

УДК 615.9 : 599.323.4

ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕТАБОЛИТОВ ВИНИЛХЛОРИДА НА БЕЛЫХ КРЫС

О.М. Журба, Е.А. Капустина

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт
медико-биологических исследований»
(ФГБНУ ВСИМЭИ), 665827, г. Ангарск,
Российская Федерация

В работе представлены экспериментальные данные о влиянии метаболитов винилхлорида на поведение белых крыс и результаты о количественном содержании в биологических средах животных, подвергшихся воздействию ксенобиотиков. Особи, разделенные на группы получали внутривенно инъекции хлорэтанола (ХЭ) в концентрации 20 мг/кг, монохлоруксусной кислоты (МХУК) в концентрации 10 мг/кг, животные контрольной группы - дистиллированную воду. Общая продолжительность воздействия ксенобиотиков составила 2 недели. Животных обследовали в тесте «Крестообразный лабиринт» и в тесте «Открытое поле». Для измерений концентраций метаболитов в биологических образцах использовали методы газовой хроматографии с электронно-захватным (ЭЗД) и масс-селективным детектированием (ГХ-МС). Выявлено, что воздействие хлорэтанола и монохлоруксусной кислоты, оказало влияние на поведение экспериментальных животных. Воздействие хлорэтанола способствовало развитию тревожности и повышенному уровню исследовательской активности у опытных животных. Интоксикация монохлоруксусной кислоты также способствовала более выраженному исследовательскому поведению наряду с возбужденным (ажитированным). У особей, экспонированных ХЭ, через час после прекращения последнего введения, выявлено присутствие данного соединения в крови. Однако уже через 2 часа после экспозиции концентрация ХЭ снизилась в 13 раз. В группе контрольных особей хлорэтанол в крови не обнаружен.

В двух экспериментальных группах, как и в контроле, наличие МХУК не обнаружено. Содержание тиодиуксусной кислоты значимо отличалось от контрольных значений.

Ключевые слова: экспериментальные исследования, винилхлорид, метаболиты винилхлорида, газовая хроматография, поведение белых крыс.

Введение. Винилхлорид (хлористый винил, хлорэтен) широко применяется в производстве суспензионного поливинилхлорида. Винилхлорид (ВХ) и 1,2-дихлорэтан (ДХЭ) являются основными хлорорганическими соединениями в воздухе рабочей зоны в производстве поливинилхлорида. Основной путь воздействия ВХ – ингаляционный. В организме винилхлорид быстро метаболизируется в печени с помощью цитохрома Р-450 с образованием промежуточных продуктов, например, хлорэтанола (ХЭ) [1]. Следует отметить, что практически весь поступивший в организм винилхлорид подвергается окислению. Монохлоруксусная кислота в организме теплокровных животных, отравленных 1,2-дихлорэтаном и винилхлоридом, образует-

ся из хлорэтанола. Это косвенно подтверждается и тем, что в моче мышей, отравленных хлорэтанолом, также обнаруживаются монохлоруксусная и тиодигликолевая кислоты [2].

Тиодиуксусная кислота (ТДУК) является основным метаболитом винилхлорида, обнаруживаемым в моче человека [3]. Cheng T.G. с соавторами, установили, что содержание данного метаболита наиболее информативно определять в начале следующей смены рабочей смены, установили что ТДУК может служить маркером для выявления факта воздействия ВХ [4].

Известно негативное влияние ВХ практически на все системы и органы человека и риск воздействия данного ксенобиотика суще-

Журба Ольга Михайловна (Zhurba Olga Mikhailovna), к.б.н., руководитель лабораторией аналитической экотоксикологии и биомониторинга ФГБНУ ВСИМЭИ, 665827, г. Ангарск, Российская Федерация, labchem99@gmail.com

Капустина Екатерина Александровна (Kapistina Ekaterina Aleksandrovna), к.м.н., научный сотрудник лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ ВСИМЭИ, 665827, г. Ангарск, Российская Федерация tox_lab@mail.ru

ствуется не только у работников химической промышленности, но и в быту [5]. Так, описан непрямой контакт с токсикантом через загрязненный воздух вблизи предприятий и мест расположения свалок отходов; употребления загрязненной воды, продуктов питания, медикаментов, упакованных в поливинилхлоридную пленку. Кроме этого, винилхлорид присутствует в табачном дыме, образуется в грунтовых водах как продукт микробной жизнедеятельности при метаболизме три- и перхлорэтилена [6]. Учитывая факт контакта работающих в производстве и населения с винилхлоридом, является актуальным изучение влияния метаболитов на организм контактирующих и выявление маркеров воздействия винилхлорида.

