить, что их относительная стабилизация в группе, получавшей БПК, всё-таки отражает стимуляцию пролиферации.

Хотя трактовка приведенных сдвигов в качестве показателя антигенотоксического защитного действия испытанного БПК представляется нам вполне обоснованной, однако нельзя не отметить ту её неопределённость, которая связана с несовпадением исходных цитогенетических показателей в сравниваемых группах. Это несовпадение не является статистически значимым и может быть отнесено к случайностям малых выборок. (Данное исследование провести успешно в оба срока удалось только у 17 женщин основной и 23 женщин контрольной группы). Значи-

Таблица 3

Распределение повреждений ДНК по классам комет (в%, $M \pm m$) в лейкоцитах крови

Группа женщин и срок исследования		Класс комет				
		C1	C2	C3	C4	C5
Получавшие БПК	1-й	50,5±3,1	10,9±0,4	9,8±2,3	20,1±4,4	6,9±0,3
	2-й	86,2±2,2*	5,6±1,4*	3,8±2,2*	0,3±0,1*	0
Не получавшие БПК	1-й	51,3±3,8	9,9±0,8	10,2±1,9	19,8±3,8	6,5±0,3
	2-й	55,2±2,1	10,3±1,6	11,6±2,1	19,6±3,6	7,1±0,4

тельно более определённые и более однозначно трактуемые результаты получены в отношении антигенотоксического эффекта БПК на макромолекулярном уровне.

Эти исследования были проведены в оба срока у 22 женщин группы, получавшей БПК, и у 28 женщин контрольной группы. Как следует из табл. 3, до приема биопрофилактического комплекса в обеих группах наблюдается сходное процентное распределение количества клеток с физиологически значимым уровнем повреждения ДНК. Последний квалифицируется, в соответствии с методом ДНК-комет, как средний (C3), высокий (C4) и полное повреждение (клетки с фрагментированной ДНК – C5). После приема комплекса отмечается достоверный положительный эффект. Так, класс полностью поврежденных клеток (C5) отсутствует, а доля клеток с высоким уровнем повреждения ДНК (C4)

снижается практически до следовых значений (0,3±0,1). Доля клеток со средним уровнем повреждения ДНК уменьшается в 2,6 раза по сравнению с состоянием до приема БПК; при этом количество практически неповрежденных клеток (C1) возрастает на 35,7%.

Как видно из той же табл. 3, в контрольной группе, характеризующейся сходным с первой группой исходным распределением повреждений по классам комет, к концу месячного периода наблюдения оно осталось практически тем же. Таким образом, сдвиг распределения ДНК-комет в основной группе ко второму сроку исследования, по-видимому, связан с воздействием БПК на процессы стабилизации генетического аппарата клеток. Это подтверждается результатами анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов ДНК, приведенными в табл. 4.

Таблица 4

Распределение радиоактивности амплифицированной ДНК в агарозном геле ($M \pm m$)

Группа женщин и срок исследования		Активность ядра, Бк/нг ДНК	Активность хвоста, Бк/нг ДНК	Коэффициент фрагментации
Получавшие БПК	1-й	43593,8±1481,2	55234,2±3256,9	0,56
	2-й	80236,4±4723,5	12367,8±124,4	0,13*
Не получавшие БПК	1-й	45624,2±1965,9	52281,3±3421,6	0,53
	2-й	48924,4±3771,6	57112,5±2218,1	0,54

Таблица 5

Распределение радиоактивности амплифицированной ДНК в агарозном геле при дополнительном радиационном воздействии ($M \pm m$)

Группа женщин и срок исследования		Активность ядра, Бк/нг ДНК	Активность хвоста, Бк/нг ДНК	Коэффициент фрагментации
Получавшие БПК	1-й	23427,2±1243,5	63641,3±2484,8	0,73
	2-й	54416,9±2463,6	20278,6±763,3	0,27*
Не получавшие БПК	1-й	23864,8±1427,1	62395,8±2571,2	0,72
	2-й	27516,4±1822,1	65193,7±2358,4	0,70

Среднее исходное значение коэффициента фрагментации ДНК в сравниваемых группах женщин составляло 0,56 и 0,53. После приема БПК испытуемыми первой группы произошло достоверное снижение коэффициента фрагментации до 0,13 (в 4,3 раза), что свидетельствует об уменьшении повреждения ДНК и эффективности биопрофилактического комплекса по данному показателю, поскольку в контрольной группе при практически том же исходном значении он не изменился и через месяц (0,54).

Как следует из результатов, представленных в табл. 5, воздействие ионизирующего излучения непосредственно на образцы клеток крови испытуемых, полученные до приема БПК, приводит к значительной степени повреждения ядерной ДНК клеток: при сравнении с табл. 4 очевидно, что коэффициент фрагментации в 1,9 раза выше по сравнению с аналогичной группой без воздействия радиационного фактора. Радиационное воздействие *in vitro* на клетки тех же испытуемых, полученные после приема комплекса, сопровождается установлением достоверно меньшего коэффициента фрагментации (в 2,7 раза), хотя степень повреждения ДНК и сохраняется на более высоком уровне по сравнению с данными той же группы после приема БПК без воздействия облучения. В оба срока показатели контрольной группы были практически на том же уровне, что и основной группе до приема БПК. Таким образом, БПК, стимулируя процессы репарации ДНК, повышает её устойчивость к радиационному воздействию. Это обстоятельство важно подчеркнуть в связи с тем, что сравнительно высокая радоновая экспозиция населения Карпинска [5] может играть роль одного из потенцирующих факторов онкологического риска.

Таким образом, применение БПК, с одной стороны, благоприятно влияет на генетический аппарат клеток человека, снижая уровень повреждений за счет репаративного/антимутагенного механизмов, а с другой — сопровождается радиопротекторным эффектом, активируя естественную внутриклеточную систему репарации радиационных повреждений ДНК. Однако, наряду с этими вероятными механизмами протекторного эффекта, присутствующими, в основном, эйкозаноидам, несомненное значение может иметь вторичное, не специфически антимутагенное влияние остальных компонентов БПК. Как уже указывалось в разделе «Введение» настоящей статьи, такой БПК и без включения в его состав эйковитола оказывал в эксперименте на животных [1] аналогичное влияние на ДНК на фоне генотоксического повреждения, хотя этот препарат и усилил благоприятный эффект.

Заключение. Оценивая существенность всех вышеописанных эффектов БПК, следует при-

нять во внимание как кратковременность проведенного курса биопрофилактики, так и то, что получавшие его женщины продолжали находиться под влиянием тех же неблагоприятных экологических условий, в которых проходит их жизнь. Однако даже на этом фоне положительный характер влияния БПК не может вызвать сомнения. В частности, для населения города, характеризующегося высоким уровнем онкологического риска, особое значение имеет сопряженность выявленных сдвигов, так или иначе связанных с механизмами защиты от мутагеназа/канцерогенеза, в том числе, с усилением процессов репарации ДНК. Испытанный биопрофилактический комплекс может быть рекомендован для применения населением тех городов, в которых среда обитания загрязнена токсичными и канцерогенными веществами.

Авторы выражают искреннюю признательность И.Ю.Полякову, С.С.Комелягину, Ю.А.Репиной и другим коллегам, работающим в г. Карпинске, за участие в формировании групп для проведения данного исследования.

Список литературы

1. **Кацнельсон Б.А., Макеев О.Г., Дегтярёва Т.Д. и др.** // *Токс. вестник*, 2007. — № 3. — С. 15-20.
2. **Кацнельсон Б.А., Дегтярёва Т.Д., Привалова Л.И.** // *Росс. хим. журнал*, 2004. — Т. 4. — № 2. — С. 65-71.
3. **Кацнельсон Б.А., Дегтярёва Т.Д., Привалова Л.И. и др.** // *Вестн. Уральской мед. академ. науки*, 2005. — № 2. — С. 70-76.
4. **Кузьмин С.В., Кацнельсон Б.А., Дегтярёва Т.Д. и др.** *Подходы к организации массовой биологической профилактики вредного влияния химического загрязнения среды обитания на здоровье детского населения и к оценке её эффективности (опыт Свердловской области). Пособие для врачей, утверждённое Секцией «Гигиена» УС МЗиСР РФ 15.02.2005 (протокола № 6).* — Екатеринбург, 2005. — 44 с.
5. **Привалова Л.И., Кацнельсон Б.А., Кузьмин С.В. и др.** *Экологическая эпидемиология: принципы, методы, применение.* — Екатеринбург: ЕМНЦ ПОЗРПП, 2003. — 276 с.
6. *Методические рекомендации «Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека». Утверждены Председателем Научного совета РАМН и МЗ и СР России по экологии человека и гигиене окружающей среды 27.04.2005 г.* — М., 2005. — 38 с.
7. **Кузоватов С.Н., Кравцов В.Ю., Вахтин Ю.Б.** // *Цитология*, 2000. — Т. 42. — № 11. — С. 1097-1102.

Материал поступил в редакцию 16.07.07.

B.A.Katsnelson, O.G.Makeyev, N.I.Kochneva, T.D.Degtyaryova, L.I.Privalova, O.Yu.Beresneva, T.V.Bushuyeva, Yu.L.Starovoytenko, V.A.Bukhanzev, V.V.Minin, O.Ye.Yeryomenko, Ye.P.Kireyeva

CONTROLLED ASSAYS OF A COMPLEX OF BIOPROTECTIVE PREPARATIONS ON WOMEN-VOLUNTEERS TO PROTECT THE ORGANISM FROM ECOLOGICALLY-INDUCED TOXIC AND CARCINOGENIC RISK

Medical Research Centre for Prophylaxis and Health Protection of Industrial Workers, Sverdlovsk Regional Department of Rospotrebnadzor, Laboratory of Molecular Medical Technologies of the Siberian Scientific Center of the Russian Academy of Medical Sciences and Sverdlovsk Regional Government of the Ural State Medical Academy, Ural State Medical Academy, Ekaterinburg

A group of high oncological risk was formed basing on the analysis of results of a purposefully conducted inquiring among women's population taking into account previously established population and individual risk factors of the development lung, intestine and mammary gland cancer. Basing on target-specific medical examination, women not having oncologic diseases were selected among this group for testing effectiveness of a bio-prophylactic complex (BPC) that was previously approved in a toxicological experiment. According to a number of functional, immunologic and cytogenetic indicators in the group to whose members BPC was administrated, a positive dynamics was revealed which was not noted or was less expressed in the control group being observed in parallel. As to tests for strengthening of DNA reparation, positive dynamics only took place in the main group which allows to prognosticate not only antitoxic but also anticarcinogenic efficacy of BPC tested.

УДК 615.214.22.099

В.В.Зобов, А.В.Ланцова, А.В.Зобов, В.Д.Акамсин, И.В.Галяметдинова, С.Г.Фаттахов, Р.Х.Гиниятуллин, С.М.Горбунов, В.С.Резник

ТОКСИЧНОСТЬ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ШИРОТА ЗАМЕЩЕННЫХ 3-(ω -БЕНЗИЛДИЭТИЛАММОНИОАЛКИЛ)-1,6-ДИМЕТИЛУРАЦИЛБРОМИДОВ И ИХ АНАЛОГОВ

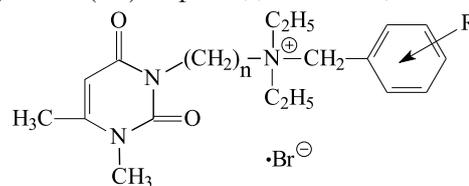
Институт органической и физической химии им. А.Е.Арбузова Казанского научного центра РАН

Ряд замещенных 3-(ω -бензилдиэтиламмониоалкил)-1,6-диметурацилбромидов и N-(аммониопентильных)-производных α,ω -бисурацилилалканов с антихолинэстеразным типом действия «высокотоксичны» относительно мышей и «малотоксичны» или «практически нетоксичны» относительно дафний. В тестах «бег на третбане» и «вращающийся стержень» (мыши, в/б) вещества, у которых 6-метилурациловый фрагмент удален от урацилового на расстояние 3–6 метиленовых групп, более фармакологически и экологически безопасны, чем прозерин и BW284c51.

Ключевые слова: ингибиторы ацетилхолинэстеразы, токсичность, терапевтическая широта.

Введение. В продолжение исследований [1–3], направленных на выявления среди моноаммониевых ингибиторов холинэстераз веществ с высокими показателями как «фармакологической» («терапевтическая широта» = DL_{50}/DE_{50}), так и «экологической» (CL_{50} , дафнии) безопасности нами был синтезирован и изучен ряд замещенных 3-(ω -бензилдиэтиламмониоалкил)-1,6-диметурацилбромидов (соединения I–III), а также ряд N-(аммониопентильных)-производных α,ω -бисурацилилалканов, являющихся аналогами 3-(ω -бензилдиэтиламмониоалкил)-1,6-диметурацилбромидов, имеющих второй урациловый цикл (соединения IV–XIV) или замещенный фенильный цикл (соединение XV).

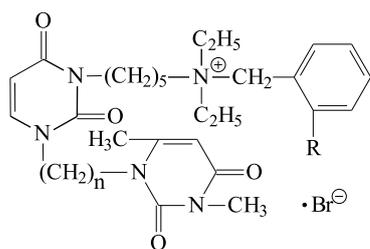
Важно было установить, насколько меняются показатели токсичности (DL_{50} , CL_{50}), избирательности влияния на локомоторную функцию (DE_{50}) и безопасности (DL_{50}/DE_{50}) соединений при введении объемного радикала по первому атому азота (N^1) пиримидинового цикла.



соединения I–III

n = 5 (I, II), 6 (III);

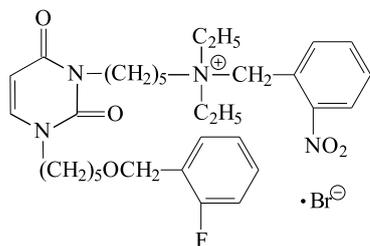
R = o-NO₂ (III); 2-NO₂, 6-F (I); 2-NO₂, 4-N₃ (II).



соединения IV-XIV

n = 3 (IV, V), 4 (VI, VII), 5 (VIII, IX), 6 (X, XI), 7 (XII, XIII), 8 (XIV);

R = CN (IV, VII, VIII, X, XII), NO₂ (VI, IX, XI, XIII, XIV), CH₂OCH₃ (V).



соединение XV

Химические названия синтезированных и изученных соединений:

1,6-диметил-3-[5-(диэтил-2-нитро-6-фторбензиламмоний)пентил]урацилбромид (I);

1,6-диметил-3-[5-(диэтил-2-нитро-4-азидобензиламмоний)пентил]урацилбромид (II);

1,6-диметил-3-[6-(диэтил-2-нитробензиламмоний)гексил]урацилбромид (III);

1-[3-(3,6-диметилаурацил-1-ил)пропил]-3-[5-(диэтил-2-цианбензиламмоний)пентил]урацилбромид (IV);

1-[3-(3,6-диметилаурацил-1-ил)пропил]-3-[5-(диэтил-2-метоксиметилбензиламмоний)пентил]урацилхлорид (V);

1-[4-(3,6-диметилаурацил-1-ил)бутил]-3-[5-(диэтил-2-нитробензиламмоний)пентил]урацилбромид (VI);

1-[4-(3,6-диметилаурацил-1-ил)бутил]-3-[5-(диэтил-2-цианбензиламмоний)пентил]урацилбромид (VII);

1-[5-(3,6-диметилаурацил-1-ил)пентил]-3-[5-(диэтил-2-цианбензиламмоний)пентил]урацилбромид (VIII);

1-[5-(3,6-диметилаурацил-1-ил)пентил]-3-[5-(диэтил-2-нитробензиламмоний)пентил]урацилбромид (IX);

1-[6-(3,6-диметилаурацил-1-ил)гексил]-3-[5-(диэтил-2-цианбензиламмоний)пентил]урацилбромид (X);

1-[6-(3,6-диметилаурацил-1-ил)гексил]-3-[5-(диэтил-2-нитробензиламмоний)пентил]урацилбромид (XI);

1-[7-(3,6-диметилаурацил-1-ил)гептил]-3-[5-(диэтил-2-цианбензиламмоний)пентил]урацилбромид (XII);

1-[7-(3,6-диметилаурацил-1-ил)гептил]-3-[5-(диэтил-2-нитробензиламмоний)пентил]урацилбромид (XIII);

1-[8-(3,6-диметилаурацил-1-ил)октил]-3-[5-(диэтил-2-нитробензиламмоний)пентил]урацилбромид (XIV);

1-[5-(2-фторбензилокси)пентил]-3-[5-(диэтил-2-нитробензиламмоний)пентил]урацилбромид (XV).

Материалы и методы исследования. Острую токсичность соединений при их внутрибрюшинном (в/б) введении определяли на нелинейных белых мышах обоего пола массой 19±2 г, а также на лабораторной культуре дафний *Daphnia magna Straus* в возрасте 18±6 ч. Для установления среднесмертельной дозы DL₅₀ (в мкмоль/кг) каждое соединение вводили 4 группам мышей (по 10 мышей на каждую дозу; n = 40); время наблюдения – 72 ч. Для установления среднесмертельной концентрации CL₅₀ (в мкмоль/л) 3 группы дафний помещали в растворы тестируемых соединений (по 30 дафний на каждую концентрацию; n = 90); время наблюдения – 48 ч. Предварительно тестировалась чувствительность культуры дафний к K₂Cr₂O₇; величина CL₅₀²⁴ ч K₂Cr₂O₇ находилась в пределах нормы (1,7 мг/л) [4]. По величине CL₅₀ на дафниях выносили первичное суждение об уровне «экологической безопасности» соединений. Симптоматика отравления соединениями при внутривенном их введении фиксировалась на кроликах-самцах породы «советская шиншилла» массой 3,0–3,5 кг.

В качестве показателей избирательности действия соединений на нервно-мышечную передачу были избраны среднеэффективные миорелаксантные дозы (DE₅₀), полученные в тесте «бег на тротуаре» (Treadmill, Nihon Kohden STS-7500A/CC-730DA, Япония; скорость протяжки ленты 1 км/ч) [5] и в тесте «вращающийся стержень» (Rota-rod treadmill; Ugo Basile, Италия; скорость вращения стержня 6 оборотов/мин) [6]. Для установления значений DE₅₀ каждое соединение вводили внутрибрюшинно 4 группам предварительно тренированных мышей (22,0±2,0 г; по 8 мышей на каждую дозу; n = 32) за 5 мин до начала выполнения физической нагрузки. В качестве критерия терапевтической широты (или «фармакологической безопасности») соединений использовался параметр DL₅₀/DE₅₀. Контрольным мышам вводился физиологический раствор. Препаратами сравнения служили антихолинэстеразные средства – прозерина метилсульфат и BW284c51 (избирательный ингибитор ацетилхолинэстеразы; Sigma).

Обработку результатов исследования проводили методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента, а также с помощью программы ToxCalc™ v.5.0.23F (Tidepool Scientific Software; U.S. Environmental Protection Agency).

Результаты и обсуждение. Из данных табл. 1 следует, что соединения I-XV по данным опытов на мышах могут быть отнесены к высокотоксичным [7]. На дафниях соединения I, II, IV-VIII, X, XII-XV – малотоксичны или практически нетоксичны [8] (табл. 2).

В картине острого действия эффективных доз соединений у животных доминировало холино-

миметическое гипервозбуждение. Выраженные антихолинэстеразные проявления (мышечные фибрилляции, подергивания и др.) не позволяли мышам полноценно выполнять бег на третбане. Более того, попытки к выполнению физической нагрузки токсифицированными мышами в тесте «бег на третбане», в отличие от теста «вращающийся стержень», приводили к усилению миорелаксантного эффекта соединений в отношении задних конечностей как по интенсивности, так и по длительности («use-dependent effect»).

По миорелаксантной активности и терапевтической широте действия соединения I-III уступают своему орто-нитробензильному анало-

Таблица 1

Биологическая активность соединений I-XV в опытах на мышах

Соединение	DL ₅₀ , мкМ, в/б	Миорелаксантная активность, DE ₅₀ , мкМ, в/б		Терапевтическая широта, DL ₅₀ /DE ₅₀	
		«бег на третбане»	«вращ. стержень»	«бег на третбане»	«вращ. стержень»
I	2,33 (2,01÷2,71)	0,29 (0,25÷0,35)	0,39 (0,33÷0,45)	8,03* (6,01÷9,99)	5,97 (4,60÷7,40)
II	3,71** (3,17÷4,35)	0,28 (0,24÷0,33)	0,37 (0,31÷0,44)	13,25* (10,03÷16,63)	10,03* (7,52÷12,48)
III	9,78** (8,65÷11,05)	1,17** (1,03÷1,34)	1,37** (1,20÷1,56)	8,36* (6,74÷9,93)	7,14 (5,78÷8,51)
IV	1,39 (1,22÷1,59)	0,09** (0,08÷0,11)	0,11** (0,09÷0,12)	15,44* (11,81÷18,19)	12,64* (10,22÷15,50)
V	1,37 (1,17÷1,60)	0,16* (0,14÷0,19)	0,24 (0,20÷0,28)	8,56* (6,33÷10,67)	5,71 (4,26÷7,07)
VI	1,10# (0,95÷1,28)	0,07** (0,06÷0,09)	0,07** (0,06÷0,09)	15,71* (11,39÷18,61)	15,71** (11,50÷18,50)
VII	0,91** (0,78÷1,05)	0,09** (0,08÷0,11)	0,11** (0,09÷0,12)	10,11* (7,67÷12,33)	8,27 (6,57÷10,57)
VIII	1,19# (1,05÷1,34)	0,07** (0,06÷0,08)	0,07** (0,06÷0,09)	17,00** (12,94÷19,06)	17,00** (12,82÷19,18)
IX	1,29# (1,14÷1,46)	0,09** (0,08÷0,10)	0,10** (0,09÷0,12)	14,33* (12,13÷17,87)	12,90* (10,21÷15,51)
X	4,50** (3,91÷5,17)	0,20* (0,17÷0,24)	0,15** (0,13÷0,17)	22,50** (17,12÷27,16)	30,00** (24,20÷37,80)
XI	3,66** (3,19÷4,21)	0,20* (0,17÷0,23)	0,28 (0,24÷0,33)	18,30** (14,50÷22,64)	13,07* (10,15÷15,85)
XII	1,78 (1,54÷2,04)	0,21* (0,18÷0,25)	0,36 (0,31÷0,41)	8,48* (6,51÷10,16)	4,94 (3,90÷6,10)
XIII	0,75** (0,62÷0,90)	0,19* (0,17÷0,22)	0,14** (0,11÷0,17)	3,95# (2,89÷4,82)	5,36 (3,83÷6,97)
XIV	2,58 (2,18÷3,04)	0,54# (0,46÷0,65)	0,68** (0,57÷0,81)	4,78# (3,51÷5,99)	3,79# (2,81÷4,79)
XV	2,23 (1,89÷2,63)	0,24 (0,20÷0,29)	0,15* (0,13÷0,18)	9,29* (6,83÷11,67)	14,87** (10,93÷18,67)
Прозерин	1,53 (1,34÷1,74)	0,39# (0,34÷0,45)	0,30 (0,26÷0,34)	3,92# (3,11÷4,73)	5,10 (4,05÷6,15)
BW284c51	2,12 (1,86÷2,42)	0,21* (0,18÷0,24)	0,25 (0,22÷0,29)	10,10* (8,07÷12,13)	8,48 (6,67÷10,29)

Различия статистически значимы (p < 0,05) по отношению к прозерину (*), BW284c51 (#)

Таблица 2

Токсичность соединений I, II, IV-VIII, X, XII-XV в опытах на дафниях *Daphnia magna*

Соединение	CL ₅₀ ^{48 ч} (мкМ)
I	94,21* (79,17 ÷ 112,11)
II	54,09* (43,98 ÷ 66,54)
IV	230,23** (196,78 ÷ 269,37)
V	220,01** (184,88 ÷ 261,81)
VI	392,25** (321,52 ÷ 478,55)
VII	756,24** (646,36 ÷ 884,80)
VIII	680,55** (581,67 ÷ 796,24)
X	548,08** (468,45 ÷ 641,26)
XII	233,37** (199,46 ÷ 273,04)
XIII	231,27** (189,57 ÷ 282,15)
XIV	267,05** (228,24 ÷ 312,44)
XV	198,06** (169,28 ÷ 231,73)
Прозерин	2,70 [#] (2,21 ÷ 3,29)
BW284c51	100,56* (82,43 ÷ 122,68)

Различия статистически значимы ($p < 0,05$) по отношению к прозерину (*), BW284c51 ([#])

гу (N³-изомер с $n = 5$), приближаясь к активности его N¹-изомера – 1-[5-(диэтил-о-нитробензиламмоно)пентил]-3,6-диметилаурацилбромиду (см. [2, 3]).

Сравнение N-аммиопентильных производных α, ω -бисурацилилалканов (соединения IV-XIV) с 3-(ω -бензилдиэтиламмониоалкил)-1,6-диметилаурацилбромидами (I-III) позволяет сделать следующие выводы: 1) среди структур IV-XIV наибольшей миорелаксантами активностью, терапевтической широтой обладают соединения, у которых 6-метилюрациловый фрагмент удален от урацилового на расстояние 3–6 метиленовых групп (соединения IV, VI, VIII-XI) (табл. 1); 2) введение второго урацилового фрагмента на расстояниях 3–8 метиленовых групп не приводит к существенному росту миорелаксантами активности и терапевтической широты по сравнению с изученными ранее 1-(ω -диэтилбензиламмоноалкил)-3,6-диметилаурацилбромидами и 3-(ω -бензилдиэтиламмониоалкил)-1,6-диметилаурацилбромидами [2, 3]. Возможно, это свидетельствует о невысокой эффективности связывания на ацетилхолинэстеразе (АХЭ) локомоторных мышц 2-го урацилового фрагмента. Можно предположить два возможных объяснения этому: 1) в пределах значений $n = 3-8$ нет зоны, способной к избирательному связыванию со вторым урациловым циклом; 2) низкая биологическая активность может быть следствием плохой растворимости N-аммиопентильных производ-

ных α, ω -бисурацилилалканов в биожидкостях (вода/липиды).

В этой связи, очевидно, что в последующем необходим синтез и изучение аналогов N-аммиопентильных производных α, ω -бисурацилилалканов, содержащих во 2-м урациловом фрагменте заместителей (ОН, СООН, Р[O], [ОН]₂, SO₂ОН и т. д.), значительно увеличивающих гидрофильность и фармакодинамический потенциал всего соединения.

Теоретически, повышение избирательности влияния соединений на АХЭ локомоторных мышц возможно за счет взаимодействия трех фрагментов молекулы ингибитора (двух урациловых и одного бензильного) с функциональными группами аминокислот, находящимися у начала «ушеля» активного центра АХЭ («урацил-связывающий участок»). В случае комплементарного («правильного») взаимодействия это должно приводить к прочному закреплению всей молекулы на АХЭ и к повышению параметров интегральной биологической активности [1-3]. Биохимическая роль этих «урацил-связывающих участков» не ясна, но можно предполагать, что геометрия взаимного расположения этих участков различна (или, иначе, строго специфична) у макромолекул АХЭ, принадлежащих не только разным таксономическим группам животных, но также разным функциональным типам синапсов (например, синапсам диафрагмы и локомоторных мышц). Данные различия могут быть основой целенаправленной разработки новых ингибиторов АХЭ с более высокими показателями избирательности в отношении тех или иных животных или групп скелетных мышц.

Заключение. Таким образом, для 6 из 15 изученных соединений (IV, VI, VIII-XI) характерны высокие показатели избирательности действия в отношении локомоторной функции и соответствующей «фармакологической безопасности» (DL₅₀/DE₅₀ до 22,5 в тесте «бег на третбане»). По критерию токсичности и соответствующей «экологической безопасности» на дафниях (CL₅₀ до 756,24 мкМ) соединения IV-VIII, X, XII-XV существенно превосходят свои фосфорилированные аналоги [2], а также прозерин и BW284c51 (табл. 2).

Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-01137, № 07-04-12097, Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-4444.2006.4, грантами АН РТ № 03-3.1-30/2006(Г), № 09-9.3-278(ПЛ)/2006(Г).

Список литературы

1. Резник В. С., Аникиенко К. А., Курочкин В. К. и др. Новый класс ингибиторов холинэстераз: тетраалкиламмониевые производные 6-метилюрацила и аллоксазина // Доклады РАН, 1998. – Т. 362. – № 1. – С. 68-70.

2. **Зобов В.В., Петров К.А., Аслямова А.А. и др.** Фосфорилированные и тетраалкиламмониевые производные урацила: безопасность и избирательность миорелаксантного действия // *Современные проблемы токсикологии*, 2004. — № 3. — С. 25-33.

3. **Зобов В.В., Аслямова А.А., Березинский Л.А. и др.** Синтез и биологическая активность некоторых моно- и бис- ω -аммиоалкилурацилбромидов // *Хим.-фарм. ж.*, 2005. — Т. 39. — № 5. — С. 15-19.

4. **Фомин Г.С.** Вода. Контроль химической, бактериальной и радиационной безопасности по международным стандартам. — 2-е изд. — М.: Протектор, 1995. — С. 410-458.

5. **Бобков Ю.Г., Виноградов В.М., Катков В.В. и др.** Фармакологическая коррекция утомления. — М.: Медицина, 1984. — 208 с.

6. **Jones B.J., Roberts D.J.** *The Quantitative Measurement of Motor Incoordination in Naive Mice Using an Accelerating Rotarod* // *J. Pharm. Pharmacol.*, 1968. — V. 20. — P. 302-304.

7. **Измеров Н.Ф., Саноцкий И.В., Сидоров К.К.** *Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном введении (справочник)*. — М.: Медицина, 1977. — С. 196-197.

8. **Graslund S., Bengtsson B.E.** *Chemicals and biological products used in south-east Asian shrimp farming, and their potential impact on the environment* // *Sci. Total. Environ.*, 2001. — V. 280. — № 1-3. — P. 93-131.

Материал поступил в редакцию 27.06.07.

V.V.Zobov, A.V.Lantsova, A.V.Zobov, V.D.Akamsin, I.V.Galyametdinova, S.G.Fattakhov,
R.Kh.Guiniyatullin, S.M.Gorbunov, V.S.Reznik

TOXICITY AND THERAPEUTIC RANGE OF 3-(ω -BENZYLDIETHYLAMMONIO-ALKYL)-1,6-DIMETHYLURACIL BROMIDES AND THEIR ANALOGS

A. Ye. Arbuzov Institute for Organic and Physical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Kazan

A row of substituted 3-[ω -benzyl diethylammonioalkyl]-1,6-dimethyluracil bromides and N-(ammoniopentyl) derivatives of α, ω -bis uracil alkanes with an anti-choline esterase type of action are «high toxic» to mice and «low toxic» or «practically non-toxic» to *Daphnia*. Under «treadmill» and «rod rotating» tests (mice, intraperitoneal) substances in which 6-methyl uracil fraction is away from uracil fraction at a distance of 3 to 6 methylene groups are pharmacologically and ecologically safer than proserine and BW284c51.

УДК 616-092.19-02:546.48

Е.В.Степанова^{1*}, О.В.Слюзова^{1*}, А.Б.Бучарская², Р.А.Киреев¹, В.В.Игнатов¹

РАЗВИТИЕ АДАПТАЦИОННЫХ МЕХАНИЗМОВ У САМОК БЕЛЫХ КРЫС В ОТВЕТ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ИОНОВ КАДМИЯ

¹Саратовский государственный университет

²Областная детская клиническая больница, Саратов

Установлено, что ионы кадмия оказывают ингибирующее воздействие на активность антиоксидантной системы организма, приводят к образованию свободных радикалов и усилению процессов перекисного окисления липидов, угнетают факторы неспецифического иммунитета. Выявлена зависимость исследованных показателей от простоты времени адаптации.

Ключевые слова: кадмий, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, механизмы адаптации, иммунитет.

Введение. Сопrotивляемость организма влиянию неблагоприятных факторов во многом определяется состоянием его физиологических систем, возрастных, половых особенностей организма, силы и продолжительности действия раздражителя. Биологический смысл

и характер адаптационных реакций заключается в мобилизации функциональных резервов организма, необходимых для поддержания гомеостаза. Конечный результат мобилизации адаптационных механизмов — приспособление организма к новым условиям внешней и внутренней среды или несостоятельность системы неспецифической защиты. Перекисное окис-

* Фрагмент диссертационной работы

ление липидов (ПОЛ) и его продукты, выступая в роли «первичных медиаторов» стресса [1] или «SOS-ответа» [2], представляют один из наиболее ранних регуляторных механизмов. Усиление свободнорадикального окисления, вызванное действием на организм неблагоприятных факторов, ведет к ответной реакции гидрофильной и гидрофобной частей антиоксидантной системы, которая рассматривается как система, принимающая непосредственное участие в молекулярных механизмах неспецифической резистентности организма к повреждающим факторам внешней среды [3].

Целью данного исследования явилось изучение процессов ПОЛ, изменений антиоксидантной системы организма и факторов неспецифического иммунитета на фоне токсического воздействия ионами кадмия и в различные периоды адаптации.

Материалы и методы исследования. Исследование проводили на самках белых беспородных крыс с начальной массой 200–250 г. Животных содержали на стандартном рационе вивария, они получали внутривенно $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ в дозе 2 мг/кг в течение 10 дней. 1-ую группу составили самки ($n = 11$), которых выводили из эксперимента через 24 ч после последнего введения. 2-ую ($n = 9$) и 3-ью группы ($n = 10$) составили самки, которых подвергали исследованию через 4 и 8 дней после последнего введения соответственно. Вторая и третья экспериментальные группы были сформированы для изучения адаптационных механизмов организма самок к токсическому агенту. В контрольную группу ($n = 9$) вошли животные, которым вводили 1 мл 0,9% NaCl и декапитировали через 24 ч после последнего введения.

После декапитации кровь собирали в предварительно гепаринизированные пробирки и подвергали центрифугированию 10 мин. при 3000 об/мин, после чего отбирали плазму. Эритроциты трижды отмывали физиологическим

раствором, центрифугируя при 1500 об/мин. Оценку интенсивности ПОЛ проводили регистрируя количество малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах и плазме [4]. О состоянии антиоксидантной защиты судили по содержанию церулоплазмина [5] в плазме, восстановленному глутатиону [6], активности глутатионредуктазы [7] и глутатион-S-трансферазы [8] в эритроцитах. Параметры гемограммы оценивали по стандартным методикам. Подсчёт количества эритроцитов и лейкоцитов проводили унифицированным методом в счётной камере Горяева, лейкоцитарную формулу оценивали методом морфологического исследования форменных элементов крови в окрашенных по Романовскому-Гимзе мазках крови [9]. Фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови оценивали микроскопически по фагоцитарным реакциям, основанным на взаимодействии с микробной тест-культурой [10]. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы Statistica 6.0. Оценка достоверности различий средних величин для независимых переменных осуществляли по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Ранее рядом авторов [12, 13] было выявлено, что острое и хроническое воздействие ионов кадмия оказывает ингибирующее воздействие на активность антиоксидантной системы, что приводит к образованию свободных радикалов и усилению процессов ПОЛ.

Так, нами было обнаружено резкое увеличение содержания МДА в эритроцитах в 3,6 раза ($p < 0,001$) и постепенное увеличение его в плазме у животных первых групп по сравнению с контролем (табл. 1). Резкое увеличение уровня МДА в мембранах эритроцитов на фоне введения ионов кадмия обусловлено интенсификацией процессов ПОЛ, активацией процессов свободнорадикального окисления с последующим повреждением биомолекул и развитием оксида-

Таблица 1

Содержание ТБК активных продуктов в эритроцитах и плазме крови у самок белых крыс на фоне воздействия ионами кадмия

Показатель	Контроль	1 группа	2 группа	3 группа
МДА-эритроцитов, $\mu\text{моль/л}$	$1,1 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,4^*$	$1,1 \pm 0,2$ $p_{1-2} < 0,003$	$1,3 \pm 0,3$ $p_{1-3} < 0,002$
МДА-плазмы, $\mu\text{моль/л}$	$0,9 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,3^{\#}$	$5,6 \pm 1,9^{\#\#}$ $p_{1-2} < 0,05$	$2,7 \pm 0,4^{**}$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$

Примечание: * – $p < 0,001$; ** – $p < 0,002$; # – $p < 0,02$; ## – $p < 0,05$ – достоверно по отношению к контролю; p_{1-2} – достоверность различий между 1 и 2 группами; p_{2-3} – достоверность различий между 2 и 3 группами; p_{1-3} – достоверность различий между 1 и 3 группами

Таблица 2

Показатели глутатионовой защиты эритроцитов и церулоплазмينا плазмы у самок белых крыс на фоне воздействия ионами кадмия

Показатель	Контроль	1 группа	2 группа	3 группа
Глутатион-S-трансфераза, мкмоль/г НЬ в мин	3,29±0,81	1,49±0,53*	1,91±0,74	1,30±0,31*
Глутатион-редуктаза, мкмоль/г НЬ в мин	1,80±0,26	0,88±0,09 [#]	1,92±0,29 p1-2 < 0,01	1,04±0,19** p2-3 < 0,02
Глутатион восстановленный, ммоль/л Ег	2,00±0,22	1,43±0,22**	2,16±0,44 p1-2 < 0,05	1,61±0,11** p2-3 < 0,04
Церулоплазмин, мг/л	353,5±35,1	221,1±30,4 [#]	173,9±12,9**	168,9±17,2*

Примечание: * – p < 0,05; ** – p < 0,02; [#] – p < 0,01 – достоверно по отношению к контролю; p1-2 – достоверность различий между 1 и 2 группами; p2-3 – достоверность различий между 2 и 3 группами

тивного стресса [13]. Ионы кадмия могут накапливаться в эритроцитах, вызывать в последующем их лизис с выходом гемоглобина в кровяном русле [14], который является мощным прооксидантом. К 4-му и 8-му дням адаптации (2 и 3 группы) данный показатель в эритроцитах приближался к контрольным значениям, а в плазме продолжал расти, увеличившись во 2-ой группе в 6,6 раза и в 3-й в 3,2 раза по сравнению с контролем. Повышение уровня МДА в плазме, вероятно, обусловлено поступлением продуктов ПОЛ из повреждённых тканей [15], а также низким уровнем церулоплазмينا, который является в плазме одним из главных антиоксидантов. Возвращение уровня МДА в эритроцитах после прошествия дней адаптации практически к контрольным значениям можно объяснить тем, что в эритроцитах более мощная АОЗ, чем в плазме, и тем, что эритроциты являются быстро обновляющимися компонентами крови [16].