Цель данного исследования – изучение воздействия метаболитов винилхлорида на поведение белых крыс и их количественное определение содержания в биологических средах экспериментальных животных, подвергшихся воздействию ксенобиотиков.

Материалы и методы исследования. Экспериментальное моделирование интоксикации метаболитами винилхлорида проводили на 90 белых беспородных крысах-самцах половозрелого возраста, массой 200-220 г, содержащихся в условиях вивария ФГБНУ ВСИМЭИ. Предварительно по методу «открытое поле» оценивали ориентировочно-двигательную активность животных, исключая из опыта белых крыс с пассивным типом поведения [8]. Животных разделили на три группы: особи первой группы получали инъекции хлорэтанола (ХЭ) в концентрации 20 мг/кг, белым крысам второй группы вводили монохлоруксусную кислоту (МХУК) в концентрации 10 мг/кг, животные третьей группы получали дистиллированную воду и служили контролем. Инъекции осуществлялись внутривенно. Общая продолжительность воздействия ксенобиотиков составила 2 недели, исключая выходные дни.

Экспериментальных животных содержали в стандартных условиях вивария, с соблюдением принципов, изложенных в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (Страсбург, Франция, 1986). Питание, уход за животными и выведение из эксперимента осуществлялось в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (приказ МЗСР РФ № 708н от 23.08.2010 г.).

Обследование животных проводили после окончания воздействия токсикантами. Для характеристики функций ЦНС использовали тесты «Открытое поле» и «Крестообразный лабиринт» [9].

Определение содержания метаболитов в крови и моче проводилось по следующей схеме: у особей, подвергавшихся воздействию ХЭ, определяли содержание ХЭ в крови через 1 ч и 2 ч после окончания воздействия, а также содержание МХУК и ТДУК в моче, у животных с интоксикацией МХУК определяли содержание МХУК и ТДГК в моче, помещая крыс в метаболические кюветы для сбора биоматериала.

Определение метаболитов винилхлорида в биосредах проводили методами газовой хроматографии с электронно-захватным (ЭЗД) и масс-селективным детектированием (ГХ-МС) [10–12]. При определении 2-хлорэтанола в крови использовали жидкостно-жидкостную экстракцию, являющуюся одним из традиционных методов разделения и концентрирования.

Газохроматографическое определение МХУК и ТДУК, содержащих в своих молекулах карбоксильные группы с активными атомами водорода, требует получения их летучих производных, что усложняет подготовку пробы и газохроматографический анализ. Для выявления данных метаболитов в моче проводили этерификацию кислот метиловым спиртом, содержащий 10% трифторида бора, в диметилэфир ТДУК и метиловый эфир МХУК, затем экстрагировали эфиры методом жидкостной экстракцией этилацетатом и далее анализировали методами газовой хроматографии [10–12].

Используемое оборудование: Газовый хроматограф Agilent 7890А с вводом split/splitless в капиллярные колонки с электронно-захватным детектором (ЭЗД). Автосамплер жидкостный Agilent 7693, позволяющий регулировать глубину погружения микрошприца в виалу. Хромато-масс-спектрометр состоящий из газового хроматографа Agilent 7890 с капиллярной колонкой HP-5ms (30 м, 0.25 мм, 0.25 мкм) и одноквадрупольного масс-селективного детектора Agilent 5975 с электронно-ударной ионизацией. Реактивы и стандарты: 2-хлорэтанол (Fluka), монохлоруксусная кислота (Aldrich), тиодиуксусная кислота (98 % масс., Aldrich), диметилэфир ТДУК (синтезирован Иркутским институтом химии им. А. Е. Фаворского СО РАН Pat. US 7.642.371 B2, USA, 560/154), этилацетат (о.с.ч.), растворы трифторида бора (10% масс.) и серной кислоты (30% масс.) в метаноле.