На фоне кадмиевой интоксикации и в различные периоды адаптации нами было установлено снижение показателей антиоксидантной защиты у самок белых крыс.

Так, при воздействии ионами кадмия в течение 10 дней происходило снижение активности глутатион-S-трансферазы в эритроцитах. Активность глутатионредуктазы (GR) и уровень восстановленного глутатиона (GSH) в эритроцитах также снижались в 2 и 1,4 раза соответственно (табл. 2). К 4-му дню адаптации (2-я группа) нами было установлено увеличение изучаемых показателей по сравнению с животными 1-ой группы. Однако к 8-му дню адаптации (3-я группа) активность изучаемых ферментов глутатионовой системы и содержание GSH в эритроцитах снова снижается по сравнению с 4-ым днем адаптации (2-я группа).

Полученные данные согласуются с работами [11, 17], в которых было установлено, что как

Таблица 3

Изменение показателей гемограммы и фагоцитарной активности крови у самок белых крыс на фоне воздействия ионами кадмия

Показатель	Экспериментальная группа			
	Контроль	1	2	3
Фагоцитарная активность, %	64,5±3,3	48,3±1,3*	47,8±0,9*	47,5±0,5*
Фагоцитарная интенсивность, кол-во поглощенных клеток/нейтрофил	2,0±0,04	1,6±0,07*	1,7±0,04*	1,6±0,1*
Лейкоциты, 10 ⁹ клеток/л	4,1±0,2	4,9±0,9	4,8±0,9	2,7±0,4**
Эритроциты, 10 ¹² клеток/л	5,3±0,02	4,8±0,6	4,5±0,5	4,4±0,3*
Нейтрофилы юные, %	0,5±0,3	1,7±0,3*	0,4±0,2 [#]	0
Нейтрофилы сегментоядерные, %	37,3±1,8	18,3±2,0*	36,8±2,7 [#]	46,5±1,5**
Эозинофилы, %	0,5±0,5	0	1,0±0,6	0
Моноциты, %	5,8±0,9	4,0±1,0	4,0±0,9	2,5±0,5*
Лимфоциты, %	52,5±1,7	73,3±1,3*	53,0±2,3 [#]	46,5±0,5 [#]

Примечание: * – достоверно по отношению к контролю p < 0,05; [#] – достоверно по отношению к 1 группе p < 0,05

однократное, так и хроническое введение солей кадмия приводит к снижению содержания глутатиона восстановленного и активности глутатионредуктазы; данный эффект усиливался по мере накопления Cd^{2+} в организме.

Однонаправленность изменений активности GR и уровня GSH у экспериментальных животных можно объяснить тесной взаимосвязью этих параметров. Хроническое воздействие ионами кадмия приводит к усиленному связыванию металла с SH-группами GSH, что возможно приводит к увеличению содержания окисленного глутатиона, этим объясняется резкое снижение уровня GSH у животных 1-ой группы. Снижение активности GR у животных 1-ой группы объяснимо ингибирующим эффектом ионов Cd. Однако у животных 2-ой группы установленное нами повышение активности GR и уровня GSH, по-видимому, связано с развитием компенсаторных механизмов, направленных на снижение цитотоксического действия металла. Несмотря на это, к 8-му дню у экспериментальных животных отмечается истощение адаптационных сил организма, характеризующееся снижением как содержания GSH, так и активности GR.

Снижение уровня церулоплазмينا в плазме крови связано со способностью ионов кадмия вступать в конкурентные взаимоотношения с ионами меди, железа, цинка, вытесняя их из белков, ферментов, гемоглобина. Ионы кадмия вытесняют ионы меди из каталитического центра церулоплазмينا, и как следствие происходит снижение уровня церулоплазмينا в плазме [18, 19].

В литературе имеются противоречивые сведения о влиянии кадмия на иммунную систему. В ряде работ показано его цитотоксическое и иммунотоксическое действие [20]. При низких дозах выявлено ингибирование им клеточного и иммунного ответа, однако, противоположное действие ионов кадмия отмечалось при более высоких дозах [21]. Ряд исследователей обнаружили угнетающее влияние на фагоцитарную активность, а также уменьшение продукции цитокинами макрофагов [22], уменьшается количество T и B лимфоцитов в селезенке и тимусе и, как следствие, могут развиваться аутоиммунные заболевания [23].

Под влиянием перорального введения кадмия у крыс нами было отмечено угнетение факторов неспецифической защиты организма, что проявляется постепенным уменьшением общего количества лейкоцитов, изменением показателей лейкоцитарной формулы, снижением активности и интенсивности фагоци-

тоза. После 10-ти дней введения ионов кадмия у крыс 1-ой группы отмечается резкое уменьшение количества нейтрофилов (табл. 3) со сдвигом формулы влево за счет возрастания количества юных лейкоцитов и увеличением количества лимфоцитов. На фоне адаптационных процессов происходит перераспределение показателей лейкоформулы: к 8-му дню адаптации количество сегментоядерных нейтрофилов увеличивается и уменьшается количество лимфоцитов и юных лейкоцитов. Угнетение факторов неспецифического иммунитета, проявляющееся в уменьшении общего количества лейкоцитов, снижении активности и интенсивности фагоцитоза, свидетельствует о наличии иммунотоксического воздействия ионов кадмия при пероральном поступлении в организм экспериментальных животных. Изменение показателей фагоцитарной активности, а также интенсивности и перераспределение показателей лейкоформулы с течением времени после последнего введения ионов кадмия, вероятно, отражает постепенное развитие «фазы декомпенсации» защитно-адаптационных механизмов иммунной системы.

Заключение. Исходя из полученных результатов, можно заключить, что адаптация самок белых крыс к воздействию кадмия происходит через активацию ПОЛ, расходования и мобилизации систем антиоксидантной защиты и факторов неспецифического иммунитета. Несмотря на это, по прошествии 4-х дней адаптации нами наблюдается приближение некоторых из исследуемых показателей к контрольным значениям, что свидетельствует о приведении организма в состояние стабильного функционирования. Так, зафиксировано снижение содержание МДА в эритроцитах и активизирование глутатионовой системы. Однако попытка организма вернуться в стабильное функционирование после кадмиевой интоксикации, оказалась несостоятельной и к 8-му дню адаптации установлено, снижение активности ферментов глутатионовой системы, продолжение снижения содержания церулоплазмينا в сыворотке крови и угнетение иммунной системы.

Список литературы

1. **Барабой В.А.** Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // *Успехи соврем. биологии*, 1991. — № 6. — С. 323-331.
2. **Benamira M., Marnett L.** // *The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal is a potent induce of the SOS response* // *Mutat Res.*, 1992. — № 5. — P. 1-10.
3. **Соколовский В.В.** Антиоксиданты и адаптация. — Л., 1984. — 62 с.

4. Методы биохимических исследований. Под ред. М.И. Прохоровой. – Л., 1982. – 285 с.
5. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия: пособие для врачей лаборантов. – Минск: Беларусь, 1976. – 310 с.
6. Sedlak J., Lindsey R. Estimation of total protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent // *Analyt. Biochem.*, 1968. – V. 25. – № 2. – P. 192-205.
7. Ланкин В.З., Гуревич С.М. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами (супероксиддисмутаза, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза) при экспериментальном злокачественном росте // *ДАН СССР*, 1976. – № 3. – С. 705-708.
8. Habig W., Pabst M., Jacoby W. The first enzymatic step in mercaptopyruvic acid formation // *J. Biol. Chem.*, 1974. – V. 249. – № 12. – P. 7130-7139.
9. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. – М.: Медицина, 1987. – 386 с.
10. Рудик Д.В., Тихомирова Е.И. Методы изучения процесса фагоцитоза и функционально-метаболического состояния фагоцитирующих клеток: методическое пособие. – Саратов: Изд. Саратовского государственного университета, 2006. – 112 с.
11. El-Maraghy S., Gad M., Fahim A. et al. Effect of cadmium and aluminium intake on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat tissues // *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2001. – V. 15. – № 4. – P. 207-214.
12. Lyn P. Toxic metals and antioxidants: the role of antioxidants in arsenic and cadmium toxicity // *Alternative Medicine Review*, 2003. – V. 8. – № 2. – P. 106-125.
13. Wagener F., Eggert A., Boerman O. Heme is potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase // *Blood*, 2001. – V. 52. – № 6. – P. 1802-1811.
14. Sarkar S., Yadav P., Bhatnagar D. Lipid peroxidative damage on cadmium exposure and alterations in antioxidant system in rat erythrocytes // *Bio-metals*, 1998. – V. 59. – № 11. – P. 153-157.
15. Зорькина А.В., Инчина В.И. Антиоксидантное действие цитохрома в условиях пролонгированного стресса // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 1997. – № 6. – С. 685.
16. Kostic M., Ognjanovich B., Dimitrijevic S. et al. Cadmium-induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rat: in vivo effects // *Eur. J. Haematol.*, 1993. – V. 51. – № 2. – P. 86-92.
17. Casalino E., Calzaretti G., Sblano C. et al. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium // *Toxicology*, 2002. – V. 179. – № 2. – P. 37-50.
18. Алексеева Н.М. Изменение активности церулоплазмينا в сыворотке крови под воздействием различных факторов // *Гигиена и санитария*, 1991. – № 8. – С. 70-71.
19. Васильев В.Б., Качурин А.М., Рокко Дж.-П. и др. Спектральные исследования активного центра церулоплазмينا при удалении и возвращении в него ионов меди // *Биохимия*, 1996. – № 2. – С. 296.
20. Pillet S., D'Elia H., Bernier J. et al. Immunomodulatory effects of estradiol and cadmium in adult female rats // *Toxicol. Sci.*, 2006. – V. 92. – № 2. – P. 423-432.
21. Lafuente A., Gonzalez-Carracedo A., Romero A. et al. Effect of cadmium on lymphocyte subsets distribution in thymus and spleen // *J. Physiol Biochem.*, 2003. – V. 59. – № 1. – P. 43-48.
22. Sant'Ana M., Moraes R., Bernardi M. Toxicity of cadmium in Japanese quail evaluation of body weight, hepatic and renal function and cellular immune response // *Environ. Res.*, 2005. – V. 99. – № 2. – P. 273-277.
23. Leffer E., Wolf C., Poklis A. et al. Drinking water exposure to cadmium an environmental contaminant, results in the exacerbation of autoimmune disease in the murine model // *Toxicology*, 2003. – V. 188. – № 2. – P. 233-250.

Материал поступил в редакцию 29.08.07.

Ye.V.Stepanova¹, O.V.Slyuzova¹, A.B.Bucharskaya², R.A.Kireyev¹, V.V.Ignatov¹

DEVELOPMENT OF ADAPTATION MECHANISMS IN WHITE RATS FEMALES IN RESPONSE TO EXPOSURE TO CADMIUM IONS

¹Saratov State University

²Regional Children's Clinical Hospital, Saratov

It was found out that Cadmium ions produce an inhibition effect on the activity of anti-oxidant system in the organism, lead to the formation of free radicals, strengthen lipid peroxidation processes, depress non-specific immunity. A dependence of indicators under test on the time after the adaptation process was revealed.

УДК 615.214.015.35.06:616.1

Е.А.Туховская^{1*}, Д.И.Ржевский¹, О.Н.Хохлова¹, А.Н.Мурашев¹, М.П.Витек^{2,3}

ГЕМОДИНАМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ ПЕРЕДОЗИРОВКЕ НОВОГО НЕЙРОПРОТЕКТОРА – СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДНОГО ФРАГМЕНТА АПОЛИПОПРОТЕИНА E «COG1410»

¹Филиал Института биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Пущино, Московская обл.

²Division of Neurology, Department of Medicine, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina

³Cognosci, Inc., Research Triangle Park, North Carolina

Проведено радиотелеметрическое исследование влияния разных доз нового синтетического фрагмента рецепторсвязывающего домена аполипопротеина E – пептида COG1410. Тест-системой служили мыши CD-1, которым имплантировали телеметрические датчики. Показано гипотензивное действие дозы пептида 6 мг/кг, что превышает терапевтическую дозу в 10 раз. Полученные результаты радиотелеметрического исследования позволяют прогнозировать побочное действие пептида COG1410 на сердечно-сосудистую систему при передозировке.

Ключевые слова: радиотелеметрия, сердечно-сосудистая система, среднее артериальное давление, частота сердечных сокращений.

Введение. Аполипопротеин E (ApoE) является преимущественным апобелком цереброспинальной жидкости [6, 20, 24], он активно экспрессируется в период повреждения нервной ткани глиальными и нейрональными клетками [1, 2, 25, 34]. ApoE участвует в процессах нейропротекции, нейрональной пластичности и реабилитации при патологии ЦНС, что продемонстрировано в исследованиях на животных, дефицитных [6, 21] или трансгенных [5] по гену ApoE. Терапевтический потенциал ApoE при всех преимуществах очень низок, так как интактный апобелок не проникает через гематоэнцефалический барьер [18]. В этой связи был синтезирован пептид, повторяющий аминокислотную последовательность, локализованную в рецепторсвязывающем регионе ApoE 138-149 с остатками аминокислотной кислоты в позициях 140 и 145, который был назван COG1410 [16]. Проведенные исследования специфической фармакологической активности COG1410 на цельной человеческой крови, стимулированной *ex vitro* липополисахаридом, показали, что пептид обладает выраженным противовоспалительным действием, подавляя высвобождение медиаторов воспаления, включая фактор некроза опухоли альфа [16]. В исследовании на мышинной модели черепно-мозговой травмы пептид COG1410 оказывал нейропротекторный эффект в дозе 0,6 мг/кг [17]. Однако известно, что большие количества

ApoE способствуют экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS) [3, 14]. Этот факт позволяет предположить, что пептид COG1410, обладающий всеми свойствами апобелка, связанными с ApoE-рецепторным взаимодействием, будет стимулировать iNOS и синтез оксида азота (NO). Данные о совместной локализации ApoE и iNOS в медиальных слоях сосудов представлены Zachary W. Q. Moore и David Y. Hui [35]. В работе этих авторов показано, что индукция iNOS в гладкомышечных клетках может быть связана с миграцией ApoE в стенки сосудов из сосудистого русла. Обычно iNOS экспрессируется в ответ на какой-либо повреждающий фактор [4, 11, 17]. NO действует как вазодилатор, который вырабатывается клетками эндотелия сосудов, диффундируя к гладкомышечным клеткам и вызывая их расширение через образование цГМФ [22]. Heger с соавторами показал, что усиленная экспрессия iNOS в сердечной мышце ведет к небольшому уменьшению частоты сердечных сокращений (ЧСС) и сердечного выброса [10]. В исследованиях некоторых авторов показано, что индукция iNOS снижает хронотропный и инотропный ответы на катехоламиновый стимул в изолированных миоцитах и интактном сердце [7, 31]. Ингибирование iNOS напротив усиливает эти ответы на β-адренэргические стимулы [9], а эндогенный NO снижает β-адренэргические ответы у людей с нарушением функций левого желудочка [8]. Механизмы, ответственные за эти эффекты, сложны и включают активацию

* Фрагмент диссертационной работы

растворимой гуанилатциклазы, ингибирование электронного транспорта [19], S-нитрозилирование тиоловых групп, и продукцию оксидантов, таких как супероксид и пероксинитрит. Известно, что рецепторы к АроЕ обильно экспрессируются в кардиомиоцитах [15, 27, 28, 30] и эндотелии капилляров и артериол [32, 33]. Так как пептид COG1410 активно изучается как нейропротектор с перспективой разработки на его основе лекарственного препарата, необходимо провести доклинические испытания его безопасности. Одним из обязательных международных требований к доклиническим испытаниям [13] является проведение исследований специфической токсичности на жизненно-важные системы органов, к числу которых относится сердечно-сосудистая система (ССС).

Целью нашей работы стало изучить влияние пептида COG1410 в разных дозах на гемодинамические параметры мышей, так как терапевтическая активность ранее показана для этих грызунов [17]. Наиболее подходящим методом для длительного и детального изучения функций ССС является радиотелеметрия, которая позволяет отслеживать циркадианные колебания гемодинамических параметров, а также уловить и определить длительность гемодинамических реакций на то или иное воздействие [23].

Материалы и методы исследований. Использовали самцов мышей линии CD-1 (НПП Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН) в возрасте 8–10 недель и массой 40–50 г. Все процедуры были одобрены Институтской комиссией по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных ФИБХ РАН. Мышам были имплантированы радиотелеметрические датчики для измерения артериального давления (PhysioTel TA11PA-C20, Data Science, Inc.). Операцию по имплантации датчиков осуществляли под кетамин-ксилазиновым наркозом (100 мг/кг + 10 мг/кг внутримышечно). Животных фиксировали на операционном столе на спине, удаляли шерсть в области шеи, делали разрез кожи и отодвигали подчелюстные слюнные железы и мышцы для доступа к сосудам. Выделяли общий ствол левой сонной артерии, брали его на лигатуры и вживляли катетер датчика в грудную аорту примерно на 1 см. Сам датчик закрепляли под кожей животного на шее, предварительно сделав ножницами карман под кожей в области грудной клетки, и закрывали разрез прерывистым швом. Восстановительный период до начала исследований на животном длился неделю. После восстановительного периода животным производили однократную болюсную инъекцию пеп-

тида COG1410 в хвостовую вену в дозах 0,6, 1,8 и 6 мг/кг, контрольным животным вводили растворитель – 0,9% раствор натрия хлорида, объем введения составлял 1 мл/кг. Регистрацию артериального давления вели в течение двух суток до и двух суток после инъекции с помощью радиотелеметрической системы сбора и анализа физиологических сигналов Data Science, Inc. Клетку с животным помещали на приемник PhysioTel RPC-1, который усиливал и передавал сигнал датчика на блок сбора сигналов – Data Exchange Matrix. Для регистрации давления крови к блоку сбора сигналов подключали блок трансформации давления с учетом атмосферного – APR-1. Блок сбора сигналов подключали к аналого-цифровой плате (PCI Card CQ2240). Анализ сигналов с определением среднего артериального давления (САД) и ЧСС осуществлялся при помощи специальной программы Dataquest A.R.T. 3.01. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica for Windows 7 тестом Duncan. Изменения исследуемых показателей считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. После восстановительного периода у экспериментальных животных наблюдалась нормальная циркадианная вариабельность гемодинамических параметров с повышенными уровнями артериального давления и ЧСС ночью, в период бодрствования грызунов. Исходные уровни САД и ЧСС составляли в темное время суток $108,8 \pm 1,5$ мм рт.ст.

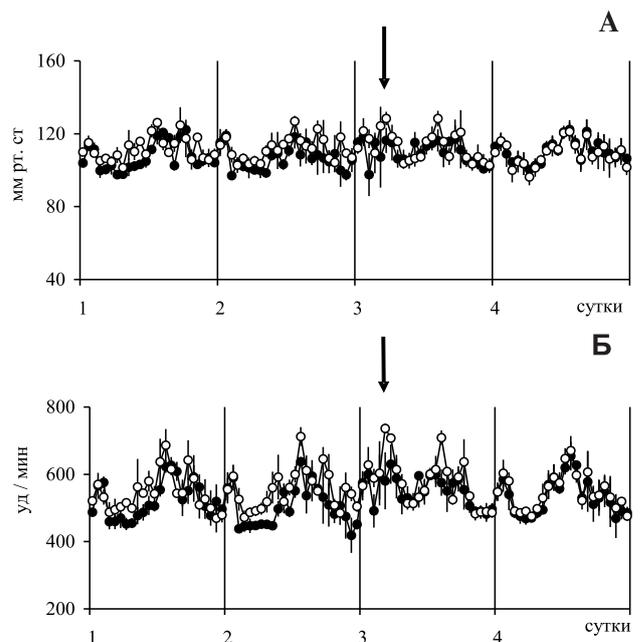


Рис. 1. САД (А) и ЧСС (Б) у мышей CD-1 в исходном состоянии и после введения COG1410 в дозе 0,6 мг/кг. Темные кружки – COG1410, светлые кружки – 0,9% NaCl. Стрелкой обозначен момент введения

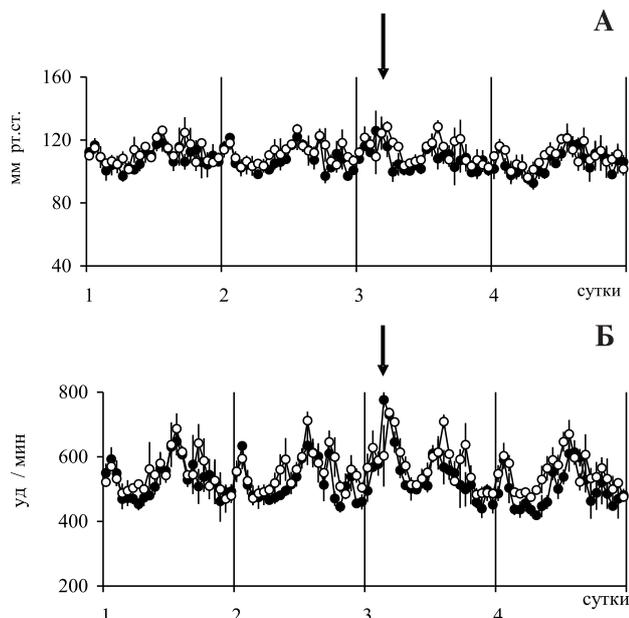


Рис. 2. САД (А) и ЧСС (Б) у мышей CD-1 в исходном состоянии и после введения COG1410 в дозе 1,8 мг/кг. Темные кружки – COG1410, светлые кружки – 0,9% NaCl. Стрелкой обозначен момент введения

и $528,9 \pm 12,7$ уд/мин, в светлое время суток – $113,8 \pm 2,1$ мм рт.ст. и $572,8 \pm 20,3$ уд/мин соответственно.

COG1410, введенный внутривенно в дозах 0,6 мг/кг (рис. 1.) и 1,8 мг/кг (рис. 2.), не оказывал выраженного влияния на ССС. Длительная регистрация САД и ЧСС после введения пептида в этих дозах не выявила каких-либо изменений этих показателей по сравнению с пара-

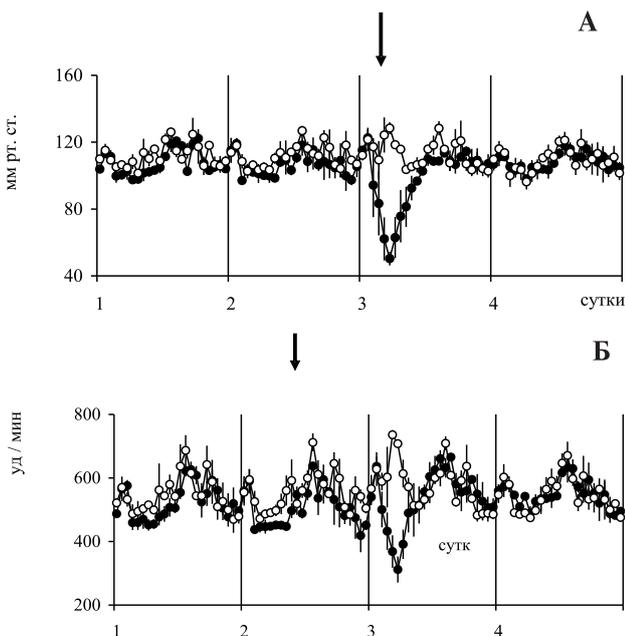


Рис. 3. САД (А) и ЧСС (Б) у мышей CD-1 в исходном состоянии и после введения COG1410 в дозе 6 мг/кг. Темные кружки – COG1410, светлые кружки – 0,9% NaCl. Стрелкой обозначен момент введения

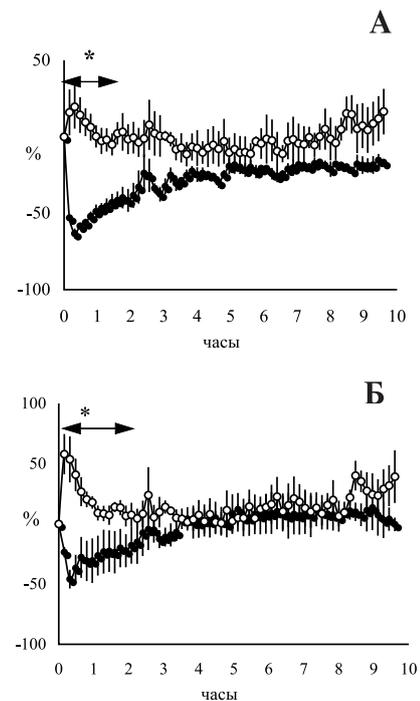


Рис. 4. Динамика изменения от исходных значений САД (А) и ЧСС (Б) при введении COG1410 в дозе 6 мг/кг мышам CD-1

Темные кружки – COG1410, светлые кружки – 0,9% NaCl.
* – $p < 0,05$ относительно группы контроль по Duncan test

метрами контрольных животных. В дозе 6 мг/кг пептид вызывал выраженное снижение САД и ЧСС (рис. 3.). На рис. 4 представлено изменение показателей за 10-часовой период регистрации. Максимум снижения САД ($-63 \pm 3\%$ относительно исходного уровня) наблюдали на 20-й мин после введения. Понижение САД сохранялось на протяжении 4-х ч, затем восстанавливалось практически до контрольного уровня. ЧСС при этой дозе также понижалась, начиная со 2-ой мин, и на протяжении 2-х ч оставалась пониженной. Максимум падения ЧСС приходился на 20-ю мин ($-47 \pm 8\%$ от исходного уровня).

Продолжительные гипотензия и брадикардия, отмеченные при введении мышам COG1410 в дозе 6 мг/кг, следует расценивать как одно из проявлений токсического действия пептида на ССС. Следует отметить, что доза пептида, при которой проявились его гемодинамические эффекты, превосходит терапевтическую дозу в 10 раз. Предполагаемый механизм подобного некомпенсированного падения САД и ЧСС – экспрессия iNOS в сосудах и сердечной мышце [12, 26] в ответ на стимуляцию АроЕ-рецепторов. COG1410, последовательность которого является частью АроЕ-рецептор-связывающего домена, в большой дозе, вероятно, взаимодействовал с АроЕ-рецепторами, которыми богаты сердце и

сосуды, вовлекая их в острый и продолжительный ответ.

Заключение. Полученные результаты радиотелеметрического исследования позволяют прогнозировать побочное действие пептида COG1410 на сердечно-сосудистую систему при передозировке.

Список литературы

1. Aoki K. et al. // *Stroke*, 2003. – V. 34(4). – P.875–880.
2. Boschert U. et al. // *Neurobiol. Dis.*, 1999. – V. 6(6). – P.508–514.
3. Brown C.M. et al. // *Free Radic Biol. Med.*, 2002. – V. 32. – № 11. – P. 1071-1075.
4. Busse R. et al. // *FEBS Lett.*, 1990. – V. 275. – P. 87-90.
5. Buttini M. et al. // *J. Neurosci.*, 1999. – V. 19(12). – P.4867–4880.
6. Chen, Y. et al. // *Neuroscience*, 1997. – V. 80. – P. 1255-1262.
7. Gyurko R. et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2000. – V. 278. – P. H971-H981.
8. Hare J.M. et al. // *Circulation*, 1995. – V. 92. – P. 2198-2203.
9. Hart C.Y. et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2001. – V. 281. – P. H146-H154.
10. Heger J. et al. // *Circ. Res.*, 2002. – V. 90. – P. 93-99.
11. Hibbs J.D. et al. // *J. Clin. Invest.*, 1992. – V. 89. – P. 867-877.
12. Hoit D. // *Brian Circ. Res.*, 2001. – V. 89. – P. 289-291.
13. ICH harmonised tripartite guideline preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6 Current Step 4 version dated 16 July 1997. – 13 p.
14. Ishigami. M. et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000. – V. 20. – P. 1020-1026.
15. Kamataki A. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002. – V. 293. – P. 1007-1013.
16. Laskowitz D.T. et al. // *Acta. Neurol. Scand.*, 2006. – V. 114 (Suppl. 185). – P. 15-20.
17. Laskowitz D. T. et al. // *J. of Neurotrauma*, 2007. – V. 24. – № 7. – P. 1093-1107.
18. Linton M. et al. // *J. Clin. Invest.*, 1991. – V. 81. – P. 270-281.
19. Lizasoain I. et al. // *Biochem. J.*, 1996. – V. 314. – P. 877-880.
20. Lynch J.R. et al. // *Ann. Neurol.*, 2002. – V. 51. – P. 113-117.
21. Masliah E. et al. // *Exp. Neurol.*, 1995. – V. 136(2). – P. 107-122.
22. Nussler A.K. et al. // *J. Exp. Med.*, 1992. – V. 176. – P. 261-264.
23. Pelat M. et al. // *Circulation*, 2003. – V. 107. – P. 2480-2486.
24. Pepper C.B. et al. // *Spectrum Int.*, 1996. – V. 36. – № 2. – P. 20-23.
25. Pitas R.E. et al. // *J. Biol. Chem.*, 1987. – V. 262(29). – P. 14352-14360
26. Poirier J. et al. // *Brain. Res. Mol. Brain. Res.*, 1991. – V. 11(2). – P. 97-106.
27. Sakai J. et al. // *J. Biol. Chem.*, 1994. – V. 269. – P. 2173-2182.
28. Takahashi S. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992. – V. 89. – P. 9252-9256.
29. Takahashi S. et al. // *J. of Atherosclerosis and Thrombosis*, 2004. – V. 11. – № 4. – P. 200-209.
30. Takahashi S. et al. // *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2003. – V. 248. – № 1–2. – P. 121-127.
31. Ungureanu-Longrois D. et al. // *Circ. Res.*, 1995. – V. 77. – P. 494-502.
32. Wada Y. et al. // *Heart and Vessels*, 2000. – V. 15. – № 2. – P. 74-80
33. Wyne K.L. et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1996. – V. 16. – P. 407-415.
34. Xu Q. et al. // *J. Neurosci.*, 2006. – V. 26(19). – P. 4985-4994.
35. Zachary W. Q. et al. // *J. Lipid Res.*, 2005. – V. 46. – P. 2083-2090.

Материал поступил в редакцию 08.08.07.

Ye.A.Tukhovskaya¹, D.I.Rzhevskiy¹, O.N.Khokhlova¹, A.N.Murashev¹, M.P.Vitek^{2,3}

HEMODYNAMIC EFFECTS AT OVERDOSE OF A NEW NEUROPROTECTOR – SYNTHETIC PEPTIDE FRACTION OF APOLYPOPROTEIN E «COG1410»

¹Branch of Academicians M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, t. Pushchino, Moscow Region

²Division of Neurology, Department of Medicine, Duke Medical Center, Durham, North Carolina

³Cognosci, Inc., Research Triangle Park, North Carolina

A radio telemetric study was conducted on the effect of different doses of a new synthetic fraction of receptor-binding domain of apolipoprotein E-peptide COG1410. A test-system was CD-1 mice with implanted telemetric sensors. The hypotensive action of a peptide dose of 6 mg/kg surpassing a therapeutic dose 10-fold was shown. The outcome of the radio telemetric study allows to prognosticate a side effect of COG1410 on cardio-vascular system at overdose.

УДК 615.91.07

Т.Г.Стратулат¹, Р.Ф.Сырку¹, А.П.Даскалюк², П.Т.Соколюк¹

ПЕРВИЧНАЯ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА НОВОГО РЕГУЛЯТОРА РОСТА РАСТЕНИЙ REGLAG

¹Государственный научно-практический центр превентивной медицины

МЗ Республики Молдова

²Центр передовых биологических технологий института генетики и физиологии растений Академии наук Республики Молдова, Кишинев

Установлено, что регулятор роста Reglalг относится к классу малоопасных соединений (DL_{50} *per os* для крыс и мышей – > 5000 мг/кг), обладает слабыми резорбтивными свойствами (DL_{50} *per cutanum* для крыс > 5000 мг/кг). Препарат не раздражает кожу и слизистые оболочки глаз кроликов. При трехмесячном введении не приводит к развитию в организме животных структурных и функциональных изменений, свидетельствующих о развитии токсического процесса.

Ключевые слова: регулятор роста, токсикологическая оценка.

Введение. В современном сельскохозяйственном производстве все большее применение находит группа средств защиты растений, обладающих рострегулирующим действием. Низкие нормы расхода, возможность управлять процессами роста и развития растений, изменяя устойчивость растений к различным внешним факторам, экологическая безопасность определяют перспективность дальнейшего применения этих препаратов [2, 4, 5]. В настоящее время изучено около 5000 соединений химического, микробиологического и растительного происхождения, обладающих в той или иной степени регуляторным действием, однако, широкое применение в мировой практике нашли около 50 препаратов. В Республике Молдова в «Государственном Реестре средств фитосанитарного назначения и средств, повышающих плодородие почвы», зарегистрировано более 400 препаратов и среди них 4 регулятора роста растений.

Учитывая интересы сельскохозяйственного производства, в Центре передовых биологических технологий (ЦПБТ) Института генетики и физиологии растений Академии наук Республики Молдова был разработан препарат Reglalг, предложенный в качестве регулятора роста растений (РРР) для предпосевной обработки семян зерновых (преимущественно пшеницы).

Исследованиями по токсикологической характеристике РРР Reglalг предусматривалось изучение: острой токсичности при однократном внутрижелудочном введении и накожном применении; раздражающего действия при однократном нанесении на кожу и слизистые оболочки; оценка кумулятивной активности.

Материалы и методы исследования. Reglalг представляет собой экстракт зеленых водорослей *Spirogira spp.* Активным компонентом препарата является комплекс жирных кислот, альдегидов, кетонов, альдегидокетонов и других нативных веществ, полученных путем экстрагирования из водорослей. Биологическая активность базируется на стимулировании развития корневой системы, увеличении способности растений к формированию приобретенной системной устойчивости. Технический препарат представляет собой 20 и 50% растворы высушенного экстракта водорослей в этиловом или бутиловом спирте. Для обработки семян препарат разводят холодной водой в соотношении 1:100 или 1:500, в зависимости от процентного содержания действующего вещества.

Токсикологические исследования высушенного экстракта водорослей проведены в соответствии с современными требованиями токсикологической экспертизы препаратов биогенного происхождения [3, 5]. Эксперименты проводили на белых беспородных мышах обоего пола (масса тела 20–25 г), крысах линии Wistar обоего пола (масса тела 130–140 г и 230–240 г в зависимости от целей эксперимента), кроликах-альбиносах (масса тела 3,0–3,5 кг). Животных содержали на стандартном пищевом рационе. Reglalг вводили *per os* зондом в виде водных растворов утром за 3 часа до кормления. Животным контрольных групп вводили соответствующее количество дистиллированной воды.

Определение DL_{50} проводили на крысах и мышах обоего пола. Кожно-резорбтивное и местно-раздражающее действие изучали на крысах-самках методом погружения хвоста на 2/3 его дли-

ны в пробирку с концентрированным раствором препарата (5000 мг/кг массы тела). Экспозиция составляла 4 ч. После эксперимента кожу хвоста обмывали теплой водой. Влияние препарата на слизистые оболочки изучали путем однократного закапывания 0,05 мл 10% раствора в конъюнктивальный мешок глаза кролика.

В последующие 14 дней вели наблюдение за состоянием животных с регистрацией массы тела. Критерием местного и резорбтивного действия препарата при нанесении на кожу и слизистые оболочки глаз служило появление внешних признаков поражения наблюдаемого участка, признаков общей интоксикации и степени выраженности ее, время развития патологических изменений слизистой и роговой оболочек.

Токсические свойства Reglalg при многократном поступлении в организм изучены в 90-дневном (субхроническом) эксперименте на 25 крысах-самках. Препарат вводили 5 раз в неделю. Были испытаны две дозы: 100 и 1000 мг/кг массы тела (1/50 и 1/5 от максимально испытанной в остром опыте). Доза 1/50 от DL_{50} , равная 100 мг/кг, является также дозой, рекомендуемой для практического применения. На протяжении всего эксперимента вели наблюдение за динамикой массы тела и гибелью животных. Забой проводили на 90-й день введения методом декапитации, в момент которой производили забор крови. Определяли клеточный состав периферической крови, уровень гемоглобина, относительную массу внутренних органов, их макроскопию, биохимические показатели сыворотки крови (содержание альбумина, глюкозы и мочевины, активность аминотрансфераз и уровень общих липидов) [7]. Для статистической обработки результатов исследования использовали *t*-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Определение среднесмертельной дозы проводили путем однократного введения препарата белым крысам в дозах: 40, 200, 1000 и 5000 мг/кг (максимально возможная в физическом плане).

В течение двух недель наблюдения гибель животных отсутствовала. Через 15 мин после введения препарата Reglalg клиническая картина интоксикации выражалась в появлении одышки, незначительной адинамии, шерсть животных «стояла дыбом». Через 24 часа после введения внешний вид и поведение животных в опытных и контрольных группах не имели различий. В результате проведенного эксперимента установлено, что DL_{50} для крыс при введении *per os* превышает 5000 мг/кг. Препарат относится к IV классу токсичности по классификации ВОЗ (мало опасные соединения).

Определение DL_{50} для мышей дало аналогичный результат. DL_{50} для мышей превышает 5000 мг/кг (IV класс опасности). Видовая и половая чувствительность при воздействии исследуемого регулятора роста на животных не выявлена.

Накожная аппликация препарата в дозе, равной 5000 мг/кг массы тела, не приводила к гибели животных. Внешний вид, состояние кожи на месте нанесения, поведение, динамика массы тела животных опытной и контрольной групп существенно не отличались между собой. На основании наблюдаемого эффекта можно сделать вывод, что PPP Reglalg обладает слабой проникающей способностью, не обладает раздражающими свойствами. DL_{50} изучаемого препарата при нанесении на кожу больше 5000 мг/кг (IV класс опасности).