Полученные материалы исследований обрабатывали с использованием U-критерия Манна-Уитни с применением пакета прикладных программ «STATISTICA 6.1» (StatSoft). Отли-

чия считали статистически значимыми при значении критерия $p < 0,05$. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона.

Результаты и обсуждение.

Характеристика поведенческой активности белых крыс. Анализ результатов исследования поведения белых крыс, подвергавшихся воздействию ХЭ и МХУК, в тесте «Крестообразный лабиринт» показал, что активность животных опытных групп имела отличия от контроля (табл. 1).

Так, особи с интоксикацией ХЭ начинали обследование лабиринта позднее, чем контрольные. Данный факт может свидетельствовать о более низкой скорости принятия решений в связи с повышенным уровнем тревожности опытных животных. Также выявлено, что крысы подвергавшиеся воздействию МХУК, осуществляли обход всех отсеков лабиринта статистически значимо быстрее, чем контрольные. В то же время количество диаметральных переходов у опытных животных было значимо выше, чем в контроле. Данные факты свидетельствуют о возбужденном состоянии животных.

При изучении результатов обследования животных в открытом поле статистически значимые отличия выявлены среди проявлений исследовательского поведения. Так, количество вертикальных стоек было значимо выше как в группе ХЭ – 2 (1-3), так и МХУК – 2 (1-5) при сравнении с контролем – 0 (0-2).

Таким образом, выявлено, что воздействие ХЭ и МХУК, являющихся продуктами трансформации винилхлорида, оказало воздей-

ствие на поведение экспериментальных животных. Воздействие ХЭ способствовало развитию тревожности и повышенному уровню исследовательской активности у опытных животных. Интоксикация МХУК также способствовала более выраженному исследовательскому поведению наряду с возбужденным (ажиотированным) состоянием.

Количественное определение метаболитов в биологических средах белых крыс. Содержание метаболитов и введенных веществ отображено в таблице 2.

У особей, экспонированных ХЭ, через час после прекращения последнего введения выявлено присутствие данного соединения в крови. Однако уже через 2 часа после экспозиции концентрация ХЭ снизилась в 13 раз. В группе контрольных особей хлорэтанол в крови не обнаружен.

В двух экспериментальных группах, как и в контроле, не обнаружено присутствие МХУК. Содержание ТДУК значимо отличалось от контрольных значений.

На рисунке 1 приведены наложенные масс-хроматограммы образца пробы мочи контрольного $C = 14$ мкг/см³ и опытного животного $C = 87$ мкг/см³. Разделение пиков удовлетворительное, этилацетат, метанол, примеси в органических растворителях, сопутствующие компоненты проб мочи не мешают определению.

В проведенных ранее исследованиях, показано, что воздействие винилхлорида способствует развитию изменений поведения белых крыс [13]. Так, у особей с интоксикацией винилхлоридом обнаруживается уси-

Таблица 1

Результаты обследования белых крыс в крестообразном лабиринте, Me (Q_{25} – Q_{75})

Показатели	Группы белых крыс		
	Хлорэтанол (ХЭ)	Монохлоруксусная кислота (МХУК)	Контроль, мкг/см ³
Начало посещения лабиринта, с	16 (7-33)*	12 (5-20)	8 (4-14)
Время полного обхода, с	184 (116-199)	144 (109-167)*	189 (155-204)
Общее кол-во переходов	6 (5-7)	8 (5-11)	5,5 (5-9)
Количество диаметральных переходов	1 (1-2)	2 (1-3)*	1 (0-2)

Примечание: * – отличия статистически значимы при сравнении с контролем, $p < 0,05$.