Наблюдение за реакцией конъюнктивы, радужной оболочки и зрачка показало незначительную реакцию у одного животного, которая выражалась в некотором усилении секреции и незначительной гиперемии в первые 24 ч после закапывания. В последующие 7 дней наблюдений реакции слизистой глаз кролика на препарат не выявлено, таким образом, Reglalg не обладает раздражающим действием на слизистую глаз кролика.

Так как при определении DL_{50} не выявлено половой чувствительности крыс к препарату, то эксперимент по изучению длительного воздействия исследуемого соединения на организм

Таблица 1

Динамика гибели и прирост массы тела животных на фоне длительного введения препарата Reglalg

Доза, мг/кг	Показатель	Срок наблюдения, дни		
		30	60	90
Контроль	кол-во животных	8	8	8
	прирост массы тела	30,1±4,74	76,25±5,18	85,88±4,34
100	кол-во животных	8	7	7
	прирост массы тела	36,86±2,07	88,57±5,22	95,0±7,75
1000	кол-во животных	8	8	7
	прирост массы тела	30,0±1,78	63,1±2,07*	78,17±10,74

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$

Биохимические показатели сыворотки крови крыс после 90 дней введения препарата Reglalg ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	Доза	
		100 мг/кг	1000 мг/кг
Альбумин, г/л	40,5 \pm 0,97	43,2 \pm 1,30	38,6 \pm 2,49
Мочевина, ммоль/л	5,46 \pm 0,41	4,56 \pm 0,26	5,65 \pm 0,53
Глюкоза, ммоль/л	6,35 \pm 0,31	6,04 \pm 0,33	6,55 \pm 0,47
Общие липиды, г/л	1,57 \pm 0,16	1,70 \pm 0,19	1,67 \pm 0,09
АЛТ, ммоль/час.л	0,93 \pm 0,08	0,68 \pm 0,09*	0,74 \pm 0,13
АСТ, ммоль/час.л	0,85 \pm 0,02	0,95 \pm 0,06	0,95 \pm 0,02**

экспериментальных животных был проведен на самках.

На протяжении 90 дней животным вводили *per os* водный раствор Reglalg в дозах 100 и 1000 мг/кг. В ходе эксперимента вели наблюдение за гибелью животных и динамикой прироста массы тела (табл. 1). Как видно из представленных данных, в опытных группах зарегистрирована гибель по одному животному. Токсические проявления воздействия препарата на протяжении всего периода наблюдения отсутствовали. При вскрытии павших животных патологические изменения внутренних органов отсутствовали. На основании полученных данных можно сделать вывод о слабо выраженных кумулятивных свойствах препарата [1].

Анализ динамики прироста массы тела животных на фоне введения различных доз препарата показал, что на протяжении эксперимента животные опытных групп равномерно прибавляли в массе. Наибольший прирост наблюдался на фоне введения дозы 100 мг/кг. Группа животных, получавших Reglalg в дозе 1000 мг/кг, начиная со второго месяца эксперимента, заметно отставала в росте, и это различие через 60 дней введения препарата носило достоверный характер. Через 90 дней эксперимента эти различия сохранялись (табл. 1).

В ходе эксперимента определяли морфологические показатели периферической крови крыс, содержание гемоглобина и уровень лейкоцитов. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии значимых различий между представленными показателями в опытной и контрольной группах животных. Однако длительное введение препарата Reglalg оказывало влияние на общий уровень лейкоцитов, приводя к дозо-зависимому росту содержания сегментоядерных нейтрофилов. Это повышение на фоне введения 1000 мг/кг препарата было достоверно значимым ($3,21 \pm 0,46$ при $1,95 \pm 0,29$ в контроле, $p < 0,05$).

Поскольку колебания показателей крови не выходят за рамки физиологической нормы, выявленные различия не свидетельствуют о разви-

тии какого-либо патологического процесса в системе кроветворения лабораторных животных.

Во время забоя животных определяли относительную массу внутренних органов: почек с надпочечниками, печени, селезенки, легких и сердца. Согласно полученным данным, в результате 90-дневного введения различных доз исследуемого препарата существенных изменений со стороны массы внутренних органов экспериментальных животных не выявлено. Это служит косвенным доказательством отсутствия серьезных нарушений со стороны функции и морфологии обследованных органов.

Для оценки функционального состояния печени и почек на фоне длительного поступления в организм Reglalg проводили биохимические исследования сыворотки крови крыс (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют о том, что препарат Reglalg не оказывает существенного влияния на белковый, углеводный и липидный обмен. Некоторое снижение активности АЛТ и повышение активности АСТ на фоне введения препарата не выходят за пределы физиологической нормы для данного вида животных.

Таким образом, при постановке длительного эксперимента четкой картины токсического воздействия препарата на организм экспериментальных животных получено не было. Наблюдалось некоторое отставание в росте массы тела при введении высшей из доз на 30 и 60-й дни (различие было достоверно-значимым). Результаты исследования морфологических и биохимических показателей крови, морфологии внутренних органов, расчет относительных коэффициентов их массы подтвердили вывод об отсутствии токсического воздействия препарата на организм животных.

Заключение. При проведении токсикологической оценки нового регулятора роста растений установлено, что Reglalg относится к малотоксичным соединениям (IV класс опасности): DL_{50} *per os* для крыс и мышей – более 5000 мг/кг массы тела; DL_{50} при нанесении на кожу – более 5000 мг/кг массы тела. Препарат не обладает

раздражающим действием на кожу (крысы), не раздражает слизистую глаз кроликов (IV класс опасности).

При постановке длительного (90 дней) эксперимента с введением доз, рекомендуемых для применения в практике, и в десять раз выше, не было получено четкой картины токсического воздействия препарата на организм экспериментальных животных. Гибель по одному животному в группе при введении доз, равных 100 и 1000 мг/кг массы тела, в поздние сроки эксперимента свидетельствует о низкой кумулятивной способности препарата ($C_{cum} > 3$). По результатам исследований препарат Reglalg предложен для регистрации и включения в «Список разрешенных к применению средств защиты растений на территории Молдовы» в качестве регулятора роста.

Список литературы

1. Асмангулян А.А. Исследование соотношения интегральных и специфических реакций организма при оценке риска воздействия регуляторов роста растений // 2-й съезд токсикологов России. Тезисы

докладов. — М.: РПОХВ, 2003. — С. 56-57.

2. Войтович А.М., Наджарян Л.А., Котеленец А.И. и др. Оценка потенциальной мутагенной активности 2,4-эпибрассинолида // Цитология и генетика, 2004. — Т. 38. — № 6. — С. 49–53.

3. Методические указания по гигиенической оценке новых пестицидов. — Киев, 1988. — С. 16-51.

4. Наджарян Н.А. Медико-биологические аспекты безопасности применения фиторегуляторов // Белорусский медицинский журнал, 2004. — № 2(8), www.bsmtu.by/btm/02.2004/index.html.

5. Шевелуха В.С. Регуляторы роста растений. — М.: Агропромиздат, 1990. — 185 с.

6. EPA, 40 CFR (Code of Federal Regulations), the Office of Pesticide Programs (OPP), — Chapter I. — Part 158.

7. Gudumac V., Vaciu E., Marin V. et al. Investigatii enzimologice. Elaborare metodica. Chisinau, 2000. — P. 37.

Материал поступил в редакцию 21.08.07.

T.G.Stratulat¹, R.F.Syrku¹, A.P.Daskalyuk², P.T.Sokolyuk¹

PRIMARY TOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF A NEW PLANT-GROWTH REGULATOR «REGLALG»

¹State Scientific and Practical Center of Preventive Medicine, Ministry of Health of Moldova Republic

²Center of Advanced Biological Techniques, Institute of Genetics and Physiology of Plants, Moldova Academy of Sciences, Kishinev

It was found out that the growth regulator Reglalg refers to the class of low hazardous compounds (LD_{50} per os for rats and mice > 5000 mg/kg), possesses low absorptive properties (LD_{50} per cutanum for rats > 5000 mg/kg). The preparation does not irritate rabbit skin and eye mucous layer. After three months of administration, it does not lead to the development of structural and functional changes demonstrating the development of toxic process in the animal organism.

УДК [615.33:577.18].099:612.8

И.А.Дьяченко^{1*}, А.Н.Мурашев¹, Т.В.Овчинникова²

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ ПЕПТАИБОЛОВ ЗЕРВАМИЦИНОВ

¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Пушино, Московская обл.

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва

В опытах на мышах CD-1 обнаружено дозозависимое нейротоксическое действие зервамицинов. Нейротоксические эффекты в дозе 0,5 мг/кг не выявлены. Доза 2 мг/кг является пороговой в проявлении нейротоксических свойств. Нейротоксическое действие зервамицинов носит обратимый характер. Zrv-ПВ вызывает более выраженные нейротоксические эффекты, чем Zrv-ПА.

Ключевые слова: тест Ирвина, мыши CD-1, пептаибол, зервамицин, нейротоксическое действие.

Введение. Пептаиболы представляют собой семейство мембрано-активных антибио-

тических пептидов, выделенных из мицелиальных спорообразующих грибов. Они содержат в своей структуре α,α -диалкиламинокислоты, в частности α -аминоизомасляную кисло-

* Фрагмент диссертационной работы

ту (Aib), а также С-концевой 1,2-аминоспирт. К семейству пептаиболов относится группа антибиотиков зервамицинов, выделенных из гриба *Emericellopsis salmosynnemata* [2]. В культурах различных штаммов гриба обнаружено и охарактеризовано 11 изоформ пептида, среди которых преобладающими являются зервамицин ПА (Zrv-ПА) и зервамицин ПВ (Zrv-ПВ) [3]. Первичные структуры Zrv-ПА и Zrv-ПВ различаются лишь одним аминокислотным остатком в четвертом положении: Zrv-ПА содержит α -аминоизомасляную кислоту, а Zrv-ПВ – D-изовалин. У зервамицинов была выявлена нейротропная активность [1, 4], сходная с активностью пептаибола ампулоспорина (Amp), выделенного из культуры штамма гриба *Sepedonium ampullosporium* [5]. У крыс в тесте «Открытое поле» было показано, что как Zrv-ПА, так и Zrv-ПВ в дозе 2 мг/кг снижают локомоторную и исследовательскую активность [1]. У мышей было обнаружено, что Zrv-ПА проявляет поведенческие эффекты в диапазоне доз от 0,05 до 2,0 мг/кг, тогда как Zrv-ПВ – в дозах от 0,5 до 12,0 мг/кг [4]. Известно, что снижение локомоторной активности у животных может быть результатом нейротоксического действия [6,7]. Целью данного исследования являлась оценка возможных нейротоксических эффектов зервамицинов ПА и ПВ.

Материалы и методы исследования. Исследование было выполнено на самцах мышей CD-1 в возрасте двух месяцев. Животных содержали в стандартных условиях: 12-часовой период освещения, комнатная температура воздуха 18–26°C, влажность 30–70%. Корм и воду мыши получали *ad libitum*. Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с требованиями комиссии ФИБХ РАН по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных.

Для изучения нейротоксического действия пептидов был использован тест Ирвина, заключающийся в комплексной оценке поведенческого и физического состояния мышей [6, 7]. Тестирование животных проводили в клетке содержания, на открытой площадке, а также осуществляли осмотр в руках. При обследовании животных в клетке содержания определяли следующие показатели: поза на боку, неспособность к передвижению, сгорбленность, застывшая поза, возбуждение, облизывание или покусывание лап, конвульсии, тремор, затрудненное дыхание. При тестировании животных на откры-

той площадке наблюдали общую локомоторную активность, исследовательскую активность, обнюхивание, подёргивание мышц головы, подергивание ушей, пошатывание, потерю равновесия, падение, стелющиеся движения, груминг, уринации, дефекации. Осмотр животных в руках включал в себя определение гиперсаливации, пилоэрекции, закрытых век глаз, а также наблюдение за сенсорными рефлексам: визуализацией объекта, силой хватания, координацией движений в момент падения. Данные показатели оценивали в баллах от 0 до 3, наиболее выраженному эффекту присваивали максимальное количество баллов [8]. Реакцию на резкий звук и ответ на прикосновение оценивали количеством баллов от 0 до 1; эти показатели определяли на открытой площадке [7].

Тестирование животных проводили через 20, 60 и 120 мин после введения препаратов. Zrv-ПА и Zrv-ПВ растворяли в 30% этаноле и вводили внутрибрюшинно однократно в дозах 0,5, 2,0 и 4,0 мг/кг массы тела животного. В качестве контроля использовали интактных животных (контроль-1) и животных, которым вводили 30% этанол в объеме 2 мл/кг (контроль-2).

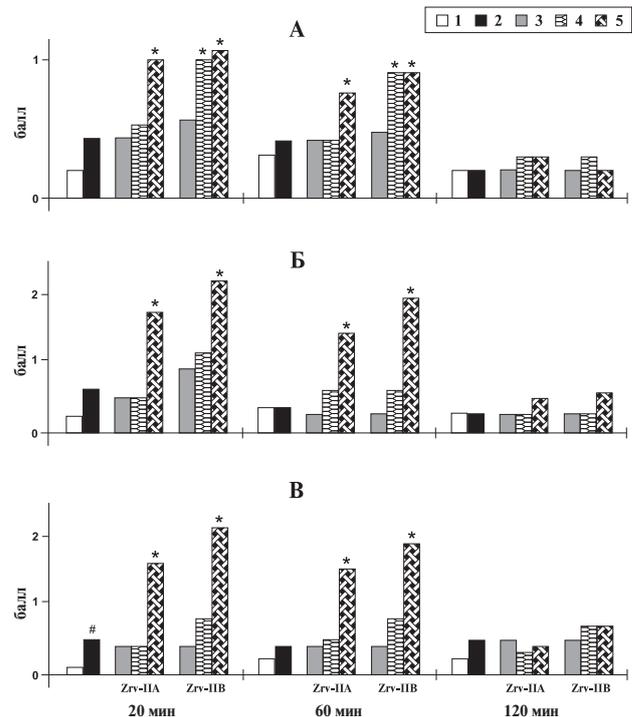


Рис. 1. Апатия (А), сгорбленная поза (Б) и покусывание лап (В), обнаруженные в тесте Ирвина под влиянием зервамицинов ПА и ПВ у мышей CD-1

Примечание. Здесь и на рис. 2 и 3: # – $p < 0,05$ по Mann-Whitney U тесту относительно интактных животных; * – $p < 0,05$ по Mann-Whitney U тесту относительно животных, которым вводили 30% этанол; 1 – интактные, 2 – 30% этанол, 3 – зервамицины (0,5 мг/кг), 4 – зервамицины (2 мг/кг), 5 – зервамицины (4 мг/кг)

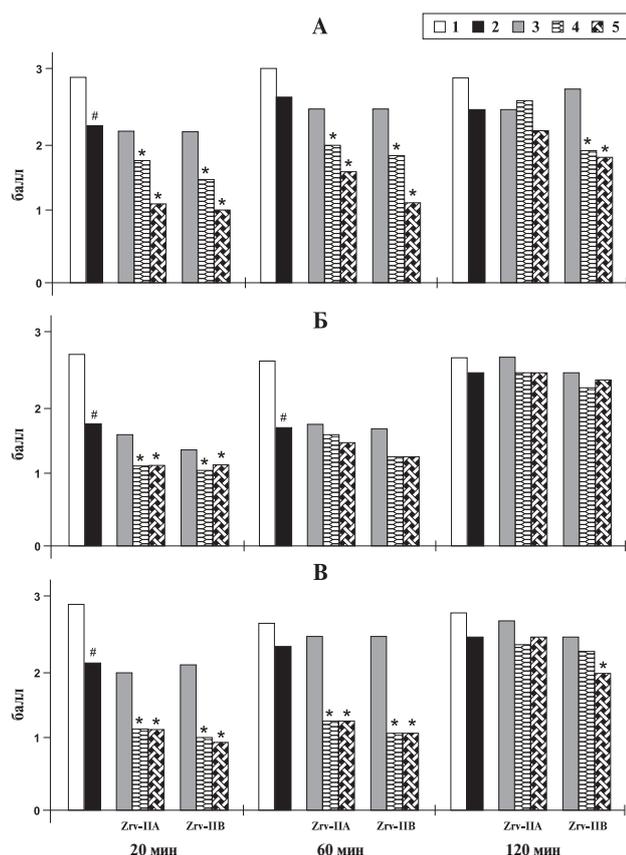


Рис. 2. Локомоторная активность (А), исследовательская активность (Б), обнюхивание (В), исследованные в тесте Ирвина под влиянием зеррамицинов IIA и IIB у мышей CD-1

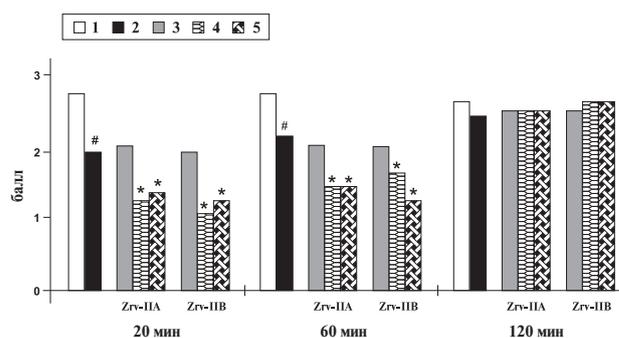


Рис. 3. Сила хватания, исследованная в тесте Ирвина под влиянием зеррамицинов IIA и IIB у мышей CD-1

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью программы Statistica 7+, используя Mann-Whitney U тест. Изменения показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Результаты осмотра животных в клетке представлены на рис. 1. В дозе 4 мг/кг как ZrV-IA, так и ZrV-IB через 20 и 60 мин после введения статистически достоверно увеличивали у животных апатию, вызывали сгорбленную позу и покусывание лап. Эти изменения были обратимы и возвращались к норме через 120 мин после введения препаратов. В дозе же 2 мг/кг только ZrV-IB статистически достоверно увеличивал у животных апатию че-

Таблица

Затрудненное дыхание и стелющиеся движения, обнаруженные в тесте Ирвина под влияние зеррамицинов IIA и IIB у мышей CD-1

Параметр	Группа	20 минута	60 минута	120 минута
Затрудненное дыхание	Интактные	0	0	0
	30% этанол	0	0	0
	ZrV-IA, 2 мг/кг	0	0	0
	ZrV-IB, 2 мг/кг	0,4±0,2**	0	0
	ZrV-IA, 4 мг/кг	1,4±0,2**	1,4±0,2**	0,2±0,1**
	ZrV-IB, 4 мг/кг	2,1±0,1**	1,8±0,1**	0,4±0,2**
Стелющиеся движения	Интактные	0	0	0
	30% этанол	0	0	0
	ZrV-IA, 2 мг/кг	0	0	0
	ZrV-IB, 2 мг/кг	0,2±0,1**	0	0
	ZrV-IA, 4 мг/кг	1,4±0,3**	1,3±0,2**	0,6±0,2**
	ZrV-IB, 4 мг/кг	1,8±0,1**	1,7±0,2**	0,4±0,1**

Примечание: # – $p < 0,05$ по Mann-Whitney test относительно интактных животных;

* – $p < 0,05$ по Mann-Whitney test относительно животных, которым вводили 30% этанол.

рез 20 и 60 мин после введения, не вызывая при этом сгорбленной позы и покусывания лап. Zrv-ПА в этой дозе вообще не оказывал влияния на данные параметры. Оба зервамицина в дозе 0,5 мг/кг не вызывали у животных апатию, сгорбленную позу и покусывание лап (рис. 1).

При осмотре животных на открытой площадке были исследованы такие параметры как локомоторная активность, исследовательская активность и обнюхивание. Как Zrv-ПА, так и Zrv-ПВ статистически достоверно уменьшали данные параметры в дозах 2,0 и 4,0 мг/кг через 20 и 60 мин после введения (рис. 2). Через 120 мин после введения только Zrv-ПВ было обнаружено снижение локомоторной активности и обнюхивания. При использовании дозы 0,5 мг/кг не было обнаружено статистически достоверных изменений параметров, изучаемых на открытой площадке, относительно животных, получавших 30% этанол (рис. 2).

Как показывают данные на рис.3, осмотр животных в руках показал, что как Zrv-ПА, так и Zrv-ПВ в дозах 2 и 4 мг/кг статистически достоверно уменьшали силу хватания через 20 и 60 мин после введения препаратов. Данные изменения носили обратимый характер и через 120 мин уже не выявлялись. Применение дозы 0,5 мг/кг не оказывало влияние на силу хватания (рис. 3).

Затрудненное дыхание и стелющиеся движения были обнаружены только у животных, получавших зервамицины в дозах 2 и 4 мг/кг (табл.). Zrv-ПВ вызывал более выраженное изменение данных параметров по сравнению с Zrv-ПА. Это воздействие также носило обратимый характер.

Выводы. 1. Zrv-ПА и Zrv-ПВ в дозах 2,0 и 4,0 мг/кг оказывают на мышей CD-1 нейротоксиче-

ское действие, имеющее обратимый характер.

2. Zrv-ПВ проявляет более выраженные нейротоксические эффекты, чем Zrv-ПА, несмотря на сходные структуры, отличающиеся только одним аминокислотным остатком.

3. Нейротоксические эффекты зервамицинов в дозе 0,5 мг/кг не выявлены. Доза 2 мг/кг является критической в проявлении нейротоксических свойств зервамицинов.

Работа выполнена при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (государственные контракты № 02.512.11.2037 от 19.02.2007 г. и № 02.522.11.2007 от 11.05.2007 г.).

Список литературы

1. *Овчинникова Т.В., Мурашев А.Н. // Доклады академии наук, 2007. — Т. 414. — № 5. — С. 707-709.*
2. *Argoudelis A.D., Dietz A., Johnson L.E. // J. Antibiot., 1974. — V. 27. — № 5. — P. 321-328.*
3. *Rinehart K.L. Jr., Gaudio L.A., Moore M.L. et al. // J. Am. Chem. Soc., 1981. — V. 103. — P. 6517-6520.*
4. *Ovchinnikova T.V., Levitskaya N.G., Voskresenskaya O.G. et al. // Chem. Biodivers., 2007. — V. 4. — № 6. — P. 1374-1387.*
5. *Ritzau M., Heinze S., Dornberger K. et al. // J. Antibiot., 1997. — V. 50. — № 9. — P. 722-728.*
6. *Daughtrey W.C., Gill M.W., Pritts I.M. et al. // J. Appl. Toxicol., 1997. — V. 17. — Suppl. 1. — P. 57-64.*
7. *Moser V. // Neurotoxicol. Teratol., 2000. — V. 19. — № 6. — P. 407-415.*
8. *Abou-Donia M.B., Goldstein LB, Shah D.U. et al. // Pharmacol. Biochem. Behav., 2002. — V. 72. — № 4. — P. 881-890.*

Материал поступил в редакцию 14.08.07.

I.A.Dyachenko¹, A.N.Murashev¹, T.V.Ovchinnikova²

INVESTIGATION OF NEUROTOXICITY OF PEPTAIBOL ZERVAMICINES

¹Branch of Academicians M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region

²Academicians M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

In experiments on CD-1 mice a dose-dependent neurotoxic action of zervamicines was found out. Neurotoxic effects were not revealed at a dose of 0.5 mg/kg. A dose of 2 mg/kg is a threshold one in the display of neurotoxic properties. Neurotoxic effects are of a reversible character. Zrv-ПВ induces more expressed neurotoxic effects than Zrv-ПА does.

Минздравсоцразвития России



Российский регистр потенциально опасных
химических и биологических веществ
Роспотребнадзора

БЮЛЛЕТЕНЬ

Российского регистра потенциально опасных химических и биологических веществ

НОВЫЕ СВЕДЕНИЯ О ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

УДК 579.841.1

Л.Р.Сулейманова^{1*}, Е.А.Асабина¹,
О.Н.Дубинина², О.Н.Логин³, С.П.Четвериков¹,
Н.Ф.Галимзянова¹, Н.Ю.Черняева²,
Р.Ф.Хуснарязанова², Н.Н.Силищев¹

¹Институт биологии Уфимского научного центра РАН
²ФГУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии
человека Роспотребнадзора»

³ГУП «Опытный завод Академии наук Республики
Башкортостан», Уфа

МИКРООРГАНИЗМ *PSEUDOMONAS* *AUREOFACIENS* ИБ 51 и БИОПРЕПАРАТ «ЕЛЕНА»

Новый биопрепарат для растениеводства «Елена», основу которого составляет природный штамм бактерий *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 [1], предназначен в качестве биофунгицида для предотвращения болезней растений, вызываемых грибами фитопатогенами, и повышения урожайности сельскохозяйственных культур [2-4].

Штамм выделен методом скрининга из образца пахотных земель. Клетки представляют собой грамтрицательные короткие, подвижные палочки, не образующие споры. На мясо-пептонном агаре штамм дает обильный рост, колонии круглые с ровными краями, гладкие, слабовыпуклые, непрозрачные, ярко-оранжевые в центре с более светлой окантовкой слизистой консистенции, в диаметре 5–6 мм, пигмент ярко-оранжевый, диффундирующий в среду.

Оптимальная температура роста – 26–30°C. По отношению к кислороду – аэроб, окислительный тип метаболизма. Желатин разжижает, пептонизирует и свертывает молоко. Образует леван из сахарозы, не гидролизует крахмал, каталазоположительный, образует аргининдигидролазу. Титр бактериальных клеток в биопрепарате – 2–3·10⁹ КОЕ/мл.

Штамм *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51

При однократном внутрибрюшинном, пероральном и интраанальном введении высо-

ких доз штамма *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 не проявляет вирулентных свойств. При внутрибрюшинном введении величина Ig DL₅₀ микробного штамма превышает «6» для мышей и «7» для крыс, при пероральном введении превышает «9», при интраанальном «7».

Значение DL₅₀ убитой культуры штамма при внутрибрюшинном введении, выраженное в Ig, превышает «9», что позволяет отнести изучаемый штамм к группе нетоксичных микроорганизмов.

Токсигенные свойства штамма не были выявлены при введении (внутрибрюшинно и перорально) фильтратов экзотоксина, полученного путем фильтрования через бактериальные фильтры 3 и 7-суточных бульонных культур.

Результаты исследования способности к диссеминации изучаемого штамма показали, что однократное пероральное введение максимальной испытанной при определении вирулентности дозы 1-суточной культуры штамма – 10⁹ КОЕ/мл, не сопровождается диссеминацией микроорганизмов во внутренние органы (кровь, сердце, легкие, печень, почки, селезенка) и не вызывает развития в организме функциональных сдвигов при периодическом в течение последующего 1-месячного периода выполнения соответствующих исследований. Повторное 20-кратное введение бактерий на протяжении 1-го месяца в ежедневной дозе 1/5·10⁹ КОЕ/мл также не ведет к диссеминации штамма во внутренние органы. Отмечаемые при этом определенные сдвиги в сравнении с параллельной контрольной группой крыс, получавшей в равной доле физиологический раствор: небольшая относительная эозинофилия, некоторое увеличение содержания белка, активности щелочной фосфатазы, уровня мочевой кислоты в сыворотке крови, – скорее всего обусловлены поступлением в организм подопытных животных значительного количества белка микробного происхождения.

Дисбиотическое действие штамма на микробиоценоз кишечника изучали на белых крысах,

* Фрагмент диссертационной работы

подвергавшихся в течение 1-го месяца ежедневной пероральной затравке культурой микроорганизма в дозе $1/5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Продолжительное введение культуры *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 не оказывало влияния на кишечную микрофлору. Штамм обладает слабовыраженными аллергенными свойствами.

Местный раздражающий эффект на слизистые оболочки глаз при контакте с *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 не отмечается.

Полученные результаты позволяют отметить, что штамм *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 не имеет медико-гигиенических противопоказаний к регистрации в качестве основы пестицидного препарата для использования в сельском хозяйстве.

Биопрепарат «Елена»

При введении максимальной дозы 5000 мг/кг массы тела гибели подопытных животных, а также внешних признаков изменения их состояния и поведения не отмечалось, что позволяет оценить препарат как малотоксичный при однократном энтеральном поступлении в организм.

Острую ингаляционную токсичность препарата оценивали на беспородных белых крысах (4 ч) и белых мышах (2 ч). Концентрация жидкого аэрозоля препарата в камере, рассчитанная весовым методом, определена на уровне 74000 мг/м³.

Случаев гибели животных не отмечено на протяжении 30-дневного периода наблюдения. Выполненное исследование позволяет оценить препарат «Елена» как малотоксичный продукт при однократном ингаляционном воздействии на организм.

Местное раздражающее влияние биопрепарата на кожные покровы испытывали на белых мышах пробирочным методом, а также на морских свинках при нанесении на выстриженный участок кожи боковой поверхности туловища ежедневно 1 г препарата в течение 10 дней. Было установлено, что как однократный, так и повторные контакты нативного продукта с кожей не оказывают заметного ирритативного эффекта.

Исследование местного действия на конъюнктиву глаз кроликов при однократном внесении 1 капли нативного препарата и его 50% разведения также не выявило заметного раздражающего влияния при наблюдении в течение 7 дней.

Кожно-резорбтивное действие биопрепарата испытывали в 2-х недельном опыте на белых мышах пробирочным методом. При этом масса тела подопытных животных, поведенческие реакции, коэффициенты относительной массы внутренних органов не отличались от соответствующих показателей контрольной группы. Гибели животных в ходе опыта не зарегистрировано.

Таким образом, препарат «Елена» следует оценить как не обладающий заметным кожно-резорбтивным эффектом.

Влияние биопрепарата «Елена» на иммунную систему оценивалось аналогично тому, как это выполнялось при тестировании микробного действующего начала препарата. Выявлено увеличение индекса гиперчувствительности замедленного типа у мышей. Другие тесты, в том числе кожные, не позволили выявить иммунологической перестройки организма. Тем не менее выявленные тенденции позволяют оценить биопрепарат «Елена» как проявляющий слабовыраженную аллергенную активность.

Кумулятивные свойства препарата изучали на беспородных белых крысах при ежедневном пероральном введении нативного продукта в дозе 1 г/кг тела, продолжительность опыта составляла 1 месяц. Животные получали суммарную дозу препарата 20 г/кг. Выполненные исследования показали, что препарат «Елена» не проявляет способности к материальной кумуляции. Вместе с тем, при продолжительном поступлении его в организм могут наблюдаться некоторые сдвиги функционального состояния центральной нервной системы, картины периферической крови, обмена веществ, морфофункционального состояния внутренних органов.

Возможность диссеминации микроорганизма, составляющего основу препарата, во внутренние органы исследовалась по окончании 1-месячного эксперимента с энтеральным введением препарата животным в суммарной дозе 20 г/кг (ежедневно вводимая доза составляла 1 г/кг). Показано, что диссеминация микроорганизма во внутренние органы при поступлении препарата «Елена» в организм отсутствует. В этом же эксперименте показано, что продолжительное внутрижелудочное поступление в организм препарата «Елена» не оказывает существенного влияния на микробиоценоз подопытных животных.

Изучалась микрофлора на очаге кожных покровов морских свинок по окончании 10-дневных ежедневных аппликаций препарата в дозе 1,0 г/кг. При этом анализировался состав микрофлоры поверхностного и глубинного слоев методом отпечатков на кровяной агар. Показано, что повторный контакт с препаратом «Елена» не оказывает заметного влияния на биоценоз поверхностного и глубинного слоев кожи.

Таким образом, биопрепарат «Елена» по величинам токсических доз и концентраций при однократном воздействии на организм малотоксичен и малоопасен и не имеет медико-гигиенических противопоказаний к использованию в сельском хозяйстве.

Список литературы

1. **Логинов О.Н., Свешникова Е.В., Силищев Н.Н. и др.** Патент RU 2203945 C12 N 1/20. Штамм бактерий *Pseudomonas aureofaciens* для получения препарата против заболеваний пшеницы, вызываемых грибными фитопатогенами. Заявл. 17.08.2001; опублик. 10.05.2003. Бюл. 13.
2. **Свешникова Е.В., Логинов О.Н., Исаев Р.Ф. и др.** // *Защита и карантин растений*, 2003. — № 10. — С. 35.
3. **Кузьмина Л.Ю., Логинов О.Н., Бойко Т.Ф. и др.** // *Сельскохозяйственная биология*, 2003. — № 5. — С. 69-73.
4. **Коршунова Т.Ю., Силищев Н.Н., Галимзянова Н.Ф. и др.** // *Башкирский химический журнал*, 2007. — Т. 14. — № 4. — С. 92-94.

Материал поступил в редакцию 08.02.08.

УДК 579.841.21

**Я.О.Логинов^{1*}, А.И.Мелентьев¹, О.Н.Логинов³,
Н.Н.Силищев¹, А.Г.Гатаулин¹, О.Н.Дубинина²,
Р.Ф.Хуснаризанова², Н.Ю.Черняева²**

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ *AZOTOBACTER VINELANDII* ИБ-1 И ПРЕПАРАТА «АЗОПОЛ» НА ЕГО ОСНОВЕ НА МАКРООРГАНИЗМ

¹Институт биологии Уфимского научного центра РАН

²ФГУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека Роспотребнадзора»

³ГУП «Опытный завод АН РБ», Уфа

В институте биологии Уфимского научного центра РАН выделен штамм *Azotobacter vinelandii* ИБ-1 продуцент экзополисахарида [10].

Целью исследования являлось изучение токсического влияния штамма и продуктов метаболизма на макроорганизм (персонал, занятый при производстве препарата) на модели лабораторных животных.

В работе использованы беспородные животные: 334 белых мышей массой 16–18 г; 154 белых крыс — 160–180 г; 46 морских свинок — 200–250 г и 9 кроликов 1,5–2 кг.

Токсиколого-гигиеническое исследование проводили в соответствии с рекомендованными методиками [2].

Штамм выделен из почвы. Клетки представляют собой короткие, подвижные палочки 1,5–2 мкм, грамтрицательные, спор не образуют, но образуют цисты. На 4-е сутки роста палочки приобретают кластридиальную форму, утрачивая подвижность. По отношению к кислороду — аэроб, окислительный тип метаболизма. В факторах роста не нуждается. Для фиксации азота необходим молибден. Каталазоположителен. В качестве источника углерода использует глюкозу, сахарозу, маннит, фруктозу, мальтозу, глицерин, декстрин, ксилозу, рамнозу, маннозу, галактозу, мезоинозитол, натрий уксуснокислый, натрий бензойнокислый, этанол, целлюлозу. Не ассимилирует сорбит, арабинозу, лактозу.

Токсикологическая оценка штамма проведена согласно МУ [8, 9]. Установлено, что штамм не вирулентен, не токсичен, не обладает токсигенностью, способностью к диссеминации, а также дисбиотическим влияниям. Аллергенные свойства слабо выражены. Местный раздражающий эффект на конъюнктиву не выражен. Штамм разрешен к применению в качестве промышленного [3, 16].

Экзополисахарид, продуцируемый *Azotobacter vinelandii* ИБ-1, представляет собой биополимер, включающий альгиновые кислоты, длинная цепь молекулы которых построена из остатков β-D-маннуриновой и α-L-гулуриновой кислот. На основе него разработан препарат «Азопол» (микробный экзополисахарид (МЭПС «АЗОПОЛ») [10]. Предназначен для нефтедобывающей и для текстильной промышленности, как заменитель крахмала для шлихтования пряжи, а также при производстве особо прочных и эластичных искусственных волокон и влагонепроницаемых тканей.

Исследована острая токсичность и опасность экзополисахарида, его влияние на интегральные показатели состояния организма экспериментальных животных и микрофлору кишечника, иммунотоксические свойства [5, 6, 7, 11, 15, 17, 18].

Препарат «Азопол» вводили энтерально в организм животных в виде 4% геля в максимально достижимой дозе. При введении дозы 5 г/кг гибели животных не зарегистрировано в течение 2-недельного срока наблюдения. Динамика массы тела в процессе эксперимента и в восстановительном периоде, а также общее состояние и поведение подопытных животных визуальных отклонений не имели.

Однократное 4-х часовое вдыхание пыли препарата в максимально достижимых концентрациях не вызывало изменений в поведении и общем состоянии опытных животных по сравнению с контрольными.

При изучении местного влияния «Азопола» установлено, что однократный контакт 5% геля препарата с кожей животных, а также более низких его разведений, не оказывал заметного раздражающего эффекта.

Кожно-резорбтивное действие экзополисахарида в виде 5% геля изучали в 2-недельном опыте на белых мышцах пробирочным методом. Уста-

* Фрагмент диссертационной работы

новлено, что масса тела подопытных животных, поведенческие реакции, а также величина коэффициентов массы внутренних органов не отличались от таковых контрольной группы. Гибель животных не наблюдалась.

Для оценки возможности алергизации организма при контакте с продуктом использован тест ГЗТ (гиперчувствительности замедленного типа) на мышах, а также сенсibilизация на морских свинках по Алексеевой-Петкевич с постановкой иммунологических тестов *in vitro*. Мыши получали сенсibilизирующую дозу препарата в количестве 100 мкг. Разрешающая доза не выявила увеличение индекса ГЗТ у мышей.

При обследовании морских свинок положительные кожные тесты у животных опытной группы не выявлены, иммунологические тесты *in vitro*: реакция специфической агломерации лейкоцитов (РСАЛ), реакция дегрануляции тучных клеток (РДТК) также дали отрицательный результат.

Кроме того, изучены кумулятивные свойства препарата, которые оценивали на белых крысах в условиях ежедневного энтерального введения 4% геля препарата в дозе 1 г/кг на протяжении 1 месяца. При этом животные суммарно получили 23 г/кг. В ходе эксперимента и по окончании общее состояние и поведение подопытных животных не имели существенных отличий от контроля. Ни одно животное не погибло. Динамика массы тела, функциональное состояние ЦНС (по поведенческим реакциям) и коэффициенты относительной массы внутренних органов (легкие, печень, почки, селезенка, надпочечники) не имели достоверных различий между группами. Вместе с тем, зарегистрировано уменьшение коэффициента относительной массы сердца ($p < 0,05$). Гематологические и биохимические исследования: общий анализ крови (гемоглобин, эритроциты, лейкоцитарная формула), ферментативная активность в сыворотке крови аланинтрансаминазы и щелочной фосфатазы, уровень общего белка, холестерина также не выявили существенных отклонений в группе подопытных животных, однако, отмечена тенденция к снижению относительного содержания лимфоцитов в крови подопытных животных. В сыворотке крови обнаружено повышение содержания триглицеридов, что, скорее всего, обусловлено поступлением в организм животных значительного количества полисахарида. Дисбиотических отклонений не выявлено.