Таблица 2

Концентрации метаболитов в биосредах экспонированных животных, Me (Q_{25} - Q_{75})

Соединение ХЭ		Экспериментальная группа белых крыс		
		МХУК	Контроль	
ХЭ в крови, мкг/см ³	1 час	2,4 (1,6-4,45)	<0,01	Не обнаружено
	2 часа	0,18 (0-0,39)*	<0,01	Не обнаружено
МХУК в моче, мкг/см ³		Не обнаружено	<0,01	Не обнаружено
ТДУК в моче, мкг/см ³		149 (117-242)**	87 (48-147)**	14 (6,6-27)

Примечание: * - при сравнении концентраций через 1 и 2 часа в опытной группе при $p < 0,05$, ** - при сравнении с контролем $p < 0,05$.

ление двигательной, ориентировочно-исследовательской активности, развивается негативно-эмоциональное, тревожное состояние. Эксперимент с воздействием метаболитов винилхлорида показал усиление исследовательской активности и тревожности у особей, подвергавшихся воздействию исследуемых веществ, что свидетельствует о их роли в развитии изменений функционирования ЦНС экспонированных животных.

Заключение. При исследовании воздействия вещества на организм важным является исследование содержания его метаболитов в биологических средах. Установлено, что введенный ХЭ быстро метаболизируется и его определение в крови имеет ограниченный временной интервал. МХУК, являющаяся метаболитом ВХ, не была выявлена ни в опытных, ни в контрольной группе, что, по-видимому, связано с ее биотрансформацией в ТДУК. Концентрация ТДУК,

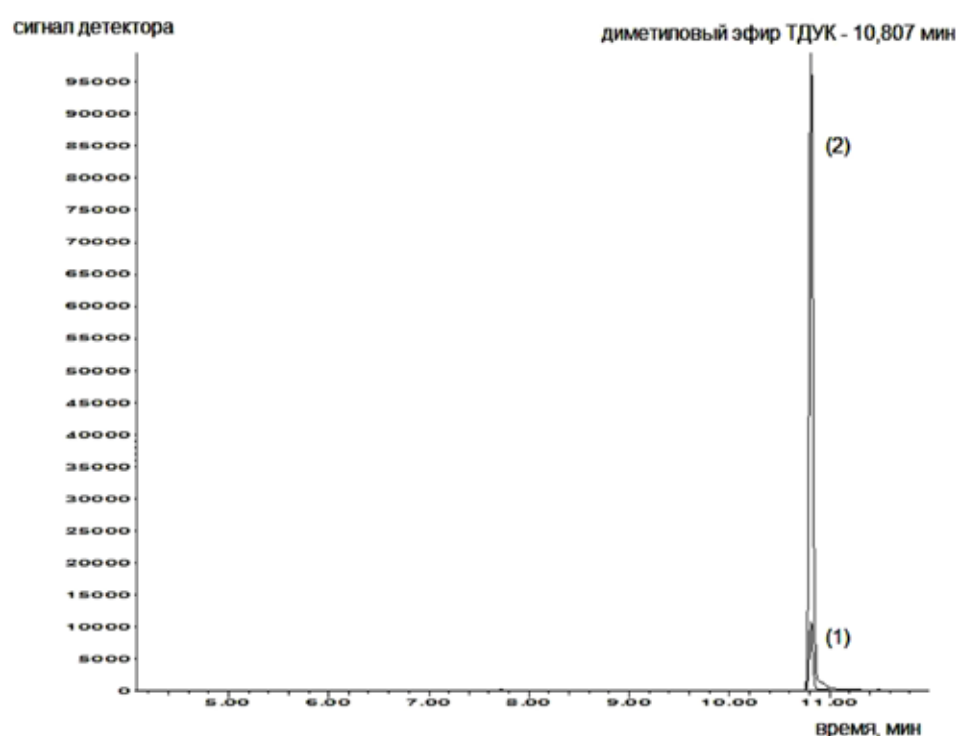


Рис. 1. Наложенные масс-хроматограммы проб мочи контрольного животного $C = 14$ мкг/см³ (1) и опытного животного $C = 87$ мкг/см³ (2). На осях координат - сигнал детектора; время.