На основе проведенных исследований можно заключить, что препарат «Азопол» по величинам токсических доз при энтеральном введении

следует классифицировать как малоопасный продукт при однократном воздействии на организм, не представляющий опасности острых ингаляционных отравлений. Местное раздражающее влияние на кожу и конъюнктиву не выражено. Не обладает заметным кожно-резорбтивным влиянием и не вызывает формирования сдвигов в функциональном состоянии иммунной системы. Препарат не проявляет значительной способности к материальной кумуляции. При повторном поступлении его в организм, однако, развиваются морфо-функциональные изменения, свидетельствующие о вмешательстве полисахарида в обмен веществ.

Таким образом, изучение токсических свойств штамма *Azotobacter vinelandii* ИБ-1 и продукта его биосинтеза экзополисахарида, показало, что негативного влияния на макроорганизм не обнаружено. Персонал, задействованный в производстве препарата «Азопол», должен соблюдать элементарные гигиенические правила, предусмотренные при работе с микроорганизмами [12, 14].

Список литературы

1. ГОСТ 12.1.008–76. ССБТ. Биологическая безопасность.
2. ГОСТ 8.563–96. ГСИ. Методики выполнения измерений.
3. Дубинина О.Н., Ткачева С.Г., Хуснарязанова Р.Ф. и др. Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека. Отчет о научно-практической работе: Исследования патогенности микробиологического препарата «Азолен» для проведения государственной регистрации. – Уфа, 2003.
4. Малышева А.Г., Растянный Е.Г., Беззубов А.А. и др. // Гиг. и сан., 2006. – № 1. – С. 32-34.
5. Методические рекомендации по использованию поведенческих реакций животных в токсикологических экспериментах для целей гигиенического нормирования, № 2166-80. – Киев, 1980.
6. Методические указания к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны, № 2163-80. – М., 1980.
7. Методические указания к постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию ПДК избирательно действующих раздражающих веществ в воздухе рабочей зоны, № 2196-80. – М., 1980.
8. Методические указания по гигиенической оценке микробных средств защиты растений от насекомых и болезней на основе неспорообразующих бактерий, № 2620-82 от 22.09.82.
9. Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды, № 5789/1-91 от 11.06.91.

10. Патент RU 2266324 С 12 N 1/20. *Продуцент экзополисахарида*. Оpubл. 20.12.2005. Бюл. 35.

11. *Показатели токсиметрии, подлежащие определению на разных стадиях производства и применения химических веществ*. МУ № 4230-86. — М., 1987.

12. *Положения об организации работы по технике безопасности в микробиологической промышленности*. — М., 1980.

13. *Предельно допустимые концентрации загрязняющих веществ в воздухе рабочей зоны*. ГН 2.2.5.1313-03. *Гигиенические нормативы*. — М.: Минздрав России, 2003.

14. *Предельно допустимые концентрации микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в воздухе рабочей зоны*. ГН 2.2.6.709. — М.: МЗ России, 1999.

15. *Проблемы нормы в токсикологии*. Под ред. И.М.Трахтенберга. — М., 1991.

16. *Ткачева С.Г., Дубинина О.Н., Хуснаризанова Р.Ф. и др.* // Сб. работ 69-й итоговой научной сессии КГМУ и отделения медико-биологических наук Центрально-Черноземного района НЦ РАМН. Ч. 1. — Курск, 2004. — С. 139-140.

17. *Трахтенберг И.М., Тимофеевская Л.А., Вятковская И.Я.* *Методы изучения хронического действия химических и биологических загрязнителей*. — Рига, 1987.

18. *Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы*. МУ 1.1.0578-96.

Материал поступил в редакцию 08.02.08.

УДК 613.579.66

**Н.В.Кобызева^{1*}, О.Н.Дубинина², О.Н.Логинов³,
С.П.Четвериков¹, Т.Ф.Бойко¹, Н.Ю.Черняева²,
Р.Ф.Хуснаризанова², Н.Н.Силищев¹**

¹Институт биологии Уфимского научного центра РАН

²ФГУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека Роспотребнадзора»

³ГУП «Опытный завод Академии наук Республики Башкортостан», Уфа

БИОПРЕПАРАТ-НЕФТЕДЕСТРУКТОР «ЛЕНОЙЛ»

Новый биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл», основу которого составляет природный консорциум нефтеокисляющих микроорганизмов *Bacillus brevis* и *Arthrobacter species* [1], предназначен для ремедиации природных и техногенных объектов от нефтяного загрязнения [2-4].

* Фрагмент диссертационной работы

Токсиколого-гигиеническая оценка препарата «Ленойл» выполнена согласно требований действующих методических указаний [5, 6].

Токсичность и опасность при введении в желудок оценивали на беспородных белых крысах и мышах. Вводился энтерально нативный препарат. При введении дозы 5 г/кг гибели животных не зарегистрировано в течение 2-х недель наблюдения. Общее состояние и поведение подопытных животных не имели отклонений, регистрируемых визуально.

При однократном 4-часовом вдыхании животными жидкого аэрозоля общее состояние и поведение животных подопытной и контрольной групп не различалось. Случаев гибели животных на протяжении 2-недельного периода наблюдения не зарегистрировано.

Местное раздражающее влияние биопрепарата изучали на белых мышах, морских свинках и кроликах. Однократный контакт с кожей животных нативного продукта, а также разбавленных растворов не оказывает заметного раздражающего эффекта. При повторных 7-кратных аппликациях появляется небольшая сухость кожных покровов. Исследование местного действия на конъюнктиву глаза кроликов не выявило способности нативного продукта вызывать развитие воспалительного процесса.

Кожно-резорбтивное действие биопрепарата испытывали в 2-недельном опыте на белых мышах пробирочным методом. Масса тела подопытных животных, поведенческие реакции, коэффициенты относительной массы внутренних органов не отличались от параметров соответствующих показателей контрольной группы. Гибели животных в ходе опыта не зарегистрировано.

Для оценки возможности аллергизации организма при контакте с препаратом использован тест гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на мышах, а также метод накожных аппликаций на морских свинках с постановкой иммунологических тестов *in vitro*. Мыши получали сенсибилизирующую дозу препарата в количестве 100 мкг. Разрешающая доза выявила увеличения индекса ГЗТ у мышей ($6,2 \pm 1,3$, в контрольной группе $3,18 \pm 0,87$), что свидетельствует об аллергической перестройке в организме подопытных животных по сравнению с контролем. При обследовании морских свинок по окончании 1-месячных аппликаций нативного продукта установлено следующее: положительные кожные тесты выявлены у 80% животных опытной группы при отсутствии таковых в контроле. Вместе с тем, количество лейкоцитов и лейкоцитарная формула, белок и белковые фракции сыворотки крови не имели отличий между опытной и контрольной группами.

Определение соотношения разных классов лимфоцитов по тесту розеткообразующих клеток выявило тенденцию ($p < 0,1$) к снижению содержания Т-лимфоцитов и увеличению В-лимфоцитов. Оценка неспецифической иммунологической реактивности морских свинок по показателям фагоцитарной реакции показала увеличение фагоцитарного числа в подопытной группе.

Результаты этого исследования свидетельствуют о том, что контакт организма с препаратом вызывает формирование определенных сдвигов в функциональном состоянии иммунной системы, выражающихся стимуляцией факторов клеточного иммунитета и неспецифической реактивности, что может служить этиологическим фактором возникновения аллергических заболеваний, главным образом дерматитов, при производственном контакте с биопрепаратом.

Кумулятивные свойства биопрепарата оценивали на беспородных белых крысах в условиях ежедневного энтерального введения дозы 1 г/кг массы тела на протяжении 1 месяца. При этом суммарная доза составила 26 г/кг. В ходе эксперимента и по окончании его общее состояние и поведение подопытных животных не имели существенных отличий от контроля, случаев гибели животных не зарегистрировано, динамика массы тела и коэффициенты относительной массы внутренних органов не имели достоверных различий между группами. Гематологические и биохимические исследования показали, что общий анализ крови (гемоглобин, эритроциты, лейкоциты, лейкоцитарная формула), ферментативная активность в сыворотке крови аспарагиновой трансминазы, аланиновой трансминазы, лактат дегидрогеназы, общий белок, белковые фракции также не выявили существенных отклонений в группе подопытных животных.

Зарегистрировано некоторое увеличение диуреза, а также суточной экскреции белка ($p < 0,05$). В сыворотке крови отмечено повышение содержания мочевой кислоты ($p < 0,02$). Отмеченные изменения, скорее всего, обусловлены поступлением в организм подопытных животных значительного количества белка микробного происхождения.

Биопрепарат «Ленойл» не содержит в своем составе патогенных и условно патогенных микроорганизмов.

Оценена способность штаммов микроорганизмов биопрепарата к диссеминации в организме. Исследование выполнено по окончании 1-месячного эксперимента с энтеральным введением беспородным белым крысам препарата в суммар-

ной дозе 26 г/кг. Использован метод посева крови и отпечатков внутренних органов на питательные среды с последующим исследованием результатов посева. Диссеминации микроорганизмов во внутренние органы не обнаружено.

Изучено дисбиотическое действие биопрепарата «Ленойл» посредством исследования микробиоценоза толстой кишки: определение содержания облигатных анаэробных бактерий (бифидобактерий, лактобацилл), кишечной палочки (нормальной и гемолизирующей), условно-патогенных энтеробактерий, в том числе протей, а также стафилококков, энтерококков, дрожжеподобных и плесневых грибов. Установлено, что явлений дисбактериоза в опытной группе по сравнению с контролем не отмечается.

Результаты токсиколого-гигиенических исследований дают основание заключить, что данный продукт может быть использован по назначению: для ускорения деградации нефти при рекультивации загрязненных нефтью территорий. Обязательным условием при этом является выполнение требований санитарного законодательства.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 08-04-99002.

Список литературы

1. **Логинов О.Н., Силищев Н.Н., Чураев Р.Н. и др.** Патент RU 2232806 C12 N 1/20. Консорциум микроорганизмов *Bacillus brevis* и *Arthrobacter species*, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов. Заявл. 12.08.2002; опубл. 20.07.2004. Бюл. 20.
2. **Логинов О.Н., Пилюгин В.В., Костюченко В.П. и др.** Патент RU 2237711 C 12 N 1/20. Способ рекультивации отбеливающей земли, загрязненной нефтепродуктами. Заявл. 30.12.2002; опубл. 10.10.2004. Бюл. 28.
3. **Логинов О.Н., Силищев Н.Н., Нуртдинова Л.А. и др.** Патент RU 2241032 C 12 N 1/20. Способ очистки водных поверхностей от нефтяного загрязнения. Заявл. 03.12.2002; опубл. 27.11.2004. Бюл. 33.
4. **Бакаева М.Д., Биккинина А.Г., Нуртдинова Л.А. и др.** // Башкирский химический журнал, 2005. — Т. 12. — № 3. — С. 123-127.
5. **Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды, № 5789/1-91 от 11.06.91.**
6. **Методические указания по гигиенической оценке микробных средств защиты растений от насекомых и болезней на основе неспорообразующих микроорганизмов, № 2620-82 от 22.09.82.**

Материал поступил в редакцию 08.02.08.

НОВЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТОКСИКОЛОГИИ И СМЕЖНЫМ ДИСЦИПЛИНАМ

Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды (перечень), Дополнение № 5 к ГН 1.2.1323-03. Гигиенические нормативы ГН 1.2.1988-07. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. — 6 с. 500 экз.

Камышников В.С. Клинические лабораторные тесты от А до Я и их диагностические профили: Справ. пособие. — М.: МЕДпресс-информ, 2007. — 313 с. 5000 экз.

Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. Дополнения и изменения № 1 к ГН 2.1.5.1315-03. Гигиенические нормативы ГН 2.1.5.2280-07. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. — 11 с. 500 экз.

European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). Joint Assessment of Commodity Chemicals JACC № 53 Cyanides of Hydrogen. Sodium and Potassium, and Acetone Cyanohydrin (CAS № 74-90-8, 143-33-9, 151-50-8 and 75-86-5). Volumes I and II. 2007. <http://www.ecetoc.org>

European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). Technical Report № 102. Intelligent testing strategy in ecotoxicology: Mode of action approach for specifically acting chemicals. 2007/ <http://www.ecetoc.org>

Intergovernmental Forum on Chemical Safety (IFCS) Katherine Shea, MD,MPH: Managing chemicals in a changing climate to protect health. 2007. http://www.who.int/entity/ifcs/documents/general/clim_change_chem.pdf

К.К.Сидоров, А.А.Виноградова

НОВЫЕ ГИГИЕНИЧЕСКИЕ НОРМАТИВЫ

В соответствии с Федеральным законом от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (Собрание законодательства Российской Федерации, 1999, № 14, ст. 1650; 2002, № 1 (ч. 1), ст. 1; 2003, № 2, ст. 167; № 27 (ч. 1), ст. 2700; 2004, № 35, ст. 3607; 2005, № 19, ст. 1752; 2006, № 1, ст. 10; № 52 (ч. 1), ст. 5498; 2007, № 1 (ч. 1), ст. 21, ст. 29; № 27, ст. 3213; № 46, ст. 5554; № 49, ст. 6070) и постановлением Правительства Российской Федерации от 24.07.2000 № 554 «Об утверждении Положения о государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации и Положения о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2000, № 31, ст. 3295, 2005, № 39, ст. 3953 Главный государственный санитарный врач Российской Федерации Г. Г. Онищенко постановлением № 75 от 28.09.07 утвердил и ввел в действие с 15 декабря 2007 г. гигиенические нормативы ГН 2.1.5.2280-07 «Дополнения и изменения № 1 к гигиеническим нормативам «Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. ГН 2.1.5.1315-03» и постановлением № 77 от 28.09.07 постановил, что с момента введения в действие гигиенических нормативов ГН 2.1.5.2280-07 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. Дополнения и изменения № 1 к ГН 2.1.5.1315-03» считать утратившими силу гигиенические нормативы веществ в ГН 2.1.5.1315-03 с порядковыми номерами: 125, 136, 1270, 298, 916, 917, 297, 524, 715, 829, 881, 940, 282, 945, 1175, 1075, 730, 785, 1195, 1264, 1177, 1276, 1327, 1282.

УТВЕРЖДЕНЫ

постановлением главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28 сентября 2007 г., № 75

2.1.5. Водоотведение населенных мест, санитарная охрана водоемов
**ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ (ПДК)
ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ВОДЕ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ
ХОЗЯЙСТВЕННО-ПИТЬЕВОГО И КУЛЬТУРНО-БЫТОВОГО ВОДОПОЛЬЗОВАНИЯ**
Дополнения и изменения № 1 к ГН 2.1.5.1315-03
Гигиенические нормативы
ГН 2.1.5.2280-07

№ п/п	Наименование вещества	№ CAS	Формула	Величина ПДК, мг/л	Лимитирующий показатель вредности	Класс опасности
1	2	3	4	5	6	7
1	Бенз/а/пирен	50-32-8	C ₂₀ H ₁₂	0,00001 ^{к)}	с.-т.	1
2	Бензол	71-43-2	C ₆ H ₆	0,001 ^{к)}	с.-т.	1
3	Броматы	7789-38-0	BrO ₃ ⁻	0,01 ^{к)}	с.-т.	1
4	Бромдихлорметан	75-27-4	CHBrCl ₂	0,03 ^{к)}	с.-т.	1
5	Винилхлорид	75-01-4	C ₂ H ₃ Cl	0,005 ^{к)}	с.-т.	1
6	1-Гидроксиэтилидендифосфоновая кислота	2809-21-4	C ₂ H ₈ O ₇ P ₂	0,6 ^{ж)}	с.-т.	2
7	1-Гидроксиэтилидендифосфоновой кислоты медьаммонийный комплекс		C ₂ H ₉ CuNO ₇ P ₂	0,6 ^{ж)}	с.-т.	2
8	1-Гидроксиэтилидендифосфоновой кислоты монокалийная соль		C ₂ H ₅ KO ₇ P ₂	0,6 ^{ж)}	с.-т.	2
9	1-Гидроксиэтилидендифосфоновой кислоты триаммонийная соль		C ₂ H ₁₇ N ₃ O ₇ P ₂	0,6 ^{ж)}	с.-т.	2
10	1-Гидроксиэтилидендифосфоновой кислоты тринатриевая соль		C ₂ H ₅ Na ₃ O ₇ P ₂	0,6 ^{ж)}	с.-т.	2
11	1-Гидроксиэтилидендифосфоновой кислоты цинковый комплекс		C ₂ H ₆ O ₇ P ₂ Zn	0,6 ^{ж)}	с.-т.	2
12	1-Гидроксиэтилидендифосфоновой кислоты цинкового комплекса динатриевая соль		C ₂ H ₅ Na ₂ O ₇ P ₂ Zn	0,6 ^{ж)}	с.-т.	2
13	Гуанидин гидрохлорид		CH ₆ CIN ₃	1,0	с.-т.	2
14	Дибромхлорметан	124-48-1	CHBr ₂ Cl	0,03	с.-т.	2
15	Дибутилфталат	84-74-2	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0,2	с.-т.	3
16	2,4-Динитротолуол	121-14-2	C ₇ H ₆ N ₂ O ₄	0,04 ^{к)}	с.-т.	1
17	2,6-Динитротолуол	606-20-2	C ₇ H ₆ N ₂ O ₄	0,08 ^{к)}	с.-т.	1
18	Диоктилфталат	117-84-0	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	1,6	с.-т.	3
19	Диметилдиаллиламмоний хлорид	7398-69-8	C ₈ H ₁₆ N	0,1	с.-т.	3
20	Диэтилфталат	84-66-2	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	3,0	с.-т.	3
21	1,3-Дихлорбензол	541-73-1	C ₆ H ₄ Cl ₂	0,02	орг. зап.	4
22	1,2-Дихлорэтан	1300-21-6	C ₂ H ₄ Cl ₂	0,003 ^{к)}	с.-т.	1
23	1,2-Дихлорэтилен	540-59-0	C ₂ H ₄ Cl ₂	0,05	с.-т.	2
24	Ди(2-этилгексил)фталат	117-81-7	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	0,008 ^{к)}	с.-т.	1
25	Медь	7440-50-8	Cu	1,0 ^{б)}	с.-т.	3
26	Молибден	7439-98-7	Mo	0,07 ^{б)}	с.-т.	3
27	Нитробензол	98-95-3	C ₆ H ₅ NO ₂	0,01 ^{к)}	с.-т.	1
28	Пентахлорбифенилы	25429-29-2	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	0,0005 ^{к)}	с.-т.	1
29	Пентахлорфенол	87-86-5	C ₆ HCl ₅ O	0,009 ^{к)}	с.-т.	1
30	Пентахлорфенолят натрия	131-52-2	C ₆ Cl ₅ ONa	0,009	с.-т.	1
31	Полиакриламиды (Mг = 1–20 млн)	25085-02-3 9003-05-8	-(C ₃ H ₅ NO) _x -(C ₃ H ₅ NO) _x - (C ₃ H ₃ O ₂ A) _y -(C ₃ H ₅ NO) _x - (C _a H _b N _c O _d A) _y	0,1	общ.	4
32	Полиакрилат натрия		(C ₃ H ₅ NaO ₂) _n	0,8	с.-т.	3
33	Полиамины (Mг = 10 тыс.—1 млн)	25988-97-0 68583-79-1 42751-79-1	(C _a H _b N _c O _d Cl _e) _n	0,05	общ.	3

1	2	3	4	5	6	7
34	Поли(винилпиридины)		$[C_9H_{12}NCH_4O_4S]_n$	0,03	общ.	2
35	Полидиаллилдиметиламмоний хлорид	26062-79-3	$(C_8H_{16}NCl)_n$	0,2	общ.	3
36	Сульфиды и сероводород (по H_2S)	7783-06-4	H_2S	0,05	орг. зап.	4
37	2,3,7,8-Тетрахлордибензо-п-диоксин	1746-01-6	$C_{12}H_4Cl_4O_2$	1 ^{к)} пг/л	с.-т.	1
38	2,3,4,6-Тетрахлорфенол	58-90-2	$C_6H_2Cl_4O$	0,001	орг. зап.	4
39	Тетрахлорэтилен	127-18-4	C_2Cl_4	0,005 ^{к)}	с.-т.	1
40	Толуол	108-88-3	$C_6H_5CH_3$	0,024	орг. зап.	4
41	2,4,6-Тринитротолуол	118-96-7	$C_7H_5N_3O_6$	0,01	с.-т.	2
42	Трихлорбифенилы	25323-68-6	$C_{12}H_7Cl_3$	0,0005 ^{к)}	с.-т.	1
43	Трихлорэтилен	79-01-6	C_2HCl_3	0,005 ^{к)}	с.-т.	1
44	Уран	7440-61-1	U	0,015	с.-т.	1
45	Хлористый циан (по цианид-иону)	506-77-4	CClN	0,07	с.-т.	2
46	Хлороформ	67-66-3	$CHCl_3$	0,06 ^{к)}	с.-т.	1
47	Хлорпикрин	76-06-2	CCl_3NO_2	0,007	с.-т.	1
48	Хром			0,05 ^{в)}	с.-т.	2
49	Цианиды			0,07 ^{е)}	с.-т.	2
50	Этилбензол	100-41-4	C_8H_{10}	0,002	орг. зап.	4

Примечания:

Названия индивидуальных веществ в алфавитном порядке приведены, где это было возможно, в соответствии с правилами Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC) и обеспечены регистрационными номерами информационно-поисковой системы химической реферативной службы (CAS) для облегчения идентификации веществ.

Величины ПДК приведены в мг вещества на 1 л воды (мг/л). Наряду с величинами ПДК указан класс опасности и лимитирующий показатель вредности, по которому установлены ПДК:

с.-т. – санитарно-токсикологический;

общ. – общесанитарный;

орг. – органолептический с расшифровкой характера изменения органолептических свойств воды (зап. – изменяет запах воды).

Вещества разделены на четыре класса опасности:

1 класс – чрезвычайно опасные;

2 класс – высокоопасные;

3 класс – умеренно опасные;

4 класс – малоопасные.

Сноски означают:

в) – для неограниченных соединений, в том числе переходных элементов, с учетом валового содержания всех форм;

е) – цианиды, простые и комплексные (за исключением цианоферратов) в расчете на цианид-ион;

ж) – в расчете на 1-гидроксиэтилендифосфовую кислоту;

к) – канцерогены.

**Указатель основных синонимов, технических, торговых и фирменных названий веществ
и их порядковые номера в таблице**

Синонимы, технические, торговые и фирменные названия веществ	Порядковый номер в таблице
1	2
ВПК-402	35
1-Гидрокси-2,3,4,6-тетрахлорбензол	38
1-Гидроксипентахлорбензол	27
ДАДМАХ	19
1-Гидроксиэтилендифосфонат калия	8
1-Гидроксиэтилендифосфонат триаммония	9
1-Гидроксиэтилендифосфонат тринатрия	10
Диаллилдиметиламмоний хлорид	19

1	2
Дибутилбензол-1,2-дикарбонат	13
2,4-Динитрометилбензол	15
2,6-Динитрометилбензол	16
Диоктилбензол-1,2-дикарбонат	17
Диэтилбензол-1,2-дикарбонат	19
Ди(2-этилгексил)бензол-1,2-дикарбонат	23
КФ-91	34
Метилбензол	40
2-Метил-1,3,5-тринитробензол	41
Оксиэтилидендифосфовая кислота	6
ПАА	31
Поли ДАДМАХ	35
Поли(5-винил-1,2-диметилпиридиний метилсульфат)	34
Полиэпихлоргидрин-диметиламины	35
Поликарбоновые кислоты	32
Поли ЭПИ-ДМА	35
Трихлорнитрометан	47
Трихлорметан	46
Флакаторн-200	34
Хлорэтилен	5
Цианоген хлорид	45

Порядковые номера веществ, предельно допустимые концентрации (ПДК) которых отменяются

Номер п/п в Дополнениях и изменениях № 1 к ГН 2.1.5.1315-03	Номер п/п веществ в ГН 2.1.5.1315-03, ПДК которых отменяются
1	125
2	136
5	1270
6	298
7	916
11	917
12	297
24	524
25	715
26	829
27	881
28	940

Номер п/п в Дополнениях и изменениях № 1 к ГН 2.1.5.1315-03	Номер п/п веществ в ГН 2.1.5.1315-03, ПДК которых отменяются
29	282
30	945
36	1075
40	730
41	785
42	1175
44	1195
45	1264
46	1177
48	1276
49	1282
50	1327

Главный государственный санитарный врач Российской Федерации Г. Г. Онищенко постановлением № 6 от 04.02.08 утвердил и ввел в действие с 01.05.08 гигиенические нормативы ГН 2.1.6.2326-08 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест. Дополнения и изменения № 4 к ГН 2.1.6.1338-03» и постановлением № 11 от 08.02.08 утвердил и ввел в действие с 01.06.08 гигиенические нормативы ГН 2.1.6.2328-08 «Дополнение № 1 к гигиеническим нормативам «Ориентировочные безопасные уровни воздействия (ОБУВ) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест. ГН 2.1.6.2309-07».

С введением в действие гигиенических нормативов ГН 2.1.6.2326-08 считать утратившим силу гигиенический норматив метантиола, установленный в ГН 2.1.6.1983-05 «Дополнение № 2 к ГН 2.1.6.1338-03», порядковый номер 7, и коэффициент комбинированного действия, не превышающий 1 (единицу) для азота диоксида, серы диоксида, установленный в ГН 2.1.6.1338-03.

УТВЕРЖДЕНЫ

постановлением главного
государственного санитарного
врача Российской Федерации
от 04 февраля 2008 г., № 6

**ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ (ПДК)
ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В АТМОСФЕРНОМ ВОЗДУХЕ НАСЕЛЕННЫХ МЕСТ
Дополнение № 4 к ГН 2.1.6.1338-03
Гигиенические нормативы
ГН 2.1.6.2326-08***

I. Пределно допустимые концентрации загрязняющих веществ в атмосферном воздухе

№ п/п	Вещество	№ CAS	Формула	Величина ПДК, мг/м ³		Лимитирующий показатель вредности	Класс опасности
				максимальная разовая	средне-суточная		
1	Летучие компоненты ароматизаторов, применяемых в производстве жевательной резинки			0,02	-	рефл.	4
2	1-Метокси-2-пропанол ацетат	108-65-6	C ₆ H ₁₂ O ₃	0,5	-	рефл.	4
3	2-Хлорпропен	557-98-2	C ₃ H ₃ Cl	0,1	0,03	рефл.-рез.	2

II. Вместо утвержденных ранее установить пределно допустимые концентрации

№ п/п	Вещество	№ CAS	Формула	Величина ПДК, мг/м ³		Лимитирующий показатель вредности	Класс опасности
				максимальная разовая	средне-суточная		
4	Метантиол	74-93-1	CH ₄ S	0,006* с вероятностью появления 2%	-	рефл.	4

III. Вместо утвержденного ранее установить коэффициент комбинированного действия

При совместном присутствии в атмосферном воздухе азот диоксид и сера диоксид обладают частичной суммацией действия, сумма их концентраций не должна превышать 1,6 при расчете по формуле

$$\frac{C_1}{\text{ПДК}_1} + \frac{C_2}{\text{ПДК}_2} + \dots + \frac{C_n}{\text{ПДК}_n} \leq 1,6,$$

где: C₁, C₂, ..., C_n – фактические концентрации веществ в атмосферном воздухе,
ПДК₁, ПДК₂, ..., ПДК_n – пределно допустимые концентрации тех же веществ в атмосферном воздухе.

Указатель основных синонимов, технических, торговых и фирменных названий веществ

Синонимы, технические, торговые и фирменные названия веществ	Порядковый номер в таблице
Изопропенилхлорид	3
Метилмеркаптан	4
β-Хлорпропилен	3

* – зарегистрированы в Министерстве юстиции Российской Федерации 29 февраля 2008 г., регистрационный номер 11260

УТВЕРЖДЕНЫ

постановлением главного
государственного санитарного
врача Российской Федерации
от 18 февраля 2008 г., № 11

**ОРИЕНТИРОВОЧНЫЕ БЕЗОПАСНЫЕ УРОВНИ ВОЗДЕЙСТВИЯ (ОБУВ)
ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В АТМОСФЕРНОМ ВОЗДУХЕ НАСЕЛЕННЫХ МЕСТ**

Дополнение № 1 к ГН 2.1.6.2309-07

Гигиенические нормативы

ГН 2.1.6.2328-08*

№ п/п	Вещество	№ CAS	Формула	Величина ОБУВ, мг/м ³
1	(3α,4α,8α,9β,11α,13α,14β,16β,17Z)-16-(Ацетилокси)-3-11-дигидрокси-29-нордаммара-17(20)-24-диен-21-овая кислота натриевая соль /фузидин натрия/	751-94-0	C ₃₁ P ₄₇ O ₆ Na	0,01
2	2-Гидроксибензальдегид /салициальдегид/	90-02-8	C ₇ H ₆ O ₂	0,01
3	Гуанидин гидрохлорид	50-01-1	CH ₅ N ₃ · HCl	0,03
4	Дезинфицирующее средство «Этоксамин» (по 2-диметилэтаноламину)	616-38-6	C ₃ H ₆ O ₃	0,25
5	Диметилкарбонат	19351-18-9	C ₃ H ₁₁ NS	0,1
6	2,2-Диметилазолидин	102-09-0	C ₁₃ H ₁₀ O ₃	0,01
7	Дифенилкарбонат	95-50-1	C ₆ H ₄ Cl ₂	0,01
8	1,2-Дихлорбензол		C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₃	0,01
9	Зола подсолнечной лузги		C ₇ H ₇ NO ₂	0,5
10	4-{N-[2-Имидазол-4-ил]этил}карбамоил}масляная кислота /витаглутам; ингамин; дикарбамин/		C ₈ H ₈ O ₃	0,01
11	1-Метил-4-нитробензол /п-нитротолуол/	99-99-0	C ₆ H ₁₄ O	0,035
12	Метилфенилкарбонат	13509-27-8	C ₁₃ H ₂₂ O	0,02
13	2-Метокси-2-метилбутан /метил-трет-амиловый эфир/	994-05-8		0,5
14	6,8-Нонадиен-2-он, 8 метил-5-(1-метилэтил)-, (E) /соланон/	5486-48-3		0,01
15	Пыль препарата «Кормофит» (смесь фитазы, пектинлиазы и α-галактозидазы по ≈ 33%)			0,04
16	Пыль таблеточной массы дигоксина (с содержанием дигоксина не более 0,3125%)			0,005
17	Таблеточная масса препарата сибазон (сибазона не более 10%)			0,002
18	2,6,6-Триметилбицикло[3.1.1]гепт-2-ен /2-пинен; α-пинен/	80-56-8	C ₁₀ H ₁₆	0,2
19	3,7,7-Триметилбицикло[4.1.0]гепт-3-ен /3-карен/	13466-78-9	C ₁₀ H ₁₆	0,2
20	2,6,6-Триметилциклогекс-1-ен-1,4-дион /4-оксоизофорон; 4-кетозофорон/	1125-21-9	C ₉ H ₁₂ O ₂	0,01
21	Фитобактериомицин			0,0001
22	Фитолавин-300 (с содержанием фитобактериомицина 8%)			0,001
23	7-Хлор-1,3-дигидро-1-метил-5-фенил-2Н-1,4-бензодиазепин-2-он /сибазон/	439-14-5	C ₁₆ H ₁₃ ClNO ₂	0,002
24	(1'S-транс)-7-Хлор-2,4,6-триметокси-6'метилспиро[бензофуран-2(3Н),-1'-[2]циклогексен]-3,4-дион /гризофульвин; гризин; фульвицин/	126-07-8	C ₁₇ H ₁₇ ClO ₆	0,004
25	Этиленкарбонат	94-49-1	C ₃ H ₄ O ₃	0,1

* – зарегистрированы в Министерстве юстиции Российской Федерации 11 марта 2008 г., регистрационный номер 11306

Указатель основных синонимов, технических, торговых и фирменных названий веществ

Синонимы, технические, торговые и фирменные названия веществ	Порядковый номер в таблице
Витаглутам	10
Гризофульвин	24
Гризин	24
Дикарбамин	7
Ингамин	7
3-Карен	19
4-Кетоизофорон	20
Метил-трет-амиловый эфир	13
п-Нитротолуол	11
4-Оксоизофорон	20
α -Пинен	18
2-Пинен	18
Салицилальдегид	2
Сибазон	23
Соланон	14
Фузидин натрий	1
Фульвицин	24

ИНФОРМАЦИЯ

ФГУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора извещает о том, что в мае-июне 2008 г. закончился срок действия государственной регистрации следующих веществ

№ п/п	Наименование вещества по IUPAC	№ CAS	Синонимы, торговые и фирменные названия	Номер гос-регистрации Номер РПОХБВ	Дата окончания срока госрегистрации
1	2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-Гексадекафторнонан-1-ол $C_9H_4F_{16}O$	376-18-1	1,1,9-Тригидроперфторнонанол; 1,1,9-тригидрогексадекафторнониловый спирт; гексадекафторнониловый спирт; спирт-теломер n_4	77.99.27.008.У. 010337.09.05 ВТ 002223	10.04.2008
2	2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7-Додекафторгептан-1-ол $C_7H_4F_{12}O$	335-99-9	α, α, ω -Тригидроперфторгептанол; 1,1,7-тригидрододекафторгептанол-1; 1,1,7-тригидрододекафторгептиловый спирт, додекафторгептиловый спирт; спирт-теломер n_3	77.99.27.008.У. 010336.09.05 ВТ 002718	24.04.2008
3	α -(1,1,3,3-Тетраметилбутил)фенил- ω -гидроксиполи(окси-1,2-этандиол) $C_{14}H_{22}O[C_2H_4O]_n$	9036-19-5	трет-Октилфеноксиполиэтоксиэтанол; моно((1,1,3,3-тетраметилбутил)фенил) эфир с полиэтиленгликолем; этоксилированный трет-октилфенол; Тритон X-102; Тритон X-100; входит в состав продукта Part 1 to Two Part Reagent Kit	77.99.26.8.У. 8077.8.06 ВТ 002719	24.04.2008
4	Диэтилкарбонат $C_5H_{10}O_3$	105-58-8	Диэтиловый эфир карбоновой кислоты; диатол; этоксиуравьиной кислоты ангидрид; ДЭК эуфин; диэтиловый эфир угольной кислоты; диэтиленкарбонат	77.99.26.8.У. 4953.5.05 ВТ 002728	26.04.2008

№ п/п	Наименование вещества по IUPAC	№ CAS	Синонимы, торговые и фирменные названия	Номер гос-регистрации Номер РПОХБВ	Дата окончания срока госрегистрации
5	Диэтилэтилфенилпропандионат $C_{15}H_{20}O_4$	76-67-5	Диэтил-2-этил-2-фенилмалонат, этилфенилдиэтилмалонат; диэтилэтилфенилмалонат; диэтиловый эфир фенилэтилмалоновой кислоты; фенилэтилдиэтилмалонат	77.99.26.8.У. 4954.5.05 ВТ 002729	27.04.2008
6	Кальций метасиликат CaO_3Si	1344-95-2	Кальций силикат; кальций гидросиликат; кальциевая соль метакремниевой кислоты; кальций моносиликат; кальций метасиликат; входит в состав продукта CYREZ 963 LF Resin Powder Concentrate	77.99.26.8.У. 9101.8.05 АТ-002721	26.04.2008
7	Поли(1,4-дигидроксibenзол) гидрат $[C_6H_5O_2]_m \cdot H_2O$		Поли(гидрохинон)гидрат; Эпотек	77.99.26.8.У. 6089.6.05 ВТ 002715	18.04.2008
8	[2-(Гидрокси-кО)-5-нитро-3-[[2-(оксо-кО)-1-(фениламино)карбонил]пропил]азо-кN'] бензолсульфонат(3-) хрома тригидрат $C_{16}H_{11}CrN_4O_8S \cdot 3H_2O$		Краситель органический спирторастворимый желтый 3	77.99.26.8.У. 4931.5.05 ВТ 002710	12.04.2008
9	[[3-Метил-5-(оксо-кО)-1-фенил-1Н-пиразол-4-ил]азо-кN']-2-(гидрокси-кО)-5-нитробензолсульфонат(3-) хрома гексагидрат $C_{16}H_{10}CrN_5O_7S \cdot 6H_2O$		Краситель органический спирторастворимый оранжевый 2Ж	77.99.26.8.У. 4932.5.05 ВТ 002711	12.04.2008
10	(4-Нитрофенил)фосфат динатрия $C_6H_4NNa_2O_6P$	4264-83-9	пара-Нитрофенилфосфат динатрия; пара-нитрофениловый эфир фосфорной кислоты динатриевая соль; моно(4-нитрофениловый эфир) фосфорной кислоты динатриевая соль; продукт K-Gold(PNPP sub.)/(ПНФФ субстрат)пара-нитрофенилфосфат натрия (водный раствор вещества)	77.99.27.8.У. 6575.6.05 ВТ 002732	01.06.2008
11	12-Гидроксиоктадекановая кислота $C_{18}H_{36}O_3$	106-14-9	12-Гидроксистеариновая кислота, 12-оксистеариновая кислота	77.99.26.8.У. 4967.5.05 ВТ 002731	05.05.2008
12	3,3',5,5'-Тетраметилбензидин $C_{16}H_{20}N_2$	54827-17-7	3,3',5,5'-Тетраметил-[1,1'-бифенил]-4,4'-диамин; продукт Enhanced K-Blue(TMB sub.)/(ТМБ субстрат) 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (водный раствор вещества)	77.99.26.8.У. 6574.6.05 ВТ 002733	01.06.2008
13	Октафторциклобутан C_4F_8	115-25-3	Циклооктафторбутан, перфторциклобутан; Хладон 318С(Ц); Хладон С318; Фреон С-318 (Freon С-318); Halocarbon С-318; Propellant С318; R-С 318	77.99.11.8.У. 8396.7.05 ВТ 002248	29.05.2008

Производство и применение перечисленных веществ возможно только после их перерегистрации.