имеющая в организме и фоновое значение, была значимо повышена у экспонированных животных даже через сутки после окончания воздействия. Таким образом, определение содержания ТДУК в биологических средах является наиболее аргументированным при изучении воздействия винилхлорида и его метаболитов, что согласуется с [14].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yong L., Feng N.N., Zhang G.H., Wang Q., Hao Y.H., Nanzhang Y. et al. Polymorphisms in the p53 pathway genes and micronucleus occurrence in chinese vinyl chloride-exposed workers. International journal of occupational medicine and environmental health. 2013; 26 (6): 825-836.
2. Кокаровцева М.Г., Киселёва Н.И. Хлорэтанол (этиленхлоридин) – один из токсичных метаболитов 1,2-дихлорэтана. Фармакология и токсикология. 1978; 1: 118-120.
3. The Environmental health criteria 215. Vinyl Chloride. Geneva: International programme on chemical safety; 1999.
4. Cheng T.J., Huang Y.E. Urinary thiodiglycolic acid levels for vinyl chloride monomer-exposed polyvinylchloride workers. Journal of occupational environmental medicine. 2001; 43 (11): 934-938.
5. Brandt-Rauf P. W., Li Y., Long C., Monaco R., Kowali G. et al. Plastics and carcinogenesis: The example of vinyl chloride. Journal of carcinogenesis. 2012; 11: 5.
6. Mutlu E., Collins L.B., Stout M.D., Upton P.B., Daye L.R., Darrell W. et al. Development and application of an LC-MS/MS method for the detection of the vinyl chloride-induced DNA adduct N2,3-ethenoguanine in tissues of adult and weanling rats following exposure to [13C2]-VC. Chemical research in toxicology. 2010; 23 (9): 1485-1491.
7. Qiu Y.L., Wang W., Wang T., Jing L., Pin S., Qian J., Jin L. et al. Genetic polymorphisms, messenger RNA expression of p53, p21, and CCND1, and possible links with chromosomal aberrations in Chinese vinyl chloride-exposed workers. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention. 2008; 17 (10): 2578-2584.
8. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высш. шк.; 1991.
9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Фисенко В.П. М.: 2005.
10. Алексеевко А.Н., Журба О.М., Меринов А.В., Королёва Г.Н. Определение монохлоруксусной кислоты в моче в виде её метилового эфира с использованием жидкостно-жидкостной микроэкстракции и капиллярной газожидкостной хроматографии. Аналитика и контроль. 2012; 16 (2). 174-180.
11. МУК 4.1.3057-13. Измерение массовой концентрации вредных веществ в биологических средах. Сборник методические указаний по методам контроля. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2013.
12. Журба О.М., Алексеевко А.Н., Шайхметов С.Ф. Хромато-масс-спектрометрическое определение тиодиуксусной кислоты в моче. Аналитика и контроль. 2013; 17 (4). 445-451.
13. Соседова Л.М., Якимова Н.Л., Титов Е.А., Капустина Е.А. Экспериментальное моделирование токсической энцефалопатии. Медицина труда и промышленная экология. 2008; 5: 17-20.
14. Cheng T.J., Huang Y., Ma Y.C. Urinary thiodiglycolic acid levels for vinyl chloride monomer-exposed polyvinylchloride workers. Journal of occupational environmental medicine. 2001; 43 (11): 934-938.

REFERENCES:

1. Yong L., Feng N.N., Zhang G.H., Wang Q., Hao Y.H., Nanzhang Y. et al. Polymorphisms in the p53 pathway genes and micronucleus occurrence in chinese vinyl chloride-exposed workers. International journal of occupational medicine and environmental health. 2013; 26 (6): 825-836.
2. Kokarotseva M.G., Kiseleva N.I. Chloroethanol (chloroethanol) – one of toxic metabolites of 1,2-dichloroethane. Farmakologiya i toksikologiya. 1978; 1: 118-120 (in Russian).
3. The Environmental health criteria 215. Vinyl Chloride. Geneva: International programme on chemical safety; 1999.
4. Cheng T.J., Huang Y.E. Urinary thiodiglycolic acid levels for vinyl chloride monomer-exposed polyvinylchloride workers. Journal of occupational environmental medicine. 2001; 43 (11): 934-938.
5. Brandt-Rauf P. W., Li Y., Long C., Monaco R., Kowali G. et al. Plastics and carcinogenesis: The example of vinyl chloride. Journal of carcinogenesis. 2012; 11: 5.
6. Mutlu E., Collins L.B., Stout M.D., Upton P.B., Daye L.R., Darrell W. et al. Development and application of an LC-MS/MS method for the detection of the vinyl chloride-induced DNA adduct N2,3-ethenoguanine in tissues of adult and weanling rats following exposure to [13C2]-VC. Chemical research in toxicology. 2010; 23 (9): 1485-1491.
7. Qiu Y.L., Wang W., Wang T., Jing L., Pin S., Qian J., et al. Genetic polymorphisms, messenger RNA expression of p53, p21, and CCND1, and possible links with chromosomal aberrations in Chinese vinyl chloride-exposed workers. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention. 2008; 17 (10): 2578-2584.
8. Buresh Ya., Bureshova O., Kh'yuston D.P. Methods and basic experiments on the study of the brain and behavior. M.: Vyssh. Shk.; 1991. (in Russian)
9. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Pod red. Fisenko V.P. M.: 2005 (in Russian).
10. Alekseeenko A.N., Zhurba O.M., Merinov A.V., Koroleva G.N. Determination of monochloroacetic acid in the urine in the form of its methyl ester using liquid-liquid microextraction and capillary gas-liquid chromatography. Analitika i kontrol'. 2012; 16 (2). 174-180 (in Russian).
11. МУК 4.1.3057-13. Measurement of the mass concentrations of harmful substances in biological fluids. Collection of methodological guidelines for control methods. Sbornik metodicheskije ukazaniy po metodam kontrolya. M.: Federal'nyy tsentr gigeny i epidemiologii Rospotrebnadzora; 2013 (in Russian).
12. Zhurba O.M., Alekseeenko A.N., Shayakhmetov S.F. Chromato-mass spectrometric determination thiodiacetic acid in the urine. Analitika i kontrol'. 2013; 17 (4). 445-451 (in Russian).
13. Sosedova L.M., Yakimova N.L., Titov E.A., Kapustina E.A. Experimental modeling of toxic encephalopathy. Occupational medicine and industrial ecology. Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya. 2008; 5: 17-20 (in Russian).
14. Cheng T.J., Huang Y., Ma Y.C. Urinary thiodiglycolic acid levels for vinyl chloride monomer-exposed polyvinylchloride workers. Journal of occupational environmental medicine. 2001; 43 (11): 934-938.

O.M. Zhurba, E.A. Kapustina

EXPOSURE TO VINYL CHLORIDE METABOLITES STUDIED IN WHITE RATS

East-Siberian Institute of Medical and Ecological Researches, 665827, Angarsk, Russian Federation

The paper presents experimental data on the effect of vinyl chloride metabolites on the white rats behavior and results of their quantitative content in biological fluids of animals exposed to xenobiotics. Animals divided into groups received intraperitoneal injections of chloroethanol (CE) in a concentration of 20 mg/kg, monochloroacetic acid (MCAA) in a concentration of 10 mg/kg, control animals received distilled water. A total duration of exposure to xenobiotics was 2 weeks. The animals were surveyed in the tests “maze” and “open field”. To measure the concentrations of metabolites in biological samples, were used gas chromatography techniques with electron capture (GS-ECD) and mass selective detection (GC-MS). It was found out that the exposure to chloroethanol and monochloroacetic acid affected the behavior of experimental animals. Exposure to chloroethanol contributed to the development of anxiety and increased level of exploratory activity in experimental animals. Intoxication with monochloroacetic acid also contributed to a more pronounced exploratory behavior along with excitement (agitation). In animals exposed to CE, the presence of this compound in blood was revealed an hour after termination of the last injection. However as early as 2 hours after exposure, the concentration of CE decreased 13-fold. In control animals chloroethanol in the blood was not found. In two experimental groups as well as in the control, the presence of MCAA was not detected. The content of thiodiacetic acid (TDAA) significantly differed from the control values.

Keywords: experimental studies, vinyl chloride, vinyl chloride metabolites, gas chromatography, behavior of white rats.

Материал поступил в редакцию 13.04.2016 г.